

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Zoologie



Mgr. Dagmar Říhová

Vliv morfometrických a mikrostrukturálních charakteristik na rozklad ulit plžů
v lesních ekosystémech

The Influence of Morphological and Microstructural Characteristics to Land Snail
Degradation in Forest Environment

Doktorská práce

školicelka: doc. RNDr. Lucie Juřičková, PhD.

Praha 2018



Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu, a že jsem uvedla všechny podstatné použité informační zdroje a literaturu. Práci jsem zpracovala samostatně ve spolupráci se spoluautory jednotlivých článků. Mé zapojení ve výzkumu je vyjádřeno pořadím autorů zahrnutých publikací a rukopisu.

V Praze dne 6. dubna 2018

Dagmar Říhová

Abstrakt

Rozklad schránek suchozemských plžů je komplexní proces, na kterém se podílí množství činitelů a vlivů, včetně vlastností schránek samotných. Důležitá je především velikost ulity, se kterou je svázán průběh i rychlost rozkladu.

Posmrtné změny začínají ztrátou původního zbarvení a u průhledných druhů zakalováním stěny schránky. Následně dochází k narušení periostraka a rozpouštění vápenatých vrstev. Tato posloupnost však v případě některých malých druhů (např. *Columella aspera*, *Nesovitrea hammonis*) může být obrácena. Živočichové mechanicky ničí prázdné schránky, huminové kyseliny ze substrátu způsobují jejich obarvování. Na povrchu schránek vyrůstají houbová mycelia či kolonie bakterií r. *Streptomyces*. Na rozkladu se rovněž podílí kořeny rostlin.

Zatímco velké schránky se rozkládají způsobem *periostrakum nejprve*, periostrakum malých ulit vytrvává i po rozpouštění ostraka. Jev je způsoben vysokou odolností periostraka malých druhů. V případě velkých schránek má periostrakum především stavební funkci při tvorbě schránky a již za života plže někdy oprýskává. Pro malé druhy představuje důležitou součást schránky, která zvyšuje její odolnost, což se rovněž projevuje odlišným průběhem rozkladu.

Velikost schránky ovlivňuje především rychlost rozkladu: malé schránky mizí velmi rychle, v závislosti na typu lokality i v řádu měsíců. Velké schránky naopak vytrvávají dlouho, po dobu několika let. Lokalita, na které k rozkladu dochází, je rovněž velmi důležitá. Místa značně kyselá a vlhká podporují rychlý rozklad, v lesích suchých a bazických se schránky uchovávají po několik let i v podobě relativně nezměněné. Různé lokality na schránkách zanechávají tzv. tafonomický podpis: unikátní směs výše zmíněných typů poškození.

Přestože je rozklad schránek komplexní záležitostí, mohou prázdné schránky poskytnout cenné informace a nesmí být přehlíženy.

Klíčová slova

Schránka, uhličitan vápenatý, periostrakum, tafonomický podpis, les, SEM

Abstract

The decomposition of land snail shell is a complex process involving a number of factors and influences, including the characteristics of conchs themselves. In particular, it is the shell size with which the progress and the rate of degradation are tightly bound.

Post-mortem changes begin with the loss of the original colour and, in the case of transparent species, by the opacification of the shell wall. Subsequently, the periostracum disruption and dissolution of calcium layers occur. However, this sequence may be reversed for some small species (e.g. *Columella aspera*, *Nesovitrea hammonis*). Animals mechanically destroy empty shells, humic acids from the substrate cause their artificial dyeing. Fungal mycelium or colonies of *Streptomyces* grow on the surface of the conchs. The plant roots are also involved in shell decomposition.

While degradation of large shells starts with periostracum disruption and subsequent ostracal dissolution, periostracum of small shells persists even after dissolution of ostracal layers. The phenomenon is caused by high resistance of the periostraca of small species. In the case of large shells, periostracum has primarily a “building” function during shell formation, and sometimes it is flaking off already during the snail’s life. For small species, it is an important part of the conch and increases its durability, which is also reflected in a different course of shell decomposition.

The shell size affects highly the rate of decomposition: small shells disappear very quickly, depending on the habitat type in order of months. On the contrary, large shells could persist for several years. The habitat influence is also very important. Acid and humid sites promote rapid decomposition; in dry and basic woods shells are kept relatively unchanged for several years. A unique and site-specific combination of the above-mentioned damage types, so called taphonomic signature, is created.

Although the decomposition of the shells is a complex process, empty shells can provide valuable information and must not be overlooked.

Key Words

Molluscan shell, calcium carbonate, periostracum, taphonomic signature, forest, SEM

Dotaz zaslany do rubriky Zeptejte se Přírodovědců (www.prirodovedci.cz) 28. března 2017

Dobrý den,

o víkendu jsem byla s vnukem na procházce v Prokopském údolí. Vnuk mě zaskočil několika otázkami, které jsem nebyla schopna plně zodpovědět a proto vás prosím o radu.

Na obrázku v příloze jsou uprostřed ulity hlemýžďe, páskovky a – droboučká světle hnědá ulitka uprostřed obrázku patří komu?

Dále by nás zajímalo, proč vždy po zimě nalézáme tolik prázdných ulit, když plži přezimují? To jich tolik uhynie? Nebo se nestačí včas zahrabat a umrznou? A proč jsou většinou ulity úplně bílé, ale některé si zachovají svoji barvu? K tomuto vzorku by nás zajímalo – posloužila ulita k přezimování nějakému pavoukovi nebo proč je tam ta drobná pavučinka? Občas lze najít osamocenou rozbitou ulitu. Nakloval ji snad nějaký pták nebo prostě praskla stářím/vlivem nepřízně podmínek?

Předem vám moc děkujeme za konzultaci!

Marie Jakoubková s vnukem



Úvod

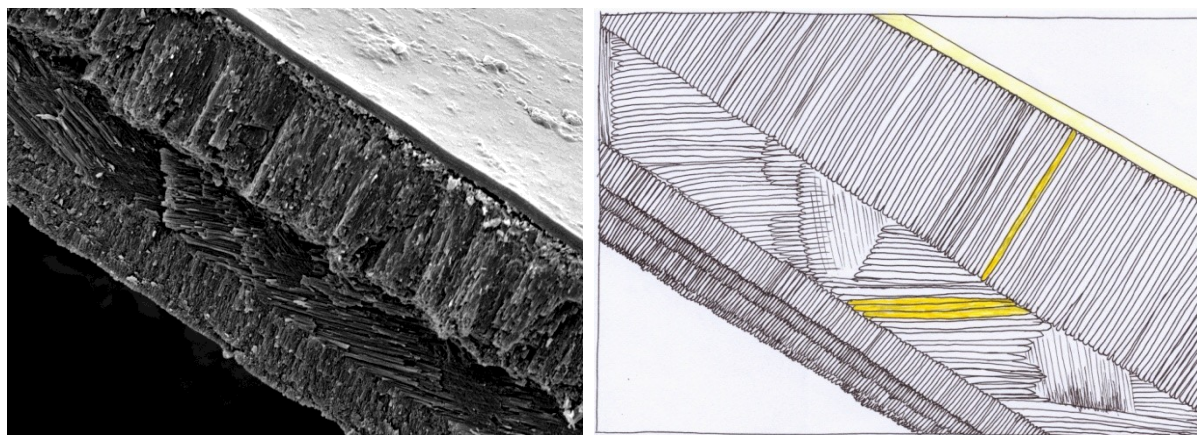
Co se stane s ulitou plže po smrti majitele? Nedělní dotaz paní Jakoubkové dokonale vystihuje jednu z komplexních a dosud ne zcela zodpovězených otázek malakozoologie. Ač víme mnohé o biologii i bionomii plžů, osudy prázdných schránek stále obestírá rouška tajemství.

Protože (sub)fossilní záznam dobře dokumentuje terciérní i kvartérní terestrické malakocenózy (např. Ložek 1964, Dvořák et al. 2010 či Juříčková et al. 2014) či vypovídá o charakteru archeologických nalezišť (Evans 1972, Davies 2008), je zřejmé, že schránky se uchovávají dlouhodobě. Zároveň je poměrně jisté, že do záznamu nevstupují všechny (paralelou může být např. práce Kidwellové a kolegů (2001)). A i přesto, že pro kvartérní malakologii i archeozoologický výzkum je tato znalost klíčová, jsou zmínky o posmrtném osudu ulit spíše anekdotické (Schilthuizen 2011).

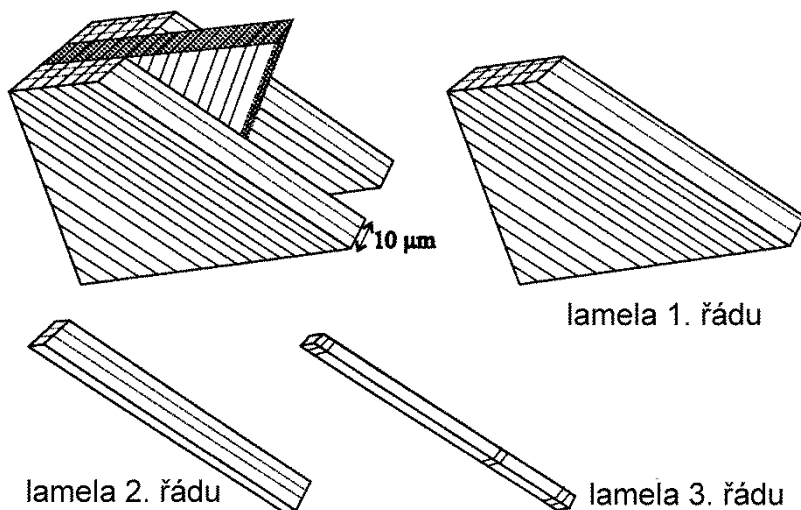
Ulity jsou tvořené z valné většiny (95–99,9 hm. %) anorganickou složkou, uhličitánem vápenatým. Zbytek – u různých měkkýšů 0,1–5 % hm. % – představuje „základní“ organická hmota (*organic matrix*) (Dauphin & Denis 2000). Největší podíl z tohoto malého procenta tvoří tzv. *periostrakum*, tenká organická vrstvička pokrývající schránku zvenku (Watabe 1988). Periostrakum se skládá z několika k sobě přiléhajících vrstev (Saleuddin 1971) a vyjma ochranné funkce je rovněž důležité při tvorbě nových částí schránky (Martin & Luquet 2004, Checa et al. 2005). Ke krystalizaci vápenatých vrstev schránky dochází pouze v uzavřeném prostoru mezi pláštěm a periostrakem.

Pod periostrakem se nachází vápenaté vrstvy, v této práci souhrnně označované jako *ostrakum* (z řeckého *ostrakon*, střep). Tradiční model stavby měkkýší schránky (např. Brusca & Brusca 2003; str. 719, obr. 20.14B), dělicí schránku na tři vrstvy – vnější organické periostrakum, střední kalcitové ostrakum a vnitřní aragonitové hypostrakum – platí pouze pro velké mlže.

Stěna schránky suchozemských plžů je tvořena složitým systémem tyčinkovitých aragonitových krystalů, obalených tenkými pochvami organické hmoty, tzv. příčně-lamelární vápenatou vrstvou (*crossed-lamellar structure*). Protože nejvnitřnější vrstva se nijak neliší od vrstev předchozích, je vhodné všechny označovat jediným souborným termínem. Vzájemné uspořádání „krystalů“ v jednotlivých vrstvách (tedy lamelách 1. řádu, viz obr. 1 a 2) této struktury je velmi důležité (v detailu rozebráno v pracích Dauphinové & Denise (2000) či Suzukiho a kolegů (2011)), protože dodává schránce nečekané mechanické vlastnosti (Hou et al. 2003). Stejně tak je pro soudržnost schránky důležitá tenká vrstvička organické hmoty, která obaluje a spojuje lamely 3. a 4. řádu (Dauphin & Denis 2000, Checa et al. 2005).



Obrázek 1: lom schránky skelnatky *Oxychilus glaber*. Vlevo SEM fotografie, vpravo schematický náčrt. Periostrakum – hladká vnější vrstva – chrání vápenaté vrstvy (parketovitě uspořádané struktury složené ze štíhlých hranolů s různou vzájemnou orientací). Ostrakum je v tomto případě tvořeno třemi vrstvami, lamelami 1. řádu. Žlutě vyznačeny lamely 2. řádu (viz následující obrázek).



Obrázek 2: Schematické znázornění stavby příčně-lamelární vrstvy. Jednotlivé „vrstvy“ se nazývají lamely 1. řádu a jsou složeny ze sloupků tenkých štíhlých krystalů, tzv. lamel 2. řádu. Štíhlé krystaly samotné pak představují lamely třetího řádu. Převzato z práce Dauphinové a Denise (2000); upraveno.

V literatuře je dokumentováno hromadění schránek (Emberton et al. 1996, Cameron et al. 2003, Schilthuizen et al. 2003) i jejich rychlý rozklad (de Winter & Gittenberger 1998, Müller et al. 2005, Ström et al. 2009). Někteří autoři (Millar & Waite 1999, Hotopp 2002, Sólomos et al. 2009) poukazují, že drobná velikost vede k rychlému rozkladu, naopak veliké robustní schránky se silnou stěnou vytrvávají v tanatocenóze (souboru schránek všech mrtvých jedinců všech druhů na lokalitě; viz Ložek 1973, str. 157) nečekaně dlouho. S prázdnými schránkami rovněž interagují živočichové, kteří přispívají k jejich poničení a následnému vymizení

z tanatocenózy (Graveland et al. 1994, Appleton & Heeg 1999, Cadée 1999, Mänd et al. 2000, Ožgo & Bogucki 2006, Cadée 2016). Osudům schránek jako takovým je však věnováno pouze několik prací.

Barrientosová (2000) zjišťovala v tropickém deštném lese Kostariky, co se stane s prázdnými schránkami drobného plže *Ovachlamys fulgens*. V průběhu rozkladu schránek, který trval celkem deset měsíců, pozorovala barevné změny (blednutí i černavé obarvení posledního závitu), ztrátu periostraka a olamování vrcholů, následované rozpadem schránek na kousky a postupným rozpuštěním.

Menez (2002) se zaměřil na vliv osvitů na stav schránek v mediteránním prostředí Gibraltaru. Schránky pozoroval v průběhu čtyř letních měsíců a zjistil, že v suchém klimatu poměrně rychle ztrácely čerstvý lesk i periostrakum samé a dokonce praskaly a olamovaly či rozlamovaly se. Velké schránky kulovitěho tvaru odolávaly korozi nejdéle, rychle se naopak rozkládaly schránky s relativně velkým povrchem. Tato studie působivě doložila vliv tvaru, plochy ústí a povrchu schránky na její trvanlivost.

Millarová & Waite (2004) katalogizovali poškození schránek ve výmladkovém lese v Sussexu (Velká Británie). Schránky byly často poškozeny předsmrtnou činností různých živočichů, a celkem bylo zdokumentováno šest základních typů poškození. Schránky měly vylámaný kotouč (stopa po predaci střevlíkovitými brouky nebo sekáči; viz Nyffeler & Symondson 2001), byly v nich vyhlodané drobné otvůrky a důlky anebo byl specificky poničen poslední závit (predace dravým plžem *Aegopinella nitidula*). Další schránky s uraženým vrcholem podlely predaci hlodavci (rovněž toto poškození je velmi specifické a díky tomu jednoduše rozeznatelné – viz Abramsky et al. 1990 a Abramsky et al. 1992), jiné byly rozbité či rozmáčkuté. Autoři si rovněž povšimli specifického poškození, způsobeného rozpouštěním ostrakálních (vápenatých) vrstev schránky za současného vytrvání periostraka (viz **obr. 3R**). Zatímco u ostatních typů poškození byl původce více či méně zjevný (nejčastějším byla predace), u posledního zmíněného zůstala příčina neznámá.

Toto nezvyklé poškození zaznamenal rovněž Pearce (2008) při výzkumu rozkladu schránek ve třech typech severoamerického lesa mírného podnebného pásu. Krom rozpouštění ostraka při vytrvání periostraka pozoroval rovněž ztrátu periostraka, tvorbu otvorů a fragmentaci. Zjistil, že různé druhy (ve studii jich bylo použito osm, s velikostí schránky pohybující se mezi 4–25 mm) se rozkládají různou rychlostí a že ztráta periostraka neurychluje snižování hmotnosti schránek. Ač sledoval rozklad schránek na třech místech, vliv lokality na rozklad nebyl prokázán. Průměrný poločas rozpadu schránek se tak ustavil na 7,5 roku. Protože však byly schránky na lokality umístěny v síťovaných opadových sáčcích (Pearce 2008, str. 112) a neměli k nim přístup živočichové, je pravděpodobné, že s jejich přispěním by rozklad probíhal rychleji. Na značné urychlení rozkladu schránek díky využití ulit coby zdroje vápníku v přehledové studii velmi pěkně ukazuje Cadée (2016).

Překvapivým zjištěním severoamerické studie bylo, že schránky se na různých lokalitách rozkládají srovnatelnou rychlostí. Z paleontologické literatury je naopak známo, že různé lokality ovlivňují zachování schránek mořských měkkýšů různě (např. Staff & Powell 1990, Perry & Smithers 2006). Komplexní vliv biotických i abiotických podmínek lokality na stav schránek vytváří tzv. tafonomický podpis konkrétního biotopu (*taphonomic signature*; Parsons-Hubbard 2005). I malé rozdíly v chemických podmínkách, způsobu ukládání a vlivu organismů se do něj promítají (Kidwell et al. 2001).

Jedinečným způsobem se podařilo doložit rozdílné zachování schránek na různých typech prameništ' Cernohorské et al. (2010). Původním zaměřením studie bylo (ve velmi hrubém přiblížení) zjistit, jakým způsobem ovlivňuje velikost snímkovací plochy zjištěnou druhovou bohatost. Protože však pouze 24 % všech nalezených jedinců představovali živí plži, provedli autoři analýzy druhové bohatosti jak pro dataset složený pouze ze živých jedinců, tak pro data doplněná o prázdné schránky. Z porovnání analýz vyplynulo, že na vápenitých prameništích

se schránky dlouhodobě zachovávají a zvyšují druhovou diverzitu zachycenou snímkováním malých plošek: výskyt 13 vzácných druhů studie podchytila jen díky nálezu prázdných schránek). Na minerálně chudých místech s nízkým pH se prázdné schránky rychle, pravděpodobně do jednoho roku, rozkládají a jejich zahrnutí do analýz druhové spektrum neovlivní. Ač prameniště představují přechodový typ biotopu, i na nich se zřetelně projevuje vliv prostředí na odlišné zachování ulit.

Cíle a struktura práce

Protože dostupné poznatky o rozkladu měkkýších schránek i faktorech, které ho ovlivňují, jsou minimální, rozhodla jsem se je doplnit a zjistit, co se může s prázdnou schránkou po smrti jejího obyvatele stát v prostředí střeoevropského lesa mírného podnebného pásu, a pozorované změny stejně jako průběh rozkladu popsat. Dalším cílem byla kvantifikace rychlosti rozkladu schránek. Závěrečnou částí se pak stalo hledání příčin posmrtných změn a hodnocení jejich vlivu, stejně jako vlivu vlastností schránek samotných na průběh rozkladu.

Součástí předložené disertace jsou tři publikované odborné články a jeden manuskript (v plném znění v **Příloze** tohoto textu):

Koukol O. a **Říhová D.** 2013: *Pentaster cepaeophilus* gen. et sp. nov. described from surface of empty shells of *Cepaea hortensis*. *Nova Hedwigia* **96(3–4)**: 495–500.
IF 0,914; počet citací k 2. dubnu 2018: 4

Říhová D., Janovský Z. a Koukol O. 2014: Fungal communities colonising empty *Cepaea hortensis* shells differ according to litter type. *Fungal Ecology* **8**: 66–71.
IF 3,219; počet citací k 2. dubnu 2018: 3

Říhová D., Janovský Z., Horsák M. a Juříčková L. 2018: Shell decomposition rates in relation to shell size and habitat conditions in contrasting types of Central European forests. *Journal of Molluscan Studies* **84**: 54–61.
IF 1,25; dosud necitován

Říhová D. a Juříčková L. (*submitted*): Degradation characteristics of empty land snail shells in Central European temperate forests. Zasláno do časopisu *Folia Malacologica*.

V přípravě jsou dva další rukopisy:

Říhová D., Holubová A. a Juříčková L. *The coat for every occasion: microstructural study of periostracal and ostracal variability in land snails*.

Říhová D., Janovský Z. a Juříčková L.: *Why do shells become opaque? The role of water in land snail shell degradation*.

SEM-fotografie lomů ulit byly využity v popularizačním článku (přiložen k **Příloze**):

Říhová D. a Juračka P.J. 2010: Příběhy z elektronového mikroskopu 3. Jakou mají měkkýši strukturu své schránky. *Živa* **3**: 121–122.

Jak zkoumat rozklad měkkých schránek?

Pilotní částí výzkumu rozkladu schránek se stal terénní experiment, který umožnil vytvořit „katalog“ posmrtných změn, ke kterým může na schránkách dojít, i analyzovat případný tafonomický podpis lokalit (*sensu* Parsons-Hubbard 2005). Coby modelové organismy posloužilo devět běžných druhů středoevropských plžů, jejichž schránky byly umístěny do šesti typů lesního prostředí a jejich stav byl pravidelně monitorován.

Modelové druhy plžů byly vybrány s ohledem na charakteristiky, které by mohly ovlivňovat způsob rozkladu tak, aby pokrývaly širokou škálu velikostí i tvarů ulit, neboť morfologie schránky ovlivňuje posmrtné zachování (Menez 2002). Je velmi pravděpodobné, že krom velikosti a tvaru mají schránky množství dalších vlastností, které determinují, co se s ní po smrti majitele stane. Tyto charakteristiky však nejsou na první pohled zjevné a proto bylo využito specifické klasifikace ekologických nároků středoevropských plžů (Lisický 1991, Juříčková et al. 2014). Suchozemské (a sladkovodní) plže lze rozdělit do deseti ekologických skupin dle jejich nároků na vlhkost, typ a míru zastínění lokality; případně dle nároků na světlo. Je to možné díky úzké a specifické vazbě na konkrétní typ biotopu. Ekologické charakteristiky se odráží nejen v anatomii, etologii či populační dynamice plžů, ale rovněž ve vlastnostech jejich schránky. Jedná se však o charakteristiky na první pohled nezjevné. Jednou z nich je ultrastruktura schránky, rozebraná níže; další na své odhalení teprve čekají. Jak naznačují práce Pfeningera et al. (2005) či Giokase et al. (2005), možným kandidátem jsou povrchové skulptury a struktury.

Tabulka 1 sumarizuje užité modelové druhy. Ekologické skupiny i nároky jsou uvedeny, aby i čtenářům neobeznámeným s běžnou malakozoologicko-ekologickou klasifikací byla na první pohled patrná diverzita užitých druhů.

Tabulka 1. Devět modelových druhů suchozemských plicnatých plžů, které byly použity pro výzkum rozkladu schránek. Jména a systematické zařazení byla převzata z práce Horsáka et al. (2013); velikost, tvar a povrch z práce Kerneyho et al. (1983). Ekologické skupiny jsou uváděny dle Lisického (1991) a Juříčkové et al. (2014).

Druh plže	Čeď	Velikost	Tvar a povrch	Ekologické nároky	Ekoskupina
<i>A. arbustorum</i>	Helicidae	velký	kulovitý, hladký	lesní, vlhkomilná	SI(AG)
<i>X. obvia</i>	Hygromiidae	velký	zploštělý, rýhovaný	xerofilní, otev. krajina	ST
<i>A. biplicata</i>	Clausiliidae	velký	vřetenitý, žebirkatý	lesní	SI(AG)
<i>I. isognomostomos</i>	Helicidae	velký	kulovitý, chlupatý	lesní, dřevomilná	SI
<i>C. lubrica</i>	Cochlicopidae	malý	vřetenitý, hladký	ubikvistní	AG
<i>N. hammonis</i>	Zonitidae	malý	zploštělý, hladký	pionýrský	AG
<i>V. pulchella</i>	Valloniidae	malý	zploštělý, j. rýhovaný	otevřená krajina	PT
<i>C. aspera</i>	Vertiginidae	malý	válcovitý, rýžkovaný	lesní, acidotolerantní	Ap
<i>C. minimum</i>	Carychiidae	malý	vřetenitý, rýžkovaný	vlhkomilná	RP

Modelové druhy jsou v tabulce seřazeny sestupně dle průměrné velikosti schránky. První čtyři druhy patří mezi velké zástupce české fauny, následujících pět druhů je klasifikováno coby malé. *Nesovitrea hammonis* a *Cochlicopa lubrica* se z této pětice mírně vyčleňují díky průměrné velikosti okolo 5 mm; zbylé tři druhy dorůstají nejvýše 3 mm (konkrétní přehledy velikostí jsou uvedeny v **Tabulce 7**). Morfologická odpověď schránek na rozkladné vlivy je velmi podobná zbývajícím třem drobným malým druhům, takže pro některé analýzy byly tyto druhy brány společně jako skupina malých druhů; v jiných analýzách (rychlost mizení; viz Říhová et al. 2018) byly přiřazeny k velkým modelovým druhům.

Prázdňé, čerstvé dospělé schránky modelových druhů, bez narušeného periostraka i dalších viditelných typů poškození byly umístěny do šestice lesních prostředí, reprezentujících běžné středoevropské lesní habitaty. **Tabulka 2** uvádí sledované biotopy a udává jejich nadmořskou výšku, pH hrabanky a průměrné roční srážky.

Tabulka 2. Šestice modelových lokalit reprezentujících typické středoevropské lesní ekosystémy. Hrabankové pH a obsah vápníku (Ca (mg)/kg substrátu) byly měřeny v Geochemické laboratoři Akademie věd ČR; Český hydrometeorologický ústav poskytl data o průměrném ročním srážkovém úhrnu (Φ). NV – nadmořská výška, udávána v m n.m.

Typ lesa	Lokalizace (GPS)	NV	pH hrab.	Ca (mg)	Φ (mm)
Olšina	50° 02' 39" N, 14° 02' 00" E	430	4.30	73.58	497
Bučina	49° 55' 15" N, 13° 50' 58" E	430	4.92	-	476
Kulturní smrčina	50° 01' 02" N, 14° 41' 59" E	400	5.39	82.41	570
Dubohabřina	49° 57' 25" N, 14° 09' 06" E	420	7.22	209.80	514
Rašelinný bor	49° 39' 28" N, 15° 53' 12" E	600	3.52	27.39	877
Sut'ový les	49° 55' 15" N, 13° 50' 59" E	450	5.61	50.92	476

Aby bylo umožněno zpětné nalezení použitých schránek, byly tyto uzavřeny do proděravělých plastových krabic o velikosti 16,5×16,5×8 cm. Otvory s průměrnou hustotou 1 ot./cm² a průměrem 4 mm byly vytvořeny elektrickou vrtačkou nebo pájkou. Protože drobné modelové druhy by bylo obtížné dohledat i v relativně malém prostoru krabičky, byly jejich schránky uzavřeny do nylonových pytlíčků s velikostí ok přibližně 320 μ m. Jak krabičky samotné, tak nylonové sáčky byly před umístěním schránek naplněny místní hrabankou a opadankou a schránky do nich rozmístěny tak, aby se navzájem nedotýkaly a případná vzniklá nahromadění uhlíčitanu vápenatého neovlivňovala přirozený průběh rozkladných procesů (Cameron & Pokryszko 2005, Sólomos et al. 2009).

Na každou lokalitu byly umístěny čtyři krabičky, obsahující vždy všech devět modelových druhů v počtu pěti schránek na každý druh. Celkem bylo pro každý druh použito 120 ulit; dohromady 1080 schránek.

Krabičky byly zakopány tak, aby žádná jejich část nevyčnívala nad povrch a nepřitahovala pozornost případných kolemjdoucích či zvířecích obyvatel lesa: byly umístěny do hloubky zhruba 15 cm, se dny rovnoběžně s půdním horizontem A (souhlasně s umístěním opadových sáčků v obdobné rozkladně-ulitové studii Pearce (2008)). Víka byla pokryta nejméně 5cm vrstvou hrabanky a opadanky a lokality byly po zakopání uvedeny do stavu co nejvíce odpovídajícího původnímu.

Schránky byly ponechány působení lesního prostředí po dobu šesti, 12, 24 a 36 měsíců. Vždy po uplynulé době byla jedna z krabiček vyjmuta a odvezena k následnému zpracování.

Její obsah byl rozprostřen do přepravky vystlané filtračním papírem a usušen stejným způsobem, jaký je používán při zpracovávání hrabankových vzorků (Ložek 1956, Kerney et al. 1983). Obsah nylonových sáčků byl sušen zvlášť na Petriho miskách o průměru 16 cm vystlaných filtračním papírem. Po dokonalém proschnutí hrabanky (vlhké schránky jsou nesmírně křehké a náchylné k fragmentaci) byly všechny schránky ručně vybrány měkkou entomologickou pinzetou a vyfotografovány. Kulovité druhy byly fotografovány z apikální a umbilikální strany, podlouhlé druhy zepředu a zezadu. Velké druhy byly fotografovány fotoaparátem Olympus C-5060 Wide Zoom, malé druhy kamerou Olympus U-eye UI-1440-C připojenou k binokulární lupě Olympus SZX 9.

Stav ulit byl následně hodnocen z pořízených fotografií. Zaznamenáno bylo sedm základních typů poškození. Poškození postihující schránku tak, že bylo možné exaktně měřit plochu jimi zasaženou (dolíky, otvory a okénka; viz níže), byla ručně změřena v programu Image Tool 3.00; u ostatních byla zaznamenána jejich přítomnost. K zaznamenání přítomnosti stačilo, aby se poškození vyskytovalo na jedné straně konkrétní ulity.

I přestože byly proděravělé krabičky umístěny co nejskrytěji, přitáhly na některých lokalitách (dubohabřina a kulturní smrkový les; okrajově rovněž rašelinný bor a bučina) pozornost divokých prasat, která je vyryla a rozbila. Je typickým chováním divokých prasat zkoumat nové předměty v domovském okrsku (Meynhardt 1983) a protože tato zvířata mají silný stisk čelistí, krabičky nepřečkaly zkoumání neporušené. Po konzultaci s odborníky (dr. V. Vohralík, PřF UK) bylo přistoupeno k ošetření lokalit posypem nastříhanými lidskými vlasy. Takto upravené vlasy odpuzují divoká prasata lidským pachem i bodavým hmatovým

vjemem do rypáku. Aby byly dodrženy stejné podmínky pro všechny zkoumané lokality, byla posypem vlasy ošetřena všechna zkoumaná místa. Ošetření bylo obnovováno dvakrát ročně, na jaře a na podzim. Přesto na výrazně exponovaných lokalitách (dubohabřina; kulturní smrkový les) došlo ke ztrátám čtvrté krabičky.

Pro analýzu dat získaných z pilotního pokusu byly použity statistické programy Canoco for Windows 4.56 a R 3.2.5. Pro testování tafonomického podpisu lokalit (**obr. 4**), druhové specifity rozkladu (**obr. 9**) i vlivu času (**obr. 14**) byla využita redundanční analýza (RDA; *redundancy analysis*). Vysvětlující proměnnou byl nejprve typ biotopu, a druh plže a čas uplynulý od začátku experimentu se staly kovariátami. Druhé dvě analýzy použily coby vysvětlující proměnnou druh plže a čas uplynulý od začátku experimentu; zbylé dvě proměnné vždy posloužily coby kovariáty. Signifikance všech kanonických os byla testována Monte Carlo permutačním testem (4999 permutací pro každý test).

Pro testování efektu biotopu na typ poškození byl použit neparametrický Spearmanův korelační koeficient. Získané p-hodnoty ($H_0: \rho \neq 0$; viz **Tabulka 5**) byly korigovány sekvenční Bonferroniho korekcí.

Poté, co byla provedena analýza stavu schránek z pilotního experimentu a výsledky porovnány s dostupnou schránkově-korozní literaturou, bylo přikročeno ke zkoumání vlivu vybraných faktorů na stav schránek. Prvním ze zkoumaných faktorů byl **vliv vlhkosti**, který je předmětem připravovaného článku (Říhová, Janovský a Juříčková, *in prep.*), jehož dosud nepublikované výsledky jsou poprvé zveřejněny v této tezi.

Vliv vlhkosti na stav schránek

Prvním ze zkoumaných faktorů byla vlhkost. Coby modelové druhy byly použity drobné druhy plžů s průsvitnou schránkou. Ke třem druhům z pilotního experimentu (*C. minimum*, *N. hammonis* a *C. lubrica*) byla přidána jantarka *Succinea putris*. Tento vlhkomilný plž dorůstá větších rozměrů (výše až 22 mm (Horsák et al. 2013)), přesto je jeho schránka za čerstva téměř průhledná téměř stejně dokonale jako schránky menších modelových druhů. Jantarka obecná je hodnocena jako vlhkomilný ekoelement (Juříčková et al. 2014).

Protože některé lokality z pilotního experimentu (olšina, rašelinný bor) jsou periodicky zaplavovány a jiné naopak syceny pouze dešťovými srážkami (bučina, suťový les a dubohabřina) a v teplé části roku značně vysychají, byl v tomto experimentu hodnocen vliv vlhkosti na dvou úrovních. Schránky byly vystaveny buď relativně mírné vlhkosti položením na navlhčenou nasákovou papírovou podložku, či byly do vody zcela ponořeny. Použity byly čerstvě nasbírané schránky s kompletním periostrakem a beze stop po zakalování stěny schránky.

Schránky vystavené vlivu mírné vlhkosti byly položeny na navlhčený papírový ubrousek do čtvercové plastové Petriho misky o velikosti 12×12 cm. Ubrousek byl navlhčen kohoutkovou vodou kapátkem tak, aby byl zcela nasycen vodou a následně na něj byly položeny pozorované schránky umbilikální stranou dospodu („vlhčené“ schránky). Schránky vystavené přímému kontaktu s vodou („máčené“) byly uzavřeny v plastové falkoně o objemu 15 ml zcela naplněné kohoutkovou vodou. Coby kontrola posloužily ulity umístěné do identických Petriho misek na stejné papírové utěrky, avšak bez navlhčení.

Celkem bylo připraveno deset navlhčených a deset suchých Petriho misek, a deset falkon naplněných vodou. Vlhčené Petriho misky byly očíslovány od jedné do deseti a srovnány sestupně do komínku, stejně jako suché Petriho misky. Očíslované falkony byly postaveny do skleněné kádinky tak, aby zaujímaly stálou polohou víčkem nahoru. Vlhčené i máčené ulity a suchá kontrola byly společně uzavřeny do průhledného plastového klip-boxu; kontrola byla navíc postavena do menšího průsvitného boxu se silikagelem na dně.

Pozorování trvalo 30 dnů. V každé misce a falkoně bylo uloženo deset schránek *N. hammonis*, osm schránek *C. lubrica*, 12 schránek *C. minimum* a 13 schránek *S. putris*. Celkem bylo použito 1290 schránek.

Protože z pilotního experimentu vyplynulo, že zakalování schránek může probíhat velmi rychle, byl stav schránek kontrolován jednou za tři dny (3×24 hodin). Vždy byla odebrána jedna miska s vlhčenými schránkami, jedna suchá miska a jedna falkona. Schránky byly vyjmuty měkkou entomologickou pinzetou a uloženy na filtrační papír do skleněných Petriho misek o průměru 6 cm, kde byly ponechány schnout 24 hodin při pokojové teplotě. Následně byly vyfotografovány stejným způsobem jako schránky v pilotním experimentu.

Stejně jako v pilotním experimentu, hodnoceny byly fotografie. Protože docházelo pouze k některým typům poškození, pozorovaným v předchozí fázi (zakalování stěny schránky, vznik laločnatých skvrn; u schránek ponořených ve vodě olupování periostraka), které nebylo narušováno zabarvením ani rozpouštěním ostraka, bylo možné v programu Image Tool 3.00 měřit i plochu částečného zakalení. Dva typy poškození (bodové zakalení a přítomnost bílých laločnatých skvrn) byly hodnoceny pouze kvalitativně na dvoubodové škále.

Získaná data byla analyzována ve statistickém programu R 2.10.1. Rychlost zakalování stěny schránky (viz **obr. 12**) byla analyzována metodou GLM (*generalised linear models*).

Houby a houbám podobné organismy porůstající povrch schránek

Protože se schránky pilotního experimentu umístěné v lesních ekosystémech už od první kontroly po šesti měsících staly substrátem pro růst hub a houbám podobných organismů, zajímalo nás, jaké organismy mohou povrchy ulit kolonizovat. Při třetí kontrole pilotního experimentu (24 měsíců) byly z povrchu ulit plamatky *A. arbustorum* z dubohabřiny, olšiny a rašelinného boru semisterilně odebrány části mycelia a získaný materiál použit pro přímou PCR amplifikaci (viz Říhová et al. 2014) a mikroskopické pozorování.

Pro bližší poznání houbových společenstev byl následně založen kultivační experiment. Coby návnada posloužily UV-světlem sterilizované schránky páskovky *Cepaea hortensis* (O.F.Müller, 1774). Druh má velkou kulovitou schránku a tedy i značnou plochu, kterou mohou houby kolonizovat. Díky velikosti se s ulitami dobře manipuluje a navíc se jedná o živočicha běžně se vyskytujícího v početných koloniích, což umožňuje získat dostatečné množství schránek pocházejících z jediné lokality (v tomto případě Botanická zahrada UK v Praze, Na Slupi 16, Praha 2).

Pro kultivační experiment byla použita modifikovaná *hair-bait* metoda, které se běžně využívá pro kultivaci půdních keratinofágních hub (Orr 1969) – místo vlasů byly houbám předloženy ulity. Coby spory poskytující substrát posloužila na sítu s oky o velikosti 1 cm prosetá hrabanka ze čtyř typů lesa (dubohabřina, olšina, rašelinný bor a suťový les; viz **Tabulka 2**), která byla umístěna do skleněných Petriho misek o průměru 16 cm. Do každé misky bylo odváženo 70 g směsi hrabanky a svrchní vrstvy půdy. Na substrát byly vrcholovou stranou dolů lehce položeny schránky páskovek a vnitřek misky byl navlhčen ostřikovačem. Pro každou lokalitu bylo založeno osm misek s pěti schránkami; celkem bylo použito 40 schránek na lokalitu a 160 schránek celkem. Schránky byly následně kultivovány v neosvětleném klimaboxu při teplotě 15 °C. Misky byly pravidelně kontrolovány a v případě vyschnutí substrátu pokropeny vodou. Každé tři měsíce navíc proběhla kontrola výskytu hub. Schránky byly sledovány opakovaně po dobu jednoho roku (tedy 4×).

Houby a houbám podobné organismy byly určovány přímým mikroskopickým pozorováním dle morfologických charakteristik anebo molekulárně-biologicky po převedení do čisté laboratorní kultury (bližší viz Říhová et al. 2014).

Po skončení experimentu byl navíc zhodnocen stav schránek z jednotlivých misek (stejnou metodikou jako v případě pilotního experimentu, schránky však byly fotografovány pouze

z apikální strany, neboť umbilikální strana nebyla v kontaktu se substrátem) a byl analyzován vliv hrabanky oproštěný od sezónních klimatických a lokálních srážkových rozdílů.

Analýza houbových společenstev i stavu schránek byla provedena ve statistickém programu Canoco for Windows 4.56. Pro analýzu stavu schránek v závislosti na biotopu byla stejně jako v pilotním pokusu použita analýza redundance (RDA) a signifikance všech kanonických os byla testována Monte Carlo permutačním testem (4999 permutací pro každý test).

Vlastnosti schránky ovlivňující způsob rozkladu

Poslední část studie vznikla díky výsledku pilotního pokusu, poukazujícímu na fakt, že způsob rozkladu schránek neovlivňují pouze vnější podmínky – vliv mají i vlastnosti schránky samé.

Tvar schránky ovlivňuje způsob a rychlost rozkladu. Schránky se štíhlými vrcholy mají vyšší pravděpodobnost, že vrchol bude ulomen (Barrientos 2000, Menez 2002), nejen díky vyčnívání vrcholu z obrysu schránky, ale také díky užší stěně ve starších částech schránky. Kombinace „čňející a křehká“ dělá z vrcholu ideální místo odlomení, odhalení vápenatých vrstev a bránu pro start rozpouštění schránky. Obdobné platí pro obústí vyčnívající z celkového obrysu schránky.

Další „zjevnou“ vlastností je velikost schránky (viz též Hotopp 2002). Velké druhy se však rozkládají pomaleji nejen díky větší mase hmoty: i průběh rozkladu je odlišný (Říhová et al. 2018; Říhová a Juříčková, *submitted*).

Jedním z překvapivých způsobů rozkladu schránek byl vznik okének (**obr. 3R**). Vznikají tak nejen plošně drobná poškození: byly zaznamenány případy, při kterých došlo ke kompletnímu rozpuštění vápenatých částí schránky a vytrvalo pouze periostrakum (**obr. 3L, M a N**). Tento typ poškození byl jen zřídka pozorován u velkých druhů. Okénka byla popsána již Millarovou a Waitem (2004); o obdobném poškození se zmiňuje rovněž Pearce (2008). Ten navíc udává, že by mohlo jít o pozůstatky rozpouštění ostraka zevnitř; Millarová a Waite o původu vzniku poškození neuvažují vůbec.

Díky rešerši sepsané Říhovou (2007), která byla věnována mikrostrukturálním charakteristikám schránek měkkýšů, bylo vzato v úvahu, že v případě rozkladu by mohly mít ústřední vliv právě tyto „nezjevné“ charakteristiky.

Periostraku je obvykle připisována role především ochranná, důležitou je však i jeho schránkotvorná činnost (Checa et al. 2005, Allgaier 2011) Je známo, že kolísání vzdušné vlhkosti způsobuje na sbírkových exemplářích praskání a odlupování periostraka (Morton 2006); u dlouhověkých druhů suchozemských plžů ostatně k oprýskávání periostraka dochází již za života. U jiných (drobných, krátkověkých) druhů naopak periostrakum vytrvává a vznikají okénka (Říhová et al. 2018).

Odpověď na otázku, proč se u různých druhů plžů periostrakum chová odlišně, může být ukryta v jeho chemickém (Saleuddin 1971) či mikrostrukturním složení. Závěrečná část disertační práce proto byla zaměřena na mikrostrukturní stavbu periostraka a přiléhajících ostrakálních vrstev, neboť jsou to i ony, které se svým rozpouštěním podílí na vzniku okének.

Mikrostruktury schránek byly zkoumány za pomoci skenové elektronové mikroskopie (SEM) na lomech ulitami. Stejně jako v případě dílčí studie vlivu vlhkosti na stav schránek, ani v tomto případě výsledky dosud nebyly publikovány, protože část vybraných druhů dosud nebyla zpracována.

Pro účely této práce je *lom* příčné mechanické narušení schránky, umožňující náhled do mikrostruktury stěny schránky. Po konzultaci s prof. J. Frýdou (ČGS) byla použita metoda ručního lámání za sucha (viz rovněž Allgaier 2007 a Allgaier 2011), protože je rychlá, levná (není k ní zapotřebí speciálních pomůcek ani chemikálií) a poskytuje dostatečně kvalitní výsledky. V některých studiích je namísto lámání použita metoda výbrusů. Povrch lomů je

v tomto případě mechanicky a chemicky dokonale zarovnan a vyleštěn, takže není patrná jeho trojrozměrná struktura ani jednotlivé lamely různých řádů. Výbrus umožňuje přesnější změření šíře lamel prvního řádu (viz **obr. 1** a **2**), lom umožňuje nahlédnout do mikroarchitektury celé struktury.

Čerstvé dospělé schránky byly upraveny tak, aby byly k měření využity pouze úlomky schránky z posledního závitu za obústím, přičemž bylo dbáno na to, aby lom nebyl veden přímo za obústím. Úlomky pocházely nejvýše z posledních tří čtvrtin tělesného závitů. Ke zpracování byly využity schránky z konchologické sbírky doc. Lucie Juříčkové a schránky k tomuto účelu přímo nasbírané. Schránky vrkoče *Vertigo lilljeborgi* byly zapůjčeny Národním muzeem v Praze a po vyfotografování vráceny do sbírek. Ostatní preparáty jsou uloženy v zázemí servisního pracoviště Laboratoře elektronové mikroskopie (PřF UK, Viničná 7, Praha 2).

Lámání bylo prováděno ručně sadou entomologických pinzet různé tvrdosti, pevnou entomologickou pinzetou a entomologickými špendlíky šíře 0–3. Získané úlomky byly pod binokulární lupou upevňovány za pomoci oboustranné lepící uhlíkové pásky na kulaté kovové podložky a před pozlacením ponechány 24 hodin v exsikátoru pro dokonalé vyschnutí. Zlacení bylo provedeno přístrojem Bal-Tec SCD 050. Pozorování proběhlo v Laboratoři elektronové mikroskopie PřF UK na přístroji SEM JEOL 6380VL.

Získané fotografie lomů byly měřeny v programu Image Tool 3.00. Bylo dbáno na to, aby měřené schránky pocházely z různých lokalit a aby bylo k dispozici nejméně pět schránek od každého druhu. Krom devíti modelových druhů z pilotního pokusu byly proměřeny schránky dalších 27 druhů z týchž i dalších čeledí. Celkově bylo vyfotografováno a proměřeno 36 druhů plžů z devíti čeledí. Prvotní data získaná na základě původních druhů totiž poukázala na některé zajímavé fenomény a proto byly dodány druhy blízce příbuzné (z téhož rodu či čeledi), avšak s odlišnými ekologickými nároky, aby bylo možné postihnout variabilitu morfologie mikrostrukturní stavby schránky v závislosti na způsobu života. Seznam všech zkoumaných druhů se systematickou příslušností, velikostí a ekologickými nároky je uveden v **Tabulce 7**. Vizualizace vybraných výsledků byla provedena ve statistickém programu R 2.10.1.



Obrázek 3: zaznamenané posmrtné proměny schránek. **A, B** – blednutí; **C** – světlé obarvení; **D** – tmavé obarvení; **E** – bodové zakalení; **F** – skvrnové zakalení; **G** – celkové zakalení; **H** – praskání periostraka; **I** – olupování periostraka; **J** – pitting; **K** – dolíky; **L, M, N** – prázdné periostrakum (zleva *C. aspera*; *C. lubrica* a *N. hammonis*); **O** – otvory vytvořené rozpouštěním; **P** – celková fragmentace; **Q** – prorážený vrchol; **R** – okénko; **S, T, U** – různé projevy dotyku kořenů rostlin; **V** – kolonie aktinomycety r. *Streptomyces*; **W** – mikroskopický snímek pseudomycelia r. *Streptomyces*; **X** – tenké černé mycelium; **Y** – tenké černé mycelium v mikroskopickém preparátu (směs vřecko- a stopkovýtrose houby (s přezkami)). Autorem fotografií ze světelného mikroskopu je Ondřej Koukol.

Co se stane s ulitou v prostředí střeoevropského lesa?

Na schránkách se v průběhu pilotního experimentu za tři roky sledování objevila poškození, která lze shrnout do sedmi základních kategorií (viz souhrnný **obr. 3**; Říhová et al. 2018 a Říhová a Juříčková, *submitted*):

- **změny barvy**: ztráta původního zbarvení, obarvení
- **zakalování stěny schránky** (pouze u malých, zprvu průhledných/průsvitných druhů)
- praskání a **olupování periostraka**
- **rozpuštění ostrakálních vrstev**
- **fragmentace**
- **otisky kořenů rostlin**
- **porostení myceliem** a houbám podobnými organismy

Tabulky 3 a 4 souhrnně uvádí výskyt těchto typů poškození pro jednotlivé lokality.

Tabulka 3: Poškození velkých modelových schránek v průběhu čas (6, 12, 24 a 36 měsíců). Zkratky označující lokality: D – dubohabřina, S – suťový les, B – bučina, O – olšina, KS – kulturní smrčina, R – rašelinný bor. – konkrétní typ poškození nebyl přítomen; • vzácná přítomnost poškození; × běžně se vyskytující typ poškození. **Barevné změny** zahrnují blednutí, světlé a tmavé obarvení; **rozpuštění ostraka** se projevuje čtyřmi způsoby: *pitting*, dolíky, otvory a okénka; **fragmentace** může být kompletní (fragmentace) či zasahovat pouze vrchol (olomení vrcholu) nebo ústí (olomení vrcholu). Poslední dva řádky jsou věnovány **výskytu hub** (houbové hyfy) a **houbám podobných organismů** (aktinomycety) na povrchu schránky. Sloupce D a KS posledního odběru (po 36 měsících) jsou prázdné, protože schránky byly zcela zničeny divokými prasaty.

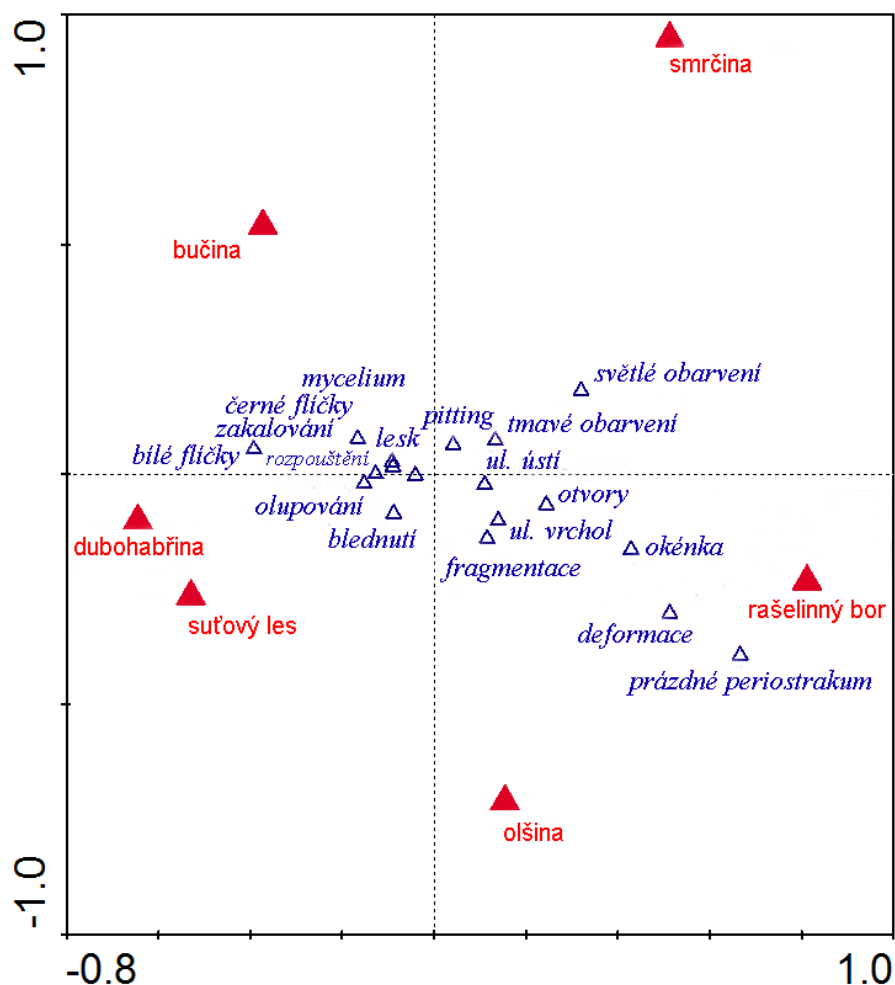
	6 měsíců					12 měsíců					24 měsíců					36 měsíců							
	D	S	B	O	KS	R	D	S	B	O	KS	R	D	S	B	O	KS	R	D	S	B	O	KS
blednutí	•	•	•	×	×	×	•	•	•	×	×	×	×	•	×	×	×	×	×	×	×	×	×
sv. obarvení	-	-	•	•	•	×	-	•	•	•	•	×	-	-	•	•	×	×	•	•	•	•	×
tm. obarvení	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	•	•	×	-	×	×
ztráta periost.	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	-	•	-	•	•	•	•	•
pitting	-	-	-	•	-	•	-	•	-	-	•	•	•	-	•	•	-	-	•	-	-	-	-
dolíky	-	•	•	•	×	×	•	•	•	×	•	•	•	×	×	×	×	•	×	×	×	×	×
otvory	•	•	-	•	•	•	•	•	•	×	•	•	•	•	×	×	×	•	•	•	×	×	×
okénka	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	•	•	-	-	•	-
fragmentace	-	-	-	-	-	-	•	-	-	-	•	-	•	-	-	•	•	•	•	•	•	•	×
olomení vrcholu	•	-	•	-	-	-	-	-	-	-	-	•	-	-	•	•	•	•	•	-	•	•	×
olomení ústí	•	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	×
otisk kořene	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	•
houbové hyfy	-	-	-	-	•	-	-	-	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	×	•
aktinomycety	•	-	-	-	-	-	-	•	•	-	-	-	-	-	-	-	-	•	•	-	-	-	•

Tabulka 4: Poškození malých modelových schránek v průběhu čas (6, 12, 24 a 36 měsíců). **Zakalení** se vyskytuje ve třech podtypech (bodové, plošné a celoulitové); **barevné změny** zahrnují blednutí, světlé a tmavé obarvení; **rozpuštění ostraka** se projevuje čtyřmi způsoby: *pitting*, dolíky, otvory a okénka. Poslední dva řádky jsou věnovány **výskytu hub** (houbové hyfy) a **houbám podobných organismů** (aktinomycety) na povrchu schránky. Sloupce D a KS posledního odběru (po 36 měsících) jsou prázdné, protože schránky byly zcela zničeny divokými prasaty.

	6 měsíců					12 měsíců					24 měsíců					36 měsíců							
	D	S	B	O	KS	R	D	S	B	O	KS	R	D	S	B	O	KS	R	D	S	B	O	KS
bod. zakalení	•	-	•	-	-	-	•	•	•	•	-	-	•	•	•	-	-	-	-	-	-	-	-
ploš. zakalení	•	-	•	-	-	-	•	•	•	-	-	•	•	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cel. zakalení	•	×	•	×	•	×	•	×	×	×	×	•	×	×	×	×	×	•	×	×	•	•	•
blednutí	•	-	•	-	•	•	•	•	•	•	•	-	•	•	•	•	•	•	-	-	•	-	-
sv. obarvení	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tm. obarvení	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ztráta periost.	•	•	•	•	-	-	•	•	-	-	•	-	-	•	-	-	-	-	-	•	•	-	-
pitting	-	•	•	-	-	-	•	-	•	-	-	-	•	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dolíky	-	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
otvory	-	•	•	•	•	-	-	-	-	×	•	•	•	•	•	×	•	•	×	•	•	•	•
okénka	-	•	•	•	•	•	-	•	•	×	•	×	-	•	•	×	×	•	×	•	•	•	×
otisk kořene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
houbové hyfy	•	•	•	•	•	-	-	×	•	•	•	•	×	•	•	•	•	•	•	•	•	×	•
aktinomycety	-	-	•	-	-	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Žádné z pozorovaných poškození či změn nebylo druhově specifické, prevalence některých však byla běžnější pro jednu či druhou velikostní skupinu (**Tabulka 3** a **Tabulka 4**). Výjimkou je zakalování stěny schránky, ke kterému může docházet výhradně u druhů původně průhledných/průsvitných a vyskytovalo se tedy pouze u malých modelových druhů. Fragmentace není u malých druhů v **Tabulce 4** zaznamenána, neboť je nesnadné odlišit ji v malém měřítku od rozpouštění vápenatých vrstev.

Nebylo zaznamenáno ani žádné biotopově unikátní poškození. Celkový obraz změny stavu schránek se však mezi lokalitami liší (**obr. 4**, **Tabulka 5**) a je vysledovatelný tafonomický podpis konkrétních biotopů. Výjimečné jsou ve svém působení na schránky především suché a/nebo bazické lokality (dubohabřina a suťový les), ve kterých schránky zůstávají poměrně dlouho nezměněné a udržují si relativně čerstvý vzhled i po jednom roce od zakopání. Na opačném konci spektra stojí lokality výrazně vlhké a kyselé (rašelinný bor, olšina), v nichž schránky rychle a důkladně korodují a po třech letech z nich zůstávají silně poškozené, téměř nedeterminovatelné fragmenty.



Obrázek 4: Rozklad schránek v různých typech lesa je místně specifický – schránky nesou tzv. tafonomický podpis konkrétní lokality. RDA analýza; vysvětlující proměnnou je typ biotopu, jako kovariáty byly použity druh plže a délka uložení na lokalitě. První kanonická osa vysvětluje 4,9 % pozorované variability, druhá 0,8 % ($p = 0,0002$). Pozice centroidů vůči sobě naznačuje podobnost tafonomických podpisů konkrétních lokalit.

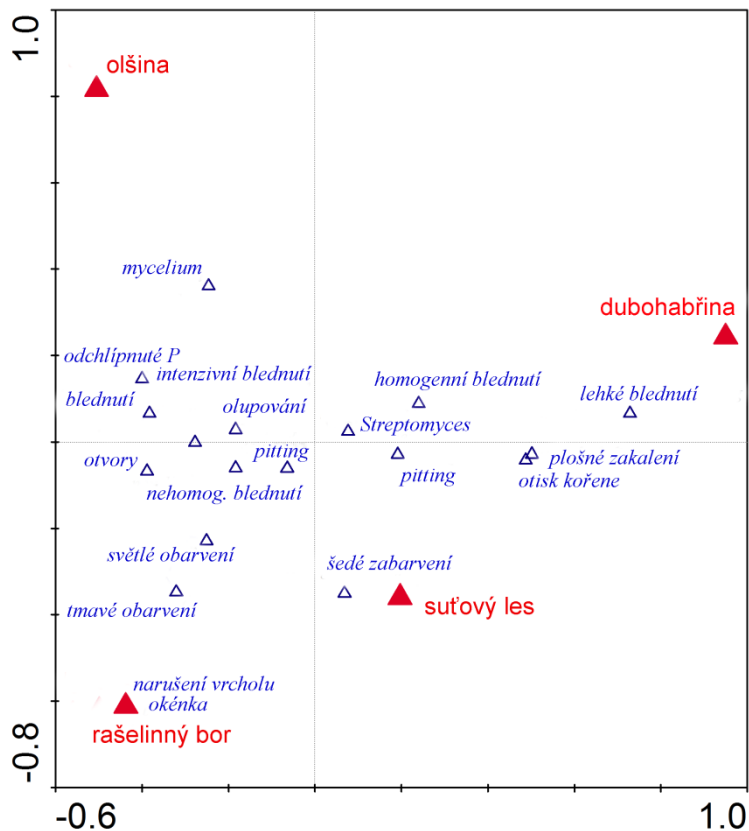
Lokalitně-specifický způsob rozkladu byl zaznamenán rovněž při analýze stavu schránek páskovky *C. hortensis*, využitých coby substrát pro výzkum diverzity houbových organismů, osidlujících povrchy schránek (více viz Říhová et al. 2014). Ač byly schránky páskovek po celý rok v teplotně i vlhkovně vyrovnaném prostředí, byl na jejich stavu odlišný vliv substrátu z různých lokalit dobře patrný (**obr. 5** a graf na **obr. 6**).

Tabulka 5. Spearmanův neparametrický korelační koeficient (ρ) mezi biotopem a typem poškození schránky; uvedeny jsou pouze nenulové hodnoty. Kvůli opakovanému testování byla použita sekvenční Bonferroniho korekce.

Typ poškození	dubohabřina	suťový les	bučina	olšina	smrčina	rašelinný bor
Deformace	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.20
Fragmentace	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.15
Udržení lesku	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Mycelium	n.s.	n.s.	0.23	n.s.	n.s.	-0.14
Blednutí	n.s.	n.s.	n.s.	0.14	n.s.	n.s.
Nepoškozené P	0.19	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0.15
Prázdné P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.15
Okénka	-0.25	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.19
Otvory	-0.29	n.s.	-0.14	0.21	n.s.	0.22
Dolíky	-0.14	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ztráta P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Olomené ústí	-0.17	-0.24	-0.13	0.21	0.17	0.23
Olomený vrchol	-0.16	n.s.	-0.14	0.20	n.s.	0.22
Světlé obarvení	-0.21	-0.20	n.s.	n.s.	0.32	0.32
Tmavé obarvení	-0.20	-0.23	n.s.	n.s.	n.s.	0.25
Zakalování	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0.13



Obrázek 5: srovnání stavu schránek pruhované morfy páskovky *C. hortensis* uložených po dobu jednoho roku ve stabilních podmínkách v hrabance z dubohabřiny, suťového lesa, olšiny a rašelinného boru (zleva doprava).



Obrázek 6: RDA analýza poškození schránek *C. hortensis* vzniklých v průběhu sledování složení spekter houbových organismů v hrabance ze čtyř lesních biotopů. První a druhá kanonická osa vysvětlují 32,7 % a 5,5 % variability (p -hodnota = 0,0002). Z grafu je patrné, že i v standardizovaných laboratorních podmínkách má hrabanka různých typů lesa na schránky odlišný vliv.

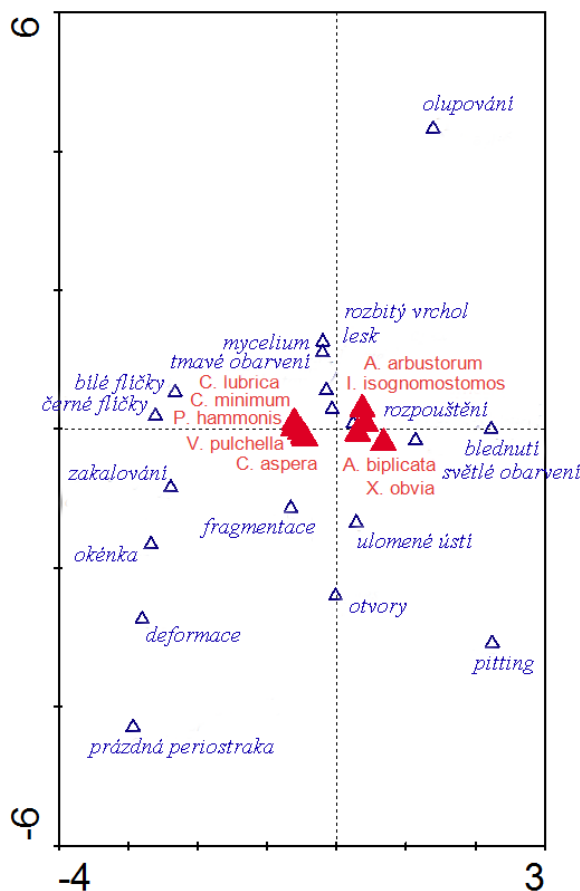
Velikost schránek má zásadní vliv na průběh (graf na **obr. 9**) i rychlost rozkladu. Zatímco koroze velkých schránek obvykle začíná zvenku, narušením periostraka a následným rozpouštěním ostrakálních vrstev (**obr. 7**), periostrakum malých schránek často vytrvává i po rozpuštění vápenatých částí schránky (**obr. 8**).



Obrázek 7: průběh rozkladu na příkladu suchomilky *Xerolenta obvia*. Rozklad velkých schránek začíná narušením povrchu, blednutím a olupováním periostraka (B). Rozpouštění ostraka počíná jako mělké dolíkovité prohlubně (C), které se dále prohlubují v otvory (D) a tyto se následně rozšiřují (E).

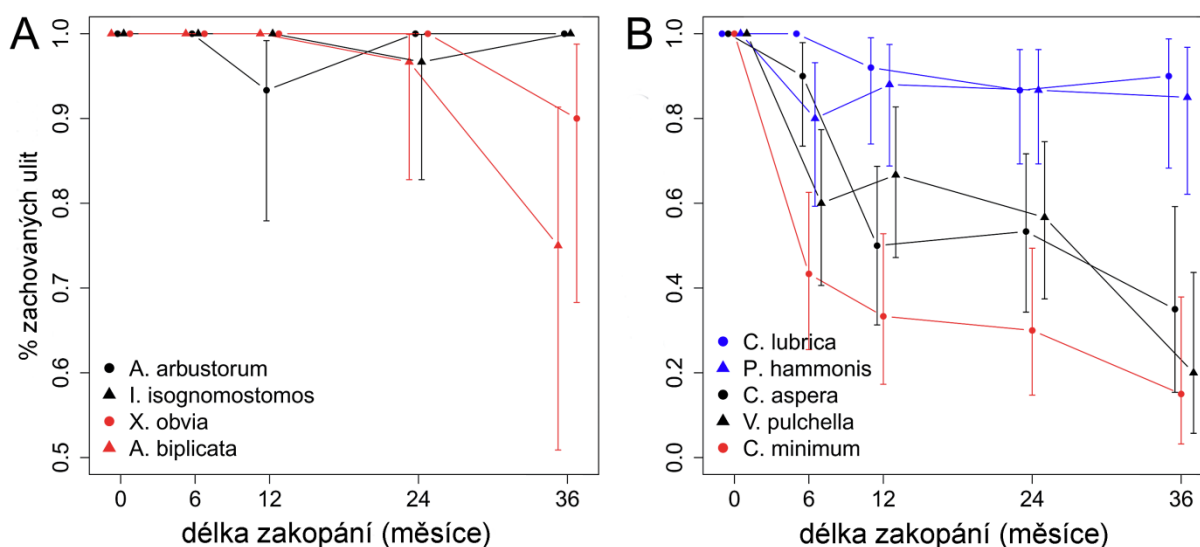


Obrázek 8: průběh rozkladu na příkladu blyštivky *Nesovitrea hammonis*. Rozklad malých schránek začíná zakalením stěny schránky (B). Následně dochází k rozpouštění ostrakálních vrstev (C, D). Prázdné periostrakum zcela zbavené vápenatých vrstev (E) je zřídka se vyskytujícím prvkem této rozkladové řady.



Obrázek 9: RDA analýza způsobu rozkladu schránek (vysvětlující proměnná – druh plže; kovariáty – lokalita a délka uložení na lokalitě). První a druhá kanonická osa vysvětlují 11,6 % a 1,7 % pozorované variability ($p=0,0002$). Velké druhy jsou seskupeny na pravé straně grafu, malé druhy obsadily levou polovinu.

Malé schránky rovněž mizí mnohem rychleji než schránky velké (**obr. 10**). Zatímco návratnost velkých schránek v pilotním experimentu byla 89 %, malých schránek v průběhu tří let zmizela třetina. Středně velkých schránek (*N. hammonis* a *C. lubrica*) bylo zpětně nalezeno 78 %; zbylých tří nejmenších druhů pouze 51 %.



Obrázek 10: Procentuální „návratnost“ schránek v závislosti na čase a velikosti schránky. A – čtyři velké druhy, B – pět malých druhů; z nichž největší (*C. lubrica* a *N. hammonis*) jsou vyznačeně modře a způsobem mizení jsou spíše než ostatním malým druhům podobny druhům velikým. Červeně je vyznačen nejmenší sledovaný plž, *C. minimum*, jehož ulity ubývaly nejintenzivněji.

Stavba periostraka a ostraka zkoumaných druhů

Elektronmikroskopická studie stavby schránky poukázala na její značné rozdíly mezi devíti modelovými druhy. Tloušťka schránky se pohybovala mezi 14 a 171 μm . Některé modelové druhy měly periostrakum obvykle jednovrstvé (*X. obvia*, *V. pulchella*, *I. isognomostomos*), většina ho měla dvojevrstvé. Výjimku představují druhy *C. aspera* a *N. hammonis*: někteří jedinci měli periostrakum dokonce třívrstvé (**Tabulka 7**).

Rozdíly byly rovněž pozorovány v relativní tloušťce periostraka, která se pohybovala od necelých dvou až po 22 % celkové šíře stěny schránky. Druhy, u kterých byl pozorován výskyt okének (*C. lubrica*, *N. hammonis*, *C. aspera* a okrajově *A. arbustorum*) patřily k druhům s relativně nejsilnějším periostrakem a rovněž se u nich častěji vyskytovalo periostrakum vícevrstvé.

Tabulka 6: Šíře schránky, periostraka a ostraka devíti modelových druhů z pilotního pokusu. **Výška** a **šířka** (mm) udávají velikost schránky; **tloušťka** (μm) značí absolutní tloušťku stěny schránky. **P abs** – absolutní tloušťka periostraka v μm , **P rel** – relativní tloušťka periostraka, **P vrs** – počet vrstev periostraka. Poslední čtyři sloupce tabulky uvádí totéž pro **ostrakum** (vápenaté vrstvy). Ekologické skupiny uváděny dle Lisického (1991) a Juříčkové et al. (2014).

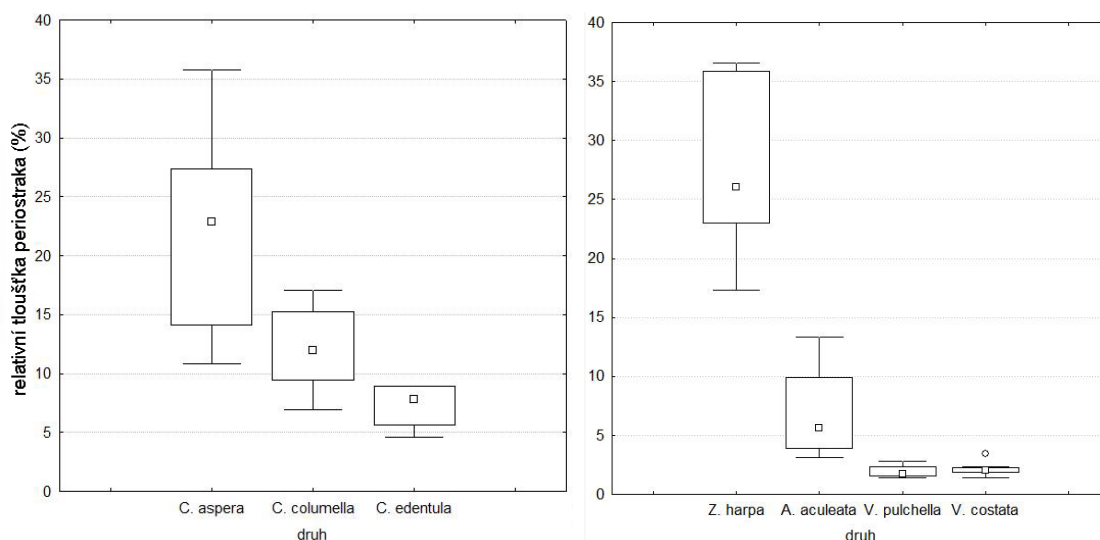
Druh plže	Ekosk.	Ekologické nároky	výška	šířka	tloušťka	P abs	P rel	P vrs	O abs	O rel	O vrs
<i>Arianta arbustorum</i>	2; SI(AG)	lesní, vlhkomilná	16	21	171,3	12,3	7,3	2,0	158,9	92,7	3,6
<i>I. isognomostomos</i>	1; SI	lesní, suťová	5,5	9	75,4	2,6	3,4	1,8	72,8	96,6	4,3
<i>Xerolenta obvia</i>	4; ST	suchomilná, otevřená st.	8,5	17	76,3	1,0	1,4	1,0	75,3	98,6	2,8
<i>Alinda biplicata</i>	2; SI(AG)	lesní, někdy na skalách	17	3,9	82,6	1,6	1,9	2,0	81,0	98,1	4,8
<i>Cochlicopa lubrica</i>	7; AG	vlhkomilná	6,25	2,65	30,9	1,5	4,9	2,0	29,4	95,1	3,1
<i>Nesovitrea hammonis</i>	7; AG	mírně vlhkomilná, ubikvistní	2	3,75	26,4	0,9	3,9	2,3	25,4	96,1	2,4
<i>Columella aspera</i>	7; Ap	ne-vápenatá stanoviště	2,25	1,35	13,3	2,7	21,9	2,2	10,6	78,1	1,3
<i>Vallonia pulchella</i>	5; PT	otevřená stanoviště	1,25	2,25	28,3	0,5	1,9	1,4	27,7	98,1	2,8
<i>Carychium minimum</i>	9; RP	silně vlhkomilná	1,9	1	16,7	0,7	4,5	2,0	16,0	95,5	2,0

Z porovnání morfologie periostraka v rozšířeném datasetu (**Tabulka 7**) je patrné, že většina zkoumaných druhů má periostrakum obvykle dvouvrstvé (21 druhů) a pouze u některých výjimek je periostrakum vícevrstvé či naopak jednovrstvé (tři, resp. dvanáct druhů). Druhy s jednovrstvým periostrakem obývají suchá výslunná nebo či silně vápenatá stanoviště. Zdá se, že relativní šíře periostraka koreluje s potřebou chránit schránku před vnějšími vlivy, které by mohly poškodit ostrakální vrstvy. Působivě jeho plasticitu dokládá porovnání blízce příbuzných druhů plžů, kteří obývají výrazně odlišné biotopy a jsou vystaveni široké škále podmínek prostředí. Tak je tomu např. u zástupců čeledi Valloniidae (kde se tloušťka periostraka pohybuje mezi 2–30 % celkové šíře schránky) nebo tří střeoevropských zástupců rodu ostroretka (*Columella*; tloušťka periostraka mezi 8–22 %). Jejich srovnání je znázorněno na **obr. 11**.

U všech zkoumaných druhů byl zaznamenán jediný typ vápenaté mikrostruktury – příčně-lamelární mikrostruktura. U různých druhů byl nalezen různý počet vrstev (resp. lamel 1. řádu; viz **obr. 1 a 2**) této struktury, který varíroval mezi jednou (někteří zástupci rodu *Columella* a *Vertigo*) a sedmi (závornatky).

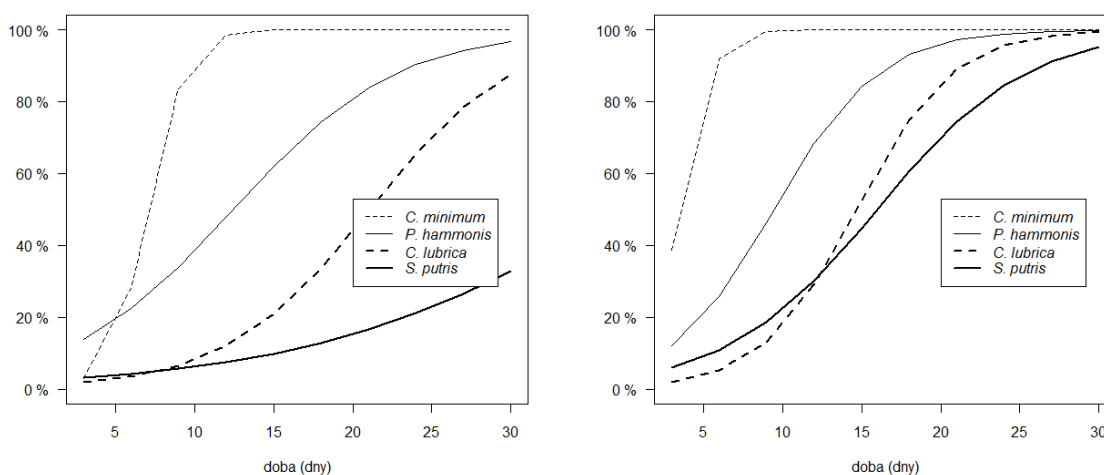
Tabulka 7: morfometrické a mikrostrukturální charakteristiky vybraných suchozemských plžů. **V** – výška schránky v mm, **Š** – průměr schránky v mm, **TS** – tloušťka schránky v μm ; **Pab** – absolutní tloušťka periostraka v μm ; **PrI** – relativní tloušťka periostraka v μm ; **vrP** – počet vrstev periostraka; **Oab** – absolutní tloušťka ostraka v μm ; **OrI** – relativní tloušťka ostraka v μm ; **vrO** – počet ostrakálních vrstev (lamel 1. řádu). Zkratka **OS** ve sloupci **ekologické nároky** značí „otevřená stanoviště“. Pokud se v kolonkách vrP a vrO vyskytují desetinná čísla, znamená to, že někteří jedinci daného druhu měli o jednu vrstvu periostraka či ostraka méně/více než většina (rozptyl 1–3 vrstvy se u žádného zkoumaného druhu nevyskytl). Tučně druhy použité v pilotní studii rozkladu schránek.

Druh plže	Čeď	EkoS	Ekologické nároky	V	Š	TS	Pab	PrI	vrP	Oab	OrI	vrO
<i>C. minimum</i>	Carychiidae	9 (RP)	silně vlhkofilný	1,9	1	16,7	0,7	4,5	2,0	16,0	95,5	2,0
<i>C. tridentatum</i>	Carychiidae	8 (HG)	vlhkofilný	2,05	0,85	16,7	0,5	3,5	1,8	16,2	96,5	2,0
<i>C. lubrica</i>	Cochlicopidae	7 (AG)	vlhkofilný	6,25	2,65	30,9	1,5	4,9	2,0	29,4	95,1	3,1
<i>C. lubricella</i>	Cochlicopidae	6 (XC)	otevřená až stepní	5,65	2,35	26,0	1,0	4,4	2,0	25,0	95,6	3,1
<i>V. costata</i>	Valloniidae	5 (PT(SI))	otevřená, suchomilná	1,3	2,45	30,7	0,6	2,1	1,0	30,1	97,9	2,9
<i>V. pulchella</i>	Valloniidae	5 (PT)	otevřená	1,25	2,25	28,3	0,5	1,9	1,4	27,7	98,1	2,8
<i>A. aculeata</i>	Valloniidae	1 (SI)	lesní, žije v opadu	2	2	23,5	1,5	7,0	2,0	22,0	93,0	3,0
<i>Z. harpa</i>	Valloniidae	2 (-)	lesní, ne-vápenatá místa	3,5	2,7	15,0	4,0	27,2	2,0	11,0	72,8	1,3
<i>C. aspera</i>	Vertiginidae	7 (Ap)	ne-vápenatá	2,25	1,35	13,3	2,7	21,9	2,2	10,6	78,1	1,3
<i>C. columella</i>	Vertiginidae	5 (PT)	horský druh	3	1,4	18,9	2,1	11,6	2,0	16,8	88,4	1,9
<i>C. edentula</i>	Vertiginidae	8 (HG)	lesní, vlhkofilná	2,75	1,4	22,9	1,8	7,5	2,0	21,1	92,5	2,7
<i>T. callicratis</i>	Vertiginidae	4 (-)	suchá, vápnomilná	1,9	0,9	9,5	0,4	4,5	1,0	9,1	95,5	2,0
<i>T. cylindrica</i>	Vertiginidae	5 (PT)	suchá, stepní	1,9	0,9	15,2	0,4	2,8	1,0	14,8	97,2	3,0
<i>V. alpestris</i>	Vertiginidae	7 (Sip)	vápencové sutě	1,9	1,1	13,6	0,6	4,5	2,0	13,0	95,5	2,7
<i>V. pusilla</i>	Vertiginidae	1 (SI)	lesní, žije v opadu	2	1,1	15,1	0,5	3,3	2,0	14,6	96,7	2,9
<i>V. angustior</i>	Vertiginidae	8 (HG)	vápnité otevřené mokřady	1,8	0,9	20,1	0,5	2,4	1,0	19,6	97,6	3,0
<i>V. substriata</i>	Vertiginidae	8 (HG)	vlhké lesy, olšiny	1,75	1,1	15,8	0,8	5,6	1,7	15,0	94,4	3,0
<i>V. antivertigo</i>	Vertiginidae	9 (RP)	otevřené mokřady	2,1	1,2	9,1	0,3	3,7	1,0	8,7	96,3	2,8
<i>V. lilljeborgi</i>	Vertiginidae	9 (RP)	kyselá mokřad. stanoviště	2,05	1,3	14,5	1,0	7,2	2,0	13,5	92,8	3,0
<i>V. arctica</i>	Vertiginidae	7 (AG)	horský, kameny a opad	2,45	1,4	13,4	1,1	8,8	2,0	12,3	91,2	3,0
<i>V. pygmaea</i>	Vertiginidae	5 (PT)	OS, ubikvista	1,95	1,1	19,8	0,6	2,9	1,4	19,3	97,1	2,4
<i>C. laminata</i>	Clausiliidae	1 (SI)	lesní, na dřevě	16	4	90,6	2,1	2,3	2,0	88,5	97,7	4,8
<i>A. biplicata</i>	Clausiliidae	2 (SI(AG))	lesní	17	3,9	82,6	1,6	1,9	2,0	81,0	98,1	4,8
<i>P. pygmaeum</i>	Punctidae	7 (AG)	ubikvistní	0,7	1,35	10,0	0,7	8,0	1,6	9,3	92,0	2,4
<i>P. servilis</i>	Punctidae	7 (-)	vlhké a stinné, v hrabance	1	1,9	15,5	0,7	4,8	2,0	14,8	95,2	1,5
<i>V. contracta</i>	Zonitidae	7 (AG)	sušší kamenitá stanoviště	1,5	2,5	18,5	0,5	3,0	1,2	18,0	97,0	2,7
<i>V. crystalina</i>	Zonitidae	2 (SI(HG))	silně vlhkofilný	1,75	3,5	22,7	0,9	4,1	1,6	21,8	95,9	3,0
<i>V. diaphana</i>	Zonitidae	1 (SI)	vlhkofilný	1,95	3,95	25,9	0,8	2,8	1,4	25,1	97,2	3,1
<i>A. minor</i>	Zonitidae	2 (Sith)	suchomilná, OS	3,3	7,5	75,2	1,9	2,7	1,1	73,3	97,3	3,1
<i>A. pura</i>	Zonitidae	1 (SI)	opad lesů, nepřilíží vlhký	2,35	4,25	23,2	1,2	5,5	2,0	22,1	94,5	2,4
<i>N. hammonis</i>	Zonitidae	7 (AG)	mírně vlhk., ubikvistní	2	3,75	26,4	0,9	3,9	2,3	25,4	96,1	2,4
<i>O. glaber</i>	Zonitidae	2 (SI(AG))	sutě, spíše sušší	7,25	12,5	55,8	1,4	2,8	2,3	54,3	97,2	2,5
<i>X. obvia</i>	Hygromiidae	4 (ST)	suchomilná, OS	8,5	17	76,3	1,0	1,4	1,0	75,3	98,6	2,8
<i>M. incarnatus</i>	Hygromiidae	1 (SI(MS))	lesní ubikvistní	10	14,5	82,2	2,6	3,3	1,8	79,6	96,7	3,3
<i>A. arbustorum</i>	Helicidae	2 (SI(AG))	lesní, vlhkofilná	16	21	171,3	12,3	7,3	2,0	158,9	92,7	3,6
<i>I. isognomostomos</i>	Helicidae	1 (SI)	lesní, suťová	5,5	9	75,4	2,6	3,4	1,8	72,8	96,6	4,3



Obrázek 11: Porovnání relativní šíře periostraka v rámci rodu ostroretka (tři druhy r. *Columella*; vlevo) a čeledi údolníčkovití (Valloniidae – čtyři druhy; vpravo).

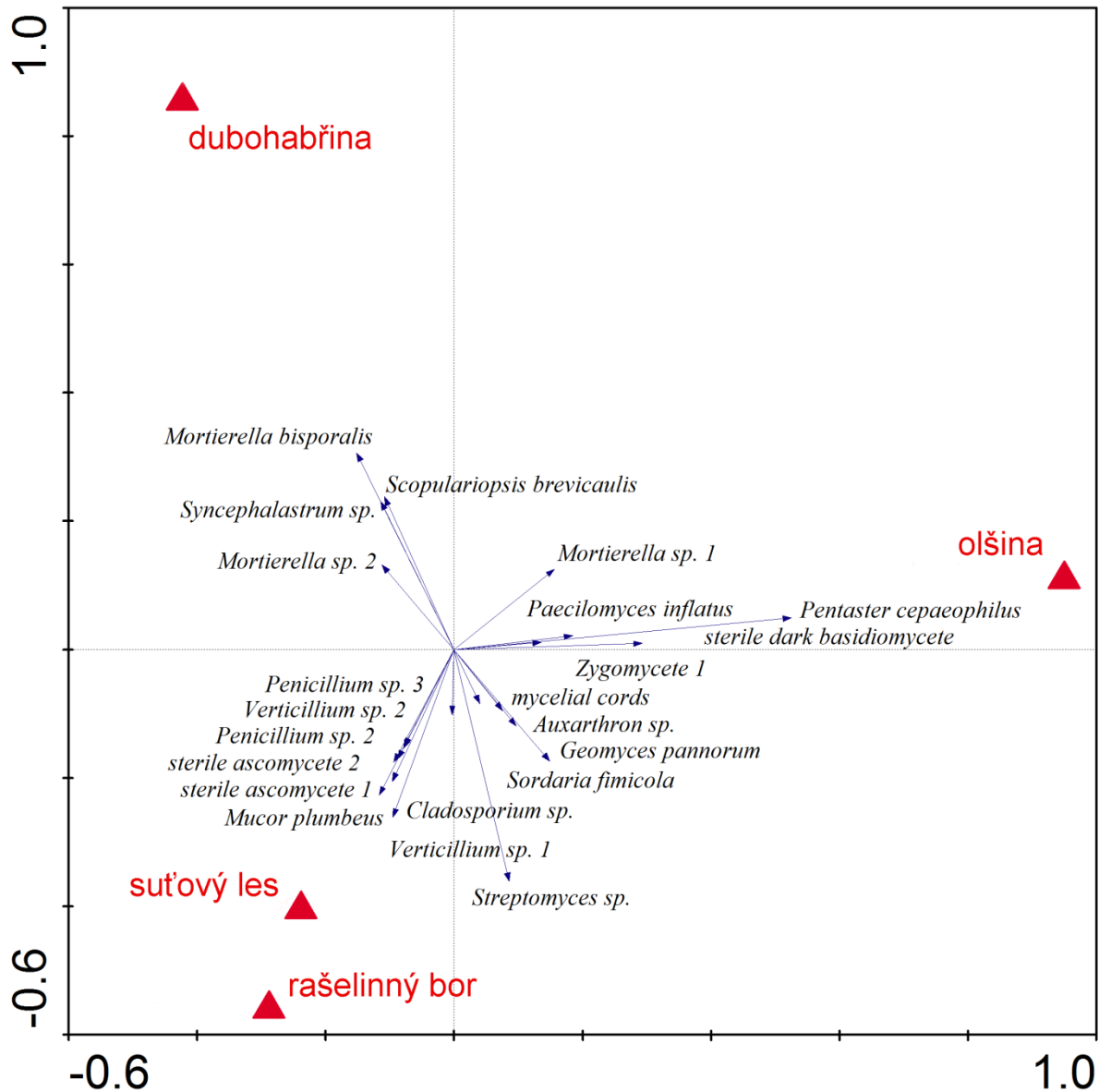
Vlhkost a intenzita provlhnutí se ukázaly být jedním z klíčových faktorů změny čerstvého vzhledu původně průsvitných schránek. Zatímco kontrolní ulity uložené v suchu v průběhu třicetidenního pozorování nezměnily své vzezření vůbec, schránky vystavené různé míře vlhkosti (vlhčení a máčení) se zakalily a okrajově došlo i k porušení periostraka (pouze u máčených schránek *S. putris*). Průběh zakalování byl velikostně specifický (**obr. 12**). Malé schránky dosáhly úplného zakalení dříve než schránky rozměrnější; nejmenší použitý druh (*C. minimum*) již po šesti (deseti v případě vlhčení) dnech. A zatímco se velké schránky (*S. putris*) ve vlhkém prostředí teprve začaly zakalovat, při kompletním namočení do vody byly po třiceti dnech téměř zcela neprůsvitné.



Obrázek 12: průběh zakalování stěny schránky pro čtyři modelové druhy. Vlevo schránky **vlhčené**, vpravo schránky **máčené**. Osa Y udává relativní plochu schránky, která přestala být průhledná.

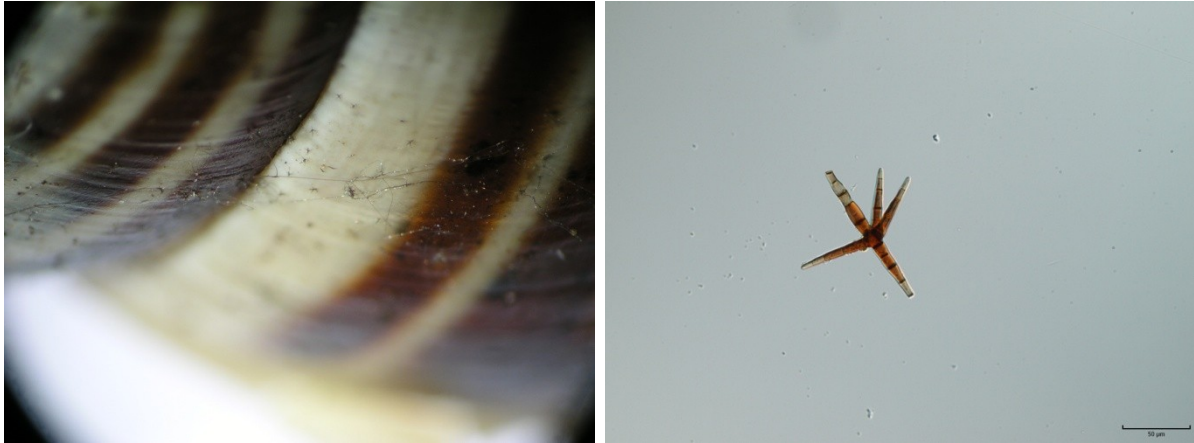
Dalším důležitým rozkladným činitelem se ukázaly být živé organismy. Přibližně 3 % schránek z pilotního pokusu bylo zcela zničeno činností velkých obratlovců (viz **Tabulky 3 a 4**). Na některých lokalitách (rašelinný bor a olšina v pilotním pokusu; suťový les a dubohabřina při sledování výskytu hub na povrchu ulit) byl navíc pozorován kontakt kořenů rostlin a schránek. V místech s nedostatkem některých prvků jsou rostliny schopné usměrnit růst svých kořenů ve směru zdroje limitujícího faktoru a v místech s nižší koncentrací vápníku pro ně ulity mohou být vhodným zdrojem jinak limitujícího prvku.

Rovněž bohatost spektra hub a houbám podobných organismů, osidlujících povrch schránek, byla překvapivá. Zatímco při hodnocení stavu schránek v pilotním experimentu pouhým okem bylo rozlišeno pět morfologických kategorií (bílé uzlíkovité, černé kyjovité, černé nitkovité, hnědé nitkovité a tenké šedé; v **Tabulkách 3 a 4** sloučeny do vláknitého mycelia a uzlíkovitého pseudomycelia), kultivační studie jich odhalila 35. Houbová společenstva nadto byla místně specifická (graf na **obr. 13**).



Obrázek 13: RDA analýza houbových společenstev čtyř lesních typů. První a druhá osa vysvětlují 5,3 % a 3,2 % pozorované variability ($p=0,0002$). Zatímco společenstva dubohabřiny a olšiny jsou velmi specifická, společenstva suťového lesa a rašelinného boru jsou si relativně podobná.

V průběhu kultivačního experimentu byl objeven a popsán nový rod a druh vřeckovýtrusé houby. Dle unikátní morfologie a specifického místa výskytu byl pojmenován *Pentaster cepaeophilus* Koukol, 2013 (viz **obr. 14**). Vyskytoval se pouze na povrchu schránek páskovek uložených v hrabance z olšiny.

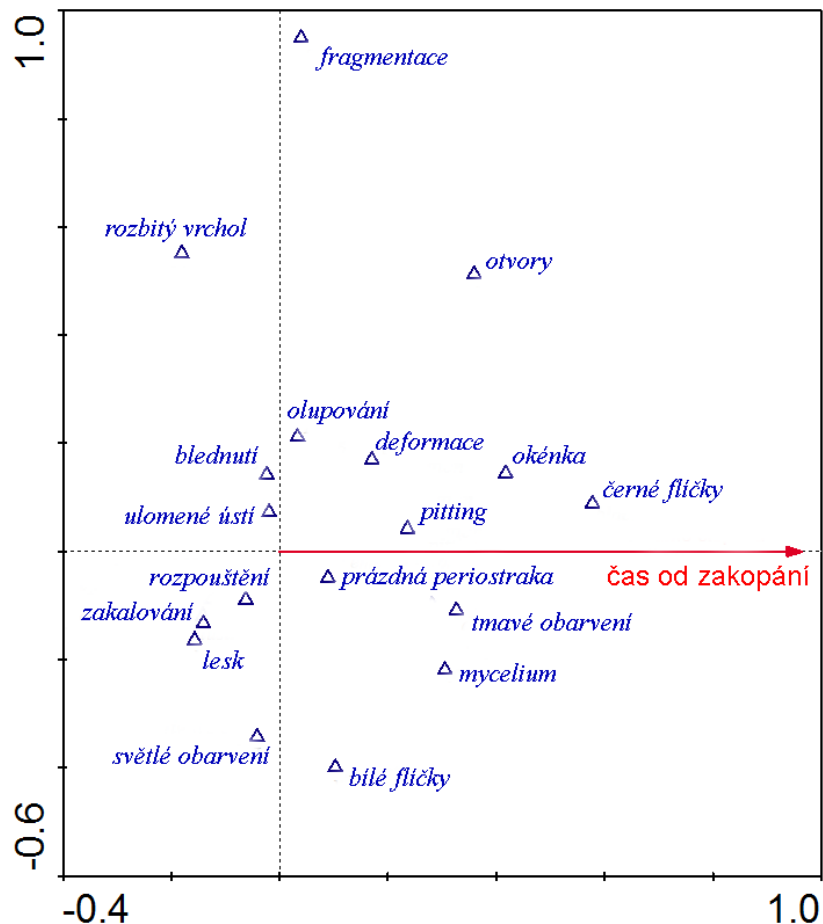


Obrázek 14: vřeckovýtrusá houba *Pentaster cepaeophilus*, nově popsaná z ulit páskovek (Koukol & Říhová 2013). Vlevo charakteristicky tvarované konidie na schránce pruhované morfy páskovky *C. hortensis*; vpravo osamocená konidie na fotografii ze světelného mikroskopu. Autorem fotografií je Ondřej Koukol.

Schránky mění svůj vzhled v průběhu času. Dochází k narušování vnějších vrstev, praskání a odlupování periostraka a posléze rozpouštění ostrakálních vrstev. Schránky krátce prázdné si zachovávají původní lesk i zbarvení; malé schránky jsou průsvitné. S postupem času se malé schránky zakalují, velké blednou (avšak nedochází k výraznějšímu chemickému narušování vápenatých vrstev) a ztrácí periostrakum. Dochází rovněž k jejich světlému obarvení (**obr. 3C**). Schránky v pokročilejším stádiu koroze nesou známky rozpouštění anorganických vrstev, dolíky a posléze otvory skrz stěnu schránky (**obr. 3J, 3K a 3O**). Pro pokročilá stádia koroze je typický značný výskyt otvorů, tmavé obarvení zbylých struktur (**obr. 3D**) a pro odolné malé druhy výskyt prázdných periostrak s kompletně rozpuštěnými vápenatými vrstevami (**obr. 3L, M a N; obr. 8**).

Celková fragmentace (**obr. 3P**) a olámaní ústí nejsou korelovány s dobou uplynulou od smrti jedince, protože jsou způsobovány náhodně působícím faktorem, živočichy. Pokud je zachována ještě nějaká část původního povrchu, může k blednutí (**obr. 3A, B**) docházet kdykoliv v průběhu koroze a proto se i tato charakteristika v grafu na **obr. 15** jeví jako na čase nezávislá.

Porostení povrchu myceliem (**obr. 3X**) a aktinomycetami (**obr. 3V**) je vázáno na aktuální podmínky počasí a vymizení antimykotického efektu slizu. V ideálních podmínkách k porostení schránek páskovky *C. hortensis* dochází do tří měsíců od vyprázdnění schránky a i když je mycelium relativně křehká struktura, která podléhá snadné destrukci za suchého počasí, delší dobu prázdné ulity jsou myceliem pokryté více než schránky čerstvější.



Obrázek 15: RDA analýza korelace typů poškození s časem uplynulým od opuštění ulity. První kanonická osa vysvětluje 5 % variability, druhá nekanonická osa vysvětluje 10 % variability ($p = 0,0002$; vysvětlující proměnná čas uplynulý od zakopání; kovariáty druh plže a typy poškození schránky).

Proč se vzhled a stav prázdných schránek proměňuje?

Prázdné schránky v prostředí střeoevropského lesa prodělávají širokou škálu změn, vedoucích k postupné degradaci a zničení. Některé ze změn nemají na první pohled destruktivní charakter. Velké schránky, původně pigmentované a vzorované, tento svůj vzor ztrácí a blednou. Původně průhledná stěna malých schránek mléční a stává se neprůhlednou – dochází k zakalování. Periostrakum i vápenaté vrstvy se obarvují v široké škále odstínů, od zářivě oranžové po téměř černou. Původně lesklé schránky se stávají matnými.

Ač z mediteránního prostředí, **blednutí** bylo v malakozoologické literatuře dokumentováno. Okrajově jej zmiňuje Barrientosová (2000) a Rundellová s Cowiem (2003). Podrobněji jej popsal Menez (2002), který vystavil schránky osmi druhů středozezemských plžů povětrnostním vlivům suchého gibraltarského léta. Ztráta barvy a původního vzoru se projevovala homogenně po celé exponované ploše pozorovaných ulit. Mimo blednutí Menez pozoroval ztrátu lesku a mizení periostraka. Pozorovaná poškození přisoudil působení osvětlení, protože v průběhu tříměsíčního sledování téměř nepřišlo.

Schránky v pilotním experimentu (viz Říhová & Juříčková, *submitted*) však bledly i přesto, že nebyly vystaveny slunečnímu světlu. Příčina blednutí ve střeoevropských lesích je jiná. Protože „mediteránní“ blednutí se projevuje jinak než „lesní“, domnívám se, že za ztrátou barvy v lesním prostředí mohou chemické změny, nastávající v ostraku a periostraku v místech dotyku schránky s vlhkými částicemi hrabanky.

Zakalování stěny malých schránek bylo poprvé zmíněno v práci Říhové a Juříčkové (*submitted*). Týká se nejen malých schránek – postihuje rovněž velké ulity, které byly původně průhledné (či alespoň velmi průsvitné; z české fauny se jedná například o zástupce čeledi Succineidae). Jev je díky změně barvy na mléčně bílou velmi nápadný i u drobných ulitek. Docházelo k němu velmi brzy na všech sledovaných lokalitách, objevovalo se do šesti měsíců. Na vlhkých lokalitách bylo rovnou pozorováno zakalení celé schránky, na lokalitách suchých (a bazičtějších) spíše počáteční stádia (**Tabulka 4**). Graf na **obr. 4** zobrazuje blednutí v levé části, která patří poškozením typickým pro dubohabřinu, suťový a bukový les. Je to proto, že zatímco na zbylých třech lokalitách došlo k rychlému rozpuštění malých schránek; zde se schránky naopak uchovaly a byla na nich patrná i poškození typická pro počátek rozkladu schránek. Ať už je mechanismus vzniku zakalení jakýkoliv (viz níže), jedná se o jeden z prvních typů narušení schránky, který umožňuje vnik dalších poškození.

K zakalení dochází při provlhnutí či namočení ulity. První stopy zakalení byly v experimentu na něj zaměřeném patrné již po třech dnech a čím vyšší vlhkost byla, tím rychleji k zakalování docházelo (**obr. 12**). Drobné schránky síměnky *C. minimum* se po navlhčení zcela zakalily již po deseti dnech. Byly-li ve vodě ponořeny zcela, zneprůhledněly do šesti dnů. Velké schránky (*S. putris*) naopak zakalování odolávaly nejdéle a docházelo k němu pouze na místech přímého kontaktu s vodou. Pozměněné plochy se postupem času rozšiřovaly. Středně velké schránky (*N. hammonis* a *C. lubrica*) se při nižší hladině vlhkosti zakalovaly středním tempem; při kompletním ponoření do vody nebyla rychlost jejich zakalování odlišná od rychlosti zakalování největších použitých schránek (**obr. 12** vpravo). Vzhled kontrolních schránek umístěných v týchž teplotních podmínkách v suchu se po celou dobu sledování nijak nezměnil.

Bezprostřední mechanismus vzniku zakalování není znám. Je možné, že při něm dochází ke změnám na mikrostrukturální úrovni schránek. Domnívám se, že zakalení schránky souvisí s narušením organické vrstvy pokrývající lamely všech řádů (**obr. 1**). Pravděpodobně dochází k jejímu odchlípnutí od krystalků a průniku vody (nebo vzduchu) mezi organickou pochvu a aragonit, což vede k tvorbě neprůhledných míst. Přesmyk aragonitu na kalcit s jinými fyzikálními vlastnostmi není pravděpodobný, protože k němu dochází obvykle za zvýšené teploty; za běžného tlaku a teploty taková změna trvá miliony let.

Obarvení schránky je dalším z typů posmrtných změn, které se zdají být nedestruktivní, avšak průběh rozkladu nedílně provází. Jediným známým výskytem předchozího popisu tmavého obarvení je zmínka Barrientosové (2000) o obarvení prvního závitů schránek v kostarickém tropickém lese. Obarvení bylo v pilotním experimentu zaznamenáno již po šesti měsících a v různé míře k němu postupně došlo na všech sledovaných lokalitách u všech modelových druhů (**Tab. 3 a 4**). Jeho výskyt na schránce obvykle doprovází další typy narušení, především rozpouštění vápenatých vrstev. Na světlých částech schránky je obarvení dobře patrné (**obr. 3C, D**), zasahuje však i periostrakum, což je vidět především na místech s okénky. Čím déle jsou schránky prázdné a ponechané na lokalitě působení vnějších vlivů, tím více jsou obarveny (**obr. 15**).

Nejintenzivněji se schránky zabarvovaly v rašelinném boru a kulturní smrčtině, zřídka docházelo k obarvení v dubohabřině a suťovém lese (**Tabulka 5; obr. 4**). Jev byl pozorován i při studiu houbových společenstev v laboratorních podmínkách (**obr. 6**).

Protože je známo, že obdobné obarvení organických materiálů působí huminové kyseliny (Hall & Packham 1965, van der Sanden 1992), domnívám se, že i obarvení schránek je jimi způsobeno.

Ztráta lesku, zmiňovaná Menezem (2002), je diskutabilní typ poškození, přestože je velmi dobře patrná (viz **obr. 9 a Tabulka 5**, ve kterých je zmíněno naopak zachování lesku).

Domnívám se, že je způsobena několika spolupůsobícími nebo zastupujícími se faktory. Schránky ležící volně v substrátu jsou často pokryty jemnými prachovými částicemi či blátem, což způsobuje, že lesk (i kdyby byl zachován), není patrný a ulita působí matným dojmem. Obdobně zmatňujícím způsobem působí rovněž blednutí a obarvení schránek.

Zajímavý fenomén byl objeven díky elektronmikroskopické části studie (rovněž viz Říhová & Juříčková, *submitted*). Zatímco při vizuálním hodnocení fotografií bylo často zaznamenáno odloupení celého periostraka a odhalení povrchu ostraka, při studiu lomů pod velkým zvětšením jsem se několikrát setkala s částečným odloupením periostraka. Schránce chyběla jeho svrchní vrstva, vnitřní byla dosud přichycena k ostraku. Odchlípnutí vnější periostrakální vrstvy bylo zaznamenáno při fotografování lomů ulit r. *Pupilla* a suchomilky *X. obvia*. Při zpracování působily matným dojmem, avšak pocházely z živých jedinců. Pro většinu zkoumaných jedinců rodu *Pupilla* bylo částečné odlupování periostraka natolik typické, že to znemožnilo jejich použití v dílčí studii stavby periostraka a ostraka.

V literatuře jsem se několikrát setkala s konstatováním, že ověřené (*worn, weathered*) schránky či schránky pozbývající čerstvého vzhledu jsou *staré* (Cameron & Morgan-Huws 1975; Rundell & Cowie 2003). Je možné, že za tímto konstatováním stálo především blednutí schránek a ztráta lesku, ať už byla způsobena čímkoliv – například „umazáním“ schránek či částečným nebo plným odlupováním periostraka.

Olupování periostraka je jev natolik významný, že jej mimo malakologů (Barrientos 2000, Menez 2002, Rundell & Cowie 2003, Pearce 2008) zaregistrovali rovněž kurátoři muzejních sbírek. Dochází k němu totiž i na exemplářích uložených v relativně stálém prostředí sbírek. Mortonová (2006) zjistila, že tento jev je působen kolísáním vzdušné vlhkosti.

V pilotním experimentu olupování periostraka postihlo všechny modelové druhy na všech lokalitách (**Tabulky 3 a 4**) a došlo k němu i na schránkách páskovek použitých coby návnada pro půdní houby (**obr. 5 a 6**). Často se vyskytovalo především na ulitách deponovaných v dubohabřině a suťovém lese (**obr. 4**), což je dáno tím, že se jedná o jeden z časných typů poškození (**obr. 15**) a proto jej lze na těchto mírných lokalitách ve větší míře než na ostatních zastihnout i v pozdějších stádiích rozpadu. Jinde je v té době překryto následujícím rozpouštěním odhalených povrchů.

Olupování se projevuje častěji na schránkách velkých modelových druhů (**obr. 9**). Vzhledem k odlišnému průběhu rozkladu malých a velkých schránek je pravděpodobné, že velké druhy jsou chráněny před předčasným rozpouštěním hlavně robustností a tloušťkou stěny schránky. Periostrakum zde plní především stavební funkci, protože je to první součást stěny schránky, která se tvoří a ostrakální vrstvy krystalizují na něm (Checa 2000, Checa et al. 2005). Ulity malých druhů, které mají stěnu schránky celkově výrazně tenčí (**Tabulka 6**), jsou rozpouštěním ohroženy mnohem více a jejich periostrakum plní výrazně ochrannou funkci, což se odráží i v odlišném způsobu rozkladu (**obr. 8**). Je pravděpodobné, že tendence k vícevrstevnému či relativně tlustému periostraku je jedním ze způsobů, jak ochranu vápenatých vrstev posílit. Jsou to právě acidotolerantní plži, kteří takovým periostrakem disponují (z druhů pilotního pokusu *C. aspera* a *N. hammonis*; z dalších měřených plžů *Oxychilus glaber* či *Zoogenetes harpa* – viz **Tabulka 7**). Okénka se mohou objevit i při rozkladu velkých schránek, avšak minoritně. V laboratorním experimentu zkoumajícím houbová společenstva povrchů schránek (Říhová et al. 2014; **obr. 6**) se objevovala především proto, že schránky nebyly mezi jednotlivými odečty ovlivňovány externími mechanicky působícími činiteli a pokud došlo k vytvoření okénka, nebylo toto poničeno, jako je tomu s velkou pravděpodobností při rozkladu ve volné přírodě.

Domnívám se, že narušení periostraka je jedním z úvodních kroků rozkladu schránek a umožňuje rozpouštění vápenatých vrstev. Zajímavé je v tomto směru konstatování Pearce (2008), v jehož experimentu ztráta periostraka vyšší rychlost rozkladu schránky

nepodporovala. Není pravděpodobné, že by to bylo způsobeno nepřesností v měření; možná se však použité robustní silnostěnné druhy rozkládají velmi pomalu bez ohledu na přítomnost periostraka.

Důvody ztráty periostraka je těžké podchytit. Ze studie Mortonové (2006) vyplývá, že je za něj zodpovědné kolísání vlhkosti v prostředí, kde se ulity nacházejí. I v pilotním experimentu schránky ve vlhkých prostředích ztrácely periostrakum intenzivně a také schránky jantarky *S. putris* ponořené ve vodě se začaly na konci experimentu olupovat. Jenže všechny lokality s výraznou ztrátou periostraka jsou nejen podmáčené, ale rovněž značně kyselé a je pravděpodobné, že i nízké pH má na stav periostraka negativní vliv. Výrazně je to patrné na hodnocení stavu schránek z mykologického pokusu (**obr. 5 a 6**).

Dalším potenciálním faktorem by mohlo být kolísání teploty v průběhu dne, neboť ztrátu periostraka zaznamenal i Menez (2002), který však ulity sledoval v mediteránním létě bez srážek. Je možné, že periostrakum reaguje na teplotní změny změnami objemovými a dochází k jeho trhání a praskání.

Nejvýraznější vliv na stav schránek a rychlost jejich úbytku i celkové mizení má **rozpouštění vápenatých vrstev**. Poškození samo již bylo dokumentováno a spojeno s nízkým pH hrabanky a půdy mnoha předchozími autory (Barrientos 2000, Müller et al. 2005, Pearce 2008, Ström et al. 2009, Cernohorsky et al. 2010). Teprve Říhová & Juříčková (*submitted*) detailně popsaly průběh rozpouštění schránek.

Rozpouštění ostraka velkých schránek (**obr. 7**) nejčastěji začíná v místech s narušeným periostrakem. Narušení může být výrazně bodové (**obr. 3J**; *pitting*). Drobné, tečkovité dolíčky se postupně rozšiřují v široké pozvolné důlky (**obr. 3K**) a následně prohlubují v otvory skrz schránku (**obr. 3O**). Pokud došlo nejprve k plošnému odloupení periostraka, vznikají široké mělké dolíčky rovnou. Jakmile jsou vytvořeny otvory skrz schránku, rozpouštění se zrychluje. Narušením vápenatých vrstev se navíc otevírá prostor pro obarvování schránek.

Malé schránky s vytrvalým periostrakem se rozpouští *zevnitř*. Zatímco periostrakum zůstává neporušené, ostrakum pod ním se rozpouští a vznikají průhledná okénka (**obr. 3R a obr. 8**). V krajních případech v extrémních biotopech dochází ke kompletnímu rozpuštění ostraka a prázdné periostrakum (připomínající svlečku hada) je vlivem okolního substrátu pomačkáno a zdeformováno. Tento způsob rozkladu byl popsán v práci Millarové a Waita (2004), kteří však nevyslovili žádnou domněnku o jeho původu. Povšiml si jej rovněž Pearce (2008), který stejně jako Říhová et al. (2018) a Říhová & Juříčková (*submitted*) usoudil, že došlo k chemické korozi zevnitř díky průniku částičky vlhkého substrátu do ulity.

Rychlost rozpouštění a mizení ulity je závislá na její velikosti (Říhová et al. 2018; **obr. 10**). Malé schránky mizí rychleji než schránky velké, které mohou na lokalitě vytrvávat nečekaně dlouho. Pearce (2008) odhaduje délku rozpadu na necelých osm let, k obdobně vysokému odhadu došli Hunt a Oates (1978; str. 419) – přes jedenáct let. Protože i v pilotním experimentu první velké schránky díky rozpouštění začaly mizet po třech letech, souhlasím s relativně vysokými odhady vytrvávání schránek všech zmíněných autorů.

V přirozených podmínkách jsou však schránky poškozovány množstvím dalších faktorů. Jedním z nejdůležitějších je činnost velkých obratlovců, v lesích střední Evropy především divokých prasat. Ta způsobují mnohdy fatální **fragmentaci** (**obr. 3P**), mechanické rozbití schránek. Mohou tak činit jak nevědomě (pošlapem), tak vědomě. Jsou totiž velmi zvědavá a fragmentace zjištěná v pilotním experimentu byla způsobena jejich tendencí zkoumat neznámé objekty v domovských okresech (Meynhardt 1983). Díky činnosti divokých prasat zmizela 3 % schránek (viz Říhová et al. 2018: tabulka 3 na str. 56).

Ve volné přírodě je procento schránek poničených živými organismy vyšší. Krabičky, ve kterých byly schránky uloženy, stejně jako opadové sáčky ve studii Timothyho Pearce (2008), znemožnily přístup dalším organismům, které schránky využívají coby zdroj vápníku a rozklad urychlují. Jejich přehled podává vynikající studie Cadéeho (2016), stejně jako jeho experimentální práce s živými měkkýši způsobujícími bioerozi (Cadée 1999). Mají-li ke schránkám např. plži přístup, mohou jejich rozklad urychlit mnohonásobně. Schránky jimi dokonce mohou být poškozovány již za života (Ožgo a Bogucki 2006). Množství organismů osidluje vnitřní prostory prázdných schránek (pavouci – Hula et al. 2009, Niedobová et al. 2013; mravenci – Bezděčka 2000; samotářské včely – Macek et al. 2012, např. str. 416). Často se však jedná pouze o podnájemníky, kteří schránku obývají a nijak nepoškozují.

Přehledová studie Millarové a Waita (2004) klasifikovala různé typy poškození nalezené na schránkách ve výmladkovém lese. Velká část pozorovaných typů poškození byla způsobena predací různými organismy a stala se rovněž příčinou smrti. Na rozdíl od čerstvých schránek využitých pro studie Říhové a kolegů (2018; *submitted*) tyto schránky již na počátku koroze měly narušené periostrakum i ostrakální vrstvy a nebyly kompletní. Je velmi pravděpodobné, že budou mizet vyšší rychlostí než celistvé schránky jedinců zemřelých stářím. Jakýkoliv odhad délky vytrvání schránky na lokalitě při vyloučení biodegradačních činitelů poskytne delší (dle odhadů Cadéeho (2016) výrazně delší) časové úseky než po jaké schránka na lokalitě skutečně vytrvá. Například ptáci využívají prázdné schránky jako jednoduše dostupný zdroj vápníku pro své vlastní potřeby a „posmrtný predační tlak“ může být především na kalcium chudých lokalitách vysoký (Graveland et al. 1994, Mänd et al. 2000).

Vyjma fragmentace způsobené živočichy byla rovněž zaznamenána **mechanická poškození, pravděpodobně způsobená pohyby okolního substrátu**. Jedná se především o ulamování částí schránky přecházejících obrys – vrcholů a obústí. Vrchol, nejstarší část schránky, je tvořen embryonální ulitkou a má nesmírně fragilní stěnu, díky čemuž je značně náchylný k odlomení. Provlhlé schránky jsou navíc velmi křehké a náchylné k poničení i jemným tlakem. Proto byla fragmentace typická především pro rašelinný bor a olšinu (**obr. 4 a Tabulka 5**), lokality vlhké a v případě periodicky zaplavované olšiny rovněž s výrazným posunem substrátu.

Ačkoliv je jev znám z marinního fosilního záznamu, překvapivým se stalo zjištění, že k terestrickému rozkladu schránek přispívají rovněž rostliny. V průběhu celé pilotní studie byly na površích schránek objevovány zvláštní povrchové otisky, připomínající stopu po plazení červovitého organismu (**obr. 3S, T a U**). „Kolejnička“ tvořená jemným blátem se však často větvila a bylo jasné, že není způsobena například plazením půdních hlístic či máloštětinatců. Teprve v posledním běhu experimentu (po 36 měsících) bylo odhaleno, že se jedná o **stopu doteku kořenů rostlin**. Tam, kde rostlinám chybí nějaká živina, jsou schopné cíleně prodlužovat své kořeny růstem ve směru bodového zdroje deficientní látky (Hodge 2004, De Kroon et al. 2005, Morris et al. 2017). Protože se stopa často objevovala v rašelinném boru, je s velkou pravděpodobností onou živinou vápník, kterého je zde nedostatek.

Stopa po doteku kořenů byla zaznamenána rovněž v experimentu zkoumajícím složení houbových společenstev na površích ulit (Říhová et al. 2014). Překvapivě se tak dalo v miskách s hrabankou z dubohabřiny a suťového lesa. Zatímco hrabanka z dubohabřiny obsahuje vysoké množství vápníku (210 mg/kg), v hrabance ze suťového lesa je ho sotva čtvrtina; méně než v substrátu z olšiny (viz **Tabulka 2**). Pro rostliny jsou nejspíš schránky natolik výhodným zdrojem vápníku, že jej využívají nehledě na vysoký obsah vápníku v okolním substrátu.

Obdobný typ poškození – větvené linie naleptávající povrch schránky – je znám z mořského prostředí (Cutler 1995 a Parsons-Hubbard 2005). Působí jej dotek kořenů mořské trávy

r. *Thalassia* a pokud se na schránkách vyskytne, je jasnou známkou alespoň dočasného pobytu schránky v porostu mořské trávy.

Porostení **houbami** a **houbám podobnými organismy** patří mezi jednu z nejnápadnějších posmrtných změn, ke kterým na povrchu schránek dochází. Zdá se však, že není destruktivní a nepřispívá k jejich rozkladu: houby neberou schránky jako zdroj živin a prvků, pouze jako inertní substrát. Nenarušují ani periostrakum, ani ostrakum (Říhová et al. 2014).

K infestaci houbami dochází časně. Byla pozorována již po šesti měsících i ve všech následujících kontrolách pilotního experimentu, na všech sledovaných biotopech i velikostních kategoriích ulit (**Tabulky 3 a 4**). V laboratorním kultivačním experimentu byly houbové struktury, byť v relativně malé míře, zaznamenány již po třech měsících. Intenzita výskytu hub v pilotním pokusu se v čase zvyšovala (**obr. 15**), což však bylo možná dáno vlhkým počasím při většině odběrů: mycelium je poměrně křehké a lze jej ze schránky snadno mechanicky odstranit, v příhodných vlhkých podmínkách však vyrůstá opakovaně. Ve venkovním prostředí dochází ke koloběhu vzrůstání a (částečné) degradace mycelia, jeho zbytky se na schránce hromadí.

Sliz plžů má antimykotické a antibakteriální vlastnosti (Czeczuga 2000; Zhong et al. 2013, Pitt et al. 2015), což je malakologům empiricky známo. Zatímco schránky živých plžů jsou hub zcela prosté, prázdné ulity jsou jimi pokryty často. Porostení myceliem je díky tomu jedním z nejlepších ukazatelů čerstvosti prázdné schránky: nejpozději do tří měsíců je možné schránky kolonizovat (Říhová et al. 2018).

Jsou-li hodnoceny vizuálně, schránky porůstá několik typů mycelia obvykle připomínajícího tenké, tmavě zbarvené nitky (**obr. 3X**; Říhová & Juříčková, *submitted*). V pilotním pokusu byly zaznamenány čtyři morfotypy, které jsou v **Tabulkách 3 a 4** spojeny do vláknitého (*houbové hyfy*) a uzlíkovitého typu (*aktinomycety*; **obr. 3V**). Molekulárně-biologickými metodami (viz Říhová et al. 2014) byla na schránkách plamatky *A. arbustorum* zjištěna vřeckovýtrusá houba *Arthroderma insingulare* a blíže neurčený zástupce rodu *Geomyces* (rovněž Ascomycota). Spleť na první pohled uniformě vypadajících vláken se při pozorování ve světelném mikroskopu ukázala být směsicí hyf hub vřeko- i stopkovýtrusých.

Laboratorní studie cílená na houbová společenstva čtyř lokalit (Říhová et al. 2014) odhalila mykoasociace mnohem bohatší. Celkem bylo zaznamenáno více než 30 morfotaxonů hub a navíc bylo odhaleno, že jeden z výrazně odlišných morfotypů – bílé uzlíkovité mycelium (**obr. 3V**) – je projevem růstu aktinomycety rodu *Streptomyces*. Bakterie patřící do tohoto rodu jsou nesmírně hojné v půdě a jsou známy především pro schopnost tvorby širokého spektra látek včetně antibiotik. Zajímavé jsou rovněž schopností tvorby tzv. pseudomycelia (Anderson & Wellington 2001, Chater et al. 2010). Při pohledu pouhým okem připomíná hyfy hub, avšak již při malém zvětšení ve světelném mikroskopu je patrné, že je složeno z drobných kulovitých buněk (**obr. 3W**), což umožňuje okamžité rozpoznání.

Houbová společenstva čtyř lokalit (dubohabřina, olšina, suťový les a rašelinný bor) byla navzájem výrazně odlišná (**obr. 13**); nejbohatší společenstva byla zaznamenána v hrabance z olšiny a rašelinného boru (21 druhů). Po třech měsících od začátku experimentu se na schránkách vyskytovalo osm morfotypů hub; nejbohatší společenstva byla zaznamenána po devíti měsících (25 morfotypů). Schránky (barevně polymorfní páskovka *C. hortensis*) byly kolonizovány bez ohledu na svou pigmentaci (Říhová et al. 2014).

Kvůli absenci charakteristických rozmnožovacích struktur a neúspěšnosti kultivace nemohla být mnohá sterilní mycelia určena; v průběhu experimentu však byl popsán zcela nový rod a druh vřeckovýtrusé houby: *Pentaster cepaeophilus* (Koukol & Říhová 2013; viz **obr. 14**). Jeho nezaměnitelná pentaradiální konidia se objevila v hrabance z olšiny a dala mu, stejně jako nezvyklý substrát, jméno.

Tafonomický podpis lokality

Ač to na první pohled není zjevné, protože všechny typy poškození byly zaznamenány ve všech typech lesů, šestice lokalit z pilotního pokusu na schránky působí specificky – vytváří tzv. tafonomický podpis lokality (**obr. 4**). Největší rozdíl je mezi skupinou lokalit výrazně vlhkých a kyselých (olšina, rašelinný bor a smrčina) na straně jedné a lokalitami mnohem suššími (případně vlhkými sezónně) a se spíše alkalickou půdní reakcí na straně druhé (dubohabřina, suťový les a bučina). Rovněž v rámci skupiny kyselých a vlhkých lokalit jsou nejvýraznější interlokalitní rozdíly. Nejmírněji a zároveň nejpodobněji na schránky působí dvojice dubohabřina-suťový les.

Pouze zřídka jsou některé typy poškození charakterističtější pro určité biotopy (**Tabulka 5**; výlučné nebyly pro zkoumané lesy zaznamenány vůbec). Je tomu tak např. v případě výskytu mycelia (především pseudomycelia rodu *Streptomyces*) na schránkách z bučiny nebo prázdného periostraka malých modelových druhů v rašelinném boru. Schránky z olšiny výrazně ztrácí původní zabarvení a blednou.

Nejničivěji na schránky působí rašelinný bor; nejméně korozivní prostředí je v dubohabřině. Vliv lokality na rozklad schránek je nižší než vliv druhu. Zdá se, že vlhkost lokality je důležitější než její pH, vlhkost jistým způsobem zprostředkovává poškození nízkým pH.

Co s prázdnou ulitou?

Vše výše zmíněné směřuje především k zodpovězení otázky: *jak zacházet s prázdnými ulitami?* Pro schopnost odhadu stáří prázdné schránky je nezbytné vzít v potaz vliv jak vnějších faktorů, tak vlastností schránky samé; a rovněž příčinu smrti.

Čerstvé schránky nejsou nikdy porostlé hyfami či hyfám podobnými strukturami. Mají (téměř) dokonale zachované periostrakum a především původní barevný vzor. Výjimkou jsou dlouhověké druhy (ve středoevropském kontextu např. hlemýžď zahradní i menší zástupci čeledi Helicidae, závornatky (Clausiliidae) nebo rod zrnovka (*Pupilla*)), u nichž dochází k oprýskávání periostraka na vrcholu schránky v místech embryonální ulitky. Druhy s periostrakálními výrůstky tyto vlásky často ztrácí; vždy však po nich v periostraku zůstávají viditelné jizvičky. Čerstvě prázdné malé schránky mají průhlednou stěnu, případně zakalení se omezuje na několik teček. I schránky středně velkých druhů (v českém kontextu vše vyjma rodu *Helix*) jsou částečně průsvitné. Pokud se uchovávají v relativně suchém prostředí, průsvitnost vytrvává i půl roku (D. Říhová, *pers. obs.*).

Pokud došlo k destruktivnímu usmrcení predátorem, jsou na čerstvě rozbitých schránkách nápadné ostré hrany v místě rozmáčknutí stěny ulity. Ohlazení těchto hran je výsledkem chemické koroze, rozpouštění, a poukazuje na rozbití před delší dobou. Některá poškození vzniklá predací (především prostrouhání stěny schránky radulou v případě napadení dravou sítkou rodu *Aegopinella* (viz Millar & Waite 2004)) je těžké odlišit od poškození způsobeného bodovým narušením periostraka a následným rozpouštěním ostraka. Nápomocný je v tomto případě celkový stav schránky. Pokud má schránka – stejně jako v případě zcela čerstvých ulit – v bezprostředním okolí poškození zachovalé periostrakum a je průsvitná či dokonce průhledná, došlo k usmrcení nedávno. Pravidlo platí pro malé schránky, protože ty se nejčastěji stávají kořistí rovněž relativně drobných sítovek.

Prázdné schránky postupně ztrácí čerstvý vzhled, malé schránky se zakalují a velké blednou. Pokud mají pigmentované periostrakum (např. *C. aspera*), lze blednutí pozorovat i u malých druhů, je však méně časté než u druhů velkých. Dochází k rozpouštění ostrakálních vrstev, zabarvování a kolonizaci povrchu houbami. Na kyselých a vlhkých lokalitách je rozklad rychlý, zatímco suché bazické lokality umožňují i malým schránkám dlouhodobé uchovávání. Proto je velmi složité stanovit všeobecně platná pravidla zacházení s prázdnými schránkami.

Prázdné drobné schránky (menší než 8 mm) na velmi vlhkých a kyselých lokalitách obvykle nevytrvávají déle než rok a pokud po nich není specificky pátráno, prázdná periostraka neupoutávají pozornost. Prázdné schránky na takových místech můžeme bez obav použít téměř v jakýchkoliv analýzách. Schránky téže velikosti však mohou na bazických a především suchých lokalitách (např. v dubohabřině) vytrvat i několik let (nejméně tři roky) téměř nedotčené rozpouštěním. Je velmi výhodné je využít při inventarizačních průzkumech, protože pomáhají zachytit vzácné druhy s nízkou populační hustotou (viz Thurman et al. 2008 či Cernohorsky et al. 2010), jejich využití v populačně-biologických studiích je však diskutabilní.

Velké schránky ve vlhkém kyselém prostředí ztrácí původní pigmentaci i periostrakum a dochází k masivnímu rozpouštění. Po třech letech i z velkých ulit (*A. arbustorum*) zůstávají pouze silně poničené, těžko determinovatelné fragmenty. Schránky výrazně zachovalejší, avšak na suchých lokalitách, mohou být i několikrát starší.

Je patrné, že využití prázdných ulit má poměrně složitá pravidla. V některých situacích však prázdné schránky mohou výrazně pomoci či je jejich využití nezbytné.

Schránky z hrabankových vzorků (tradiční malakozoologická metoda kvantitativního výzkumu; viz Ložek 1956) ze suchých lesních lokalit mohou být až z poloviny tvořeny „mrtvými jedinci“ – tedy prázdnými schránkami různého stáří. Cameron s Pokryszkovou (2005) doporučují při zpracovávání hrabankových vzorků zachovat tzv. pravidlo desetinásobku. Aby mohl být vzorek považován za relevantní odraz skutečné malakofauny lokality, musí obsahovat 10× více jedinců než je počet zjištěných druhů (nebo alespoň 200 schránek). Dosáhnout takto vysokých čísel je na některých lokalitách při použití pouze živých jedinců nemožné. Využití prázdných schránek je v takových případech jediným východiskem. Populace některých druhů plžů v průběhu roku fluktuují. U plžů čeledi skleněnkovitých (Vitrinidae) jsou populační cykly dobře známy. Ve velkých masách se vyskytují na podzim a po zbytek roku jejich přítomnost dosvědčují pouze prázdné schránky (Umiňsky 1983, Kralka 1986, Horsák et al. 2013). Avšak i další druhy mají proměnlivou populační hustotu. Její přesná dynamika však není dostatečně probádána a v takových případech prázdné schránky dobře dokumentují přítomnost těchto druhů. Totéž platí pro druhy obývajících drobné mikrohabitaty (Schilthuizen 2011) a nedobytné štěrby (Thurman et al. 2008).

Pravděpodobně nejobecnějším pravidlem, které lze použít pro stanovení využitelnosti prázdných schránek, je tzv. *pravidlo čerstvé schránky* (případně *pravidlo nenarušeného periostraka*), některými autory již intuitivně využívané či dokonce vyslovené (Labaune & Magnin 2001, Horsák & Hájek 2003, Cameron & Pokryszko 2005 (str. 541) či Juříčková et al. 2008). Schránky se zchovalým leskem, bez narušeného periostraka (s přihlédnutím k možnému mírnému olupování v oblasti vrcholu u víceletých druhů) a s nepoškozeným barevným vzorem (je-li přítomen); v případě malých druhů schránky s dokonale průhlednou schránkou či přítomností bodového zakalení, lze bez obavy z narušení objektivit analýz použít téměř pro jakýkoliv typ výzkumu. Z výsledků mykologicko-malakologické studie Říhové a spolupracovníků (2014) lze k *pravidlu čerstvé schránky* dodat *pravidlo nepřítomnosti houbových hyf*: jsou-li schránky prosté houbové infestace, jsou velmi pravděpodobně prázdné méně než tři měsíce.

Budoucnost výzkumu rozkladu schránek

Budoucí výzkum rozkladu schránek je vhodné směřovat dvěma směry: experimentálním ověřováním vlivu různých faktorů prostředí na stav schránek a studiem schránky samotné. Ač je to s podivem, mikrostrukturní analýze schránek suchozemských plžů dosud nebyla věnována (na rozdíl od schránek mnohých mořských měkkýšů) téměř žádná pozornost. Přitom právě zde se nejspíše skrývá odpověď na otázku, proč se některé malé druhy rozkládají způsobem natolik nezvyklým, jako je tomu například u ostroútky *Columella aspera*.

Poděkování

Za každým projektem stojí tým realizátorů; idea při jeho vzniku však obvykle pochází z jediné mysli. Výzkum rozkladu schránek je v tomto směru jedinečný díky původně nezávislým a následně propojeným nápadům **Lucie Juříčkové** a **Michala Horskáka**. Nebýt Lucčina všestranného vedení, materiálního zajištění experimentů, závoznícko-převoznických a poradenských služeb a pochopení pro veškeré mé poklesky, nikdy bych práci nedokončila. Michal toto konání doplnil střízlivým statistickým nadhledem a efektivně korigoval mé příliš vzletné či naopak kritické představy.

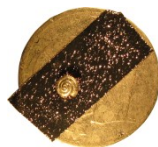
Bez statistické, logické a emoční opory **Zdeňka Janovského** by mé výsledky představovaly pouze neuspořádanou zmeť empirických faktů nezpůsobitelných k publikaci.

Role parataxonomy jsem se zhostila a do práce v mykologické laboratoři pronikla díky spolupráci s **Ondřejem Koukolem**. Společné úsilí bylo korunováno objevem a popisem půvabné půdní mikromycety *Pentaster cepaeophilus*. Za pomoc s určením hub děkuji rovněž **Lukáši Faltejskovi**.

Petr J. Juračka mne uvedl do světa elektronové mikroskopie. Zásluhou jeho nedostižného vzoru a pevného odhodlání **Mirka Hylíše** a **Aničky Holubové** jsem se naučila pracovat se SEM a objevila fascinující svět mikrostruktur měkkýší schránky.

Veliký dík patří servisnímu a realizačnímu týmu – **rodině Říhové** a **Štěpánce Podroužkové** – bez jejichž materiální a logistické podpory by výzkum rozkladů měkkýších schránek jen těžko probíhal. **Jan H. Ponert** a **Stanislav Vosolobě** poskytli materiální oporu části experimentů a jejich postřehy ze zeleného světa posunuly mé chápání průběhu rozkladu měkkýších schránek. Paleontologické zrcadlo neontologickým postřehům dodal **Jakub Prokop**, jemuž budiž vysloveny díky i za patronaci elektronmikroskopické části studie. Kousavé poznámky **Petra Kmenta** se ukázaly být bolestivým, o to však účinnějším zdrojem inspirace. Malakologické trio **Jitka Horáčková-Jana Škodová-Ondřej Korábek** se postaralo o stálý přísun naděje, bláznivých nápadů a sarkastických poznámek stejně jako schránek použitých v dílčích experimentech.

Korespondence s **Gerhardem Cadée** a **Timothy Pearcem** a výsledky jejich bádání mi byly v závěrečné fázi sepisování teze velikou oporou.



Citovaná literatura

- Abramsky Z., Alfia H., Shachak M. et Brand S. **1990**: Predation by rodents and the distribution and abundance of the snail *Trochoidea seetzenii* in the Central Negev Desert in Israel. *Oikos* **59**: 225–234.
- Abramsky Z., Shachak M., Subach A., Brand S. et Alfia H. **1992**: Predator – prey relationships: rodent – snail interaction in the Central Negev Desert of Israel. *Oikos* **65**: 128–133.
- Allgaier Ch. **2007**: Active Camouflage with Lichens in a Terrestrial Snail, *Napaeus (N.) barquini* (Gastropoda, Pulmonata, Enidae). *Zoological Science* **24(9)**: 869–876.
- Allgaier Ch. **2011**: A Hairy Business – Periostracal Hair Formation in Two Species of Helicoid Snails (Gastropoda, Stylommatophora, Helicoidea). *Journal Of Morphology* **272**: 1131–1143.
- Anderson A.S. & Wellington E. **2001**: The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51(3)**: 797–814.
- Appleton C.C. & Heeg J. **1999**: Removal of calcium by *Natalina cafra* (Pulmonata: Rhytidae) from the shells of its prey. *Journal of Molluscan Studies* **65**: 271–273.
- Barrientos Z. **2000**: Population dynamics and spatial distribution of the terrestrial snail *Ovachlamys fulgens* (Stylommatophora: Helicarionidae) in a tropical environment. *Revista de Biología Tropical* **48(1)**: 71–87.
- Bezděčka P. **2000**: Schránky měkkýšů jako příležitostné úkryty mravenců. *Sborník Přírodovědného klubu v Uherském Hradišti* **5**: 115–119.
- Brusca R.C. & Brusca G.J. **2003**: *Invertebrates*, Second Edition, Sinauer Associates, Inc.
- Cadée G.C. **1999**: Bioerosion of shells by terrestrial gastropods. *Lethaia* **32**: 253–260.
- Cadée G.C. **2016**: Decay rates of shells in aquatic and terrestrial habitats, some comments. *Basteria* **80(4–6)**: 193–194.
- Cameron R.A.D. & Morgan-Huws F.L.S. **1975**: Snail faunas in the early stages of a chalk grassland succession. *Biological Journal of the Linnean Society* **7**: 215–229.
- Cameron R.A.D., Mylonas M., Triantis K., Parmakelis A. et Vardinoyannis K. **2003**: Land-snail diversity in a square kilometre of Cretan maquis: modest species richness, high density and local homogeneity. *Journal of Molluscan Studies* **69**: 93–99.
- Cameron R.A.D. & Pokryszko B.M. **2005**: Estimating the species richness and composition of land mollusc communities: problems, consequences and practical advice. *Journal of Conchology* **38(5)**: 529–547.
- Cernohorsky N.H., Horsák M. et Cameron R.A.D. **2010**: Land snail species richness and abundance at small scales: the effects of distinguishing between live individuals and empty shells. *Journal of Conchology* **40(2)**: 233–241.
- Cutler A.H. **1995**: Taphonomic implications of shell surface textures in Bahia la Choya, northern Gulf of California. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **114**: 219–240.
- Czeczuga B. **2000**: Zoospore fungi growing on freshwater molluscs. *Polish Journal of Environmental Studies* **9(3)**: 151–156.
- Dauphin Y. & Denis A. **2000**: Structure and composition of the aragonitic crossed lamellar layers in six species of Bivalvia and Gastropoda. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **126**: 367–377.
- Davies P. **2008**: *Snails: Archaeology and Landscape Change*. Oxbow Books.
- De Kroon H., Huber H., Stuefer J.F. et Van Groenendael J.M. **2005**: A modular concept of phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist* **166**: 73–82.

- de Winter A. & Gittenberger E. **1998**: The land snail fauna of a square kilometer patch of rainforest in southwestern Cameroon: high species richness, low abundance and seasonal fluctuations. *Malacologia* **40** (1–2): 231–250.
- Dvořák Z., Mach K., Prokop J. et Knor S. **2010**: *Třetihorní fauna severočeské hnědouhelné pánve*. Granit Praha.
- Emberton K.C., Pearce T.A. et Randalana R. **1996**: Quantitatively sampling land-snail species richness in Madagascan rainforests. *Malacologia* **38**(1–2): 203–212.
- Evans J.G. **1972**: *Land Snails in Archaeology*. Seminar Press London and New York.
- Giokas S., Pafilis P. et Valakos E. **2005**: Ecological and physiological adaptations of the land snail *Albinaria caerulea* (Pulmonata: Clausiliidae). *Journal of Molluscan Studies* **71**: 15–23.
- Graveland J., van der Wal R., van Balen J.H. et van Noordwijk A.J. **1994**: Poor reproduction in forest passerines from decline of snail abundance on acidified soils. *Nature* **368**: 446–448.
- Hall E.S. & Packham R.F. **1965**: Coagulation of Organic Colour with Hydrolyzing Coagulants. *Journal (American Water Works Association)* **57**(9): 1149–1166.
- Hodge A. **2004**: The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* **162**: 9–24.
- Hotopp K.P. **2002**: Land snails and soil calcium in Central Appalachian Mountain forest. *Southeastern Naturalist* **1**(1): 27–44.
- Horsák M. & Hájek M. **2003**: Composition and species richness of molluscan communities in relation to vegetation and water chemistry in the Western Carpathian spring fens: the poor-rich gradient. *Journal of Molluscan Studies* **69**: 349–357.
- Horsák M., Juříčková L. et Pícka J. **2013**: *Molluscs of the Czech and Slovak Republics*. Kabourek Press Zlín.
- Hou D.F., Zhou G.S. et Zheng M. **2003**: Conch shell structure and its effect on mechanical behaviours. *Biomaterials* **25**(4): 751–756.
- Hula V., Niedobová J. et Košulič O. **2009**: Overwintering of spiders in land-snail shells in South Moravia (Czech Republic). *Acta Musei Moraviae, Scientiae biologicae* **94**: 1–12.
- Hunt S. & Oates K. **1978**: Fine structure and molecular organization of the periostracum in a gastropod mollusc *Buccinum undulatum* L. and its relation to similar structural protein systems in other invertebrates. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **283**: 417–459.
- Chater K.F., Biró S., Kye Joon L., Palmer T. et Schrempf H. **2010**: The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews* **34**(2): 171–98.
- Checa A. **2000**: A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissue and Cell* **32**(5): 405–416.
- Checa A., Rodríguez-Navarro A.B. et Esteban-Delgado F.J. **2005**: The nature and formation of calcitic columnar prismatic shell layers in pteriomorphian bivalves. *Biomaterials* **26**: 6404–6414.
- Juříčková L., Horsák M., Cameron R.A.D., Hylander K., Míková A., Hlaváč J.Č. et Rohovec J. **2008**: Land snail distribution patterns within a site: The role of different calcium sources. *European Journal of Soil Biology* **44**: 172–179.
- Juříčková L., Horsák M., Horáčková J., Abrahám V. et Ložek V. **2014**: Patterns of land-snail succession in Central Europe over the last 15, 000 years: main changes along environmental, spatial and temporal gradients. *Quaternary Science Reviews* **93**: 155–166.
- Kerney M.P., Cameron R.A.D. et Jungbluth J.H. **1983**: *Die Landschnecken Nord- und Mitteleuropas. Ein Bestimmungsbuch für Biologen und Naturfreunde*. Verlag Paul Parey. Hamburg und Berlin.
- Kidwell S.M., Rothfus T.A. et Best M.M.R. **2001**: Sensitivity of taphonomic signatures to sample size, sieve size, damage scoring system, and target taxa. *Palaios* **16**: 26–52.

- Koukol O. & Říhová D. **2013**: *Pentaster cepaeophilus* gen. et sp. nov. described from surface of empty shells of *Cepaea hortensis*. *Nova Hedwigia* **96(3–4)**: 495–500.
- Kralka R.A. **1986**: Population characteristics of terrestrial gastropods in boreal forest habitats. *American Midland Naturalist* **115**: 156–164.
- Labaune C. & Magnin F. **2001**: Land snail communities in mediterranean upland grasslands: the relative importance of four sets of environmental and spatial variables. *Journal of Molluscan Studies* **67**: 463–474.
- Lisický M.J. **1991**: *Mollusca Slovenska*. Bratislava: Veda, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied.
- Ložek V. **1956**: *Klíč československých měkkýšů*. Bratislava: Vydavatelstvo Slovenskej Akadémie vied.
- Ložek V. **1964**. *Quartärmollusken der Tschechoslowakei*. Verlag der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha.
- Ložek V. **1973**: *Příroda ve čtvrtohorách*. Academia, nakladatelství Československé akademie věd.
- Macek J., Straka J., Bogusch P., Dvořák L., Bezděčka P. et Tyrner P. **2012**: *Blanokřídli České republiky I. – žahadloví*. Academia Praha.
- Mänd R., Tilgar V. et Leivits A. **2000**: Calcium, snails, and birds: a case study. *Web Ecology* **1**: 63–69.
- Marin F. & Luquet G. **2004**: Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus Palevol* **3**: 469–492.
- Menez A. **2002**: The degradation of land snail shells during the annual dry period in a Mediterranean climate. *Iberus* **20(2)**: 73–79.
- Meynhardt H. **1983**: *Mezi divočáky*. 1. vydání. Nakladatelství Panorama Praha.
- Millar A.J. & Waite S. **2004**: Patterns of shell damage among snails from a coppice woodland in Sussex, England. *Journal of Conchology* **38(4)**: 421–440.
- Morris E.C., Griffiths M., Golebiowska A., Mairhofer S., Burr-Hersey J.G.T., von Wangenheim D., Atkinson B., Sturrock C.J., Lynch J.P., Vissenberg K., Rizt K., Wells D.M., Mooney S.J. et Bennett M.J. **2017**: Shaping 3D Root System Architecture. *Current Biology* **27(17)**: R919–R930.
- Morton J. **2006**: The effect of relative humidity on mollusc periostracum and the use of coatings to prevent loss. *Collection Forum* **20(1–2)**: 67–82.
- Müller J., Strätz Ch. et Hothorn T. **2005**: Habitat factors for land snails in European beech forests with a special focus on coarse woody debris. *European Journal of Forest Research* **124**: 233–242.
- Niedobová J., Hula V. et Košulič O. **2013**: Prázdné ulity plžů a tajemství, která skrývají. *Živa* **1**: 26–28.
- Nyffeler M. & Symondson W.O. **2001**: Spiders and harvestmen as gastropod predators. *Ecological Entomology* **26**: 617–628.
- Orr G.F. **1969**: Keratinophilic fungi isolated from soils by a modified hair bait technique. *Sabouraudia* **7(2)**: 129–134.
- Ožgo M. & Bogucki Z. **2006**: Shell predation and cannibalism in land snails living on acid and calcium-deficient soils. *Folia Malacologia* **14(4)**: 217–220.
- Parsons-Hubbard K. **2005**: Molluscan taphofacies in recent carbonate reef/lagoon systems and their application to sub-fossil samples from reef cores. *Palaios* **20**: 175–191.
- Pearce T.A. **2008**: When a snail dies in the forest, how long will the shell persist? Effect of dissolution and micro-bioerosion. *American Malacological Bulletin* **26(1/2)**: 111–117.
- Perry Ch.T. & Smithers S.G. **2006**: Taphonomic signatures of turbid-zone reef development: Examples from Paluma Shoals and Lugger Shoal, inshore central Great Barrier Reef, Australia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **242**: 1–20.

- Pfenninger M., Hrabáková M., Steinke D. et Dèpraz A. **2005**: Why do snails have hairs? A Bayesian inference of character evolution. *BMC Evolutionary Biology* **5:59** (11 str.).
- Pitt S.J., Graham M.A., Dedi C.G., Taylor-Harris P.M. et Gunn A. **2015**: Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail *Helix aspersa*. *British Journal of Biomedical Science* **72(4)**:174–178.
- Rundell R.J. & Cowie R.H. **2003**: Preservation of species diversity and abundances in Pacific island land snail death assemblages. *Journal of Conchology* **38(2)**: 155–163.
- Říhová D. **2007**: *Vliv různých vegetačních poměrů v lesích na rozklad ulit plžů*. Bakalářská práce, PřF UK Praha.
- Říhová D., Janovský Z. et Koukol O. **2014**: Fungal communities colonising empty *Cepaea hortensis* shells differ according to litter type. *Fungal Ecology* **8**: 66–71.
- Říhová D., Janovský Z., Horsák M. et Juříčková L. **2018**: Shell decomposition rates in relation to shell size and habitat conditions in contrasting types of Central European forests. *Journal of Molluscan Studies* **84(1)**: 54–61.
- Říhová D. & Juříčková L. **submitted**: Degradation characteristics of empty land snail shells in Central European temperate forests. *Folia Malacologica*
- Saleuddin A.S.M. **1971**: Fine structure of normal and regenerated shell of *Helix*. *Canadian Journal of Zoology* **49**: 37–41.
- Schilthuizen M., Chai H. et Kimsin T.E. **2003**: Abundance and diversity of land-snails (Mollusca: Gastropoda) on limestone hills in Borneo. *The Raffles Bulletin of Zoology* **51(1)**: 35–42.
- Schilthuizen M. **2011**: Community ecology of tropical forest snails: 30 years after Solem. *Contributions to Zoology* **80**: 1–15.
- Sólymos P., Kemencei Z., Páll-Gergely B., Farkas R., Vilisics F. et Hornung E. **2009**: Does shell accumulation matter in micro-scale land snail surveys? *Malacologia* **51(2)**: 389–393.
- Staff G.M. & Powell E.N. **1990**: Local variability of taphonomic attributes in a parautochthonous assemblage: can taphonomic signature distinguish a heterogeneous environment? *Journal of Paleontology* **64(4)**: 648–658.
- Ström L., Hylander K. et Dynesius M. **2009**: Different long-term and short-term responses of land snails to clear-cutting of boreal stream-side forests. *Biological Conservation* **142**: 1580–1587.
- Suzuki M., Kogure T., Weiner S. et Addadi L. **2011**: Formation of Aragonite Crystals in the Crossed lamellar Microstructure of Limpet Shells. *Crystal Growth & Design* **11**: 4850–4859.
- Thurman C.F., Shackleton L.P. et Haskell D.G. **2008**: Does the Density of Dead Shells Predict the Density of Living *Anguispira cumberlandiana* Lea, 1840 (Gastropoda: Discidae)? *The American Midland Naturalist* **159(2)**: 478–481.
- Umiński T. **1983**: Vitrinidae (Mollusca, Gastropoda) of Poland. Their density and related problems. *Annales Zoologici* **37**: 289–311.
- van der Sanden W.A.B. **1992**: *Through Nature to Eternity: The Bog Bodies of Northwest Europe*. Batavian Lion International.
- Watabe N. **1988**: Shell structure. In: Wilbur K.M. ed. *The Mollusca vol. 11: Form and Function*. Academic Press, Inc., pp. 69–104.
- Zhong J., Wang W., Yang X., Yan X. et Liu R. **2013**: A novel cysteine-rich antimicrobial peptide from the mucus of the snail of *Achatina fulica*. *Peptides* **39**: 1–5.

Příloha

Koukol O. a Říhová D. 2013: *Pentaster cepaeophilus* gen. et sp. nov. described from surface of empty shells of *Cepaea hortensis*. *Nova Hedwigia* **96(3–4)**: 495–500.

Říhová D., Janovský Z. a Koukol O. 2014: Fungal communities colonising empty *Cepaea hortensis* shells differ according to litter type. *Fungal Ecology* **8**: 66–71.

Říhová D., Janovský Z., Horsák M. a Juříčková L. 2018: Shell decomposition rates in relation to shell size and habitat conditions in contrasting types of Central European forests. *Journal of Molluscan Studies* **84**: 54–61.

Říhová D. a Juříčková L. (*submitted*): Degradation characteristics of empty land snail shells in Central European temperate forests. Manuskript, zaslán do časopisu *Folia Malacologica*.

Říhová D. a Juračka P.J. 2010: Příběhy z elektronového mikroskopu 3. Jakou mají měkkýši strukturu své schránky. *Živa* **3**: 121–122.





Pentaster cepaeophilus* gen. et sp. nov. described from surface of empty shells of *Cepaea hortensis

Ondřej Koukol^{1*} and Dagmar Říhová²

¹ Department of Botany, Charles University in Prague, Benátská 2, CZ-128 01 Prague, Czech Republic

² Department of Zoology, Charles University in Prague, Viničná 7, CZ-128 44 Prague, Czech Republic

With 2 figures

Abstract: *Pentaster cepaeophilus* gen. et sp. nov. (Pezizomycotina inc. sed.) is proposed for a fungus colonizing surface of empty shells of the land snail *Cepaea hortensis*. The genus is characterised by melanised, multiseptate staurosporous conidia with five arms seceding rhexolytically. The conidia are unique in that two arms form a central axis and three arms stretch from its centre. The morphological similarity to *Tripospermum* and *Tetraposporium* is discussed.

Key words: anamorphic ascomycete, Gastropoda, pentaradiate conidia, alder alluvial forest.

Introduction

Staurosporous hyphomycetes are typical colonizers of decaying leaf litter from plants growing along streams with running water (Mueller et al. 2004). Their conidia are mostly formed by four stretched arms (tetraradiate conidia) that ensure attachment to a substrate by at least three points. The conidium in this position is quickly and firmly attached to the substrate before germination (Kendrick 2003).

Rarely, these fungi were also recovered from rainfall collected beneath canopies of mature forests or from rain-washed tree trunks at localities far from streams (Mueller et al. 2004). In our study, a distinct staurosporous hyphomycete was found on empty shells of *Cepaea hortensis* (O.F.Müller, 1774) (nomenclature according to Horsák et al. 2010) cultivated on litter from alder alluvial forest during an experimental study

*Corresponding author: ondrej.koukol@natur.cuni.cz

of microfungi associated with empty gastropod shells (Říhová & Koukol, unpubl. results). The litter was not cultivated underwater nor was a well-aerated stream in close vicinity to the sampling locality.

Conidia of this fungus differ in a number of features from conidia of known genera and therefore a new genus is proposed to accommodate the studied fungus.

Material and methods

Litter from alder alluvial forest was collected in Benešův Luh forest (48°46'39.3"N, 13°51'59.5"E, 430 m a.s.l.) between Bratronice and Chyňava (Czech Republic). The litter was periodically flooded from a nearby mesotrophic brook before sampling for the experiment. For the purpose of this experiment, shells of *Cepaea hortensis* were collected in The Botanical Garden of the Charles University in Prague (Czech Republic), but this gastropod species occurs naturally in Benešův Luh forest (D.Říhová, personal observation).

Litter with empty shells was placed into glass Petri dishes (16 cm in diam.) and kept at 15/16°C day/night regime in dark. The fungus was observed after 4 months of cultivation on the surface of several shells. Attempts to isolate the fungus into pure culture were not successful. Conidia picked by a sterile needle under a dissecting microscope and placed on various natural agar media were overgrown by contaminating microfungi.

For light microscopy, fungal structures were mounted in Melzer's reagent and examined with differential interference contrast (Olympus BX-51 with digital camera). Pictures were further enhanced using the Helicon Focus and Adobe Photoshop programs. Microscopic measurements are reported as the mean \pm standard deviation (values of 20 measurements). The holotype specimen is deposited in PRM (Herbarium of the Prague National Museum, Czech Republic).

Taxonomy

Pentaster Koukol gen. nov.

Mycobank Accession Number: MB 564336

ETYMOLOGY: *Pentaster* = referring to the overall appearance of conidia resembling a star with five arms.

Anamorphic fungus, hyphomycete, saprotrophic. On the natural substrate mycelium superficial, conidiophores micronematous. Conidiogenous cells terminal. Conidia solitary, pentaradiate, multiseptate, composed of main axis and three arms, arms stretching from the centre of the main axis, straight, tapering. Conidia secede rhexolytically.

SPECIES TYPICA: *Pentaster cepaeophilus* Koukol sp. nov., see below.

***Pentaster cepaeophilus* Koukol, sp. nov.**

Figs 1–2

Teleomorph – anamorph connection: unknown.

Mycobank Accession Number: MB 564337

Vegetative hyphae brown, septate, 4.5–9 μ m wide, forming a loose network on the surface of the substrate. Conidiogenous cells determinate, monoblastic, terminal,

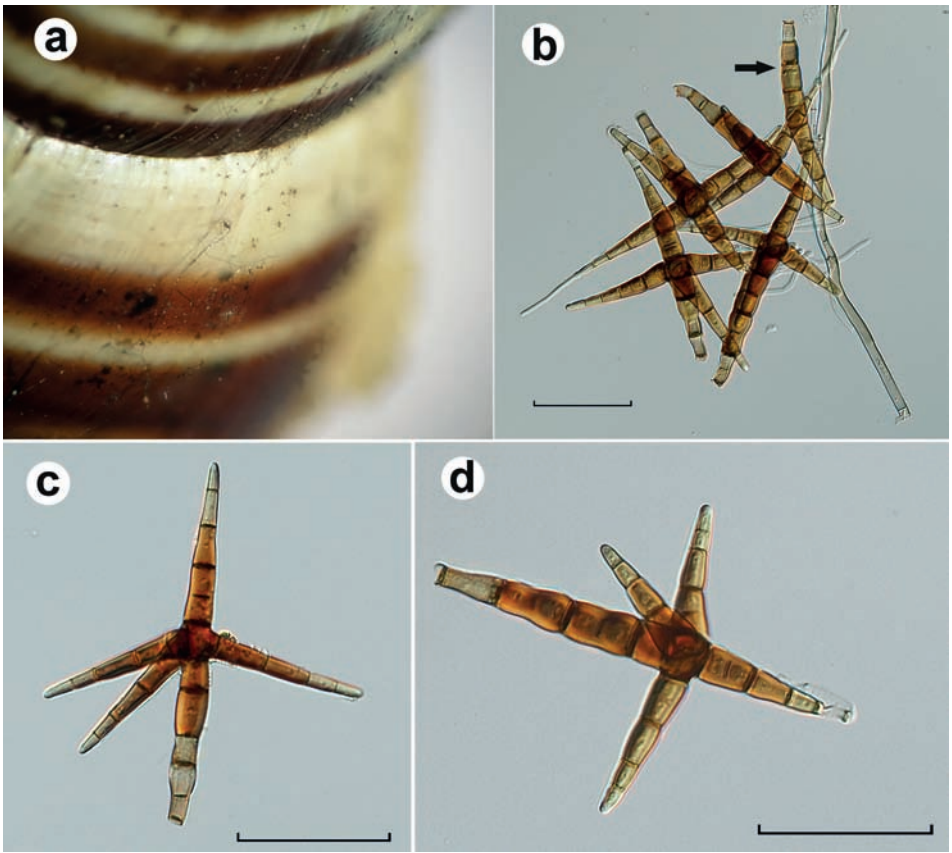


Fig. 1. *Pentaster cepaeophilus*. a. Mycelium with conidia on the shell of *Cepaea hortensis*. b. Conidia (some of them germinating from apical cells) and vegetative hyphae. Note the conidium without side arms (see arrow). c–d. Two mature detached conidia (Bars = 50 μ m).

5–7 μ m wide. Conidia pentaradiate, dark brown in the middle, paler towards the base and the tip. Central axis straight, reaching (98.5)107–136(160) μ m length and (10)11.5–15.5(17.5) μ m width in the middle, 7–10-septate. Three arms stretching in plane approximately orthogonal to the conidium axis from the middle cell, straight, (35)47–62(70) μ m long and (7.5)9.5–12(14) μ m wide at the base, 3–5-septate. Apical cells of the central axis and arms hyaline to subhyaline, tapering towards 2.5–5.5 μ m. Conidia germinate from terminal cells of each of the arms with hyaline hyphae 2.5–3.5 μ m wide.

HOLOTYPE: On surface of empty shell of *Cepaea hortensis* on litter from alder alluvial forest sampled in Benešův Luh forest between Bratronice and Chyňava (Czech Republic), 30 Nov 2011, leg. O.Koukol & D.Řihová (PRM899945).

ETYMOLOGY: *cepaeophilus* = referring to the substrate, gastropod of the genus *Cepaea*.

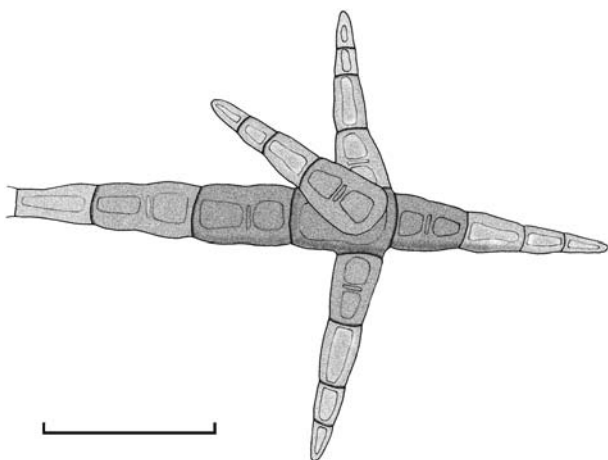


Fig. 2. Mature detached conidium of *Pentaster cepaeophilus* (Bar = 50 μm).

Discussion

Pentaster cepaeophilus is characterized by production of strictly pentaradiate conidia that consist of a central axis and three arms stretching from its centre. The conidium is symmetrical along a mirror plane cutting through the centre of the central axis and one arm. Microfungi forming strictly or predominantly pentaradiate conidia are rather rare compared to the more common tetra- or hexaradiate shape. Batista (1957) described the monotypic genus *Pentaposporium* that was characterised by pentaradiate conidia formed on erect conidiophores. According to the protologue, conidia of *P. furcoryae* Bat. reached the same dimensions as conidia of *P. cepaeophilus*, but were produced on erect conidiophores and were constricted at the septa (Batista 1957). We did not study the type collection, but we incline to the opinion of Hughes (1976), who considered the species to belong to *Tripospermum* based on the dominant presence of tetra- or hexaradiate conidia and phialides of the *Phialophora*-like synanamorph in the type collection. Pentaradiate conidia present in the collection most probably resulted from aberrant division of the conidium (Hughes 1976). *Dwayangam quadricauda* (Drechsler) Subram. also produces conidia that at maturity have five arms, but they are hyaline and have a completely different symmetry (Drechsler 1961). Various other species forming predominantly tetra- or hexaradiate conidia may occasionally produce conidia with five arms, such as *Qaudricladium aquaticum* Nawawi & Kuthub. (Nawawi & Kuthubutheen 1989) or *Tulipispora ingoldii* Révay & Gönczöl (Révay et al. 2009), but they are all hyaline and their arms are constricted at the base. Among species with melanised conidia, in *Tripospermum* four arms typically stretch from two central cells, but conidia with prolonged stalk cells, such as at *T. myrti* (Lind) S. Hughes, may be considered as pentaradiate (Matsushima 1975). Nevertheless, *Pentaster* differs from *Tripospermum* in the symmetry of conidia and presence of the central axis.

The absence of distinct conidiophores and production of terminal multiradiate brown conidia shows morphological similarity to *Tetrabrunneospora*, but conidia in this genus are strictly tetra- or hexaradiate. Their shape results from growth of a primordium in one axis, its septation followed by elongation and septation of the distal cell in three axes (Dyko 1978). It is not known whether the three arms of *P. cepaeophilus* grow from the central cell simultaneously with the axis, or the axis is first formed and then the central cell produces three lateral arms. The latter would be supported by rare presence of conidia without lateral arms (Fig 1b). On the other hand, these conidia may be aberrant.

Pentaster resembles also *Tetrasporium* that has integrated conidiogenous cells and one arm of the conidium is stretched in its axis, but the conidiogenous cell is denticulate and conidia are only tetra- or hexaradiate (Ellis 1971).

Setae that occur on the subiculum of some ascomycetes (*Crassochaeta*, Réblová 1999) and basidiomycetes (*Asterostroma*, Suhara et al. 2010) may be also similar to staurospores and brown to dark brown. However, setae in these genera are variable in number of branches, nonseptate and never germinate as conidia.

Conidia of *Pentaster* are released rhexolytically, each conidium has a remnant of the conidiogenous cell on the basal cell of the central axis (Fig. 2). Though conidia did not germinate on agar plates, we observed germination of conidia on the substrate (Fig. 1b). Apical cells of one or several arms simultaneously produced hyaline mycelium. This confirms the role of the arms in attachment to the substrate (Kendrick 2003).

Pentaster cepaeophilus seems to have a substrate affinity towards the proteinaceous material or the calcareous microstructures present in gastropod shells. Mycelial nets with conidia were found on about 20 shells resting on the litter. Sterile brown mycelium probably belonging to *P. cepaeophilus* was observed also on the litter particles, but no conidia were visible under the dissecting microscope to confirm the connection.

Acknowledgements

We thank to Dr. David Minter and Dr. Ludmila Marvanová for valuable comments on the fungus. This study was supported by the Grant Agency of the Charles University in Prague (project no. 62109) and by the grant SVV-2012-265 206.

References

- BATISTA, A.C. 1957: Novos géneros e espécies de fungos imperfeitos. – *Rev. Biol.* **1**: 97–112.
- DRECHSLER, C. 1961: Some clampless hyphomycetes predacious on nematodes and rhizopods. – *Sydowia* **15**: 9–25.
- DYKO, B.J. 1978: New aquatic and water-borne hyphomycetes from the southern Appalachian Mountains of the United States. – *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **70**: 409–416.
- ELLIS, M.B. 1971: Dematiaceous Hyphomycetes. – *Commonwealth Mycol. Inst., Kew.*
- HORSÁK, M., L. JUŘIČKOVÁ, L. BERAN, T. ČEJKA & L. DVOŘÁK 2010: Annotated list of mollusc species recorded outdoors in the Czech and Slovak Republics. – *Malacologica Bohemoslovaca*, **Suppl. 1**: 1–37.

- HUGHES, S.J. 1976: Sooty molds. – *Mycologia* **68**: 693–820.
- KENDRICK, B. 2003: Analysis of morphogenesis in hyphomycetes: new characters derived from considering some conidiophores and conidia as condensed hyphal systems. – *Can. J. Bot.* **81**: 75–100.
- MATSUSHIMA, T. 1975: *Icones Microfungorum A Matsushima Lectorum*. – Kobe, Japan.
- MUELLER, G.M., G.F. BILLS & M.S. FOSTER 2004: Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. – Acad. Press, San Diego.
- NAWAWI, A. & A.J. KUTHUBUTHEEN 1989: *Quadricladium aquaticum* gen. et sp. nov., an aquatic hyphomycete with tetradiate conidia. – *Mycotaxon* **34**: 489–495.
- RÉBLOVÁ M. 1999: Studies in *Chaetosphaeria* sensu lato IV. *Crassochaeta* gen. nov., a new lignicolous genus of the Trichosphaeriaceae. – *Mycotaxon* **71**: 45–67.
- RÉVAY, A., J. GÖNCZÖL & E. DESCALS 2009: *Tulipispora ingoldii* (Hyphomycetes) gen. et sp. nov. from submerged wood. – *Nova Hedwigia* **88**: 41–48.
- SUHARA, H., N. MAEKAWA, S. USHIJIMA, K. KINJO & Y. HOSHI 2010: *Asterostroma* species (Basidiomycota) from mangrove forests in Japan. – *Mycoscience* **51**: 75–80.

Manuscript received February 14, 2012, accepted August 17, 2012.

available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funeco

Fungal communities colonising empty *Cepaea hortensis* shells differ according to litter type



Dagmar ŘÍHOVÁ^a, Zdeněk JANOVSKÝ^b, Ondřej KOUKOL^{b,*}

^aDepartment of Zoology, Charles University in Prague, Faculty of Science, Viničná 7, CZ-128 44 Prague, Czech Republic

^bDepartment of Botany, Charles University in Prague, Benátská 2, Faculty of Science, CZ-128 01 Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2012

Revision received 27 November 2013

Accepted 17 January 2014

Available online 22 February 2014

Corresponding editor:

John Dighton

Keywords:

Broadleaved litter

Central Europe

Coniferous litter

Gastropoda

Saprotrophic fungi

ABSTRACT

Soil and litter fungi can colonise and decompose many natural materials, including highly resilient proteinaceous compounds of animal origin. The shells of terrestrial gastropods are formed from such a compound (conchiolin) combined with inorganic calcium carbonate. In this study, we investigated fungal communities colonising empty shells of the common terrestrial gastropod *Cepaea hortensis*. Shells were exposed on the surface of litter from four different forest types (alder alluvial, oak-hornbeam, peat-bog pine and scree forest) and the fungi were surveyed and identified in four 3-month periods. We found 27 fungal species, one fungus forming mycelial cords, seven types of sterile mycelium and streptomycetes colonising the shells. The most frequent fungal species identified were common soil fungi. Multivariate analysis revealed a significant effect of the litter type on the fungal community. Humidity and pH at the locality are likely to be more important for fungal communities than the proteinaceous material of the shell.

© 2014 Elsevier Ltd and The British Mycological Society. All rights reserved.

Introduction

Saprotrophic fungi, together with bacteria, act as decomposers of various natural compounds of animal origin in terrestrial ecosystems. Their pivotal role in the decomposition of epidermal derivatives containing the highly resilient protein keratin is widely accepted (Onifade et al., 1998; Scott and Untereiner, 2004; Currah et al., 1996). Gastropod shell represents a less common animal-derived substratum with multi-layered structure composed of inorganic calcium carbonate covered by organic periostracum. This thin organic layer is composed of conchiolin, a protein related to keratin (Hunt and Oates, 1978; Watabe, 1988; Goffer, 2007). Although empty

shells contribute very little to the organic matter in the soil, they represent a specific substratum in animal matter that combines inorganic and organic materials.

Compared with the intensively studied fungi associated with feathers, hair and bone, fungi growing on the shells of terrestrial gastropods have received little attention. Among molluscs, most attention has been paid to economically important marine bivalves and their roles as hosts or transmitters of pathogenic fungi (Kohlmeyer, 1969; Friedman et al., 1997; Pirkova and Demenko, 2008) and fungus-like thraustochytrids (Porter and Lingle, 1992). Prior to this study, only one study investigated the fungi and oomycetes that colonised the shells of freshwater molluscs (Czeczuga, 2000).

* Corresponding author. Tel.: +420 221 951 650; fax: +420 221 951 645.

E-mail address: ondrej.koukol@natur.cuni.cz (O. Koukol).

1754-5048/\$ – see front matter © 2014 Elsevier Ltd and The British Mycological Society. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2014.01.002>

Fungi isolated from the shells of aquatic molluscs utilise different substrates. Freshwater fungi, oomycetes and thraustochytrids typically utilise conchiolin (Porter and Lingle, 1992; Czezcuga, 2000; Golubic et al., 2005), whereas marine fungi exploit the calcareous parts of the shell (Porter and Zebrowski, 1937; Kohlmeyer, 1969). Traces left by endolithic fungi have been observed from fossilised shells (Porter and Zebrowski, 1937; Cavaliere and Alberte, 1970; Golubic et al., 2005) and also from recent shell fragments in calcareous sands (Friedman et al., 1997; Golubic et al., 2005).

Little, if anything, has been published on the fungal colonisation and decomposition of the shells of terrestrial gastropods. Living gastropods are likely to be protected by fungicide in their slime (Czezcuga, 2000), but empty shells would not be protected from fungal colonisation. Indeed, lichenised fungi have been found growing on empty shells (Peake and James, 1967). Unpublished records contain reports of unknown fungi colonising the empty shells of various gastropod species found in an alluvial environment (Horáčková J., pers. comm.). Additionally, the fungus *Trichophyton* sp. has been observed on *Arianta arbustorum* shells (Faltejsek L., pers. comm.), and an unknown member of *Trichocomaceae* has been found on the shells of *Powelliphanta* and *Paryphanta* species in New Zealand (Anonymous, 2012).

The primary aim of our study was to characterize the fungal communities associated with empty shells of a common forest land snail *Cepaea hortensis* exposed on litter from four different forest types. We hypothesised that the fungal community would differ over time and among forest types. Secondly, we wanted to find out whether fungal colonisation would affect the decomposition of these shells.

Material and methods

Site description

Four temperate forest localities in the Czech Republic differing in vegetation cover, soil type, pH and humidity (Table 1) were chosen: alder (*Alnus glutinosa*) alluvial forest, oak-hornbeam (*Quercus* sp., *Carpinus betulus*) forest, peat-bog pine (*Pinus* spp.) forest and scree forest. The alder alluvial forest differed from the other localities in relatively high ground water level throughout the whole year in the sampling location.

Leaf litter and the partially underlying organic horizon were collected from all of the localities on Nov. 26th 2010 in sterile plastic bags. In the laboratory, the collected soil was sieved through a 1 cm mesh and immediately distributed into sterile glass Petri dishes (16 cm in diam., 70 g per dish).

C. hortensis (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae) was chosen because this open forest species is common across Western and Central Europe and Northern America (Kerney et al., 1983; Pearce et al., 2010). Additionally, this species was repeatedly observed in the studied localities. Its shells reach sizes of up to 20 mm in diameter and can easily be obtained in large numbers. For the purpose of this experiment, shells were collected in the Botanical Garden of the Charles University in Prague (Czech Republic). This species occurs in three basic colour forms (yellow, pink and banded), and all forms were used in this study (yellow – 63 shells, pink – 33 shells, banded – 64 shells).

Table 1 – Description of the studied forest localities, including soil pH and the amount of calcium (Ca)

Forest type	Coordinates	Location	Altitude (m a.s.l.)	Soil pH ^a	Ca ^b (mg)	Average monthly precipitation (mm)	Dominant tree species	Dominant undergrowth	Soil type
Alder alluvial forest	50° 02' 39" N, 14° 02' 00" E	Between Bratronice and Chynava	430	4.30	73.58	39.5	<i>Alnus glutinosa</i> , <i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Anemone nemorosa</i> , <i>Carex</i> spp., <i>Chrysosplenium alternifolium</i> , <i>Rubus</i> spp.	Haplic gleysols
Oak-hornbeam forest	49° 57' 25" N, 14° 09' 06" E	Doutnáč hill near Bubovice	420	7.22	209.80	42.3	<i>Carpinus betulus</i> , <i>Quercus</i> sp., <i>Tilia cordata</i>	<i>Lathyrus vernus</i> , <i>Galium odoratum</i>	Rendzic leptosols
Peat-bog pine forest	49° 39' 28" N, 15° 53' 12" E	Near Radostín	600	3.52	27.39	71.5	<i>Picea abies</i> , <i>Pinus</i> spp.	<i>Vaccinium myrtillus</i> , <i>V. vitis-idaea</i>	Haplic histosols
Scree forest	49° 55' 15" N, 13° 50' 59" E	Near Točnák	450	5.61	50.92	41.2	<i>Acer platanoides</i> , <i>Fagus sylvatica</i> , <i>T. cordata</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i> , <i>Galeobdolon luteum</i> , <i>Galium odoratum</i> , <i>Impatiens noli-tangere</i> , <i>Mercurialis perennis</i> , <i>Urtica dioica</i>	Hyperskeletal leptosols

a Measured in solution according to Pansu and Gautheyrou (2006).

b Given as mg per 1 g of dried sample.

Experimental design

A modified method for the isolation of keratinophilic fungi (Orr, 1969) was used. Shells were sterilised by UV-C germicidal lamp (G30T8, 254 nm, Sankyo Denki, Japan) for 16 hr. Sterilised shells were placed on the surface of the litter layer using sterile tweezers. Five shells were placed in each Petri dish with the apical side (the upper part of the shell) facing down and in direct contact with the litter. Eight replicates were set up for each locality (a total of 40 shells per locality). The dishes were sealed with Parafilm to prevent desiccation and kept at 15 °C in the dark. When necessary, the soil was moistened with tap water to maintain the litter humid. This procedure was carried out after dish examination.

Isolation and identification of fungi

The dishes were examined after four 3-month periods. The shells were moved from the litter layer, and the apical side was surveyed with a stereomicroscope (EZ4, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) to detect the presence of fungi and changes in the appearance of the periostracum that would indicate shell decomposition. Fungal colonies on the shell surface were mostly limited to tufts of hyphae, single conidiophores, sporangia, pycnidia or sexual fruit bodies. Fungal structures were picked with a sterile needle, mounted in water or Melzer's reagent and examined with a light microscope (CX31, Olympus, Tokyo, Japan). When possible, fungi were also isolated into pure culture by picking visible structures with a sterile needle and culturing them on wort agar prepared from brewers wort (Staropramen Brewery, Prague, Czech Republic) with final sucrose content of 2 % w/v (Fassatiová, 1986). This universal medium does not select for fungal species with specific nutrition requirements. Unfortunately, fungi producing sterile mycelia, single conidiophores or sporangiophores mostly failed to grow on the agar plates or were overgrown by faster growing contaminants. Unexpectedly, filamentous streptomycetes were frequently present on the shells and their occurrence was, therefore, recorded together with the presence of fungi. However, they were not further isolated into pure culture nor identified.

Fungi were mostly identified based on phenotypic characteristics. The identification of the fungi that were successfully isolated into pure cultures was confirmed using DNA methods. Genomic DNA was isolated from 7- to 14-day old cultures using the ZR Fungal/Bacterial DNA Kit (Zymo Research, California, USA). Nuclear rDNA containing internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S and D1/D2 domains of the 28S region was amplified with the primer sets ITS1F/NL4 or ITS1/NL4 (White et al., 1990; O'Donnell, 1993). The PCR products were purified with a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taipei, Taiwan). Sequencing with the same primers was conducted at the service laboratory of the Charles University in Prague, Faculty of Science. The sequences obtained were then compared with the GenBank database using the BLASTn algorithm. Only a 99–100 % match with reliable sources (ex-type sequences, taxonomic studies) was accepted as proof of identification.

Statistical analyses

The presence of a particular fungal taxon or morphotype on a shell was recorded during four separate surveys, and the number of shells colonised by a particular fungus within a dish was used as the dependent variable (i.e. frequency of occurrence). Only observations of fungi that appeared on more than five shells were used for further statistical analyses.

The statistical analyses were focused on the differences between the four forest types and the potential turnover of fungal communities in time. These questions were evaluated with a Redundancy Discriminate Analysis (RDA), since occurrences of different fungal species are not mutually independent. RDA was selected as the most convenient multivariate analysis, because a preliminary Detrended Correspondence Analysis (DCA) indicated species turnover along the 1st DCA axis of only 1.8 S.D., which is well within the range recommended for the use of RDA (Lepš and Šmilauer, 2003). The colour form of the shell, tested in the first run, showed a non-significant effect on the fungal communities ($p > 0.1$) and, therefore, the colour form was omitted in further tests. When testing the effects of locality and time on fungal species composition, the second predictor was always used as a covariate, and permutations were appropriately restricted to reflect the temporal split-plot nature of the data (four repeated measures from one shell and 4 999 permutations in all tests). All statistical analyses were run using CANOCO software 4.56 (ter Braak, 1988).

Results

Based on direct observation and cultivation, 27 fungal species and eight morphotypes (one fungus forming mycelial cords and seven types of sterile mycelium) were identified on the shell surfaces (Table 2). Besides fungi, filamentous streptomycetes were also observed. Ascomycetes were dominant (21 species), followed by members of Mucoromycotina (five species). At least two morphotypes (mycelial cord-forming fungus and sterile dark mycelium with clamp connections) belonged to basidiomycetes. Unidentified morphotypes dominated in occurrence, appearing on 56 % of shells. Other fungi observed on more than 5 % of shells included common soil fungi, such as *Mortierella* sp., *Verticillium* sp. and *Sordaria fimicola*. Shells exposed on litter from alder alluvial forest were intensively colonised by *Pentaster cepaeophilus*, a bizarre anamorphic ascomycete that is currently known only from shells of *C. hortensis* (Koukol and Říhová, 2013). The majority of shells was colonised by streptomycetes (86 % of shells).

The number of fungal species and morphotypes on the shells increased from 8 after 3 months to 25 after 9 months and dropped to 23 in the final observation. The highest number of fungal species and morphotypes was observed on shells exposed on litter from alder and peat-bog forests (21 species), while the lowest number was found in the scree forest (11 species).

Redundancy Discriminate Analysis (RDA) showed that locality was the dominant factor affecting the fungal

Table 2 – Fungal taxa and morphotypes recorded on empty shells of *Cepaea hortensis* exposed on litter of four different forest types. Species labelled by * were isolated into pure culture and identified based on a combination of phenotypic characteristics and molecular data.

Fungal taxon	Frequency of occurrence (%)					Total
	Peat-bog pine forest	Alder alluvial forest	Scree forest	Oak-hornbeam forest		
<i>Mortierella</i> sp. 1	6.3	16.9	8.8	12.5		11.1
<i>Verticillium</i> sp. 1	9.4	4.4	15.0	2.5		7.8
<i>Sordaria fimicola</i> *	13.8	11.9	3.1	0.0		7.2
<i>Pentaster cepaeophilus</i>	0.0	23.8	1.3	0.0		6.3
<i>Cladosporium</i> sp.	6.9	1.3	8.8	0.6		4.4
<i>Geomyces pannorum</i>	8.8	6.3	0.0	0.0		3.8
<i>Mucor plumbeus</i>	11.9	0.0	0.0	0.0		3.0
Onygenales sp.*	2.5	0.0	0.0	0.0		2.5
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	0.6	0.6	0.0	8.8		2.5
<i>Mortierella bisporalis</i>	0.0	0.0	0.0	6.9		1.7
<i>Auxarthron</i> sp.*	3.8	2.5	0.0	0.6		1.7
<i>Syncephalastrum</i> sp.	0.0	0.0	0.0	5.6		1.4
<i>Mortierella</i> sp. 2	1.3	0.0	0.0	3.1		1.1
<i>Penicillium</i> sp. 2	4.4	0.0	0.0	0.0		1.1
<i>Paecilomyces inflatus</i> *	0.0	3.1	0.0	0.0		0.8
<i>Penicillium</i> sp. 3	0.6	0.6	1.9	0.0		0.8
<i>Verticillium</i> sp. 2	3.1	0.0	0.0	0.0		0.8
<i>Absidia glauca</i>	2.5	0.0	0.0	0.0		0.6
<i>Penicillium</i> sp. 1	0.0	0.0	0.6	1.9		0.6
<i>Trichoderma</i> sp.	0.0	2.5	0.0	0.0		0.6
<i>Beauveria bassiana</i>	0.0	1.9	0.0	0.0		0.5
<i>Pseudeurotium bakeri</i> *	0.0	1.9	0.0	0.0		0.5
<i>Pochonia suchlasporia</i> *	0.0	0.0	0.0	1.3		0.3
<i>Clonostachys divergens</i> *	0.0	0.6	0.0	0.0		0.2
<i>Doratomyces microsporus</i>	0.0	0.6	0.0	0.0		0.2
<i>Doratomyces verrucisporus</i>	0.0	0.6	0.0	0.0		0.2
<i>Geotrichum candidum</i>	0.0	0.6	0.0	0.0		0.2
<i>Penicillium atramentosum</i> *	0.6	0.0	0.0	0.0		0.2
Fungal morphotypes						
Sterile dark basidiomycete	50.6	73.8	52.5	49.4		56.6
Basidiomycete with mycelial cords	0.6	2.5	5.0	0.6		2.2
Sterile ascomycete 1	5.0	0.0	2.5	0.0		1.9
Sterile ascomycete 2	5.6	0.0	0.0	0.0		1.4
Zygomycete 1	1.3	3.8	0.0	0.6		1.4
Zygomycete 2	0.0	0.0	0.0	0.6		0.2
Sterile ascomycete 3	0.0	0.0	0.0	1.9		0.5

community ($p = 0.0048$). This factor explained 10.5 % of the total variability in fungal composition. Fungal species and morphotypes were distributed into two groups, with the majority of fungi significantly associated with the three localities with acidic soils (Fig 1). Fungal community composition also changed significantly over time ($p = 0.0002$), and the time of survey explained 3.8 % of the total variability.

The appearance of the *C. hortensis* shells changed during the experiment. Colour changes (fading and artificial colouration), periostracal cracks and dissolution of the calcareous layers of the shell were observed. The first alterations of the shell appearance (fading) were observed already after 3 months. At the second observation (after 6 months), the shells were visibly faded, and their periostracum was significantly loosened. The shells exposed on litter from the oak-hornbeam forest (with the highest soil pH) showed considerably lower levels of decomposition (data not shown). However, neither periostracal cracks nor dissolved pits were obviously caused by fungal activity. Visible fungal colonies were always localised on apparently intact periostracum.

Discussion

The most important factor affecting the fungal community colonising the shells of *C. hortensis* during our experiment was the type of litter on which the shells were exposed. The characteristics of the four litter types reflected site differences (vegetation cover, soil type, pH and average yearly precipitation). Highest abundance of fungi was observed on shells incubated on litter from acidic soil. Only four species had an affinity for litter from the oak-hornbeam forest (Fig 1). *Scopulariopsis brevicaulis* known to grow better in alkaline medium (Domsch et al., 2007), was one of the abundant species in this alkaline soil.

Considering that the low pH was related also to low Ca content (Table 1), the shells could serve as a source of calcium ions for fungi in this environment. Nevertheless, we did not observe fungal colonies on the bare calcareous layer, so that we cannot confirm this expectation. The time course of our experiment was apparently too short to estimate the

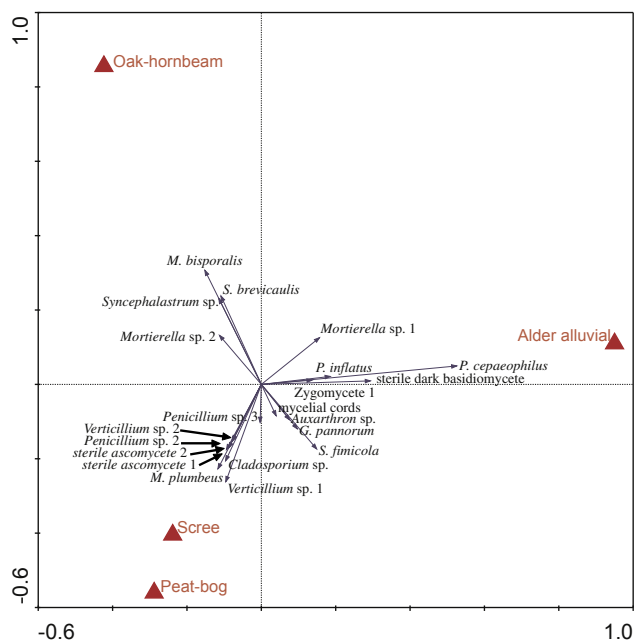


Fig 1 – Ordination plot (RDA) for the fungal species and morphotypes present on shells exposed for 1 yr on plant litter from four different forest types. The projection of the first and second axes is shown, explaining 5.3 % and 3.2 % of variability, respectively.

utilisation of calcium from the partly decomposed shells. In a longer time span, mobilisation and transport of calcium ions may be expected of basidiomycetes (Gadd, 2007). Sterile dark mycelium with clamp connections was present on more than half of the shells, and fungus forming mycelial cords was mostly found on shells from alder alluvial and scree forests (Table 2).

The dominant fungi observed on the shells were those mostly known as either chitinolytic (*Mortierella* sp., Domsch et al., 2007), or cellulolytic (*Verticillium* sp., *S. fimicola*, Domsch et al., 2007) or their ecology was not known. This was the case for *P. cepaeophilus*, which was described based on material obtained during the present study and is not known from other substrata (Koukol and Říhová, 2013). Only two species with known keratinolytic activity were recorded in our study: *Auxarthron* sp. (Currah, 1985) and *S. brevicaulis* (Domsch et al., 2007).

Keratinolytic species of the genera *Trichophyton* and *Chrysosporium*, which are frequently isolated from soils using the hair bait method (Ajello et al., 1965; Orr, 1969), were not recorded on the shells. It is likely that the soil pool of these fungi is limited in the studied localities due to the absence of human impact, such as municipal waste or sludge depositions (Ulfig, 2003). During a previous survey of microscopic soil fungi in the locality in oak-hornbeam forest, no such species were recorded either (Fassatiová, 1966).

At the end of our experiment, the overall patterns of shell alteration differed among all four studied localities and resembled the changes observed in field experiments (Evans, 1972; Barrientos, 2000; Millar and Waite, 2004; Pearce, 2008; Cernohorsky et al., 2010; Říhová, unpublished results).

Alterations appeared more slowly in the oak-hornbeam forest. Shells exposed on litter from this forest showed only various types of fading and pitting. Shells from peat-bog pine and alder alluvial forest were more extensively damaged. These shells were heavily faded, their colouration was changed and their shell wall was dissolved. None of these alterations were apparently caused by either fungal or streptomycete colonies that were always observed on intact periostracum. This result is in agreement with the rare occurrence of species known to target keratin or the products of keratin decomposition, and we believe that fungi are not the cause of any of the observed shell alterations.

Conclusion

Our study showed that the composition of the fungal community colonising empty gastropod shells in litter is above all affected by characteristics of the leaf litter and include fungi with diverse substrate preferences. We believe that these fungi were merely accidental colonisers rather than specialists accessing the organic matter in periostracum. This conclusion is based on the low occurrence of known keratinolytic and keratinophilic fungi. Visible periostracal changes on decomposed shells are more likely to have been caused by abiotic factors, as suggested by other studies (De Winter and Gittenberger, 1998; Pearce, 2008). Therefore, the role of fungi as a cause of shell decomposition was not supported.

Acknowledgement

This study was supported by the Grant Agency of the Charles University in Prague (project no. 62109) and by institutional resources of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic for the support of science and research (SVV-2013-267 201). We thank Mgr. Jitka Horáčková and Mgr. Lukáš Faltejsek for information about hyphae growing on empty shells. Soil pH was measured in the Laboratory of Environmental Geology and Geochemistry (Institute of Geology, AS CR) by Dr. Jan Rohovec. Precipitation data were obtained by the courtesy of the Czech Hydrometeorological Institute (CHMI).

REFERENCES

- Ajello, L., Varsavsky, E., Delvingt, W., 1965. Keratinophilic fungi from Belgian soils. *Transactions of the British Mycological Society* 48, 417–421.
- Anonymous, 2012. New Zealand Fungi and Bacteria (NZFUNGI). Landcare Research. <http://nzfungi.landcareresearch.co.nz>. accessed 30.08.12.
- Barrientos, Z., 2000. Population dynamics and spatial distribution of the terrestrial snail *Ovachlamys fulgens* (Stylommatophora: Helicarionidae) in a tropical environment. *Revista de Biología Tropical* 48, 71–87.
- Cavaliere, A.R., Alberte, R.S., 1970. Fungi in animal shell fragments. *The Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society* 86, 203–206.

- Cernohorsky, N.H., Horsák, M., Cameron, R.A.D., 2010. Land snail species richness and abundance at small scales: the effects of distinguishing between live individuals and empty shells. *Journal of Conchology* 40, 233–241.
- Czeczuga, B., 2000. Zoospore fungi growing on freshwater molluscs. *Polish Journal of Environmental Studies* 9, 151–156.
- Currah, R.S., 1985. Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. *Mycotaxon* 24, 1–216.
- Currah, R.S., Abbott, S.P., Sigler, L., 1996. *Arthroderma silverae* sp. nov. and *Chrysosporium vallenarense*, keratinophilic fungi from arctic and montane habitats. *Mycological Research* 100, 195–198.
- De Winter, A., Gittenberger, E., 1998. The land snail fauna of a square kilometer patch of rainforest in Southwestern Cameroon: high species richness, low abundance and seasonal fluctuations. *Malacologia* 40, 231–250.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H., 2007. Compendium of Soil Fungi, second ed. IHW Verlag, Eching.
- Evans, J.G., 1972. Land Snails in Archaeology. Seminar Press, London and New York.
- Fassatiová, O., 1966. Bodenmikromyceten am Hügel Doudnác im Böhmischem Karst. *Preslia* 38, 1–14.
- Fassatiová, O., 1986. Moulds and Filamentous Fungi in Technical Microbiology. Elsevier, Amsterdam.
- Friedman, C.S., Grindely, R., Keogh, J.A., 1997. Isolation of a fungus from shell lesions of New Zealand Abalone, *Haliotis iris* Martyn and *H. australis* Gmelin. *Molluscan Research* 18, 313–324.
- Gadd, G.M., 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* 111, 3–49.
- Goffer, Z., 2007. Archaeological Chemistry, second ed. John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
- Golubic, S., Radtke, G., Le Campion-Alsumard, T., 2005. Endolithic fungi in marine ecosystems. *Trends in Microbiology* 13, 229–235.
- Hunt, S., Oates, K., 1978. Fine structure and molecular organization of the periostracum in a gastropod mollusc *Buccinum undatum* L. and its relation to similar structural protein systems in other invertebrates. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 283, 417–459.
- Kerney, M.P., Cameron, R.A.D., Jungbluth, J.H., 1983. Die Landchnecken Nord- und Mitteleuropas. Ein Bestimmungsbuch für Biologen und Naturfreunde. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Kohlmeyer, J., 1969. The role of marine fungi in the penetration of calcareous substrates. *American Zoologist* 9, 741–746.
- Koukol, O., Říhová, D., 2013. *Pentaster cepaeophilus* gen. et sp. nov. described from surface of empty shells of *Cepaea hortensis*. *Nova Hedwigia* 96, 495–500.
- Lepš, J., Šmilauer, P., 2003. Multivariate Analysis of Ecological Data Using CANOCO. Cambridge University Press, Cambridge.
- Millar, A.J., Waite, S., 2004. Patterns of shell damage among snails from a coppice woodland in Sussex, England. *Journal of Conchology* 38, 421–440.
- O'Donnell, K., 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds, D.R., Taylor, J.W. (Eds.), *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 225–233.
- Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A., Al-Zarban, S., 1998. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology* 66, 1–11.
- Orr, G.F., 1969. Keratinophilic fungi isolated from soils by a modified hair bait technique. *Sabouraudia* 7, 129–134.
- Pansu, M., Gautheyrou, J., 2006. *Handbook of Soil Analysis*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- Peake, J.F., James, P.W., 1967. Lichens and mollusca. *The Lichenologist* 3, 425–427.
- Pearce, T.A., 2008. When a snail dies in the forest, how long will the shell persist? Effect of dissolution and micro-bioerosion. *American Malacological Bulletin* 26, 111–117.
- Pearce, T.A., Olori, J.C., Kemezis, K.W., 2010. Land snails from St. Ezleazr Cave, Gaspé Peninsula, Quebec: antiquity of *Cepaea hortensis* in North America. *Annals of Carnegie Museum* 79, 65–78.
- Pirkova, A.V., Demenko, D.P., 2008. Cases of shell disease in the giant oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia) cultivated in the Black sea. *Russian Journal of Marine Biology* 34, 309–315.
- Porter, C.L., Zebrowski, G., 1937. Lime-loving molds from Australian sands. *Mycologia* 29, 252–257.
- Porter, D., Lingle, W.L., 1992. Endolithic thraustochytrid marine fungi from planted shell fragments. *Mycologia* 84, 289–299.
- Scott, J.A., Untereiner, W.A., 2004. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Medical Mycology* 42, 239–246.
- ter Braak, C.J.F., 1988. CANOCO – A FORTRAN Program for Canonical Correlation Ordination by Partial Detrended Canonical Correspondence Analysis, Principal Components Analysis and Redundancy Analysis (Version 2.1). Agricultural Mathematics Group Report LWA-88–02, Wageningen.
- Ulfig, K., 2003. Studies of keratinolytic and keratinophilic fungi in sewage sludge by means of a multi-temperature hair baiting method. *Polish Journal of Environmental Studies* 12, 461–466.
- Watabe, N., 1988. Shell structure. In: Wilbur, K.M. (Ed.), *The Mollusca, Form and Function*, vol. 11. Academic Press, Inc., pp. 69–104.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic, San Diego, pp. 315–322.



Shell decomposition rates in relation to shell size and habitat conditions in contrasting types of Central European forests

Dagmar Říhová^{1,4}, Zdeněk Janovský^{2,5}, Michal Horský³ and Lucie Juříčková¹

¹Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, Prague 2, CZ-128 44, Czech Republic;

²Department of Botany, Faculty of Science, Charles University, Benátská 2, Prague 2, CZ-128 44, Czech Republic;

³Department of Botany and Zoology, Faculty of Science, Masaryk University, Kollářská 2, Brno, CZ-602 00, Czech Republic;

⁴Department of Biology and Environmental Sciences, Faculty of Education, Charles University, M. Rettigové 4, Prague 1, CZ-116 39, Czech Republic; and

⁵Institute of Botany, Czech Academy of Sciences, Žitná 1, Příhonic by Prague, CZ-252 43, Czech Republic

Correspondence: D. Říhová; e-mail: dagmar.rihova@pedf.cuni.cz

(Received 27 February 2017; editorial decision 31 October 2017)

ABSTRACT

Empty mollusc shells provide evidence of the species' presence over various temporal and spatial scales. However, the persistence of the shell can differ depending on the levels of soil pH and soil humidity. Although this is generally known, there are virtually no experimental data on shell decomposition rate and its relation to shell size and site conditions. Here we study disappearance and degradation rates of shells of nine common species covering the variation in shell size and ecological requirements of temperate European land snails. These shells were exposed to decomposition during a 3-year field experiment in six forest types, representing a gradient of soil pH and humidity. Rates of disappearance and (in larger species) of degradation were estimated by removing the exposed shells and measuring their condition after 6, 12, 24 and 36 months. The disappearance rate was modelled by generalized linear models in relation to species and forest type. The data showed an increase in shell disappearance rate from dry alkaline through to wet acidic forests, but the effect of species size outweighed that of habitat. While shells of large species only started to disappear after 3 years in wet acidic sites, most shells of small species had already disappeared by that time. In contrast, in dry habitats the loss of small shells only started after 3 years. The results clearly support the benefits of using empty shells in mollusc research, especially less damaged shells, which represent the individuals that were alive less than 2 years ago, regardless of shell size and habitat type. However, the marked differences in decomposition rate related to shell size and habitat also highlight the need to take these into account if a studied parameter is confounded with variation in shell size and/or site alkalinity or humidity.

INTRODUCTION

Mollusc shells can persist for a long time after the death of the animal and are thus an outstanding source of information for ecological (Cameron & Pokryszko, 2005) and palaeoecological studies (e.g. Ložek, 1964; Evans, 1969; Davies, 2008). Recent litter samples contain a mixture of empty shells and those still containing body tissue. Empty shells sometimes predominate (e.g. Rundell & Cowie, 2004; Örstan *et al.*, 2005; Clements *et al.*, 2008), but they are mostly damaged to various extents, suggesting their potentially different ages.

Numerous ecological factors have been postulated to affect the persistence and degradation rate of empty shells: (1) soil pH and calcium content (de Winter & Gittenberger, 1998; Schilthuizen & Rutjes, 2001; Schilthuizen, Chai & Kimsin, 2003; Müller, Strätz & Hothorn, 2005; Ström, Hylander & Dynesius, 2009); (2) drought (Cameron & Morgan-Huws, 1975; Cameron *et al.*, 2003) and humidity (Barrientos, 2000); (3) insolation (Menez, 2002) and (4) activities of living animals that frequently use shells as a calcium source (for overview see Barker, 2004). Some characteristics

of the shell itself, especially its thickness (Millar & Waite, 1999), have also been suggested to affect shell persistence. Long-term persistence and even fossilization are supposed to be linked with highly calcareous (e.g. Ström *et al.*, 2009) and dry conditions (e.g. Cameron *et al.*, 2003). In contrast, rapid shell decay is known empirically from sites with a low soil pH and with high humidity (de Winter & Gittenberger, 1998; Barrientos, 2000; Müller *et al.*, 2005; Ström *et al.*, 2009). A tendency for accumulation of large and usually thicker shells was recorded by Solyomos *et al.* (2009) and also mentioned by Schilthuizen (2011). Hotopp (2002) assumed that minute shells (smaller than 3 mm, e.g. the genera *Punctum* and *Carychium*) could completely disappear within several months, while Boschi & Baur (2008) stated that in some (unspecified) habitat types shells could persist for several years before disappearance. Pearce (2008) focused explicitly on among-habitat differences in shell degradation. He did not find any differences among forests differing in vegetation cover and of similar pH, but provided the first experimental evidence of faster degradation of the shells of small species. On the other hand, the habitat type was

found to play a dominant role in a study of shell degradation in fens along a gradient of pH and mineral richness (Cernohorsky, Horsák & Cameron, 2010). Far less evidence exists about the physical alteration of shells during decomposition than for rates of shell disappearance.

However, to our knowledge, there has been no experimental study of the rate of shell degradation in relation to shell size and habitat conditions. Here, we present the results of a 3-year field experiment on shell disappearance and degradation rates of nine common European land-snail species covering almost the full size range of the European fauna. The experiment was repeated in six types of forest habitats representing the main types of temperate forests along the gradients of soil pH and humidity. We aimed to quantify the relative importance of shell size and habitat type on rates of shell loss, measured under a standardized protocol. For large species, which decompose much more slowly than small shells, we were also able to follow the degradation process in more detail by measuring the accumulation of small-scale damage on the shell surface that preceded shell disappearance.

MATERIAL AND METHODS

Studied species and sites

We selected nine common land-snail species to represent faunal variation in shell size, shape and habitat requirements (Table 1), as models for the shell decomposition patterns of European species. All these model species occur frequently across the study region, although *Columella aspera* is limited to mountainous areas of Atlantic-like climate. Six forest types (oak-hornbeam forest, scree forest, spruce plantation, beech forest, alder alluvial forest and peat-bog pine forest) were selected to represent habitats on the gradient of soil pH and humidity in Central European forests (Table 2). Essentially, alder alluvial and peat-bog pine forests can be considered as wet sites in terms of soil moisture, while oak-hornbeam forest is dry. The remaining three habitats are intermediate in soil humidity. In terms of soil pH, the oak-hornbeam forest site is at the alkaline end of the spectrum, the peat-bog pine forest is strongly acidic; the remaining sites are slightly acidic. At each site we measured soil pH and calcium content in an accredited laboratory of the Institute of Geology of the Czech Academy of Sciences (IG CAS) and obtained annual precipitation from the Czech Hydrometeorological Institute (CHMI).

Experimental design

Shells were placed in the centre of polyethylene plastic boxes filled with local soil and leaf litter (hereafter referred to only as 'soil'). Boxes (16.5 × 16.5 × 8 cm) were perforated by 4 mm holes (density 1 hole/cm²). Large shells were placed freely into the soil filling

each box, while small shells were first put into permeable nylon bags (mesh size 320 µm; bag size 8 × 6 cm) along with the soil. The boxes were buried with their bottoms parallel with the boundary of the soil A horizon c. 15 cm deep, completely covered by leaf litter. Five shells of each of nine study species were placed in each box and four boxes were buried at each site during spring 2006 (i.e. 1080 shells used in total). The first box was excavated 6 months after burial, followed by further boxes after 12, 24 and 36 months. The entire contents of excavated boxes (litter, soil and shells) were dried for 14 d at room temperature. Shells were removed by hand or using soft forceps, and those recovered were counted.

Each year chopped human hair was placed on the ground around the boxes in order to deter wild boars. In spite of this, one box in the spruce plantation and one in the oak-hornbeam forest was completely destroyed by wild boars, limiting the dataset from each of these habitats to the first three time intervals; some other boxes were partly destroyed (Table 3).

Shell degradation and its measurement

The four large species (*Arianta arbustorum*, *Xerolenta obvia*, *Alinda biplicata* and *Isognomostoma isognomostomos*) mostly persisted even after 36 months. For these we measured four quantitative characteristics of degrading shells: (1) total area of pitted surface; (2) total area of 'windows' (see Results); (3) total area of holes and (4) total area of lost periostracum (Fig. 1). For analysis, these four characteristics were summed into a single variable 'damage', representing the overall state of shell degradation.

The proportion of damaged surface was measured on shell photographs in Image Tool v. 3.00 (available at <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). The shells were photographed from two sides (apical and umbilical for flattened and spherical shells, anterior and posterior for elongated shells) using an Olympus C-5060 Wide Zoom camera, or an Olympus U-eye UI-1440-C camera (only small species) mounted on an Olympus SZX 9 stereomicroscope.

Data analysis

We conducted two separate analyses. First, we analysed the rates of disappearance along with the time since burial, species size and habitat type for all nine study species. Second, we analysed the rate of damage to the shell surface, but only for the four largest species (Table 1). We used generalized linear models (GLM) with quasi-binomial error structure (due to detected overdispersion; Crawley, 2007) and canonical logit link function to analyse the proportion of shells recovered within each box and time intervals. For the analysis of shell damage, we first calculated mean damage of the shells of a given species recovered from each box in order

Table 1. Characteristics of the studied land-snail species.

Species	Size (mm)	Shape and structure	Ecology
<i>Arianta arbustorum</i> (Linné, 1758)	16.00 × 19.36	Spherical, smooth	Forest, wet, acid-tolerant
<i>Xerolenta obvia</i> (Menke, 1828)	6.36 × 12.51	Flattened, grooved	Open, xeric, basophile
<i>Alinda biplicata</i> (Montagu, 1803)	15.65 × 3.79	Spindle, ribbed	Forest, mesic, basophile
<i>Isognomostoma isognomostomos</i> (Schröter, 1784)	5.74 × 8.93	Spherical, hairy	Forest, mesic, basophile
<i>Cochlicopa lubrica</i> (O. F. Müller, 1774)	5.57 × 2.46	Spindle, lustrous	Open/forest, mesic, basophile
<i>Nesovitrea hammonis</i> (Ström, 1765)	1.56 × 3.35	Flattened, smooth	Open/forest, mesic, acidotolerant
<i>Vallonia pulchella</i> (O. F. Müller, 1774)	1.09 × 1.97	Flattened, fine grooved	Open, xeric/wet, basophile
<i>Columella aspera</i> Waldén, 1966	1.57 × 1.16	Cylindrical, fine ribbed	Forest, mesic, acidophile
<i>Carychium minimum</i> O. F. Müller, 1774	1.71 × 0.95	Spindle, grooved	Open/forest, wet, basophile

Nomenclature and ecological characteristics follow Horsák *et al.* (2013). Mean values of measured shell height × width ($n = 20$) are given. Shell shape and surface type follow Kerney *et al.* (1983). The first four species were considered as 'large', the next as 'intermediate' and the last three as 'small'.

Table 2. Description of studied forest sites giving their geographical location, altitude, soil pH, soil calcium content (Ca) and annual precipitation (Precip.).

Type of forest	Location	Altitude (m a.s.l.)	Soil pH	Ca (mg/kg)	Precip. (mm)
Oak-hornbeam forest	49°57'25"N; 14°09'06"E	420	7.22	209.8	514
Scree forest	49°55'15"N; 13°50'59"E	450	5.61	50.9	476
Spruce plantation	50°01'02"N; 14°41'59"E	400	5.39	82.4	570
Beech forest	49°55'15"N; 13°50'58"E	430	4.92	NA	476
Alder alluvial forest	50°02'39"N; 14°02'00"E	430	4.30	73.6	497
Peat-bog pine forest	49°39'28"N; 15°53'12"E	600	3.52	27.4	877

Sites are ordered based on their soil pH.

Table 3. Percentage values of recovered shells for all studied snail species and habitats.

Species	Oak-hornbeam				Scree forest				Beech forest				Spruce plantation				Alder alluvial forest				Peat-bog pine				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
<i>Arianta arbustorum</i>	100	100	100	-	100	100	100	100	80*	100	100	100	100	100	100	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Xerolenta obvia</i>	100	100	100	-	100	100	100	100	60*	100	100	100	100	100	100	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>I. isognomostomos</i>	100	100	100	-	100	100	100	100	40*	100	100	100	100	100	100	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Alinda biplicata</i>	100	100	100	-	100	100	100	100	60*	100	100	100	100	100	100	-	100	100	100	80	100	100	80	60	60
<i>Cochlicopa lubrica</i>	100	-	100	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-	100	100	100	100	-	100	100	80	80
<i>Nesovitrea hammonis</i>	100	-	100	-	100	100	100	100	100	100	100	100	0	80	80	-	100	100	100	80	-	100	60	80	80
<i>Columella aspera</i>	100	100	100	-	100	100	100	20	100	100	60	100	60	60	80	-	100	80	40	0	80	60	0	20	20
<i>Vallonia pulchella</i>	100	100	100	-	100	100	100	20	100	100	80	0	100	60	-	0	0	20	0	60	0	0	0	0	0
<i>Carychium minimum</i>	100	100	100	-	100	100	80	0	60	60	20	60	0	60	20	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Roman numerals (I–IV) indicate time intervals since burial: 6, 12, 24 and 36 months. Disturbance by wild boars is indicated by an asterisk or by a dash if the entire group of conspecific shells was lost.

to avoid pseudoreplication. This average value was then modelled by linear regression, first being square-root transformed to improve homogeneity of the distribution. Time since burial was expressed as the log-transformed number of months and species size was estimated as: $\ln(W^2 \times H)$, where W = shell width and H = shell height. All computations were conducted in the R statistical environment (v. 3.2.5, available at www.r-project.org).

RESULTS

In total, we used 1080 shells of nine species (480 large, 240 medium and 360 small). After 36 months, we recovered 799 shells (428 large, 188 medium and 183 small); in total 74% of all used shells. During the study, 11% of large, 22% medium and 49% of small shells disappeared. After 6 months, 55 shells disappeared (20%, including 18 destroyed by wild boars); after 12 months another 40 shells disappeared (15%; including 10 destroyed by wild boars) and after 24 months another 45 shells disappeared (17%). In total, 28 shells (2.6%) were destroyed by wild boar activity. Percentage losses for all studied species and habitats are summarized in Table 3.

Shell degradation patterns

The initial stage of shell dissolution is indicated by pitting (Fig. 1B). Deeper and more extensive pitting turns into holes, a sign of advanced dissolution (Fig. 1C). Holes covered by translucent, sometimes coloured, periostracum are referred to as 'windows' (Fig. 1D); this type of dissolution is especially common in small species, in which intact periostracum devoid of all calcareous material can be found (e.g. frequent in *Columella aspera*, less frequent in *Nesovitrea hammonis* and *Cochlicopa lubrica*). A different type of shell decomposition is loss of periostracum, which first separates from the calcareous material and then peels off (Fig. 1A). The shell

beneath a peeled periostracum often retains its original surface sculpture but, when unprotected, is prone to quicker dissolution.

Each of these four types of shell degradation occur in all three shell-size categories. Nevertheless, there are two distinctive degradation patterns. The first is typical of larger species (over 8 mm) and starts with periostracal rupture followed by dissolution of calcareous material by deepening of pits into large holes. Small and medium-sized species (less than 8 mm) tend to decompose from within according to the second pattern, in which calcareous material dissolves while the periostracum remains intact.

Effect of shell size and habitat type

Small shells started to disappear within the first 6 months in wet and acidic habitats, but not in dry habitats (Table 3, Fig. 2B). *Columella aspera*, the most resistant small species, started to disappear within the first 6 months in spruce plantation and peat-bog pine forest, but (except in alder alluvial forest) its shells persisted until the end of the experiment. Medium-sized species started to disappear within the first 6 months only in spruce plantation; in other habitats they persisted until 24 months (peat-bog pine forest) or 36 months (alder alluvial forest). Large shells only started to disappear by the end of the 36-month period in alder alluvial forest and peat-bog pine forest. In other habitats large shells persisted until the end of the experiment (with the exception of the shells destroyed by wild boars).

Shell size was the best predictor of the rate of shell disappearance (Table 4), since the three largest species (*Arianta arbustorum*, *Xerolenta obvia* and *Alinda biplicata*) hardly disappeared during the 3 years of the experiment (Fig. 2A, B). The effect of habitat type was approximately half as strong as that of shell size, but still important (Fig. 2C–F). The oak-hornbeam forest and beech forest sites had the lowest loss rates (Fig. 2D), whereas shells disappeared significantly faster in the spruce plantation and peat-bog pine forest (Fig. 2F). The scree site was similar to the first two types as only the smallest species disappeared in 3 years (Fig. 2E), while the

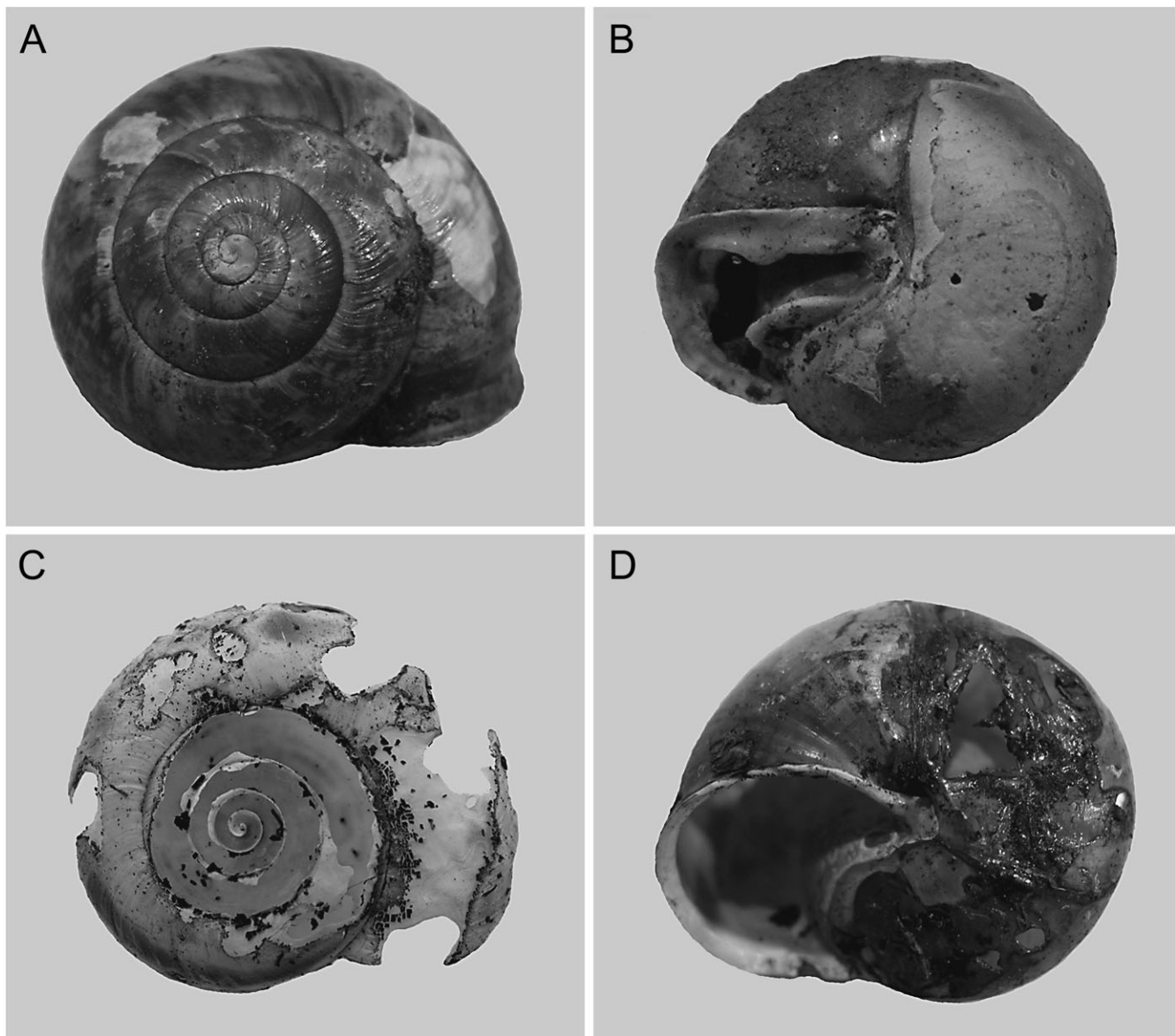


Figure 1. Examples of shell degradation characteristics. **A.** Peeling periostracum; *Arianta arbustorum* exposed in a spruce plantation for 24 months. **B.** Pitting; *Isognomostoma isognomostomos* in a beech forest for 24 months. **C.** Holes; *Xerolenta obvia* in a peat-bog pine forest for 36 months. **D.** Windows; *A. arbustorum* in a peat-bog pine forest for 36 months.

alder alluvial forest was similar with the second two types. The interactions are hard to interpret separately from the main effects within the binomial GLM framework, as they combine in the resulting shape of the relationship in a nontrivial way.

The patterns of damage accumulation in large species followed trends similar to those of shell disappearance, but in this case only the main effects of time, shell size and habitat were significant (Table 5). Since the effect of shell characteristics was much smaller than in the analysis of disappearance rate (*c.* 3 units to *c.* 8 units), its contribution to the explained variation was less than that of habitat (Fig. 3A, B).

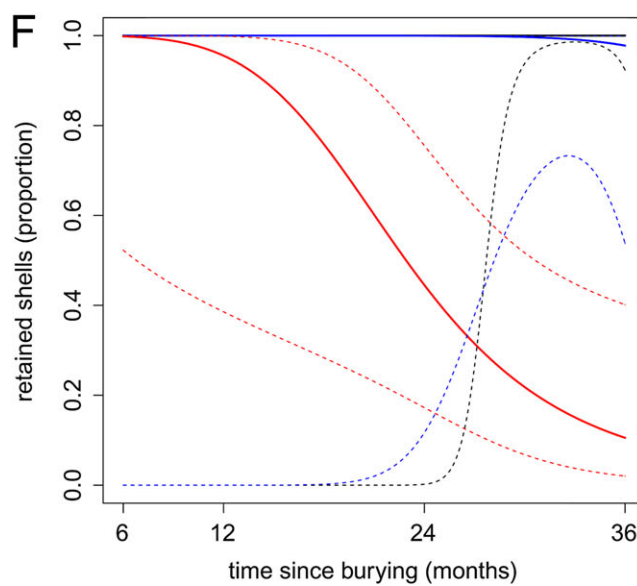
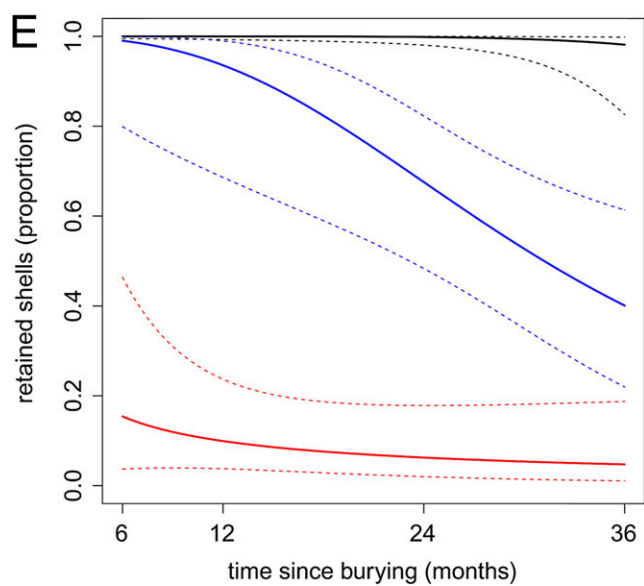
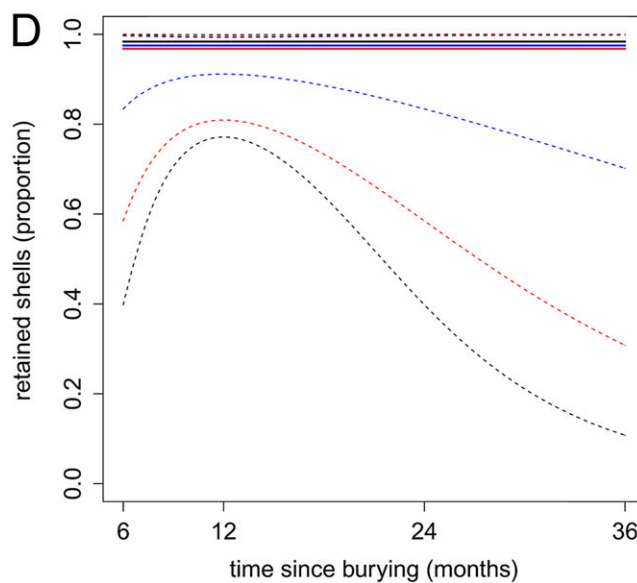
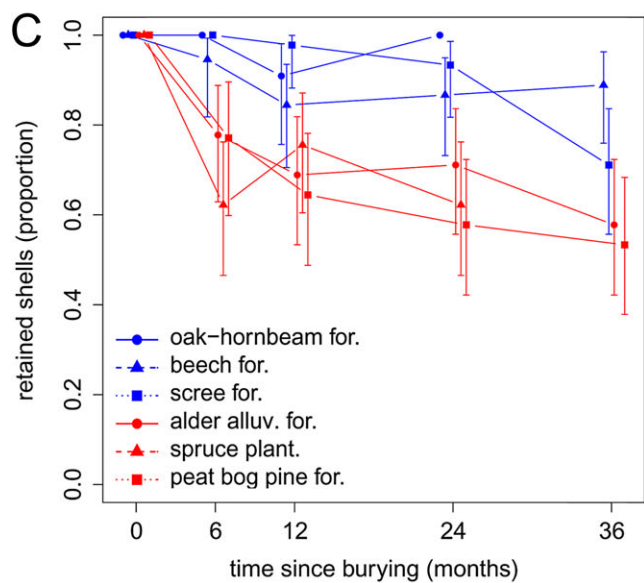
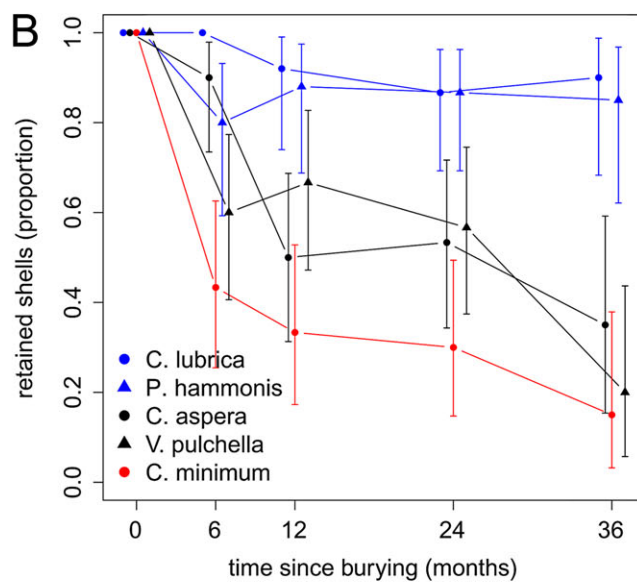
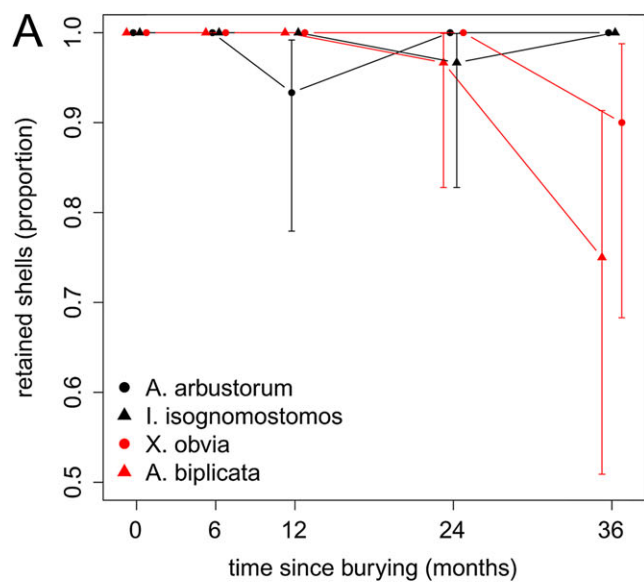
DISCUSSION

Smaller shells degrade faster

Shell size was the most important predictor of shell degradation rate (Fig. 2) with the first specimens of small species disappearing

within just six months. In the habitats that most encouraged decomposition, i.e. alder alluvial and peat-bog pine forests, small shells mostly disappeared completely by the end of the third year since burial. This is in agreement with Hotopp's (2002) assumptions about the decomposition of small shells. However, in drier and more alkaline sites (i.e. oak-hornbeam and beech forests), minute shells persisted almost completely even after 3 years, and in scree forest the disappearance only just started at that time. It is clear that under favourable conditions even minute shells may persist for a relatively long time, of the order of months or several years.

Among small species, shells of *Columella aspera* were the most resistant (Fig. 2B). Like the shells of the other small species, they started to disappear within first 6 months, but shell remnants (frequently only empty periostraca) were present even after 36 months in peat-bog pine forest. The periostracum of this acid-tolerant species, living e.g. on *Vaccinium* vegetation in peat-lands (Welter-Schultes, 2012), is remarkably thick (unpublished data), giving the



shell the ability to withstand such harsh condition. The other two small-shelled species in the study (*Carychium minimum* and *Vallonia pulchella*) have relatively thinner periostracum (unpublished data) and this is reflected in their more rapid decomposition rate and lower incidence of periostracal windows.

The medium-sized species (*Cochlicopa lubrica* and *Nesovitrea hammonis*) showed the largest among-habitat differences in disappearance rates. In term of overall disappearance rate, medium-sized shells are more similar to large shells than to small shells (Fig. 2D). The generally high persistence of large shells (Fig. 2A cf. 2B) may simply be a function of their larger mass of calcium carbonate. The thickness of the calcareous shell wall can also contribute to the durability of such shells. Observed shell dissolution starts at ruptures in the periostracum and the relative thickness of the periostracum in large-shelled species is usually lower than in small species (unpublished data). The durability of large shells is hence a consequence of the resistant shell wall. This corresponds with the different picture of ongoing corrosion in large shells and with the findings of other researchers about persistence of robust shells (e.g. Sóllymos *et al.*, 2009).

The long persistence of large shells that we observed in all habitats corresponds with empirical evidence already reported (e.g. Millar & Waite, 1999, 2004; Schilthuizen, 2011) and to some extent supports Evans's (1972) conjecture of shell duration for tens or even hundreds of years in dry and alkaline conditions. In

general, our measured decomposition rates of all shell size categories are slower than previously assumed (e.g. Schilthuizen *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2005; Ström *et al.*, 2009), emphasizing that molluscan shells are long-lasting objects.

How to use empty shells in molluscan studies

There is a lack of consensus among malacologists on the use of empty shells in field studies (see also Coppolino, 2010). Some researchers have treated empty shells in the same way as live specimens regardless of their condition (e.g. Coppois, 1984; de Winter & Gittenberger, 1998; Hotopp, 2002; Tattersfield *et al.*, 2006), whereas others count empty shells only when they have an intact periostracum (e.g. Labaune & Magnin, 2001; Horsák & Hájek, 2003; Juříčková *et al.*, 2008). A third group of malacologists work only with live specimens (e.g. Hawkins, Lankester & Nelson, 1998; Martin & Sommer, 2004a, b; Schamp, Horsák & Hájek, 2010). Occasionally, empty shells alone are used for specific purposes (e.g. Clements *et al.*, 2008; Thurman *et al.*, 2008). This variation in approach makes sense, because empty shells provide qualitatively different information according to the studied environment and the purpose of the research. In particular, the large variation we found in persistence in relation to shell size and habitat conditions can inform decisions about the use of empty shells and the interpretation of results.

Advantages and limitations of use of empty shells

Biodiversity inventories aim to detect all species currently present at a site. Some species can typically be detected only from empty shells and thus inclusion of empty shells is recommended (Cameron & Cook, 1999; Thurman *et al.*, 2008; *Platyla polita* or *Cecilioides acicula*, personal observations). Furthermore, the use of empty shells is especially helpful in simple compilations of biodiversity in spatially- and temporally-structured mollusc communities, since some species live only in certain microhabitats (Schilthuizen, 2011) or at certain seasons of the year (e.g. Vitrinidae; Horsák, Juříčková & Pícka, 2013). Empty shells are useful if sampling is carried out only once in the year and when recording rare species, as the probability of finding rare species as living individuals is affected by many external and intrinsic factors (e.g. Cameron & Pokryszko, 2005; Sóllymos *et al.*, 2009).

In a classic study, Cameron & Pokryszko (2005) proposed 200 specimens as the minimal number of shells in a representative soil sample or to record at least ten times more shells than the number of recorded snail species. When counting only living animals, these thresholds can be problematic, especially when collecting samples during dry periods or in oligotrophic and dry habitats. Including empty shells can be essential for recording the majority of species, but the risk of counting species that are not currently present increases particularly for robust species with a large and thick shell. Such empty shells could potentially reflect past ecological conditions, especially if for example a successional change recently took place at the site (Schilthuizen, 2011).

Some gastropods possess synchronized life cycles according to which their abundances fluctuate seasonally (e.g. Umiňský, 1983; Kralka, 1986). These population fluctuations are buffered by the use of empty shells that can be found during the whole season. The use of empty shells can then compensate for the impoverishment of local gastropod check-lists (Cameron & Pokryszko, 2005). In such cases, we recommend the use of 'fresh shells' or the 'periostracum criterion', as already adopted by some authors (e.g.

Table 4. Results of the quasi-binomial GLM of shell disappearance rate (null deviation: 751.04, null df: 193, residual deviation: 196.46, residual df: 170, dispersion parameter $\Phi = 1.305$).

Term	df	Deviance	R^2_L (%)	$P(>F)$
Time (log)	1	16.01	2.1	<0.001
Shell size	1	307.09	40.9	<0.001
Habitat	5	166.40	22.2	<0.001
Time \times shell size	1	0.22	0.0	n.s.
Time \times habitat	5	22.64	3.0	0.005
Shell size \times habitat	5	27.12	3.6	0.001
Time \times shell size \times habitat	5	15.11	2.0	0.046

df, degrees of freedom; R^2_L , likelihood ratio R^2 (a pseudo- R^2 measure recommended for binomial GLM; Menard, 2000); $P(>F)$, probability of observing a given F -value under the null hypothesis.

Table 5. Results of the linear model of damage accumulation (square-root transformed).

Term	df	Sum sq.	Expl. var. (%)	$P(>F)$
Time (log)	1	0.862	26.8	<0.001
Shell size	1	0.351	10.9	<0.001
Habitat	5	0.611	19.0	<0.001
Time \times shell size	1	0.020	0.6	n.s.
Time \times habitat	5	0.008	0.2	n.s.
Shell size \times habitat	5	0.055	1.7	n.s.
Time \times shell size \times habitat	5	0.011	0.4	n.s.
Residuals	64	1.297	40.3	-

df, degrees of freedom; Sum sq., sum of squares; Expl. var., percentage of explained variance; $P(>F)$, probability of observing a given F -value under the null hypothesis.

Figure 2. Observed proportions of recovered shells during the experiment (A–C) and predictions from the model (D–F). **A.** The four largest snail species (averaged across all habitats). **B.** The five smallest species. **C.** Average recovery proportions in different habitats. **D.** Model predictions for the least harsh site, oak-hornbeam forest. **E.** Model predictions for an intermediate site, scree forest. **F.** Model predictions for site with the worst conditions for shell preservation, peat-bog pine forest. Error bars in A–C denote 95% confidence intervals. In D–F, black solid lines correspond to predictions for the largest species *Arianta arbustorum*; solid blue lines to predictions for the intermediate species *Cochlicopa lubrica* and red lines for *Carychium minimum*, the smallest species studied; dashed lines of the same colour represent 95% confidence intervals of model relationship.

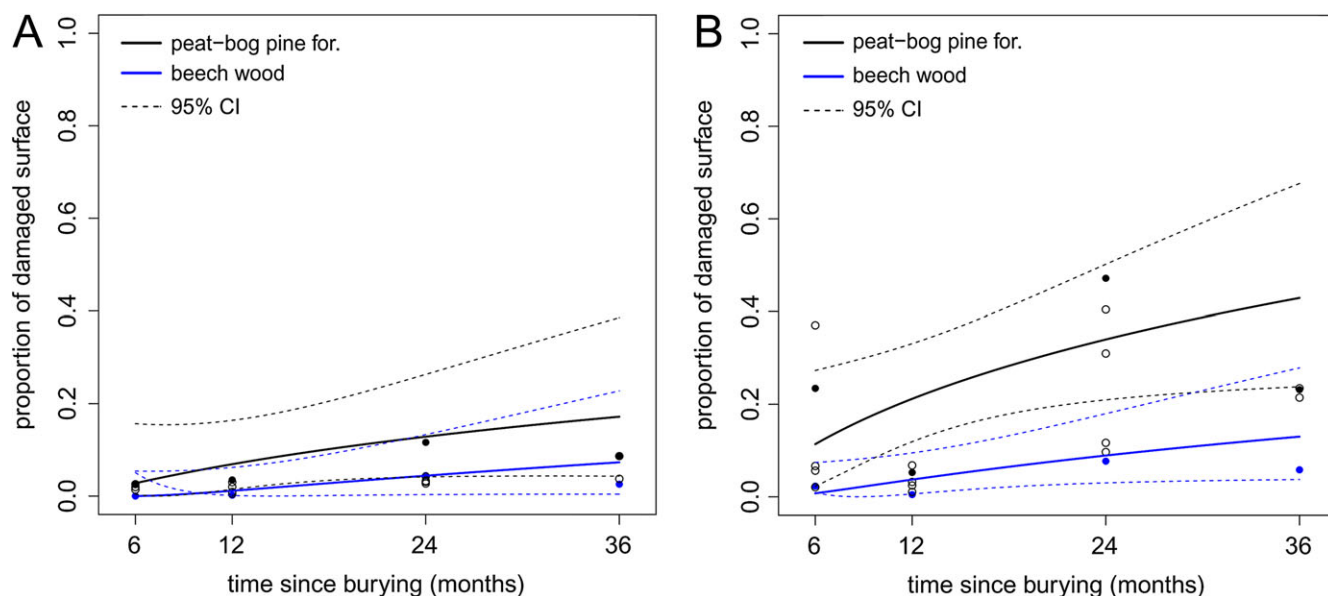


Figure 3. Proportion of damaged surface in relation to time since burial for the four large snail species with low disappearance rates. **A.** *Arianta arbustorum*, the largest species. **B.** *Alinda biplicata*, the smallest of the large species. Damage proportions were averaged from all shells recovered in a given box. Key: black solid line and black filled circles, model prediction for harshest habitat, peat-bog pine forest; solid blue line and black filled circles, model prediction for least harsh habitat, beech forest; open circles, the remaining intermediate habitats. Dashed lines denote 95% confidence interval of model relationship.

Labaune & Magnin, 2001; Horsák & Hájek, 2003; Cameron & Pokryszko, 2005: 541; Juříčková *et al.*, 2008). This means that only fresh shells with intact periostracum, original colouration and without erosion of calcareous material should be counted for statistical analyses. In agreement with others (Evans, 1972; Cameron & Morgan-Huws, 1975; Davies & Grimes, 1999; Menez, 2002), we conclude that shells found in topsoil lose their fresh appearance (e.g. intact periostracum) within 1 year of death. In small snails and semislugs, the best criterion of freshness of an empty shell is a transparent shell wall. However, special attention should also be paid to the presence of opaque empty shells of minute species in dry and alkaline localities, as our results suggest that they are able to persist in such sites for a relatively long time.

The use of empty shells of large species is more problematic, because their durability is greater, so that they could potentially represent assemblages from former times (Table 3, Fig. 2D; Cameron & Pokryszko, 2005: 542). Even subfossil shells sometimes occur commonly in the topsoil of suitable habitats such as dry grasslands and limestone outcrops, making it difficult to distinguish between ‘new’ (i.e. still occurring at the site) and ‘old’ (subfossil, perhaps extinct) shells. In mesic and wet forest habitats, which prevail in central Europe, shells more than 2 years old are often highly corroded. A marked loss of original colouration and strong pitting and/or holes, could then be used as an empirical threshold to indicate age and hence to evaluate shell utilization for research purposes. On the other hand, the longevity of some species could jeopardize this criterion, because apical corrosion, periostracum damage or even its total loss can occur even during the snail’s lifetime (Menez, 2002; Morton, 2006). Nevertheless, in living specimens holes through the entire shell wall are virtually absent. Another reliable indication of shell age is infestation by fungal hyphae; empty shells are frequently overgrown by mycelium, whereas living shells are never infested. Říhová, Janovský & Koukol (2014) showed that fungi are able to colonize the surface of empty shells of *Cepaea hortensis* within 3 months.

Conclusion

Shell degradation is a complex process driven by various factors, mainly related to characteristics of the shell and habitat. Based on

our field experiment, two distinct degradation patterns were observed, distinguishing smaller species (shell <8 mm) and larger species, respectively. The former retained their periostracum while calcareous material was dissolved, while the latter lost their periostracum first. Small shells started to degrade within 6 months of death, with almost all shells disappearing within 36 months in humid and acid habitats. Large shells were more durable and started to disappear after 24 months, with the majority of studied shells persisting for the entire study period. The habitat type was found to be of less importance for shell degradation than shell size and other intrinsic factors. However, in dry and calcareous habitats shells of all sizes may persist for a long time, with the shell size becoming more important as habitat basicity and dryness increase.

We conclude that shells with a retained periostracum, original colouration and without major erosion of calcareous material (large holes through shell wall) can be used as data sources with virtually no risk of including species no longer occurring at the study site.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Czech Hydrometeorological Institute (CHMI) for providing climatic data and to Jan Rohovec for the measurement of chemical parameters of soil samples. Tomáš Herben provided useful statistical advice; Robert A.D. Cameron, Jeffrey C. Nekola, Timothy A. Pearce and Menno Schilthuisen made many valuable comments on previous versions of the manuscript. The study was supported by the Grant Agency of Charles University (GAUK Project no. 62109), Hlávka’s Foundation, SVV 260434/2017 and Progress Q17. MH and LJ were supported by grant project 17-05696S of the Czech Science Foundation. DR cordially thanks all members of Opisthokonta for their participation in this study.

REFERENCES

- BARKER G.M. (ed.) 2004. *Natural enemies of terrestrial molluscs*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- BARRIENTOS, Z. 2000. Population dynamics and spatial distribution of the terrestrial snail *Ovachlamys fulgens* (Stylommatophora: Helicarionidae) in a tropical environment. *Revista de Biología Tropical*, **48**: 71–87.

- BOSCHI, C. & BAUR, B. 2008. Past pasture management affects the land snail diversity in nutrient-poor calcareous grasslands. *Basic and Applied Ecology*, **9**: 752–761.
- CAMERON, R.A.D. & COOK, L.M. 1999. Island land snail relocated. *Journal of Molluscan Studies*, **65**: 273–274.
- CAMERON, R.A.D. & MORGAN-HUWS, D.I. 1975. Snail faunas in the early stages of a chalk grassland succession. *Biological Journal of the Linnean Society*, **7**: 215–229.
- CAMERON, R.A.D., MYLONAS, M., TRIANTIS, K., PARMAKELIS, A., BARKER, G.M. & VARDINOYANNIS, K. 2003. Land-snail diversity in a square kilometre of Cretan maquis: modest species richness, high density and local homogeneity. *Journal of Molluscan Studies*, **69**: 93–99.
- CAMERON, R.A.D. & POKRYSZKO, B.M. 2005. Estimating the species richness and composition of land mollusc communities: problems, consequences and practical advice. *Journal of Conchology*, **38**: 529–547.
- CERNOHORSKY, N.H., HORSÁK, M. & CAMERON, R.A.D. 2010. Land snail species richness and abundance at small scales: the effects of distinguishing between live individuals and empty shells. *Journal of Conchology*, **40**: 233–241.
- CLEMENTS, R., NG, PKL, LU, X.X., AMBU, S., SCHILTHUIZEN, M. & BRADSHAW, C. 2008. Using biogeographical patterns of endemic land snails to improve conservation planning for limestone karsts. *Biological Conservation*, **141**: 2751–2764.
- COPPOIS, G. 1984. Distribution of bulimulid land snails on the northern slope of Santa Cruz Island, Galapagos. *Biological Journal of the Linnean Society*, **21**: 217–227.
- COPPOLINO, M.L. 2010. Strategies for collecting land snails and their impact on conservation planning. *American Malacological Bulletin*, **28**: 97–103.
- CRAWLEY, M.J. 2007. *The R book*. J. Wiley, Chichester, UK.
- DAVIES, P. 2008. *Snails: archaeology and landscape change*. Oxbow Books, Oxford, UK.
- DAVIES, P. & GRIMES, C.J. 1999. Small-scale spatial variation of pasture molluscan faunas within a relic watermeadow system at Wylve, Wiltshire, U.K. *Journal of Biogeography*, **26**: 1057–1063.
- DE WINTER, A. & GITTENBERGER, E. 1998. The land snail fauna of a square kilometer patch of rainforest in southwestern Cameroon: high species richness, low abundance and seasonal fluctuations. *Malacologia*, **40**: 231–250.
- EVANS, J.G. 1969. Land and freshwater Mollusca in archaeology: chronological aspects. *World Archaeology*, **1**: 170–183.
- EVANS, J.G. 1972. *Land snails in archaeology*. Seminar Press, London.
- HAWKINS, J.W., LANKESTER, M.W. & NELSON, R.R.A. 1998. Sampling terrestrial gastropods using cardboard sheets. *Malacologia*, **39**: 1–9.
- HORSÁK, M. & HÁJEK, M. 2003. Composition and species richness of molluscan communities in relation to vegetation and water chemistry in the Western Carpathian spring fens: the poor-rich gradient. *Journal of Molluscan Studies*, **69**: 349–357.
- HORSÁK, M., JUŘÍKOVÁ, L. & PICKA, J. 2013. *Molluscs of the Czech and Slovak Republics*. Kabourek Press, Zlín.
- HOTOPP, K.P. 2002. Land snails and soil calcium in Central Appalachian Mountain forest. *Southeastern Naturalist*, **1**: 27–44.
- JUŘÍKOVÁ, L., HORSÁK, M., CAMERON, R.A.D., HYLANDER, K., MÍKOVCOVÁ, A., HLAVÁČ, J.Č. & ROHOVEC, J. 2008. Land snail distribution patterns within a site: the role of different calcium sources. *European Journal of Soil Biology*, **44**: 172–179.
- KERNEY, M.P., CAMERON, R.A.D. & JUNGBLUTH, J.H. 1983. *Die Landschnecken Nord- und Mitteleuropas. Ein Bestimmung für Biologen und Naturfreunde*. Verlag Paul Parey, Hamburg.
- KRALKA, R.A. 1986. Population characteristics of terrestrial gastropods in boreal forest habitats. *American Midland Naturalist*, **115**: 156–164.
- LABAUNE, C. & MAGNIN, F. 2001. Land snail communities in Mediterranean upland grasslands: the relative importance of four sets of environmental and spatial variables. *Journal of Molluscan Studies*, **67**: 463–474.
- LOŽEK, V. 1964. *Quartärmollusken der Tschechoslowakei*. Verlag der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha.
- MARTIN, K. & SOMMER, M. 2004a. Relationship between land snail assemblages patterns and soil properties in temperate-humid forest ecosystems. *Journal of Biogeography*, **31**: 531–545.
- MARTIN, K. & SOMMER, M. 2004b. Effects of soil properties and land management on the structure of grassland snail assemblages in SW Germany. *Pedobiologia*, **48**: 193–203.
- MENARD, S. 2000. Coefficients of determination for multiple logistic regression analysis. *American Statistician*, **54**: 17–24.
- MENEZ, A. 2002. The degradation of land snail shells during the annual dry period in a Mediterranean climate. *Iberus*, **20**: 73–79.
- MILLAR, A.J. & WAITE, S. 1999. Molluscs in coppice woodland. *Journal of Conchology*, **36**: 25–48.
- MILLAR, A.J. & WAITE, S. 2004. Patterns of shell damage among snails from a coppice woodland in Sussex, England. *Journal of Conchology*, **38**: 421–440.
- MORTON, J. 2006. The effect of relative humidity on mollusc periostracum and the use of coatings to prevent loss. *Collection Forum*, **20**: 67–82.
- MÜLLER, J., STRÄTZ, C. & HOTHORN, T. 2005. Habitat factors for land snails in European beech forests with a special focus on coarse woody debris. *European Journal of Forest Research*, **124**: 233–242.
- ÖRSTAN, A., PEARCE, T.A. & WELTER-SCHULTES, F. 2005. Land snail diversity in a threatened limestone district near Istanbul, Turkey. *Animal Biodiversity and Conservation*, **28**: 181–188.
- PEARCE, T.A. 2008. When a snail dies in the forest, how long will the shell persist? Effect of dissolution and micro-bioerosion. *American Malacological Bulletin*, **26**: 111–117.
- RUNDELL, R.J. & COWIE, R.H. 2004. Preservation of species diversity and abundances in Pacific island land snail death assemblages. *Journal of Conchology*, **38**: 155–163.
- ŘÍHOVÁ, D., JANOVSKÝ, Z. & KOUKOL, O. 2014. Fungal communities colonising empty *Cepaea hortensis* shells differ according to litter type. *Fungal Ecology*, **8**: 66–71.
- SCHAMP, B., HORSÁK, M. & HÁJEK, M. 2010. Deterministic assembly of land snail communities according to species size and diet. *Journal of Animal Ecology*, **79**: 803–810.
- SCHILTHUIZEN, M. 2011. Community ecology of tropical forest snails: 30 years after Solem. *Contributions to Zoology*, **80**: 1–15.
- SCHILTHUIZEN, M., CHAI, H. & KIMSIN, T.E. 2003. Abundance and diversity of land-snails (Mollusca: Gastropoda) on limestone hills in Borneo. *Raffles Bulletin of Zoology*, **51**: 35–42.
- SCHILTHUIZEN, M. & RUTJES, H.A. 2001. Land snail diversity in a square kilometre of tropical rainforest in Sabah, Malaysian Borneo. *Journal of Molluscan Studies*, **67**: 417–423.
- STRÖM, L., HYLANDER, K. & DYNESIUS, M. 2009. Different long-term and short-term responses of land snails to clear-cutting of boreal stream-side forests. *Biological Conservation*, **142**: 1580–1587.
- SÓLYMOS, P., KEMENCEI, Z., PÁLL-GERGELY, B., FARKAS, R., VILISICS, F. & HORNUNG, E. 2009. Does shell accumulation matter in micro-scale land snail surveys? *Malacologia*, **51**: 389–393.
- TATTERSFIELD, P., SEDDON, M.B., NGEREZA, C. & ROWSON, B. 2006. Elevational variation in diversity and composition of land-snail faunas in a Tanzanian forest. *African Journal of Ecology*, **44**: 47–60.
- THURMAN, C.F., SHACKELTON, L.P. & HASKELL, D.G. 2008. Does the density of dead shells predict the density of living *Anguispira cumberlandiana* Lea, 1840 (Gastropoda: Discidae)? *American Midland Naturalist*, **159**: 478–481.
- UMIŃSKY, T. 1983. Vitrinidae (Mollusca, Gastropoda) of Poland. Their density and related problems. *Annales Zoologici*, **37**: 289–311.
- WELTER-SCHULTES, F.W. 2012. *European non-marine molluscs, a guide for species identification*. Planet Poster Editions, Göttingen.

Degradation characteristics of empty land snail shells in Central European temperate forests

Dagmar Říhová^{ab*} and Lucie Juříčková^b

^aCharles University in Prague, Faculty of Education, Department of Biology and Environmental Studies, M. Rettigové 4, CZ-11639 Prague 1, Czech Republic (e-mail: dagmar.rihova@pedf.cuni.cz)

^bCharles University in Prague, Faculty of Science, Department of Zoology, Viničná 7, CZ-12844 Prague 2, Czech Republic

*corresponding author

Key words: Pulmonata, changes of shell condition, calcium carbonate dissolution, taphonomic signature

Running head: Land snail shell degradation

Abstract

What happened with the shell after snail's death? The paper is focused on land snail shell degradation in temperate forests. During three-year lasting study, seven types of shell alterations were recorded. Colour changes manifest as loss of original pigmentation, or shell dyeing caused by humic and fulvic acids from soil and leaf litter. Transparent shells in wet environment undergo opacification of shell wall. High levels of soil moisture and low pH probably cause periostracum cracking and peeling off. Exposed ostracal layers start to dissolve and pits appear. Later, they deepen into holes. Fragmentation is usually caused by large vertebrates, or, in the case of apex and mouth breakage, probably by substratum movement. Plant root are able to touch shell surface and uptake calcium from it. They leave specific traces on the shell surface. Shell surface could be infested by fungi and actinobacteria.

Combined effect of these alteration characteristics change shell appearance and create taphonomic signatures typical for specific forest types. Two basic shell degradation patterns were recognized. The degradation of large shells starts with periostracum deterioration followed by ostracal dissolution. Periostracum of small shells could persist while ostracal layers dissolve.

1. Introduction

A shell is vitally important for land snails. Although inorganic, it constitutes indivisible unity with living animal that takes care of its conch. The mucus has bactericide effects, preventing the shell degradation by various microorganisms (Czeczuga 2000; Zhong et al. 2013, Pitt et al. 2015). Even species living in highly humid and acidic environment are able to prevent their shells against major dissolution of calcareous parts of the shell since they choose optimal microhabitat (Pouličková et al. 2005). Some damage can occur on shells already during the life of long-lived species, but shells of short-lived species usually stay almost intact with vivid colouration and perfect periostracum during its life. After snails' death, the protective effects stop to act. Shell fall victim to various environmental influences and becomes the object of degradation. Periostracum starts to fade and peel off, and the gate for carbonate dissolution opens. Various organisms occur both on surface (Říhová et al. 2014, Johnston et al. 2015) and inside the shell (Peake & James 1967, Moreno-Rueda et al. 2008), some of them even consume empty shells to obtain calcium easily (e.g. Graveland et al. 1994, Cadée 1999, Barrientos 2000).

All those processes lead to more or less gradual disappearance of shell. However, the way how shell disappears depends both on habitat conditions and shell properties (Menez 2002, Pearce 2008, Cernohorsky et al. 2010). Shell disappearance rate increase from dry alkaline to wet acidic forests, but the effect of species size outweighed characteristics of habitat (Říhová et al. 2018). Thus, there arise possibilities to reconstruct the basic habitat conditions based on shell alteration types. Although it might be important especially in a reconstruction of past environment based on (sub)fossil land snail assemblages, it has never been used so far.

Knowledge of shell degradation pattern is essential also in ecological studies. Standard litter sample (e.g. Kerney et al. 1983, Cameron & Pokryszko 2005) contain both fresh and partly corroded shells. Sometimes, dead shells even prevail living ones (Mikovcová 2006, Cernohorsky et al. 2010). However, the occurrence of some rare species, usually minute and soil- or crevice-dwelling, is documented frequently only thanks to the presence of empty shells (Cameron & Cook 1999, Thurman et al. 2008). Despite this, the presence of corroded shells in samples in ecological and population studies is usually resolved by ignoring them. Especially when conducting population studies, the exclusive use of living or intact specimens is common (e.g. Hawkins et al. 1998, Martin & Sommer 2004a, Martin & Sommer 2004b, Schamp et al. 2010).

For all these purposes the survey of shell alteration and degradation characteristics for various recent habitat types is needed. Unfortunately, there are not many studies describing the influence of habitat to shell degradation. Unlike marine shell degradation, which is described relatively well (see Zuschin et al. 2003, Parsons-Hubbard 2005), land snail shell degradation is badly understudied.

To fill this gap we (i) present the “catalogue” of shell alteration characteristics for common Central European temperate forest types, (ii) describe the course of shell degradation, and (iii) provide the overview of possible causes of shell alterations.

2. Methods

The course of shell degradation was studied on nine common European land snail species in six Central European forest types (for list of snail species and forest sites see Table 1 and Table 2).

Species were chosen in respect to their commonness, shell size and shape, and ecology to cover the general variability of central European terrestrial gastropods. They belong to eight families and cover wide range of sizes (Horsák et al. 2013). We clustered them into two size categories – small and large species. The average largest dimension of small species was

under 8 mm; large species were greater than 8 mm. All model species are common in Central Europe.

Table 1: Nine studied land snail species. Shell size, shell shape, type of the surface, and general ecological characteristics follow Kerney et al. (1983); names and families follow Horsák et al. (2013).

Landsnail species	Family	Size	Shape, structure	Ecology
<i>Arianta arbustorum</i> (Linné, 1758)	Helicidae	large	spherical, smooth	forest/hygrophilous
<i>Xerolenta obvia</i> (Menke, 1828)	Hygromiidae	large	flattened, grooved	open, xerophilous
<i>Alinda biplicata</i> (Montagu, 1803)	Clausiliidae	large	spindle, ribbed	forest
<i>I. isognomostomos</i> (Schröter, 1784)	Helicidae	large	spherical, hairy	forest/dendrophilous
<i>Cochlicopa lubrica</i> (O.F. Müller, 1774)	Cochlicopidae	small	spindle, lustrous	forest/open country
<i>Nesovitrea hammonis</i> (Ström, 1765)	Zonitidae	small	flattened, smooth	pioneer, forest/open
<i>Vallonia pulchella</i> (O.F. Müller, 1774)	Valloniidae	small	flattened, fine grooved	open country
<i>Cclumella aspera</i> Waldén, 1966	Vertiginidae	small	cylindrical, fine ribbed	forest, acidotolerant
<i>Carychium minimum</i> O.F. Müller, 1774	Carychiidae	small	spindle, grooved	hygrophilous

Six chosen sites represent the main types of Central European forests: alder alluvial, beech, oak-hornbeam, peat-bog pine, scree, and planted spruce forest. All sites are situated in the Czech Republic at medium altitudes between 400–600 m a.s.l. They differ in geology, vegetation cover, pH of the litter layer (3.52–7.22) and humidity (annual precipitation between 476–877 mm per year) (Table 2). High groundwater level is typical for alder alluvial and peat-bog pine forest; scree forest has fluctuating water regime dependent on local rainfall. All localities were twice per year treated with human hair as a prevention against wild board digging activity. Despite this, two boxes (one in oak-hornbeam forest and one in spruce cultivation) were lost.

Table 2. Description of studied forest sites giving their geographical location, altitude, soil pH, soil calcium content (mg/kg of substratum; measured in IG, AS CR), and annual precipitation (Φ). The missing Ca value in beech wood was not measured because of technical problems. Precipitation data were obtained from Czech Hydrometeorological Institute (CHMI).

Type of forest	Location	Altitude (m a.s.l.)	Soil pH	Ca (mg)	Φ (mm)
Alder alluvial forest	50° 02' 39" N, 14° 02' 00" E	430	4.30	73.58	497
Beech wood	49° 55' 15" N, 13° 50' 58" E	430	4.92	-	476
Planted spruce forest	50° 01' 02" N, 14° 41' 59" E	400	5.39	82.41	570
Oak-hornbeam forest	49° 57' 25" N, 14° 09' 06" E	420	7.22	209.80	514
Peat-bog pine forest	49° 39' 28" N, 15° 53' 12" E	600	3.52	27.39	877
Scree forest	49° 55' 15" N, 13° 50' 59" E	450	5.61	50.92	476

The study was focused on the influence of abiotic condition on shell degradation. Observed shells were hence deposited into the centre of polyethylene plastic boxes filled with local soil and leaf litter (hereafter referred as “soil”). Boxes (16.5 × 16.5 × 8 cm) were perforated by small holes (density 1 hole/cm²). Large shells were placed freely into the substrate filling each box, while small shells were put into permeable nylon bags (mesh size ca 320 μ m; bag size ca 8 × 6 cm) along with the soil. These boxes were then buried with their bottoms parallel with the boundary of soil A horizon approximately 15 cm deep.

Five fresh shells of each of nine model species were placed in each box and four boxes were buried at each site. Thus, altogether 120 shells per species and 1080 shells in total were used; all shells were used only once. Boxes were excavated sequentially after six, twelve, twenty-four and thirty-six months. The whole contents of excavated boxes were dried at room temperature, then shells were removed.

The presence of alteration types was evaluated from pictures of the shells. Shells were photographed from two sides (apical and umbilical for flattened and spherical shells, anterior and posterior for elongated shells) by an Olympus C-5060 Wide Zoom camera (large species) or by Olympus U-eye UI-1440-C camera mounted on an Olympus SZX 9 stereomicroscope (small species). Only one person evaluated all the pictures.

Mycelium from three specimens of *A. arbustorum* (oak-hornbeam, alder alluvial and peat bog pine forest) was semi-sterile scraped off from the shell surface and obtained material was used for fungi determination according to the protocol mentioned in Říhová et al. (2014). Some fungi were identified based on phenotypic characters by an Olympus BX 51 microscope and photographed by an Olympus E-510 camera.

3. Results

In the six types of Central-European forests, seven basic shell degradation types were recorded: colour changes, shell wall opacification, periostracum peeling, dissolution of calcareous parts of the shell, fragmentation, root imprint, and fungal (actinobacterial) infestation. The presence of distinct subtypes of these basic categories is listed in Table 3 for large species and Table 4 for small species. Table 5 sums numbers of recovered shells for all runs (6–36 months) of the study.

Table 3: Shell alteration characteristics typical for **large model species** and their presence in four runs of the study (6, 12, 24 and 36 months). Abbreviation of localities: OH – oak-hornbeam forest, SF – scree forest, BW – beech wood, AA – alder alluvial forest, PS – planted spruce forest, BP – peat-bog pine forest. – means no presence of particular degradation subtype; • scarce presence of degradation subtype; × prevalent presence of degradation subtype. **Colour changes** include fading, light and dark dyeing; **carbonate dissolution** includes initial and advanced pitting, holes and windows; **fragmentation** complete fragmentation, apex and shell mouth breakage. The last two items refer to the **fungal infestation**. Columns OH and PS for 36 months are empty due to loss of all experimental shells caused by wild boars.

	6 months						12 months						24 months						36 months						
	O H	S F	B W	A A	P S	B P	O H	S F	B W	A A	P S	B P	O H	S F	B W	A A	P S	B P	O H	S F	B W	A A	P S	B P	
fading	•	•	•	×	×	×	•	•	•	×	×	×	×	•	×	×	×	×			×	×	×		
light dyeing	-	-	•	•	•	×	-	•	•	•	•	×	-	-	•	•	×	×	•	•	•				×
dark dyeing	-	-	-	-	-	•	-	-	-	•	-	•	-	-	-	•	•	×	-	×	×				×
per. peeling	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	-	•	-	•	•	•				•
initial pitting	-	-	-	•	-	•	-	•	-	-	•	•	•	•	-	•	•	-	-	•	-				-
advanced pitting	-	•	•	•	×	×	•	•	•	×	•	•	•	×	×	×	×	•	×	×	×				×
holes	•	•	-	•	•	•	•	•	•	×	•	•	-	•	•	×	×	×	•	•	×				×
windows	-	-	-	•	-	-	-	-	-	•	-	•	-	-	-	•	•	•	-	-	•				-
complete fragmentation	-	-	-	-	-	-	•	-	-	-	•	-	•	-	-	•	•	•			•	•	•		×
apex breakage	•	-	•	-	-	-	-	-	-	-	-	•	-	-	•	•	•	•	-	•	•				×
mouth breakage	•	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				×
root imprint	-	-	-	•	-	-	-	-	-	•	•	•	-	•	-	•	-	•	-	•	•				•
fungal hyphae	-	-	-	-	•	-	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	×				•
pseudomycelial tufts	•	-	-	-	-	-	-	•	•	-	-	-	•	-	-	-	-	•	•	•	-				•

Table 4: Shell degradation characteristics typical for small model species and their presence in four runs of the study (6, 12, 24 and 36 months). Abbreviation of localities: OH – oak-hornbeam forest, SF – scree forest, BW – beech wood, AA – alder alluvial forest, PS – planted spruce forest, BP – peat-bog pine forest.– means no presence of degradation type; • scarce presence of degradation type; × prevalent presence of degradation type. **Opacification** has three subtypes (dot, spot and complete opacification); **colour changes** include fading, light and dark dyeing; **carbonate dissolution** include initial and advanced pitting, holes and windows. The last two items refer to the **fungal infestation**. Columns OH and PS for 36 months are empty due to loss of all experimental shells caused by wild boars.

	6 months						12 months						24 months						36 months					
	O	S	B	A	P	B	O	S	B	A	P	B	O	S	B	A	P	B	O	S	B	A	P	B
	H	F	W	A	S	P	H	F	W	A	S	P	H	F	W	A	S	P	H	F	W	A	S	P
dot opacification	•	-	•	-	-	-	•	•	•	•	-	-	•	•	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spot opacification	•	-	•	-	-	-	-	•	•	•	-	-	•	•	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-
complete opacification	•	×	•	×	•	×	•	×	×	×	×	•	×	×	×	×	×	•	×	×	•	-	-	•
fading	•	-	•	-	•	•	•	•	•	•	•	-	•	•	•	•	•	-	-	•	-	-	-	-
light dyeing	-	-	-	•	-	-	-	-	•	•	•	-	-	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	-
dark dyeing	-	-	-	•	-	•	-	-	-	•	•	•	-	-	-	-	•	•	•	•	•	-	-	•
periostracum peeling	•	•	•	•	-	-	•	•	•	-	-	•	-	-	•	-	-	-	•	•	-	-	-	-
initial pitting	-	•	•	-	-	-	•	-	•	•	-	-	•	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
advanced pitting	-	-	•	-	•	-	-	•	•	-	-	-	•	•	•	-	•	-	-	-	-	-	-	-
holes	-	•	•	•	•	•	-	•	•	•	×	•	•	•	•	•	×	•	•	×	•	•	•	•
windows	-	•	•	•	•	•	-	•	•	×	•	×	-	•	•	×	×	•	×	•	•	•	×	×
root imprint	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fungal hyphae	•	•	•	•	•	-	-	×	•	•	•	•	×	•	•	•	•	•	•	×	•	-	-	-
pseudomycelial tufts	-	-	•	-	-	-	-	-	•	-	•	-	-	•	•	-	-	-	•	-	-	-	-	-

Table 5: Percents of recovered shells for all model snail species and studied biotopes in all four runs of the study. Roman numbers (I–IV) indicates the runs of the study (6, 12, 24 and 36 months since beginning, respectively). Zero means that the whole shell group disappear; dashes (-) and asterisks (*) indicate runs disturbed by wild boars; dash the total destruction of whole group of conspecific shells; asterisk partly disturbed shell group.

	Oak-hornbeam				Scree forest				Beech wood				Spruce plantation				Alder alluvial forest				Peat-bog pine					
	I	II	III	I V	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	I V	I	II	III	IV	I	II	III	VI		
<i>A. arbustorum</i>	10	10	10	-	10	10	10	10	80*	100	10	10	100	100	10	-	100	100	10	10	10	10	10	10		
<i>X. obvia</i>	10	10	10	-	10	10	10	10	60*	100	10	10	100	100	10	-	100	100	10	10	10	10	10	10		
<i>I. isognomostomos</i>	10	10	10	-	10	10	10	10	40*	100	10	10	100	100	10	-	100	100	10	10	10	10	10	10		
<i>A. biplicata</i>	10	10	10	-	10	10	10	10	60*	100	10	10	100	100	10	-	100	100	10	80	10	10	80	60		
<i>C. lubrica</i>	10	-	10	-	10	10	10	10	100	100	10	10	100	100	10	-	100	100	10	10	-	10	10	80		
<i>N. hammonis</i>	10	-	10	-	10	10	10	10	100	100	10	10	0	80	80	-	100	100	10	80	-	10	60	80		
<i>C. aspera</i>	10	10	10	-	10	10	10	20	100	100	60	10	60	60	80	-	100	80	40	0	80	60	0	20		
<i>V. pulchella</i>	10	10	10	-	10	10	10	20	100	100	10	80	0	100	60	-	0	0	20	0	60	0	0	0		
<i>C. minimum</i>	10	10	10	-	10	10	80	0	60	60	20	60	0	60	20	-	0	0	0	0	0	0	0	0		

Two basic degradation patterns were observed. One of them is typical for small species, the second one for large shells. Degradation of large shells starts with periostracum disruption followed by ostracum dissolution: pits deepen into holes and shell is gradually dissolving (Figs. 1–4). Degradation of small species starts with dissolution of ostracum, while periostracum is still preserved. “Windows” (see below) are created and periostracum begins to disrupt later. In extreme cases, only empty periostracum remains (Figs. 5–8).

Fading of original colouration

After death, original shell colouration fades away and the pigment pattern, if present, becomes faint (Figs. 9–10). This is clearly visible especially in large model species (*A. arbustorum*, *A. biplicata*, *I. isognomostomos*, and *X. obvia*). Small species do not fade. Only in *C. aspera* the loss of original colour marks the initial stage of shell degradation. Fading could affect the whole surface of the shell, but it is not homogeneous and used to be spotty. It occurs only in shells with naturally pigmented periostracum and ostracum. It was observed in all studied forest types but in different extent. While fading was barely registered during first six months in forests with alkaline litter, large shells were highly faded in acidic litter at the same time (Table 3). This type of shell alteration is one of the most common and time-dependent.

Shell wall opacification

This degradation type occurs only in species with transparent shells (when fresh), and, as well as fading, it is also time-dependent (Table 4). First, opaque dots (“dot opacification” in Table 4; Fig. 11) emerge followed by broadening of these dots into round spots (“spot opacification” in Table 4, Fig. 12). In the last stage, shell wall becomes completely opaque (“complete opacification” in Table 4, Fig. 13). All these stages occurred during the first six month and toward later stages of degradation, the proportion of completely opaque shells increased. The intensity of opacification varies from almost imperceptible in early stages of degradation to completely opaque in later stages of degradation.

High incidence of complete opacification during the whole study is caused by the effect of quick disappearance of smallest species *C. minimum* and *V. pulchella*, which become opaque very early and then completely dissolve and vanish, while larger species *N. hammonis* and *C. lubrica* start to change their transparent nature later.

Loss of periostracum

Thin organic layer covering shell surface – periostracum – sometimes cracks (Fig. 14) and flakes off from calcareous part of the shell (Fig. 15). The area under a peeled periostracum retains its original surface sculpture. It exposes calcareous shell parts for subsequent dissolution. Loss of the periostracum is one of the initial types of shell degradation occurring already during first six months in all types of forests (Table 3).

It is typical especially for large species (*A. arbustorum*, *A. biplicata*, *I. isognomostomos*), in lesser extent it was recorded also in small species (mainly *C. minimum*, *C. lubrica* and *V. pulchella*; see Table 4). Although not visible with naked eye, it is also present in *X. obvia* (compare shell fractures with and without periostracum on Figs. 16–17).

Shell dyeing

Edges of periostracum as well as bare calcareous parts of shell are exposed to another environmental impact – shell dyeing. Colour changes usually start on patches with peeled periostracum (Fig. 18; light dyeing). Dark dyeing (Fig. 19) is typical for peat-bog pine forest and spruce plantation, where it started to occur during the first six month (Table 3). In lesser extent, it was detected in all studied forest types. Dyeing occurs in all types of shells and after two years, its dark variant prevails.

Dissolution of calcareous parts of the shell

Dissolution is typical for all studied forest types as well as each model land snail species. It has several distinct subtypes: pitting, holes and “windows”. The initial stage of dissolution we call initial pitting since it is marked by presence of shallow point depressions in the shell wall (Fig. 20). These depressions may extend into wide dissolved areas with smooth inner surface (advanced pitting; Fig. 21). The following stage – holes – is derived by broadening and

deepening of larger pits (see Table 3; Figs. 22–24). After emergence of holes, the rate of shell disappearance accelerates thanks to wide bare area exposed to dissolution.

“Windows” are a specific type of holes covered by the transparent, sometimes tinted periostracum (Figs. 25–26). In extreme cases (specifically in some small species, mainly *C. aspera*; rarely in *C. lubrica* and *N. hammonis* (Figs. 27–29), all calcareous parts of the shell are lost and only empty periostracum remains. Such empty periostraca often undergo deformation. This subtype of shell dissolution is extremely rare in large species and was recorded only in *A. arbustorum* (Fig. 26) and *I. isognomostomos* on edges of larger holes. In some cases, bare periostracum changes colour and becomes dark brown when still being transparent.

Fragmentation

Shell fragmentation is caused by mechanical breakage. It is marked by the presence of sharp edges of broken parts contrary to above mentioned dissolution (always smooth edges of dissolved holes).

Three types of shell fragmentation were discriminated. The shell could be broken into several similarly large pieces (complete fragmentation in Table 3; Fig. 30), or the apex or mouth could be chipped off to some extent (Figs. 31–32).

Fragmentation occurs in both size categories of shells, but in small species is easily mistaken for carbonate dissolution and wasn't recorded there.

Root imprint

On shells of all sizes we detected a specific muddy trace looking like double rail (Figs. 33–35). It resembled crawling trace of small wormlike creature with the maximum distance between “rails” around 0.75 mm. In last stage of the experiment, we found several cases of association of these traces with plant roots. Occurrence of these structures is weakly time-dependent and root imprints appeared especially in forests with acidic litter (Table 3).

Fungal infestation

The last of observed alteration characteristics is surface infestation by fungi and actinobacteria. Their colonies usually resemble thin fibres, sometimes branched (in Table 3 and 4 as “fungal hyphae”), and gain number of colours. The most frequent are black (Fig. 36–37), dark-brown, tan and white. Sometimes, small tufts or knots of various colour (the most frequently white (Fig. 38); also grey or lichen green) are present on shell surface. They represent actinobacterial pseudomycelia of genus *Streptomyces* (Fig. 39).

The continuous presence of fungal infestation during the whole experiment is caused by fragile nature of hyphae and pseudomycelial tufts. Those structures repeatedly grow up, degrade and their residues sometimes persist.

By the use of direct PCR amplification and sequencing, two fungi taxa were revealed: *Arthroderma insingulare* Padhyeet Carmichael 1972 (Ascomycota: Arthrodermataceae), and *Geomyces* sp. Traaen 1914 (Ascomycota: Myxotrichaceae). Microscopic observation revealed that black mycelium represents the mixture of two hyphae type. Fibres with clamp connection belong to some basidiomycete fungus, broader fibre with slightly verrucous surface belongs most likely to ascomycete fungi (Fig. 37).

Timing of shell degradation

Majority of observed degradation types emerge during the first **six months** and already during this period differences among habitats become evident. Localities with low soil pH and high substrate humidity have harmful effect on shells even after such short period (compare planted spruce forest (PS) and peat-bog pine forest (PB) with other columns in section 6

months in Table 3; and percentage of recovered shells in Table 5). On the opposite side, large shells in alkaline localities (oak-hornbeam and scree forest) look after six months more or less similar to the state immediately after death. While opacification of smallest species (*V. pulchella*, *C. minimum*) is almost finished during this period and followed by dissolution of calcareous parts, opacification of medium-sized species (*N. hammonis* and *C. lubrica*) occurred without dissolution. Large species undergo fading of original colouration and light dyeing, apex and shell mouth breakage, initial pitting and loss of periostracum. Other types of shell degradation (e.g. holes or fungal infestation) are recorded in lesser extent.

In initial phase of degradation, large shells disappear solely due to action of large animals. The persistence of small shells is influenced more by local abiotic factors than by animals, and smallest species start to disappear already within 6 months (spruce plantation; in lesser extent also in peat-bog pine and alder alluvial forest).

After **12 months**, the most pronounced types of shell alteration are dyeing, mouth breakage and fungal infestation; for small species also opacification. Smallest species start to disappear at that time (see Table 5). Since protective periostracal layer is already invaded, the dissolution of calcareous layers is common in both size groups. In small species and *A. arbustorum*, dissolution manifests also as windows. Their periostracum is still stiff enough to cover the holes in calcareous layers.

The cause of complete shell loss differs among habitat types. While in oak-hornbeam, scree and beech forests it is caused almost exclusively by wild boars, dissolution is more important in other sites.

After **two years**, habitat-related difference among small shell disappearance is clear. While in oak-hornbeam and scree forests minute shells persist almost completely, they start to disappear in beech wood and spruce plantation. Only scarce remnants could be found in alder alluvial and peat-bog pine forest. Since especially shells of durable small species (*C. aspera*, *N. hammonis* and *C. lubrica*) are present, windows are typical for this degradation stage. In specific cases only empty periostraca remain (Figs. 27–29). Degradation of the large species is in its advanced state: shells are heavily faded, stained and carbonate dissolution is remarkable. Thanks to non-vertebrate decomposition, first specimens of large shells disappear (*A. biplicata* in peat-bog pine forest).

In the last stage of shell degradation observed in this experiment (**36 months** after burial), almost all small shells disappeared. Some of them were destroyed by wild boars (oak-hornbeam forest), other just dissolved (alder alluvial and peat-bog pine forest). Only a few severely damaged shards or empty periostraca remain in peat-bog pine forest. Large shells in acidic and humid localities (alluvial and peat-bog pine forests) are deeply ruined and sometimes do not allow species identification. Again, *A. biplicata* is the only large species which disappeared completely. None of other large species did disappear during the study thanks to abiotic degradation.

4. Discussion

During three years of field experiment, we recorded seven main types of shell degradation. Some of them are time-dependent (fading, opacification, periostracum peeling, dissolution of calcareous parts, shell dyeing). Other are mostly accidental (fragmentation, fungal infestation), but longer exposition increases their probability of occurrence as well. Similar types of shell alterations were already mentioned by Millar and Waite (2004) and Pearce (2008) and they seem to be common in temperate forests. All observed types of shell alteration are present in almost all studied snail species as well as in all studied localities.

Soil pH and soil humidity are the most important environmental factors enhancing shell disappearance (see also work of Cernohorsky et al. (2010: 237)), but taphonomic signature (unique mixture of alteration types typical for particular locality or group of localities) is

produced by combined effect of other influences. They usually do not speed up degradation or disappearance rate, but leave characteristic traces.

According to our knowledge, majority of shell alterations were caused by abiotic environmental factors, but we revealed also the role of other organisms in the process of shell degradation.

Causes of shell alterations

Fading, one of the earliest degradation types, is already known from Mediterranean shells. Menez (2002) convincingly showed that in Mediterranean, insolation is the main factor causing loss of colouration. Since the shells in current field experiment weren't exposed to sun light, the cause of fading in temperate forests has to be different. Also the manifestation of this alteration type is different. Shells exposed to sun-light fade evenly and the whole exposed surface changes colour homogeneously. On shells buried in substrate, the loss of colour manifests in small patches and finally, shells were heterogeneously spotted. It looks like the fading appeared only in places with direct contact of leaf litter and/or soil particles with the shell surface.

Typical initial stage of small species shell degradation is **shell wall opacification**. Opacification is caused by increased humidity or direct immersion in water. In very small species (e.g. *C. minimum*) it is only matter of days until the shell becomes entirely opaque (Říhová & Juříčková, *in. prep.*). In the field, the process is slower and habitat-dependent. Even after 24 months more or less translucent shells were found (oak-hornbeam forest).

The mechanism of opacification remains unknown. The shell itself is built from composite material made from aragonite crystallites covered by thin sheets of organic material (Wilmot et al. 1992, Dauphin & Denis 2000, Hou et al. 2003) and opacification might be the result of degradation of these sheets. Other possible cause is the unstuck of organic sheet from aragonite crystallites, when opacification might be caused by thin layer of water or air between them.

Shell dyeing appeared in all types of forest environment and affected all model species regardless of their size or original colouration. This alteration type is usually connected with already eroded shell parts, free periostracal fringes, ostracal spots barren from periostracum or surface of pits and edges of holes. Older shells are dyed more and shells with most pronounced staining originate from peat-bog pine forest and spruce plantation. Soil of both habitats is rich in humic and fulvic acids. Since it is known that those chemical substances cause dyeing of organic matters (Hall & Packham 1965, van der Sanden 1992), it is probable that they are responsible also for observed artificial shell colouration.

In accordance with Morton (2006) we believe that **cracking of periostracum** is caused by high substrate humidity and its fluctuation. It is especially common in alder alluvial and peat-bog pine forests, in lesser extent also in beech and spruce forest. All those habitats are seasonally for short period highly moist what negatively affects protective organic layer of the shell. On the other hand, those habitats are also highly acidic and cracking of periostracum could be caused by chemical changes driven by low pH.

Fragmentation is caused by a mechanical cause. Biotic reasons are more pronounced in living snails since fragmentation usually emerges during predation of living specimen (for overview, see work of Barker (2004)). Millar and Waite (2004) described three types of fragmentation attributed to animals: removing of the shell whorls by beetles or harvestmen; gnawing and grazing marks on the shell surface; and holes rasped by *Aegopinella nitidula*.

The major causes of fragmentation in this study were wild boars and humans. Wild boars completely destroyed the fourth boxes in oak-hornbeam and planted spruce forests. They smashed boxes as well as some large shells during investigation of new objects in their territory. Other shells were thrown out of the boxes and lay freely on substrate. After wild

board action, authors of the study accidentally broke some of them when reaching the locality. Thus, fragmentation caused by large animals is important cause of shell degradation and accelerates shell disappearance. Our results support Pearce's (2008) and Cadée's (1999, 2016) conclusions about the importance of bioerosion for shell degradation and its enhancing properties. Without bioerosion, shells would persist much longer in alkaline environment.

On the other hand, breaking of apex and mouth as the most overhanging parts of shells are caused probably by small movement of substratum. Several taxa of land snails (e.g. genus *Rumina* and some door snails (Welter-Schultes 2012)) break their apices already during snail life. Shell apex, so called protoconch, is the oldest part of shell and therefore easy to break. Moreover, water soaked shells are more brittle and prone to breakage. Thickened apertures overhang the overall shell shape and that causes their easy breakage. In accordance with Menez (2002) we recorded that shells with spherical shape are more breakage-resistant than shells of other shapes (Table 5 – see the difference between spherical *A. arbustorum* and *I. isognomostomos* and elongated *A. biplicata*).

The first cases of **root imprint** look like small worm footprint. In later stages of the experiment, branched traces were found and shortly after that, the association of unidentified seedling tightly touching shell surface was detected.

In localities with lack of some important element, plant roots are able to “stretch out” in the direction of source of deficient element in order to increase its uptake (Hodge 2004, De Kroon et al. 2005, Morris et al. 2017). Observed “footprint” is thus a root imprint, what is supported by the fact that it is common especially in peat-bog pine forest, where calcium could be a limiting element for plants. Empty shells hence become important source of it and we believe that plants could enhance the speed of shell degradation in such localities.

Fungal and actinobacterial infestation was very common in all studied localities during all four controls. When assessing the age of an empty shell, presence of fungal-like organisms is useful. We know from laboratory experiment (Říhová et al. 2014) that fungi colonise shell surface early after snail's death – within three months. Within this period, shells are probably protected by antifungal properties of gastropod slime (Czeczuga 2000, Zhong et al. 2013).

Several morphotypes of fungal hyphae and actinobacteria colonies were present on the shell surface (they are summarized into two categories in Table 3 and Table 4). When assessing this diversity in detail, around 30 morphotaxa were found (for detailed overview see Říhová et al. 2014). Fungi and actinobacteria colonise outer surface of shell, but do visibly penetrate neither periostracum nor ostracum. It seems more likely that they use empty shells as an inert surface for reaching other parts of substratum, not the source of calcium or organic compounds itself. However, fungi using complex organic (keratinous) substrates are known (Błyskal 2009). Periostracum has different chemical composition (Hunt & Oates 1978) and since we didn't measure metabolic activity of observed fungi, their specific role in shell degradation remains unknown.

Size-specific degradation pattern

The habitat type was found to be of less importance for shell degradation than shell size and other intrinsic factors (in detail see Říhová et al. 2018). Already, Menez (2002) and Pearce (2008) noticed species-specific degradation velocity. Small shells disappear prior the large ones (Hotopp 2002, Millar & Waite 2004).

Size-specific degradation pattern is not necessarily connected with different degradation velocity. It depicts the typical course of shell alteration for two size categories. Large shells degrade “from outside” and shell alteration starts with periostracum disruption. Small shells degrade “from inside” and ostracal dissolution takes place (compare Figs. 1–4 and Figs. 5–8).

This observation refers to the fact that shell degradation is influenced also by other, so far unknown shell characteristics (e.g. the thickness of periostracum or microstructural architecture), not only shell size.

Taphonomic signatures: site-specific degradation pattern

When evaluating overall shell condition after triennial experiment, low environmental impact on shells was recorded in **oak-hornbeam** and **scree forests**. Shells retain their original lustre and intact periostracum for relatively long time, fading was common even in later stages of shell degradation. All types of alteration, which appeared in other habitats very early, occurred in those two forests later. Even small shells in oak-hornbeam persist for long time (see Table 5). For large species, conspicuous fungal and actinobacterial infestation was common. In later stages of large shell degradation, high incidence of fading, loss of periostracum and initial pitting were typical.

Also shells deposited in **beech wood** are heavily infested by actinobacterial tufts. When persisting for longer time, small shells are highly opaque here.

For shells degrading in **spruce cultivation**, light (brightly orange) dyeing was typical. When shells persist here more than two years, their surface was highly pitted and mouths chipped off.

Alluvial and **peat-bog pine forests** represent the most corrosive environment. After two years of degradation, local shells were heavily perforated and fragmented. Ostracal layers in small shells underwent rapid dissolution and windows emerge. Remaining periostraca underwent deformation. This is typical especially in peat-bog pine forest, in alder alluvial it was observed in lesser extent.

Surprisingly, Pearce (2008) didn't mention site-specific degradation pattern and rate of decomposition when examining shell degradation in three types of North American forests. Those forests are probably very similar to each other. Contrary, from marine palaeontological literature (e.g. Kidwell et al. 2001), taphonomic signatures are well-known.

How to recognize old shells?

When assessing the shell age, it is necessary to take into account the influence of specific biotope as well as intrinsic shell factors.

Fresh shells retain original colouration and almost intact lustrous periostracum. Fresh minute shells possess completely or largely transparent shell wall. No fungal or actinobacterial infestation is present.

The influence of habitat type on shell degradation is fundamental. In wet and acid localities (like e.g. peat-bog pine or alder alluvial forests) the degradation is rapid; dry and alkaline localities (oak-hornbeam, scree and partly beech forests) enable long shell persistence.

Empty small shells in acidic wet environment are usually not older than several months. We agree with Cernohorsky et al. (2010) that in wet and acid localities small shells almost completely disappear within one year. In dry alkaline environment, small shells change their transparent appearance and become opaque usually during several months, but could stay preserved for at least three years.

Several months old large shells in acidic environment loss original colouration and their periostracum started to peel off. Shells older than one year loose periostracum and possess huge dissolution of calcareous layers (pitting or holes), broken shell parts are susceptible to dyeing. Thus, shell fragments of large species found in wet localities are probably younger than relatively well preserved shells in dry localities.

Fungi colonise surface of empty shells of all size and all habitat types within three months (Říhová et al. 2014), what is probably the best indicator of shell freshness: no fungi = shell younger than three months.

Acknowledgement

Authors are grateful for financial support to the Grant Agency of Charles University (project GAUK No. 43-259 101), and the Czech Science Foundation (projects GAČR No. 17-05696S and 17-07851S). The project was financed also by SVV 260434/2018 and Progres Q17. Hlávka's Foundation supported presentation of intermediate results. ČHMÚ kindly provided climatic data. Jan H. Ponert helped with uncovering the mystery of root imprint, Ondřej Koukol and Lukáš Faltejsek helped with fungal determination and provided fungi microphotographs. Zdeněk Janovský improved greatly early versions of manuscript. We thank Lukas Bíba for helping with graphics.

References

- Barker G.M. (ed) 2004. Natural Enemies of Terrestrial Molluscs. CABI.
- Barrientos Z. 2000. Population dynamics and spatial distribution of the terrestrial snail *Ovachlamys fulgens* (Stylommatophora: Helicarionidae) in a tropical environment. *Rev. Biol. Trop.* 48 (1): 71–87.
- Błyskal B. 2009. Fungi utilizing keratinous substrates. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 63 (6): 631–653.
- Cadée G.C. 1999. Bioerosion of shells by terrestrial gastropods. *Lethaia* 32: 253–260.
- Cadée G.C. 2016. Decay rates of shells in aquatic and terrestrial habitats, some comments. *Basteria* 80 (4–6): 193–194.
- Cameron R.A.D., Cook L.M. 1999. Island land snail relocated. *J. Molluscan Stud.* 65(2): 273–274.
- Cameron R.A.D., Pokryszko B.M. 2005. Estimating the species richness and composition of land mollusc communities: problems, consequences and practical advice. *J. Conchol.* 38 (5): 529–547.
- Cernohorsky N.H., Horsák M., Cameron R.A.D. 2010. Land snail species richness and abundance at small scales: the effects of distinguishing between live individuals and empty shells. *J. Conchol.* 40(2): 233–241.
- Czeczuga, B., 2000. Zoosporic fungi growing on freshwater molluscs. *Pol. J. Environ. Stud.* 9 (3): 151–156.
- Dauphin Y., Denis A. 2000. Structure and composition of the aragonitic crossed lamellar layers in six species of Bivalvia and Gastropoda. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 126: 367–377.
- De Kroon, H., Huber, H., Stuefer, J. F., Van Groenendael, J. M. 2005. A modular concept of phenotypic plasticity in plants. *New Phytol.* 166: 73–82.
- Graveland J., van der Wal R., van Balen J.H., van Noordwijk A.J. 1994. Poor reproduction in forest passerines from decline of snail abundance on acidified soils. *Nature* 368: 446–448.
- Hall E.S., Packham R.F. 1965. Coagulation of Organic Colour with Hydrolyzing Coagulants. *J. Am. Water Works Assoc.* 57 (9): 1149–1166.
- Hawkins J.W., Lankester M.W., Nelson, R.R.A 1998. Sampling terrestrial gastropod using cardboard sheets. *Malacologia* 30 (1–2): 1–9.
- Hodge A. 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytol.* 162: 9–24.
- Horsák M., Juříčková L., Pícka J. 2013. Molluscs of the Czech and Slovak Republics. Kabourek Press Zlín.
- Hotopp K.P. 2002. Land snails and soil calcium in Central Appalachian Mountain forest. *Southeast. Nat.* 1 (1): 27–44.
- HouD.F., Zhou G.S., Zheng M. 2003. Conch shell structure and its effect on mechanical behaviours. *Biomaterials* 25 (4): 751–756.
- Hunt, S., Oates K. 1978. Fine structure and molecular organization of the periostracum in a gastropod mollusc *Buccinum undulatum* L. and its relation to similar structural protein systems in other invertebrates. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 283: 417–459.
- Johnston P.R.,Hguyen H.D.T., Park D., HirookaY. 2015. *Harorepupu aotearoa* (*Onygenales*) gen. sp. nov.; a threatened fungus from shells of *Powelliphanta* and *Paryphanta* snails (*Rhytididae*). *IMA Fungus* 6(1): 135–143.
- Kerney M.P., Cameron R.A.D, Jungbluth J.H. 1983. *Die Landschnecken Nord- und Mitteleuropas. Ein Bestimmungsbuch für Biologen und Naturfreunde.* Verlag Paul Parey. Hamburg und Berlin.
- Kidwell S.M., Rothfus T.A., Best M.M.R. 2001. Sensitivity of Taphonomic Signatures to Sample Size, Sieve Size, Damage Scoring System, and Target Taxa. *Palaios* 16: 26–52.
- Martin K., Sommer M. 2004a. Relationship between land snail assemblages patterns and soil properties in temperate-humid forest ecosystems. *J. Biogeogr.* 31: 531–545.
- Martin K., Sommer M., 2004b. Effects of soil properties and land management on the structure of grassland snail assemblages in SW Germany. *Pedobiologia* 48: 193–203.

- Menez A. 2002. The degradation of land snail shells during the annual dry period in a Mediterranean climate. *Iberus* 20 (2): 73–79.
- Míková A. 2006. The malacocoenosis response on selected gradients of forest microhabitats. (Odpověď malakocenóz na vybrané gradienty lesních mikrostanovišť). Diploma Thesis, Charles University in Prague (Czech Republic). (In Czech)
- Millar A.J. & Waite S. 2004. Patterns of shell damage among snails from a coppice woodland in Sussex, England. *J. Conchol.* 38 (4): 421–440.
- Moreno-Rueda G., Marfil-Daza C., Ortiz-Sanchez F.J., Melic A. 2008. Weather and the use of empty gastropod shells by arthropods. *Ann. Soc. entomol. Fr.* 44(3): 373–377.
- Morris E.C., Griffiths M., Golebiowska A., Mairhofer S., Burr-Hersey J. Goh. T., von Wangenheim D., Atkinson B., Sturrock C.J., Lynch J.P., Vissenberg K., Ritz K., Wells D.M., Mooney S.J., Bennett M.J. 2017. Shaping 3D Root System Architecture. *Curr. Biol.* 27 (17): R919-R930.
- Morton J. 2006. The effect of relative humidity on mollusc periostracum and the use of coatings to prevent loss. *Collection Forum* 20 (1–2): 67–82.
- Parsons-Hubbard K. 2005. Molluscan taphofacies in recent carbonate reef/lagoon systems and their application to sub-fossil samples from reef cores. *Palaios* 20: 175–191.
- Peake J.F., James P.W. 1967. Lichens and mollusca. *Lichenologist* 3: 425–427.
- Pearce T.A. 2008. When a snail dies in the forest, how long will the shell persist? Effect of dissolution and micro-bioerosion. *Am. Malacol. Bull.* 26 (1/2): 111–117.
- Pitt S.J., Graham M.A., Dedi C.G., Taylor-Harris P.M., Gunn A. 2015. Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail *Helix aspersa*. *Br. J. Biomed. Sci.* 72(4):174–178.
- Pouličková A., Hájek M., Rybníček K. (Eds.) 2005. Ecology and paleoecology of spring fens in the western part of the Carpathians. Palacký University, Olomouc.
- Říhová D., Janovský Z., Koukol O. 2014. Fungal communities colonising empty *Cepaea hortensis* shells differ according to litter type. *Fungal Ecol.* 8: 66–71.
- Říhová D., Janovský Z., Horsák M., Juříčková L. 2018. Shell decomposition rates in relation to shell size and habitat conditions in contrasting types of Central European forests. *J. Molluscan Stud.* 84 (1): 54–61.
- Schamp B., Horsák M., Hájek M. 2010. Deterministic assembly of land snail communities according to species size and diet. *J. Anim. Ecol.* 79 (4): 803–810.
- Thurman C.F., Shackleton L.P., Haskell D.G. 2008. Does the Density of Dead Shells Predict the Density of Living *Anguispira cumberlandiana* Lea 1840 (Gastropoda: Discidae)? *The Am. Midl. Nat.* 159 (2): 478–481.
- van der Sanden W.A.B. 1992. *Through Nature to Eternity: The Bog Bodies of Northwest Europe.* Batavian Lion International.
- Welter-Schultes F. 2012. *European non-marine molluscs, a guide for species identification.* Planet Poster Editions, Göttingen, Germany.
- Wilmot N.V., Barber D.J., Taylor J.D., Graham A.L. 1992. Electron microscopy of molluscan crossed-lamellar microstructure. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 337: 21–35.
- Zhong J., Wang W., Yang X., Yan X., Liu R. 2013. A novel cysteine-rich antimicrobial peptide from the mucus of the snail of *Achatina fulica*. *Peptides* 39: 1–5.
- Zuschin M., Stachowitsch M., Stanton Jr. R.J. 2003. Patterns and processes of shell fragmentation in modern and ancient marine environments. *Earth Sci. Rev.* 63: 33–82

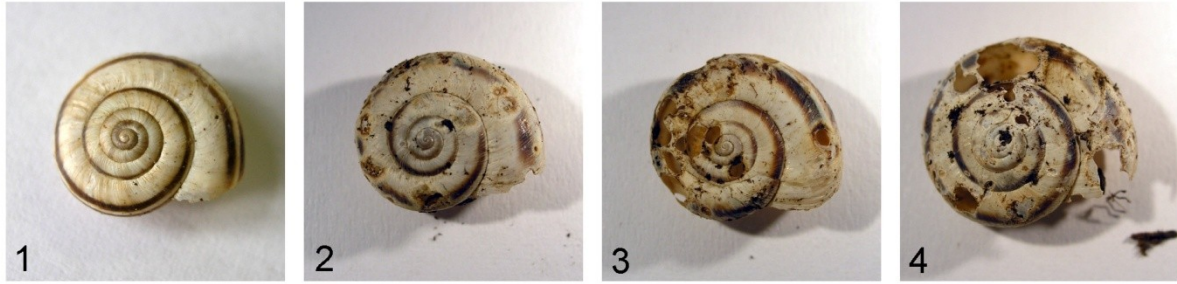


Fig. 1–4: degradation pattern typical for large shells (*X. obvia*). 1 – fresh shell; 2 – advanced pitting combined with dark dyeing; 3 – progressive dissolution of calcareous layers, advanced pitting combined with holes; 4 – late stage of dissolution.

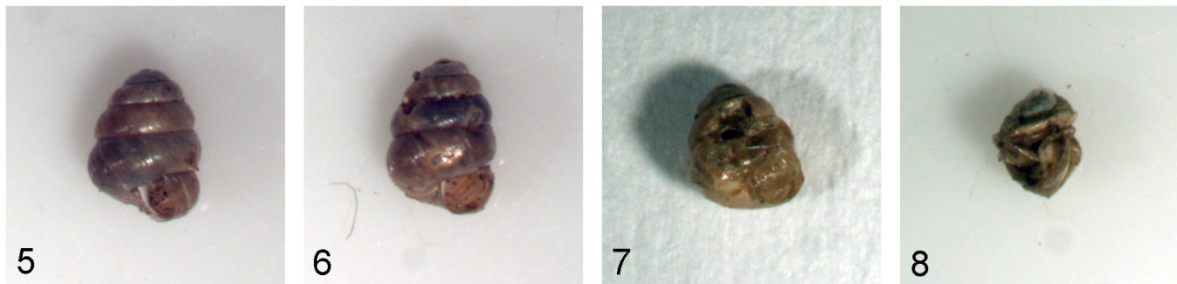


Fig. 5–8: degradation pattern typical for some small shells (*C. aspera*). 5 – fresh shell; 6 – windows; 7 – progressive dissolution of calcareous layers combined with persisting periostracum; 8 – empty periostracum could undergo deformation.



Fig. 9–10: fading. 9 – fading on *X. obvia* (oak-hornbeam forest, 12 months); 10 – heavy fading combined with both types of dyeing, *A. arbustorum* (peat-bog pine forest, 12 months).



Fig. 11–13: opacification of *C. lubrica*. 11 – initial phase of opacification is marked by small opaque dots in the shell wall (beech forest, 6 months); 12 – intermediate phase of opacification marked by round spots (scree forest, 12 months); 13 – final stage of opacification (alder alluvial forest, 6 months).



Fig. 14–15: loss of periostracum. 14 – cracking of periostracum combined with fading (*A. arbustorum*; spruce cultivation, 12 months); 15 – subsequent loss of periostracum (*I. isognomostomos*; scree forest, 12 months).

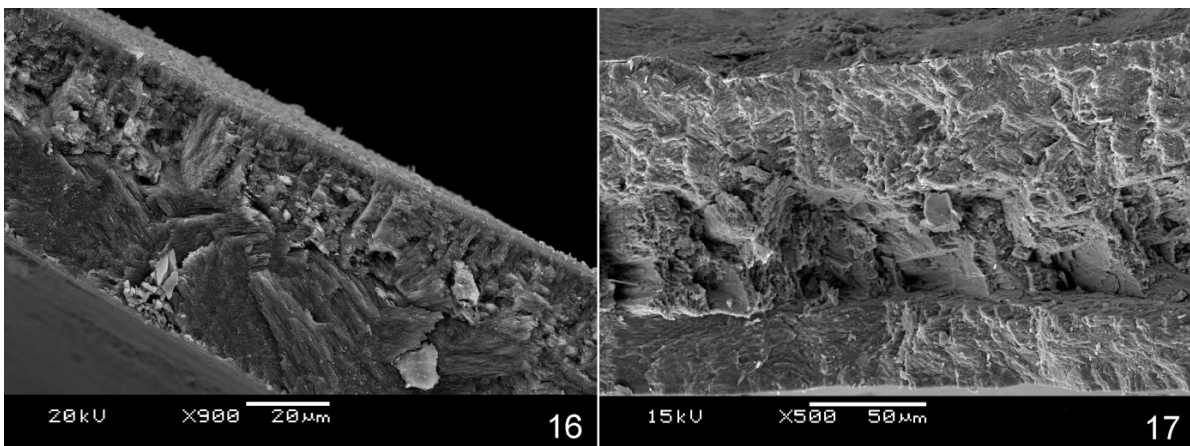


Fig. 16–17: SEM pictures of shell fractures. 16 – fracture with complete periostracum; note conspicuous periostracal projections on the shell surface in the upper part of the picture. 17 – fracture with impaired periostracum (only thin layer tightly connected with ostracum remains, in upper part of the fracture). First number in black bar indicates accelerating voltage of electron beam, second magnification. Picture 17 made by Petr J. Juračka.

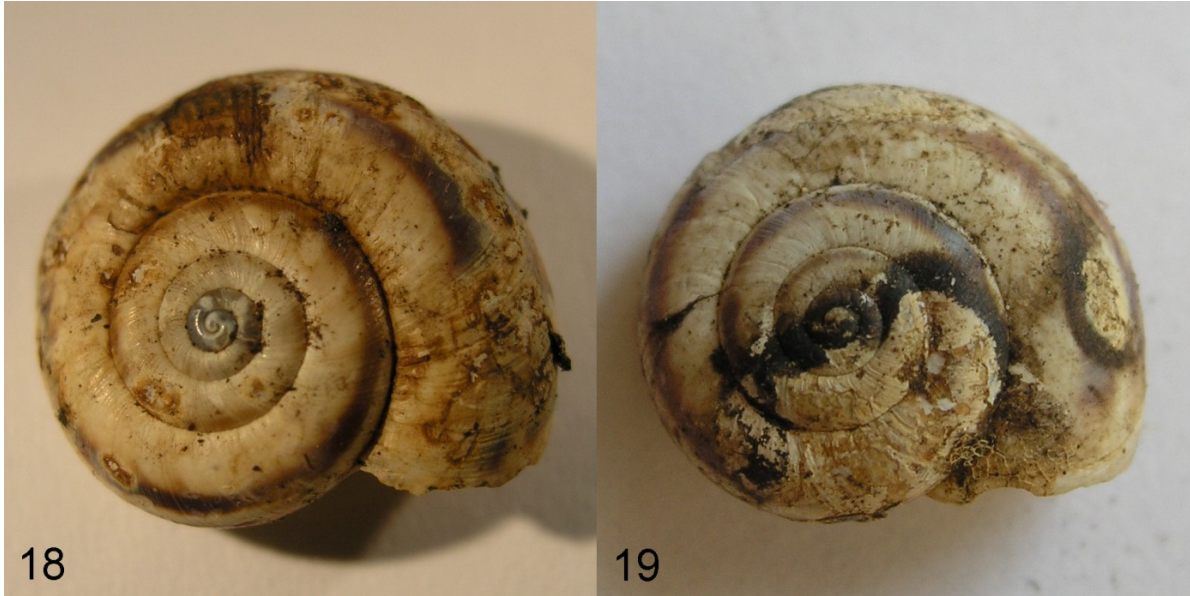


Fig. 18–19: dyeing. 18 – light dyeing (*X. obvia*; peat-bog pine forest, 6 months); 19 – dark dyeing (*X. obvia*; beech forest, 36 months).

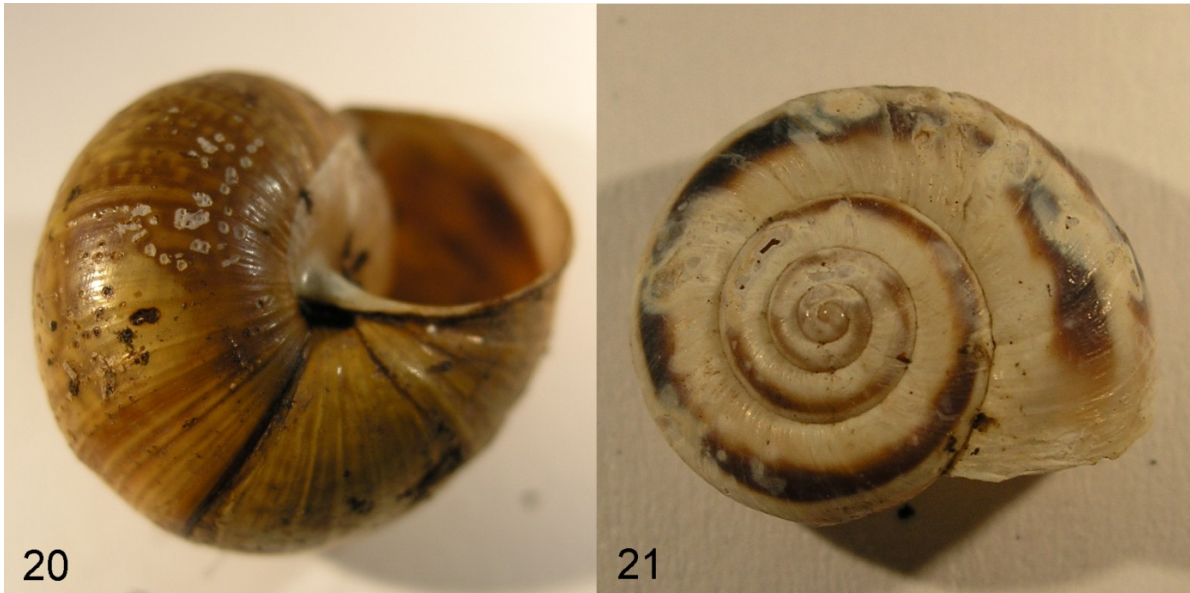


Fig. 20–21: initial phase of dissolution of calcareous layers. 20 – initial pitting (*A. arbustorum*; peat-bog pine forest, 6 months); 21 – advanced pitting (*X. obvia*; planted spruce forest, 12 months).



Fig. 22–24: late phase of dissolution. 22 – holes on *X. obvia* (peat-bog pine forest, 36 months); 23 – holes on *I. isognomostomos* (peat-bog pine forest; 36 months); 24 – holes on *A. biplicata* (scree forest, 12 months).

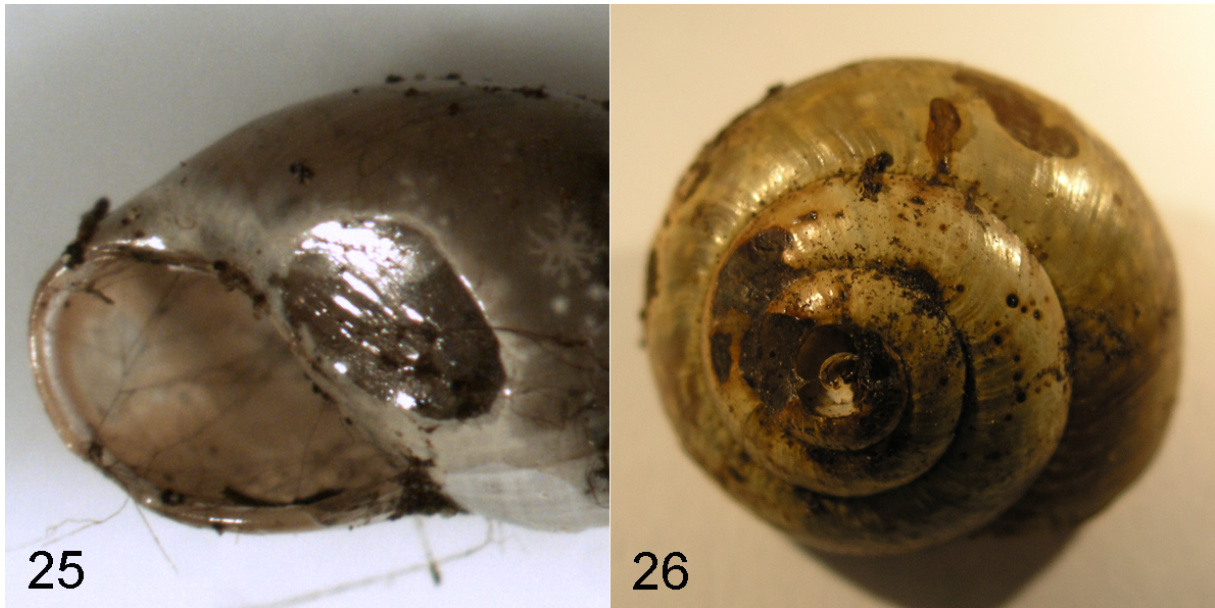


Fig. 25–26: specific type of small shell degradation – windows. 25 – typical appearance of windows (*C. lubrica*; alder alluvial forest, 12 months); 26 – rare occurrence of windows in large species, combined with heavy fading and dark dyeing (*A. arbustorum*; peat-bog pine forest, 12 months).

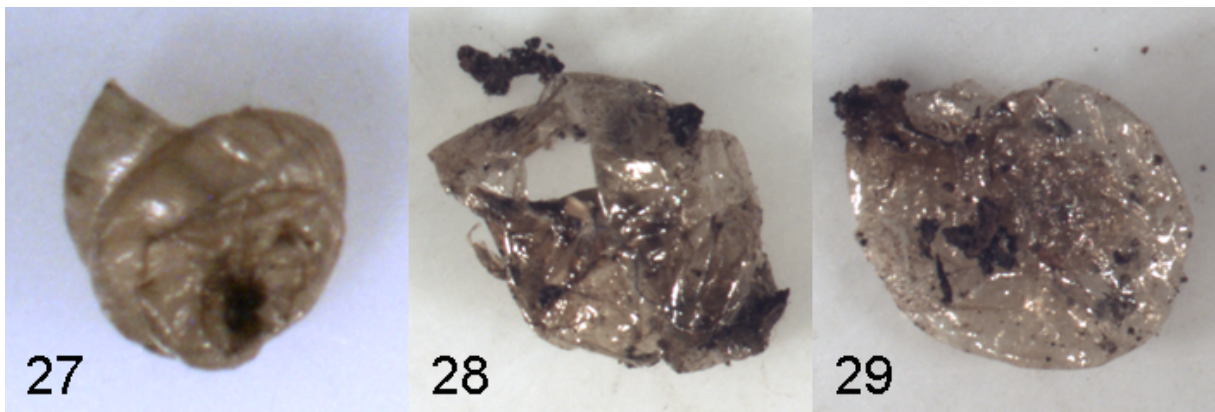


Fig. 27–29: empty periostracum of *C. aspera* (peat-bog pine forest, 12 months; fig. 27), *C. lubrica* (peat-bog pine forest, 36 months; fig. 28) and *N. hammonis* (peat-bog pine forest, 36 months; fig. 29).



Fig. 30–32: mechanical fragmentation. 30 – complete fragmentation caused by trampling of large vertebrate (*A. arbustorum*; planted spruce forest, 12 months); 31 – broken apex (*A. arbustorum*; oak-hornbeam forest, 6 months); 32 – chipped mouth combined with fading (*A. biplicata*; alder alluvial forest, 6 months).



Fig. 33–35: plant root trace. 33 – combined with dark dyeing on *X. obvia* (alder alluvial forest, 6 months); 34 – combined with windows and dark dyeing on *A. arbustorum* (peat-bog pine forest, 36 months); 35 – combined with heavy fading and periostracum peeling on *I. isognomostomos* (alder alluvial forest, 6 months).



Fig. 36–37: fungal infestation. 36 – thin black mycelium on *X. obvia* (beech forest, 12 months); 37 – LM picture of thin black mycelium reveals that it is a mixture of ascomycete (broader rugose hyphae) and basidiomycete (hyphae with clamp connections). Picture 37 made by Ondřej Koukol.

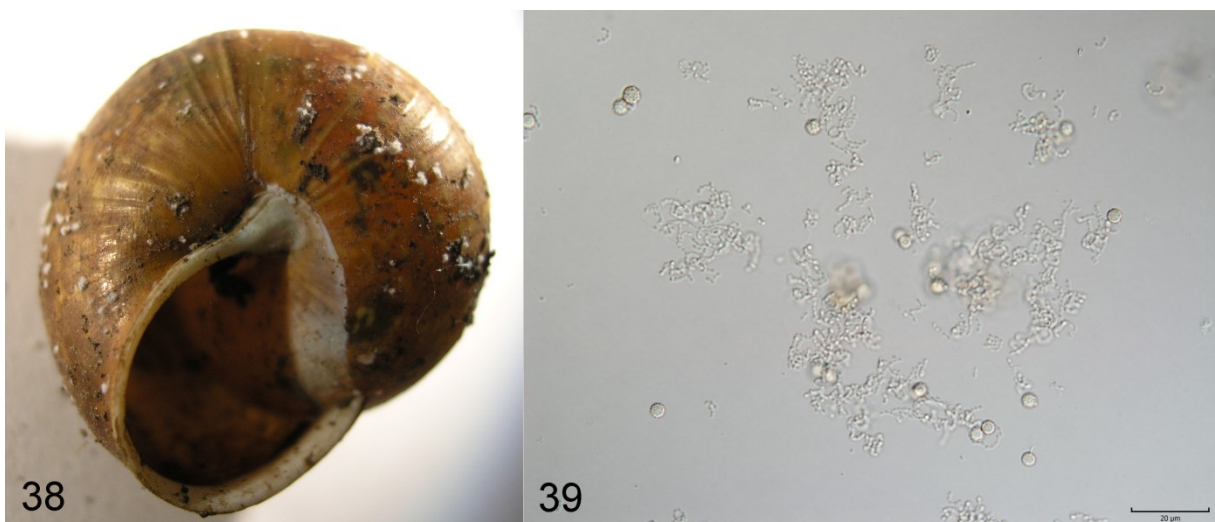
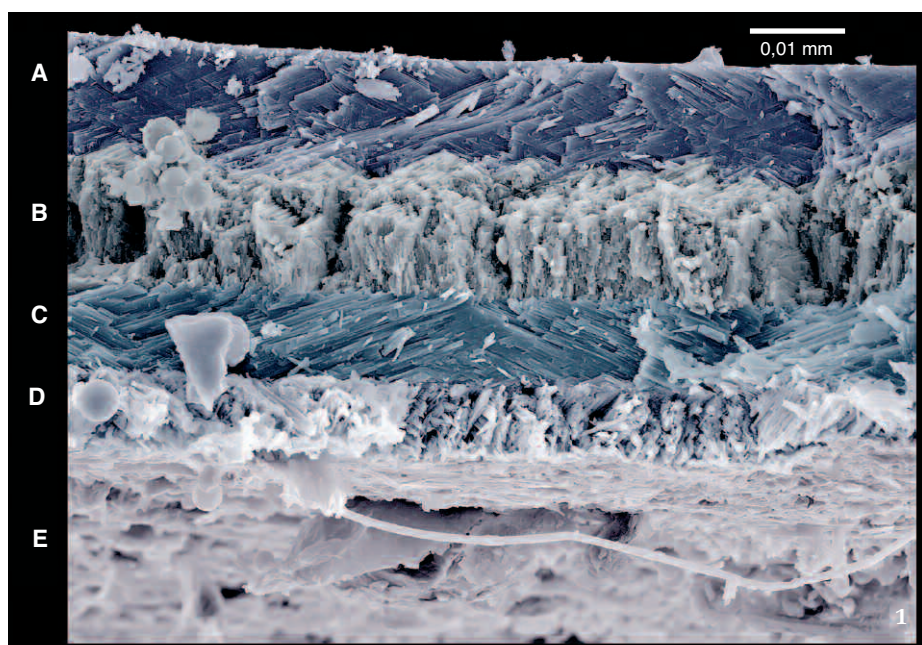


Fig. 38–39: actinobacterial infestation. 38 – pseudomycelial tufts on *A. arbustorum* (oak-hornbeam forest, 6 months); 39 – LM picture of *Streptomyces* sp. with typical chain shape. Picture 39 made by Ondřej Koukol.

Příběhy z elektronového mikroskopu. 3. Jakou mají měkkýši strukturu své schránky

Schránky měkkýšů jsou objektem zájmu dětí, vědců i profesionálních sběratelů. Na jejich povrchu můžeme nalézt rozmanité struktury, často udivující komplexnosti a krásy, pro které se společně s pestrými barvami stávají předmětem obdivu. Málokdo ale ví, že i pohled do nitra stěny schránky odhalí obdivuhodné vápenaté mikrostruktury.



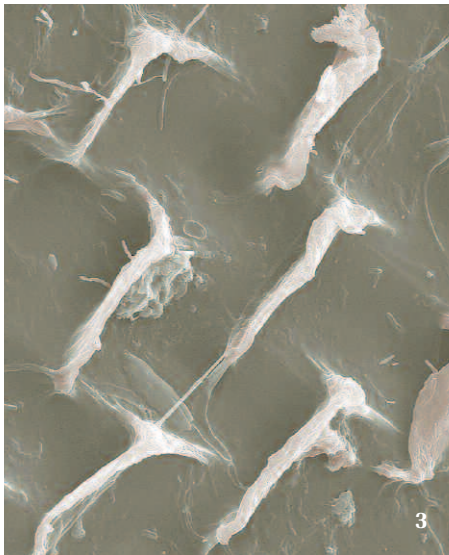
Ulity i lastury měkkýšů tvoří uhličitán vápenatý (CaCO_3), všeobecně oblíbená stavební látka u bezobratlých živočichů. K vytváření kosterních prvků či alespoň inkrustaci pevných částí svého těla ho používají také některé houby, ramenonožci, korýši, mechovky, mořští mnohoštětinatci nebo koráli. Uhličitán vápenatý se vyskytuje v několika krystalografických variantách, z nichž nejčastější jsou v živočišné říši kalcit a aragonit. Obě varianty se mírně liší svými fyzikálními vlastnostmi. Kalcit má nižší hustotu, méně stabilní je však aragonit. Měkkýši své schránky vytvářejí z obou variant, ale u suchozemských druhů je aragonit coby stavební materiál mnohem běžnější.

Pod skenovacím elektronovým mikroskopem zjistíme, že se schránka neskládá z jednolitého plátu uhličitanu vápenatého. Naopak, nachází se v ní množství drobných, složitě uspořádaných krystalků, které obaluje tenká blanka, tvořená složitou směsí proteinů. Tato vnitřní mikrostruktura, v níž je anorganická část schránky navzájem propojena organickým „tmelem“, zajišťuje vynikající mechanické vlastnosti. Drobné prasklinky, vznikající různými nárazy ulity (např. při pádu), pronikají snáze mezi krystalky a organickou částí, čímž „vyplytvají“ energii a brzy zcela zanikají. Integrita schránky jimi není ohrožena tak, jak by tomu bylo v případě popraskání schránky vytvořené z jediného kusu. Střídání organické a anorganické fáze zajišťuje také určitou míru pružnosti. Na povrchu schránky se navíc nachází pigmentovaná organická vrstva – periostrakum (obr. 2F, obr. 3), dávající ulitám plžů charakteristický lesk a zbarvení a podporující jejich pružnost. Mnohdy nese různé jizvy nebo výstupky a výrůstky (také obr. 2 a 3).

Periostrakum při tvorbě schránky vzniká nejdříve a teprve pod ním dochází ke krystalizaci uhličitanu vápenatého a ukládání vnitřních anorganických vrstev. Ve schránkách měkkýšů se vyskytuje několik typů mikrostruktur, jejichž tvarová rozmanitost se odráží i v jejich názvech. U mlžů zde nalézáme často vrstvu, která se skládá z pěti- až šestibokých hranolků kalcitu (hranolová vrstva), a také lístkovitou vrstvu z plochých krystalů položených přes sebe. Lamelární vrstva (má několik různě orientovaných vrstev – obr. 1 a 2) je složena z množství tyčinkovitých krystalků uhličitanu vápenatého vytvářejících lamely, které se k sobě přikládají v různých úhlech. Výsledný obrázek poněkud připomíná podlahu sestavenou z různých velikých parket se specifickým povrchovým ryhváním.

1 Lom schránky hlemýždě zahradního (*Helix pomatia*). Na snímku jsou patrné čtyři vrstvy lamelární struktury (písmena A–D), ze kterých je schránka složena. Vnější povrch ulity představuje spodní hranu lomu (E).

2 Lom schránky zuboústky trojzubé (*Isognomostoma isognomostomos*). Je vidět pět různě orientovaných vrstev lamelární struktury (A–E), z nichž je schránka vystavěna. Ve spodní části snímku vystupují výrazné struktury pigmentované organické vrstvy – periostraka (F).



Známou strukturou je perleť, pro své zbarvení a opalizaci odedávna využívaná ve šperkařství. Tvoří ji drobné šestiúhelníkové šupinky aragonitu, poskládané na sobě podobně jako cihly ve zdi. Homogenní vrstva se vyskytuje především v lasturách mořských mlžů a tvoří ji drobné krystalky nepravidelného tvaru bez specifického vzájemného postavení.

Mikrostruktury měkkýších schránek se vyznačují různými mechanickými vlastnostmi. Ty, u nichž je mezi krystalky velké množství organické hmoty (perleť), jsou nesmírně odolné vůči nárazům i vrtání a takové schránky jsou bezpečné také před mnohými predátory. Struktury s menším

3 Periostrakum zuboústky trojzubé (*Isognomostoma isognomostomos*) s šupinovitými výrůstky neznámé funkce. Zvětšeno 650×. Snímky P. J. Juračky

podílem organické hmoty (hranolová nebo lamelární struktura) dobře odolávají po-praskání schránky. Především lamelární struktura svou složitostí efektivně zastavuje postup prasklin. Listovitá a homogenní struktura ulity obsahují jen minimální podíl organické složky, přesto své mořské majitele dobře chrání před abrazivní silou vln.

Skenovací mikroskop tedy opět umožnil poodhalit fantastické mikrostruktury, a to schránek měkkýšů a jejich na první pohled obyčejných lomů; schránky však představují jeden z nejkvalitnějších kompozitních materiálů mezi nebem a edafonem. Pohled na vnitřní struktury ulit plžů nás zároveň přesvědčil o dokonalosti těchto krásných, i když mnohdy skrytě žijících a poměrně neznámých živočichů.

Adam Lacina, Michal Horský

Endemická vřetenovka opavská v kritickém ohrožení – z červené knihy našich měkkýšů

Suchozemští plži jsou díky své omezené schopnosti aktivního šíření dobrými kandidáty na skupinu s vysokou mírou endemismu. To platí nejlépe pro faunu mediteránní oblasti a samozřejmě pro oceánské ostrovy, zejména ty staré a více vzdálené od pevniny. Naopak ve středoevropské fauně máme opravdových endemitů velmi málo. Ještě výraznější to je v případě naší malakofauny. O to více jsou ojedinělé případy endemismu v našich poměrech výjimečné a ochránářsky cenné, jako např. vřetenovka opavská (*Cochlodina cerata opaviensis*).

Jediným endemitem naší fauny měkkýšů na úrovni druhu je vřetenka lesklá (*Bulgaria nitidosa*), která se hojně vyskytuje v povodí Berounky v jihozápadní části středních Čech. Ovšem i tento mladý druh někteří zahraniční autoři zpochybňují a považují ho pouze za poddruh jihoevropské vřetenky štíhlé (*B. vetusta*). Jako poddruhy jsou také hodnoceny i zbývající endemické rasy, jejichž populace jsou u nás geograficky izolované a značně vzdálené od souvislého areálu rozšíření. Všichni tito plži – nádolka moravská (*Vestia ranojevici moravica*), vřetenovka krkonošská (*Cochlodina dubiosa corcontica*) a vřetenovka opavská (*C. cerata opaviensis*) patří shodně jako vřetenky do čeledi závonatkovití (*Clausiliidae*). Je zajímavé, že všichni se k nám rozšířili přibližně v období atlantiku – v době lesního optima holocénu. Není proto divu, že jsou vázání především na přirozené lesní až pralesní biotopy. Předpokládáme, že se

většina k nám většina z nich dostala dálkovým přenosem za pomoci jiných živočichů, v těchto případech zřejmě ptáků. Dlouhodobá izolovanost a genetické důsledky skutečnosti, že na počátku celé populace stálo velmi málo jedinců, v limitním případě pouze jeden, mohly vést ke vzniku morfologických i ekologických rozdílů. Jeden z těchto druhů – vřetenovka opavská (obr. 1) – se od ostatních uvedených endemitů navíc odlišuje svou alarmující ohrožeností, podle aktuálních znalostí již hraničí s vyhynutím.

Vřetenovka opavská se řadí k největším zástupcům, v naší fauně početné, výše zmíněné čeledi. Ulita je válcovitě vřetenovitá, narudle hnědá, lesklá a téměř hladká. Jako většina představitelů čeledi má i tato vřetenovka levotočivou ulitu, velmi vysokou a štíhlou. Její výška se pohybuje okolo 18 mm a šířka kolem 4 mm. Od nominotypického poddruhu – vřetenovky voskové (*C. cerata cerata*) – se moravská

subspecie odlišuje hlavně velikostí (je daleko vyšší), štíhlostí a tmavší barvou. Patrový návalek v obústí ulity není vytvořen, zato hltanový mozol je velmi zřetelný a je proto důležitým determinačním znakem. Nejzřetelnější je u cívkové desky (viz šipka v obr. 1), kde končí dosti náhle, jakoby zde vytvářel pomyslný járek. Tento znak je důležitý hlavně při odlišení od vřetenovky hladké (*C. laminata*), která je běžným lesním druhem a obývá prakticky všechny lokality vřetenovky opavské.

Vřetenovka vosková se vyskytuje nejlépe našemu území v pohoří jádrových Karpat Slovenska, do flyšové části proniká pouze v oblasti Kysuce. Na Slovensku je především druhem podhorských smíšených lesů, dává přednost suťovým stano-

