

Bakalářská práce

Mechanismy a prevence přenosu račího moru **Mechanisms and prevention of transmission of crayfish plague**

Jiří Svoboda

Katedra ekologie

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

školitel: RNDr. Adam Petrusek Ph.D.

konzultantka: Mgr. Eva Kozubíková

srpen

2009

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně a uvedl jsem všechny použité prameny a literaturu.

V Praze dne 7. 8. 2009.

Děkuji svému školiteli RNDr. Adamu Petruskovi Ph.D. a konzultantce Mgr. Evě Kozubíkové za vydatnou pomoc a rady, které mi hojně poskytovali. Za pomoc děkuji i doc. Ing. Pavlu Kozákovi Ph.D. a Ing. Miloši Buřičovi. Rodině děkuji za podporu, které se mi dostávalo po celou dobu mého dosavadního studia a díky níž jsem měl dostatek času a klidu pro psaní této práce.

Obsah

Abstrakt a klíčová slova.....	3
Úvod	4
1. <i>Aphanomyces astaci</i>	5
1.1. Stručná charakteristika životního cyklu.....	5
1.2. Pohlavní rozmnožování u <i>Aphanomyces astaci</i>	5
1.3. Mycelium.....	5
1.4. Zoospory	6
1.5. Encystace zoospor	6
1.6. Opakování stadia zoospory	7
1.7. Klíčení cyst	7
1.8. Napadení nového hostitele.....	8
1.9. Jak dlouho <i>Aphanomyces astaci</i> přežívá bez hostitele?.....	9
2. Hostitelé <i>Aphanomyces astaci</i>	9
2.1. Raci	10
2.2. Jiné organismy než raci.....	12
3. Fyzikální a chemické limity přežití <i>Aphanomyces astaci</i>	14
3.1. Teplota	14
3.1.1. Usmrcení zoospor a cyst extrémními teplotami	14
3.1.2. Usmrcení mycelia extrémními teplotami	15
3.2. Vlhkost, pH a vliv chemikálií.....	15
4. Mechanismy šíření račího moru na nové lokality.....	16
4.1. Přenos vodou	16
4.2. Přenos pomocí raků	16
4.2.1. Přenos evropskými druhy raků.....	17
4.2.2. Přenos severoamerickými druhy raků	17
4.2.3. Význam vlastního pohybu raků pro šíření račího moru	17
4.3. Přenos jinými organismy vyjma člověka.....	18
4.3.1. Přenos zoospor a cyst <i>A. astaci</i>	18
4.3.2. Přenos tkání hostitele s myceliem <i>A. astaci</i>	18
4.4. Role člověka	19
4.4.1. Přemísťování raků	19
4.4.2. Převoz ryb.....	20
4.5. Hledání zdroje nákazy	20
4.6. Minimální „dávka“ patogenu nutná pro infekci.....	21
5. Opatření proti račímu moru	22
5.1. Léčba raků	22
5.2. Prevence šíření račího moru	22
5.2.1. Prevence šíření v rámci jedné lokality.....	22
5.2.2. Prevence šíření mezi lokalitami.....	23
Závěr	32
Seznam literatury	33

Abstrakt

Račí mor je onemocnění raků působené patogenem *Aphanomyces astaci* ze skupiny Oomycetes. *A. astaci* je řazen mezi nejhorší invazní druhy světa, protože působil a působí vymírání populací původních evropských druhů raků. Obecně se vyšší míře rezistence těší jen raci původem ze Severní Ameriky, zatímco raci z Evropy, Asie a Austrálie jsou vůči moru citlivější. Nicméně v citlivosti raků z obou skupin je určitá mezidruhová i vnitrodruhová variabilita, například citlivost raka bahenního není dosud s jistotou stanovena. Mezi jednotlivými způsoby šíření moru v přírodě nejspíše dominuje přenos způsobený lidskou činností. Avšak nedostatek znalostí o přenosu rybami, ptáky, savci a možná i dalšími koryšmi umožňuje jen velmi hrubé odhady jejich významu, což působí značné problémy i při hledání zdrojů nákazy. Ačkoliv je původce moru objektem intenzivního výzkumu, dopátrat se konkrétních opatření proti šíření moru je nesnadné. Léčba raků v současnosti není možná a je spíše otázkou vzdálené budoucnosti. Výsledky laboratorních pokusů ukazují na možnost prevence přenosu moru mezi raky v rámci jedné lokality pomocí solí. Přenosu moru mezi jednotlivými lokalitami lze částečně zabránit pokusy o izolaci nemocných raků pomocí bariér a úpravou hospodaření člověka v dané oblasti. Pokud raci na nějaké lokalitě v důsledku račího moru vymřou, vyhyne zde i *A. astaci*. V případě velkých lokalit s komplikovanou morfologií k úplnému vymření hostitele a tím i patogenu pravděpodobně často nedochází. V práci diskutuji nejrůznější metody usmrcení propagulí *A. astaci* i jeho mycelia v tělech raků. Současné znalosti metod dezinfekce jsou spíše nedostatečné, zejména v případě chemické dezinfekce. Práci završuje shrnutí v odborné literatuře uváděných způsobů regulace lidské činnosti, jež by měly vést ke snížení přenosu moru.

Summary

Crayfish plague is a disease caused by the oomycete *Aphanomyces astaci*. It is considered to be one of the worst invasive species because it has caused numerous crayfish mass mortalities in Europe. Generally, crayfishes of North American origin are highly resistant, while European, Asian and Australian crayfishes are susceptible to the disease. However, there is an inter- as well as intraspecific variability in both groups; for example, the susceptibility of the crayfish *Astacus leptodactylus* is not sufficiently explored. Human activities are probably the main factor causing the spread of crayfish plague. However, the knowledge of other potential means of transmission (such as by fish, birds, mammals, and possibly other crustaceans) is poor, which complicates searching for the source of infection for any particular mass mortality. Although the crayfish plague is one of the most studied diseases of invertebrates, finding the means of prevention of its spread is not easy. Treatment of crayfish individuals cannot be possible nowadays, and is unlikely in the near future. Some experiments indicate that transmission of crayfish plague among individuals at a locality could be prevented by treatment with salts. The transmission among localities can be suppressed only partially, by isolation of infected crayfish with barriers and by regulation of human activities. When crayfish become extinct at a locality as a result of crayfish plague outbreak, *A. astaci* should also become extinct there; however, this process is not efficient in large localities of complicated morphology. In the thesis, I also discuss potential methods for destruction of propagules and mycelium. Knowledge of reliable disinfection is insufficient, particularly in the case of chemical disinfection. I conclude by summarizing published suggestions for regulation of human activities, which should prevent or reduce the crayfish plague transmission.

Klíčová slova

Aphanomyces astaci, račí mor, přenos, prevence, šíření, hostitelé, dezinfekce

Key words

Aphanomyces astaci, crayfish plague, transmission, prevention, spread, disease hosts, disinfection

Úvod

Račí mor je nemoc postihující raky působená oomycetem *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) (Söderhäll and Cerenius 1999). Český název hnileček račí (Cejp 1959) není vžitý, a proto v práci používám latinské pojmenování. Račí mor je nejvážnější známá nemoc raků, která způsobila vymření mnoha populací původních evropských druhů raků (Söderhäll and Cerenius 1999). Račí mor byl na evropském území poprvé zaznamenán v druhé polovině 19. století. Do dnešní doby bylo morem zasaženo území téměř všech států Evropy (Alderman 1996). Vymírání zbývajících populací evropských raků pokračuje i v současnosti (Diéguez-Uribeondo 2006), a to i na území České republiky (Kozubíková et al. 2006; Kozubíková et al. 2008; Kozubíková et al. 2007).

Vyhubením populací raků je patogen schopen ovlivnit strukturu celého společenstva. Raci regulují, nebo alespoň významně ovlivňují tok látek a energie bentosem, což má vliv například i na potravní nabídku pro ryby (Momot et al. 1978). Dalším dokladem bylo rozsáhlé bujení vegetace a zrychlení procesu zazemňování jezer po vymření jezerních populací raků říčních (Unestam 1973).

Vymírání raků v důsledku napadení morem však není problémem pouze ochrany přírody. Úhyny chovaných raků působí přímé ekonomické škody. Chov citlivých druhů raků je rozšířen například v Austrálii (Holdich 1993; Souty-Grosset et al. 2006), a tak by zavlečení račího moru na tento kontinent mělo pro toto odvětví hospodářství závažné důsledky (DAFF 2005). Lov raků je v některých oblastech Evropy, například ve Skandinávii, také významnou rekreační aktivitou (Jussila and Mannonen 2004; Nylund et al. 1993; Unestam 1973).

Význam tohoto patogenu demonstruje i to, že byl nominován mezi 100 nejhorších invazních organismů v Evropě (Vila et al. 2009) i na Zemi (Lowe et al. 2004).

Díky intenzivnímu vědeckému výzkumu je mor považován za jednu z nejprozkoumanějších chorob mezi nemocemi bezobratlých živočichů (Souty-Grosset et al. 2006). V českém jazyce základní informace o račím moru shrnuje (Kozubíková and Petrusek in press). I přes rozsah nashromážděných dat není snadné najít v literatuře odpověď na otázku, jak zabránit šíření moru. Objevují se plány řešení konkrétních situací (DAFF 2005; Diéguez-Uribeondo et al. 1997; Taugbol et al. 1993), souhrnná práce diskutující mechanismy a prevenci přenosu moru však v současnosti chybí nejen v češtině, ale i v odborné literatuře. Právě takovou prací by měla být tato rešerše, ve které se pokusím utřídit a posoudit známé informace o mechanismech a prevenci přenosu račího moru.

1. *Aphanomyces astaci*

V této kapitole jsou uvedeny informace o životním cyklu *A. astaci*, které jsou důležité pro hledání či pochopení mechanismů a prevence přenosu račího moru. Stručně je představen životní cyklus, jehož některé části jsou podrobněji zpracovány ve zbývajících částech kapitoly.

Rozpoznat *A. astaci* od jiných druhů tohoto rodu pouze pomocí morfologických znaků nelze, a tak bývá užíváno molekulárních metod založených na rozpoznávání specifických úseků DNA (Ballesteros et al. 2006; Oidtmann et al. 2006; Royo et al. 2004). Pro přesné určení se zejména ve starších pracích používaly také infekční experimenty s citlivými raky v kombinaci s mikroskopickým pozorováním (Cerenius et al. 1988). Detailněji o determinaci *A. astaci* pojednává článek (Kozubíková and Petrusek in press).

1.1. Stručná charakteristika životního cyklu

A. astaci se vyskytuje ve třech základních stádiích - jako mycelium, zoospora a cysta (Oidtmann et al. 2002). V hostiteli roste *A. astaci* jakožto mycelium tvořené hyfami. Za určitých okolností mycelium postupným růstem opustí račí kutikulu, ve styku s vodou pak dochází ke tvorbě sporangií, jež slouží k asexuálnímu rozmnožování. Ve sporangiu vznikají primární spory (Söderhäll and Cerenius 1999). Po opuštění sporangia se primární spory poblíž sporangia zakulacují a vytváří buněčnou stěnu, tj. dochází k tvorbě cyst neboli encystaci (Olson et al. 1984). Z těchto cyst, přesněji nazývaných „primární cysty“, se uvolňují zoospory, každá se dvěma bičíky. Zoospora slouží k šíření moru na nového hostitele a představuje tedy z hlediska šíření moru zásadní článek životního cyklu. Když se zoospora podaří dosednout na tělo hostitele, dochází k další encystaci. Cysta po čase klíčí v hyfu a prorůstá tkáněmi hostitele, kde postupně vytváří mycelium (Olson et al. 1984; Söderhäll and Cerenius 1999). Pokud zoospora encystuje na nevhodném substrátu, může dojít namísto klíčení k uvolnění nové zoospory - dochází k opakování stadia zoospory (Cerenius and Söderhäll 1984b, 1985). Detailnější informace o životním cyklu v českém jazyce podávají (Kozubíková and Petrusek in press).

1.2. Pohlavní rozmnožování u *Aphanomyces astaci*

V životním cyklu *A. astaci* nejspíše úplně chybí pohlavní rozmnožování s následnou tvorbou oospor (Söderhäll and Cerenius 1999; Souty-Grosset et al. 2006), podobně jako i u jiných druhů rodu *Aphanomyces* napadajících živočichy (Diéguez-Uribeondo et al. 2009). Pro prevenci račího moru je absence sexuálního stadia důležitá, neboť u příbuzných druhů ze skupiny Oomycetes vznikají při sexuálního rozmnožování oospory, které mají schopnost přežívat i několik let a přestát vyschnutí stanoviště a extrémní teploty (Diéguez-Uribeondo et al. 2009; Souty-Grosset et al. 2006).

1.3. Mycelium

Předpokládá se, že v přirozeném prostředí žije *A. astaci* striktně parazitickým způsobem života na tělech hostitelů (raků) a není schopen přežívat jako saprofyt. Tuto hypotézu podporuje řada pozorování. V laboratorních kulturách bývá mycelium přerůstáno organismy rychleji rostoucími (Oidtmann et al. 1999b; Unestam 1965). Navíc přítomnost bakterií inhibuje růst *A. astaci* v mediu (Oidtmann et al. 2004). Ve srovnání s jinými příslušníky rodu vykazuje *A. astaci* lepší růst v račím séru, při pokusech *in vitro* proniká do kutikuly raků, zatímco saprofytické druhy

nikoliv (Unestam 1969a), produkce chitináz je u mycelia *A. astaci* nezávislá na přítomnosti chitinu (Andersson and Cerenius 2002; Unestam 1966).

Některé výsledky laboratorních pokusů naznačují, že by mycelium mohlo produkovat látky brzdící přechod do dalších fází životního cyklu. Unestam navrhl, že mycelium při svém růstu produkuje nějaký inhibitor sporulace (Unestam 1969b). Tato myšlenka není v rozporu s používanými postupy indukce sporulace, protože při jejich aplikaci dochází i k naředění původního media, konkrétní postupy uvádějí například (Alderman and Polglase 1986; Cerenius and Söderhäll 1984b, 1985; Häll and Unestam 1980). Cysty ponechané ve sporulačním mediu společně s myceliem neuvolňují zoospory, zřejmě tedy musí dojít k oddělení cyst od mycelia se sporulačním mediem (Cerenius and Söderhäll 1984b). Více než patnáctiprocentní koncentrace media použitého již při sporulaci má inhibiční vliv na klíčení (Svensson and Unestam 1975), což opět naznačuje existenci inhibitorů produkovaných myceliem. Jestli však v uvedených případech dochází k rychlejšímu vývoji aspoň částečně díky naředění inhibitoru, zůstává nezodpovězeno.

1.4. Zoospory

Zoospora je jediným aktivně pohyblivým stadiem *A. astaci* a hraje klíčovou roli v šíření infekce na další hostitele. Ovlivnění tohoto stadia by tudíž mohlo být využito v prevenci račího moru. Zajímavé jsou poznatky týkající se taxie zoospor. Kdybychom dokázali zoospory přimět k pohybu na námi určené místo, mohli bychom je z prostředí odebrat. Překážkou použití by zřejmě byla malá rychlost zoospor, která sice není známa, ale soudě podle rozměrů zoospor, asi 8 x 12 μm (Alderman and Polglase 1986), nebude rychlost jejich plavání pro takové použití dostatečná. I přesto bychom hypoteticky mohli taxie zoospor využít. Pokud by se podařilo přimět zoospory, aby plavaly ke zdroji námi dodaného atraktantu a ne směrem k povrchu hostitele, došlo by možná k narušení šíření infekce. Dosud však není známo, nakolik je chemotaxe zoospor klíčová pro hledání hostitele, a tak není možné posoudit účinnost uvedeného opatření.

Zoospory při hledání nového místa k životu preferují na račích místa poraněná (Nyhlén and Unestam 1980). Ve shodě s tímto pozorováním pokusy prokázaly přítomnost chemotaxe, a to nejen k rankám na tělech raků. Byla pozorována chemotaxe ke končetině raků evropských i amerických druhů, zejména k oblastem s tenkou a měkkou kutikulou, jako jsou klouby a špičky končetin, ventrální strana zadečku a vrcholy očních stopek (Cerenius and Söderhäll 1984a; Oidtmann et al. 2004).

Chemotaxe byla pozorována při teplotách 5°C i 20°C. Atraktant je stabilní i v 99 °C (Cerenius and Söderhäll 1984a). Při srovnání se saprofytickými druhy rodu *Aphanomyces* se ukázalo, že chemotaxe byla u *A. astaci* slabší, ale specifitější (Unestam 1969a). Avšak ani u *A. astaci* nevyvolávají chemotaxi pouze látky z hostitelů (raků), pozorována byla taxie i k exsudátům kořenů hrachu (Cerenius and Söderhäll 1984a).

Elektrotaxe je dosud popsána z jediné práce (Unestam 1969a). Zoospory plavaly k negativní elektrodě při použití proudu 10 mikroampér a napětí 5 V.

1.5. Encystace zoospor

Encystací je označován proces, kdy se spora ztrácí bičíky a zakulatí se. Během těchto procesů se tvoří buněčná stěna (Cerenius and Söderhäll 1984b). Povrch cysty je lepkavý, aby se mohla cysta přichytit na povrch hostitele (Souty-Grosset et al. 2006). Cysta lepkavost po několika minutách ztrácí a nadále již není přichycení schopná (Söderhäll and Cerenius 1999). V laboratorních podmínkách lze encystaci indukovat mnoha různými podněty -

přidáním media, změnou teploty či vlhkosti, přidáním iontů některých kovů, mannitolu, změnou pH, pomocí aminokyselin nebo i turbulencemi způsobenými vortexováním, mícháním či pipetováním (Cerenius and Söderhäll 1984b; Söderhäll and Cerenius 1983; Souty-Grosset et al. 2006; Svensson and Unestam 1975; Unestam 1966).

Fyzikální ošetření jako míchání a zahřívání mají podle práce (Svensson and Unestam 1975) inhibiční vliv na následné klíčení, neboť při padesátinásobném promíchání zoospor nabráním a vypuštěním pipetou klíčivost poklesla na polovinu. Naopak (Cerenius and Söderhäll 1985) uvádějí, že se klíčivost spor encystovaných vortexováním a encystovaných bez vortexování neliší.

1.6. Opakování stadia zoospory

Pokud zoospora encystuje mimo povrch vhodného hostitele, může se z cysty uvolnit znovu zoospora. Uvolněná zoospora je druhou generací zoospor. Vortexování těchto spor indukovalo encystaci a cysty po čase uvolnily třetí generaci zoospor. Při snaze o kultivaci čtvrté generace zoospor, došlo k uvolnění zoospor jen z jednoho až dvou procent cyst (Cerenius and Söderhäll 1984b). Toto několikanásobné opakování stadia zoospory je zřejmě adaptací k parazitickému způsobu života (Cerenius and Söderhäll 1985), která je obecně přítomná u parazitických druhů rodu *Aphanomyces* (Diéguez-Uribeondo et al. 2009).

Syntéza proteinů je pozastavena během stadia zoospory i cysty a vzrůstá až po indukci klíčení (Cerenius and Söderhäll 1984b). Zdá se tedy, že některé látky spotřebovávané zoosporami a cystami jsou produkovány již během myceliální fáze a tato stadia jsou na myceliem vytvořené zásobě závislá. Tato zásoba by pochopitelně nebyla nekonečná, proto by měl být omezený i možný počet opakování stadia zoospory. Jestli je ale počet čtyř generací zoospor skutečným maximem není zcela jasné, výše uvedená práce je zatím jediným zdrojem informací o počtu opakování stadia zoospory u *A. astaci*. U příbuzného druhu *Saprolegnia parasitica* je počet opakování nižší, pokud stadium pohyblivé zoospory trvá déle (Dieguéz-Uribeondo et al. 1994). Zda platí taková závislost i u *A. astaci* není dosud známo (Cerenius and Söderhäll 1984b).

Z omezenosti počtu opakování stadia zoospor plyne, že pokud bychom byli schopni přimět zoospory k encystaci mimo tělní povrch hostitele a následně každou uvolněnou generaci zoospor též, došlo by po určitém počtu generací ke spotřebování veškerých zásobních látek. Nakonec by měla schopnost poslední generace cyst uvolňovat zoospory poklesnout na minimum, a tak by nedocházelo k přenosu moru na nové hostitele. V literatuře se zatím tato hypotéza neobjevila, ačkoliv způsobů indukce je mnoho, jak jsem uvedl výše (kapitola 1.5). Nejtěžším úkolem by asi bylo vyvolat encystaci zoospor mimo povrch hostitele na celé lokalitě, navíc bez výraznějšího negativního ovlivnění zbytku společenstva. Nutným předpokladem by bylo i velmi rychlé spouštění encystace, aby zoospory nestihly dosáhnout povrchu hostitele.

1.7. Klíčení cyst

Encystovaná zoospora (sekundární cysta) může buď klíčit hyfou, nebo uvolnit zoosporu. Encystace zoospory a klíčení cysty jsou tedy u *A. astaci* dva oddělené procesy. Tyto procesy lze oddělit i laboratorně (Svensson and Unestam 1975). Jakmile cysta jednou začne klíčit, není už zpětná změna na zoosporu možná (Cerenius and Söderhäll 1984b). Toho by se hypoteticky dalo využít k léčbě nakažené populace či k desinfekci vody. Pokud bychom byly schopni indukovat encystaci i klíčení mimo hostitele, došlo by ke klíčení mimo kutikulu hostitele a životní cyklus *A. astaci* by byl přerušen. Avšak zoospory se pravděpodobně daří přimět ke klíčení pouze do té doby, než encystují a vytvoří si buněčnou stěnu (Cerenius and Söderhäll 1987), tj. přibližně do 15 minut od spuštění encystace (Cerenius

and Söderhäll 1984b). Navíc encystace a klíčení zoospor bývá indukována zvýšenou koncentrací solí (Svensson and Unestam 1975), a tak by při tomto způsobu indukce pravděpodobně docházelo k ovlivnění celého ekosystému. Eliminace moru na lokalitě by pak byla spíše Pyrrhovým vítězstvím. Námitkou by mohl být též fakt, že klíčivost se i v ideálních koncentracích indukujících látek pohybovala okolo 50 % (Svensson and Unestam 1975). Není snadné posoudit, nakolik to vylučuje použití pro potírání moru. Kritérium „vyklíčenosti“, tedy měřítko, jímž se posuzuje vyklíčení či nevyklíčení cysty, totiž bývá v laboratorních pokusech vymezeno jako určitá délka klíčící hyfy. Není tedy jasné, zda i při výsledku hodnoceném jako klíčení 51 % cyst nedošlo ve všech cystách ke změnám, které by jim zabránily v uvolnění zoospor. Informace o látkách indukujících klíčení uvádějí například kromě výše uvedených článků například (Souty-Grosset et al. 2006).

1.8. Napadení nového hostitele

K přenosu *A. astaci* mezi hostiteli přímo pohlavními buňkami hostitelů nedochází (DAFF 2005). Uváděn tak bývá pouze jediný způsob napadení nového hostitele, a to pomocí zoospor (Söderhäll and Cerenius 1999). Mycelium je stadium specializované na růst v hostiteli, kde není překážkou jeho křehkost a náchylnost k mechanickému poškození, jeho schopnost přežít mimo tkáň hostitele proto nejspíš nebude vysoká. Mycelium prorůstá tkáněmi raků a při styku s okolní vodou dochází ke sporulaci (Söderhäll and Cerenius 1999), tudíž se ve volné vodě mycelium v porovnání se zoosporami a cystami vyskytuje daleko méně. Navíc mycelium samozřejmě nemá žádné mechanismy směřované taxe k novému hostiteli. V neposlední řadě je pravděpodobnost napadení nového hostitele myceliem snížena tím, že i kdyby se náhodou hyfa ocitla na kutikule raka (například při kontaktu dvou raků), musela by se prorůstáním do kutikuly uchytit dříve, než by byla setřena či odplavena. Zřejmě z těchto důvodů nebývá možnost šíření moru myceliem volně se vyskytujícím ve vodě zmiňována.

Klíčovým bodem životního cyklu pro načasování rozmnožování je nejspíše spuštění sporulace, neboť životnost primární spory a cysty není dohromady delší než několik dní (více v kapitole 1.9.).

Obecně přijímané je zatím tvrzení, že ke sporulaci dochází těsně před smrtí hostitele a těsně po ní (Oidtmann et al. 2002; Oidtmann et al. 2004; Söderhäll and Cerenius 1999; Taugbol et al. 1993; Vogt 1999), nebo při jeho svlékání (Oidtmann et al. 2002; Oidtmann et al. 2004).

Podle jiné, poněkud obecnější hypotézy ke sporulaci dochází, pokud je imunita hostitele oslabena. Rovnováha ustanovená mezi parazitem a hostitelem se oslabením vychýlí a hostitel již dále nezvládá bojovat s narůstajícím patogenem (Cerenius et al. 2003). Tedy podle této hypotézy může ke zvýšené sporulaci docházet i mimo výše uváděná období života raka, například za zhoršení podmínek či při napadení jinými parazity.

(Nylund and Westman 2000) uvádějí, že rak signální napadený *A. astaci* šíří mor stále, zatímco rak říční jen krátce po smrti. Z uváděných informací však není patrné, z čeho toto tvrzení vychází. Podobně bez citace původního zdroje uvádějí (Söderhäll and Cerenius 1999), že z neoslabeného infikovaného raka signálního se propagule moru uvolňují jen v malé míře. Pokud je však nějak stresován či nemocný, uvolňuje se z jeho těla více propagulí.

Zatím tedy není příliš jasné, do jaké míry je úhyn či svlékání hostitele klíčové pro šíření moru na další hostitele. První výsledky akvariálních pokusů s infikovaným rakiem pruhovaným (*Orconectes limosus*) a rakiem říčním (*Astacus astacus*) ukázaly, že k přenosu moru z raka pruhovaného na raka říčního dochází i mimo období svlékání či úmrtí raka pruhovaného (Svoboda, nepublikovaná data). Pro porovnání intenzity sporulace v období úhynu či svlékání s intenzitou sporulace mimo tato období by bylo nejvhodnější kvantifikovat zoospor ve vodě. Právě pokusem o kvantifikaci zoospor v nádrži během života raků se budu pravděpodobně zabývat během magisterského studia.

1.9. Jak dlouho *Aphanomyces astaci* přežívá bez hostitele?

Mimo hostitele se vyskytují cysty a zoospory, tudíž je rozhodující délka trvání těchto dvou stadií. *A. astaci* přetrvávala během laboratorních prací ve stadiu cysty hodiny (Alderman and Polglase 1986; Cerenius and Söderhäll 1984a, b). Nejdelší dobu výskytu cysty udává práce z roku 1986, stádium cysty podle ní trvá 8 až 12 hodin. Plovoucí spory byly pozorovány v pokojové teplotě ještě druhý den po uvolnění, ve 2°C až 5 dní (Unestam 1966). Další studie uvádí nejméně 48 hodin při 16 °C až 20°C (Alderman and Polglase 1986; Olson et al. 1984). Chemotaxe se neliší u čerstvých a 24 hodin starých zoospor (Cerenius and Söderhäll 1984a), což naznačuje, že schopnost nalézt hostitele během života zoospor nejspíše neklesá.

V jiných pokusech nebyla měřena přímo délka jednoho stadia zoospory, ale bylo sledováno, jako dlouho propagule (tj. cysty a zoospory) vydrží živé bez svého hostitele. Při teplotě vody 2 °C byly ve vodě pozorovány živé zoospory i po 2 měsících (Unestam 1966), voda se zoosporami vydrží infekční nejméně týden při 14 °C (Unestam 1969a), i po 14 dnech vystavení teplotám 0 °C, 5 °C, 10 °C i 15 °C byly přítomny živé propagule (CEFAS 2000). Při teplotě 10 °C byly spory schopné infekce ještě po 6 dnech od uhnutí raka, po 9 dnech se však už nákaza zdravého raka nepodařila (Matthews and Reynolds 1990). Přítomnost živých zoospor v nádobě po období přesahujícím pozorovanou délku života zoospory lze vysvětlit pomocí opakování stadia zoospory.

Detailnější rozbor však odhaluje nesoulad výše uvedených údajů. Při teplotě 2 °C byly živé zoospory pozorovány i po dvou měsících. I při použití co nejdelších pozorovaných intervalů pro každé stadium a co největšího pozorovaného počtu opakování se součet těchto dob přiblíží jen jednomu měsíci. Přesněji při následujících předpokladech: ve vzorku na počátku byly i primární spory, každá generace zoospor žila pět dní, došlo ke třem opakováním stadia zoospory (tj. celkem čtyřem generacím zoospor), encystace probíhá pouze několik minut (Cerenius and Söderhäll 1984b), každé stadium cysty trvalo 12 hodin, by součet činil pro čtyři stadia zoospor a čtyři stadia cyst dohromady jen 22 dní. 22 dní však není ani jedna polovina z pozorovaných dvou měsíců., Nesoulad by mohl být hypoteticky zapříčiněn následujícími jevy. 1. Stadium cysty by mohlo trvat déle (například za nižší teploty). 2. Může docházet i k více než třem opakováním stadia zoospory. 3. Zoospory mohou encystovat i za více než pět dní pohybu. Dodávám, že není příliš překvapivé, že uvedený součet nesouhlasí s pozorováním zoospor v nádobě. Podmínky v laboratoři a v přírodě jsou rozdílné. Navíc některé práce nebyly zaměřeny na vytyčení doby přežívání daného stadia, zejména v případě zdrojů informací o délce trvání stadia cysty jsou pravděpodobně uváděny spíše doby, za které lze očekávat uvolnění pro práci potřebného počtu zoospor. Cílem výše uvedeného počítání tak má být spíše poukázání na nedostatky v našich znalostech dob přežívání propagulí *A. astaci*.

2. Hostitelé *Aphanomyces astaci*

Jak vyplývá z českého i cizojazyčných pojmenování nemoci působené *A. astaci* (česky: račí mor, anglicky: crayfish plague, španělsky: peste del cangrejo, francouzsky peste des écrevisses aj.), jedná se o nemoc postihující raky. Tento fakt sám o sobě ale neznamená, že by původce račího moru nemohl napadnout i jiné organismy. Opomenutí nějakého hostitele by přitom pro léčebná a preventivní opatření mohlo být fatální.

2.1. Raci

Na světě existuje několik set druhů raků (skupina Astacida), rozdělených do tří čeledí: Astacidae, Cambaridae, Parastacidae (Souty-Grosset et al. 2006). Všichni recentní zástupci se vyskytují ve sladkých vodách či v jejich blízkosti (Scholtz 2002).

Přirozeně se raci vyskytují na všech kontinentech kromě Afriky a Antarktidy. Původně se v Evropě vyskytovali jen zástupci čeledi Astacidae, konkrétně rodů *Astacus* a *Austropotamobius*. V současné době se v důsledku činnosti člověka v Evropě objevují i raci z čeledí Cambaridae, původem ze Severní Ameriky, a Parastacidae, z Austrálie (Souty-Grosset et al. 2006).

V přírodních podmínkách bylo pozorováno, že v populacích raků říčních může račí mor působit úhyn všech jedinců (Söderhäll and Cerenius 1999), vysokou citlivost potvrdily i experimenty (Diéguez-Urbeondo and Söderhäll 1993; Unestam 1969a, c, 1972, 1975; Vey et al. 1983). A tak objeví-li se v některé populaci raků říčních *A. astaci*, můžeme tuto populaci považovat za ztracenou (Bohman et al. 2006; Unestam 1975). Rak říční není jediný druh raka, který je velmi citlivý, další druhy raků, jejichž citlivost k *A. astaci* byla experimentálně ověřována, shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1 – Raci a jejich rezistence vůči moru

Kategorie rezistence: „nízkou“ hodnotu rezistence vykazuje například rak říční, neboť obvykle hynou všichni jedinci. „Vysoká“ míra rezistence je typická například pro raka signálního, jedinci hynou spíše zřídka. Jako „střední“ je označena rezistence v případech, kdy autoři přímo takto popsali stupeň citlivosti či když autor upozornil na vyšší míru rezistence v porovnání s rakem říčním. Takové relativní vymezení kategorií činí potíže při porovnávání výsledků různých studií, částečnou nápravou bývá užívání raka říčního jako standardu. Z uvedeného vyplývá, že mezi kategoriemi neexistuje jasná hranice a slovo „střední“ má spíše upozorňovat na určitou mezidruhovou variabilitu v rámci tzv. citlivých druhů raků (kategorie „střední“ a „nízká“).

Citované práce jsou uvedeny ve sloupci „zdroj“ pod čísly podle klíče: 1 - (Alderman et al. 1987), 2 - (Diéguez-Urbeondo and Söderhäll 1993), 3 - (Persson and Söderhäll 1983), 4 - (Roy 1993 podle DAFF 2005), 5 - (Schäperclaus 1935; Schikora 1916 podle Unestam 1969c), 6 - (Unestam 1969c), 7 - (Unestam 1969a), 8 - (Unestam 1972), 9 - (Unestam 1975), 10 - (Vey et al. 1983), 11 - (Vorburger and Ribí 1999).

Údaj o výskytu v České republice, zařazení a oblasti původu pochází z publikace (Souty-Grosset et al. 2006). Druh *Pacifastacus leniusculus*, dříve řazený do čeledi Astacidae (Souty-Grosset et al. 2006), je zařazen do čeledi Cambaridae (Braband et al. 2006).

Druh	čeleď	oblast původu	volně v ČR	stupeň rezistence vůči moru	zdroj
rak říční (<i>Astacus astacus</i>)	Astacidae	Evropa	ano	nízká	2, 6, 7, 8, 9, 10
rak kamenáč (<i>Austropotamobius torrentium</i>)	Astacidae	Evropa	ano	nízká	11
rak bahenní (<i>Astacus leptodactylus</i>)	Astacidae	Evropa, Asie	ano	střední, či nízká	1, 6
rak běloklepetý (<i>Austropotamobius pallipes</i>)	Astacidae	Evropa	ne	nízká	1, 6
rak pruhovaný (<i>Orconectes limosus</i>)	Cambaridae	Severní Amerika	ano	vysoká	5, 10
rak signální (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	Cambaridae	Severní Amerika	ano	vysoká	3, 8, 9
rak červený (<i>Procambarus clarkii</i>)	Cambaridae	Severní Amerika	ne	vysoká	6
<i>Procambarus hayi</i>	Cambaridae	Severní Amerika	ne	vysoká	6

<i>Cambarus bartoni</i>	Cambaridae	Severní Amerika	ne	vysoká	6
<i>Cambarus sp.</i> (blízký druhu <i>extranius</i>)	Cambaridae	Severní Amerika	ne	vysoká	6
<i>Cambarus latimanus</i>	Cambaridae	Severní Amerika	ne	vysoká	6
<i>Cambarus longulus</i>	Cambaridae	Severní Amerika	ne	vysoká	6
<i>Cambarus acuminatus</i>	Cambaridae	Severní Amerika	ne	vysoká	6
<i>Orconectes propinquus</i>	Cambaridae	Severní Amerika	ne	vysoká	6
<i>Orconectes erichsonianus</i>	Cambaridae	Severní Amerika	ne	vysoká	6
<i>Orconectes virilis</i>	Cambaridae	Severní Amerika	ne	vysoká	6
<i>Faxonella clypeta</i>	Cambaridae	Severní Amerika	ne	vysoká	6
<i>Cambaroides japonicus</i>	Cambaridae	Japonsko	ne	nízká	6
<i>Cherax papuanus</i>	Parastacidae	Papua Nová Guinea	ne	nízká	9
<i>Cherax destructor</i>	Parastacidae	Austrálie	ne	střední	9
<i>Cherax quinquecarinatus</i>	Parastacidae	Austrálie	ne	střední	9
<i>Cherax quadricarinatus</i>	Parastacidae	Austrálie	ne	nízká	4
<i>Geocherax gracilis</i>	Parastacidae	Austrálie	ne	střední	9
<i>Astacopsis gouldi</i>	Parastacidae	Tasmánie	ne	střední	9
<i>Astacopsis fluviatilis</i>	Parastacidae	Tasmánie	ne	nízká	9
<i>Euastacus kershawi</i>	Parastacidae	Austrálie	ne	nízká	8
<i>Euastacus clydensis</i>	Parastacidae	Austrálie	ne	nízká	9
<i>Euastacus crassus</i>	Parastacidae	Austrálie	ne	nízká	9

Jak ukazují data v tabulce 1, severoamerické druhy jsou vůči moru méně citlivé, používáno bývá slovo „rezistentní“ anebo spojení „vysoce rezistentní“. Tato vlastnost se projevuje tak, že raci jsou sice napadáni *A. astaci*, ale nakažené populace nevymírají. Menší citlivost severoamerických raků vůči moru je zdůvodňována tím, že *A. astaci* je původem též ze Severní Ameriky. Koevoluce severoamerických raků a patogenu vedla k vytvoření rovnovážnému stavu (Diéguez-Uribeondo et al. 1995; Huang et al. 1994; Söderhäll and Cerenius 1999; Unestam 1969c, 1972, 1975). Rovnováha ale není ustanovena tak, že by parazitace neměla na americké druhy raků negativní vliv, za určitých podmínek se může *A. astaci* podílet i na smrti hostitele. Souhrn dosud známých poznatků o takových podmínkách podává (DAFF 2005). Naopak druhy z Evropy a Japonska vykazují daleko vyšší citlivost (nízkou rezistenci), a tak po infekci morem dojde s největší pravděpodobností k vymření celé populace (Taugbol 2004). Podobnou citlivost jako evropské druhy projevují i raci z Austrálie a Nové Guiney, proto se obvykle všechny dosud testované druhy raků, jež nejsou severoamerického původu, označují jako citlivé. Stejná citlivost se předpokládá i u všech dalších raků, kteří nepocházejí ze Severní Ameriky. Dosud však nebyla ověřována citlivost ani jednoho druhu raka například z Jižní Ameriky, Madagaskaru či kontinentální východní Asie.

Nejasnosti panují kolem citlivosti raka bahenního. Rak bahenní jevil podle studie (Unestam 1969c) střední míru citlivosti, protože nebyl tolik citlivý jako například rak říční či *Cambaroides japonicus* z Japonska. Když byly všechny tyto tři druhy společně vystaveny koncentraci 10 000 spor *A. astaci* v jednom mililitru vody, všichni jedinci citlivějších druhů uhynuli do dvanáctého dne od začátku pokusu, zatímco v případě raků bahenních uhynuli pouze 3 z 5 jedinců, a to až po dvanáctém dnu. Dva raci bahenní tedy v nádrži moru nepodlehli a byli výzkumníky usmrceni po 75 dnech od začátku pokusu. Naopak o daleko vyšší citlivosti raků bahenních svědčí později prováděné pokusy (Alderman et al. 1987), které ukázaly následující: při vystavení koncentraci 13 zoospor.ml⁻¹ uhynuli všichni do 12

dnů, při koncentraci 1,3 zoospor ml⁻¹ uhynuli všichni za 40 dní. Rozdílnost těchto výsledků v porovnání s prací z roku 1969 autoři novější studie bohužel nediskutují. Taxon „rak bahenní“ je v současnosti považován za pravděpodobný komplex druhů (Souty-Grosset et al. 2006), a tak se jako jedno z hypotetických vysvětlení rozdílů nabízí, že byly pro pokusy použity geneticky velmi odlišné linie raků, které se skutečně tolik liší svou citlivostí vůči moru. Rozporuplné laboratorní výsledky jsou doplněny pozorováním z přírodních populací raků bahenních v Turecku (Harlioğlu 2008), jež však neumožňuje dobře posoudit citlivost raků bahenních, jak je diskutováno v kapitole 5.2.1.

Nezodpovězená je zatím otázka klesající rezistence evropských populací raků signálních v Evropě, která byla položena v práci (Persson and Söderhäll 1983). Autoři zopakovali pokusy uvedené v práci (Unestam 1975) a na rozdíl od starší studie raci po přidání spor hynuli. Jedním vysvětlením je pokles rezistence u studovaných jedinců, například v důsledku poklesu genetické diverzity po inbreedingu v některých invazních populacích, jinými by mohl být naopak vzrůst virulence *A. astaci* a možná nejjednodušším by byly nevhodné podmínky pokusu či účast jiných faktorů (jiní paraziti, stres). Sami autoři volají po dalších pracích na toto téma. Bohužel výsledky další práce (López et al. 2002) nejsou srovnatelné, protože bylo použito jiné experimentální schéma a nižší dávky zoospor. Nicméně i tato práce uvádí, že dávky spor dříve považované pro *Pacifastacus leniusculus* za subletální mohou způsobit smrt.

Hypotetický růst rezistence evropských druhů raků

Doklady určitého potenciálu pro boj s infekcí *A. astaci* u neamerických raků je fakt, že po injikování malých množství živých zoospor *A. astaci* do těla raků říčních nedochází k úhynu, naopak vzroste rezistence těchto raků (Unestam and Weiss 1970) nebo že při pokusech s rakem *Cherax destructor* byla pozorována částečná melanizace (následek imunitní reakce raka) některých hyf (Unestam 1975), stejně jako u raků bahenních (Unestam 1969c). V rámci citlivých druhů raků je přítomna vnitrodruhová variabilita v rezistenci, proto by se postupnou selekcí evropských druhů raků mohly vyšlechtit linie odolnější vůči moru (Cerenius et al. 2002), jak naznačoval již (Unestam 1973). V roce 1969 Unestam psal, že dosud nebyla pozorována žádná rezistentní populace evropských raků, ačkoliv je mor v Evropě přítomen již více než 100 let (Unestam 1969c). Pozorování z finských jezer však naznačují, že se možná v populacích raků říčních vyvinula zvýšená rezistence ke kmenu *A. astaci*, který se v oblasti vyskytuje nejdéle (Viljamaa-Dirks 2008).

2.2. Jiné organismy než raci

Laboratorní kultivace ukázala, že *A. astaci* dokáže růst i v mediu bez jakýchkoliv látek z raků (Unestam 1965), což vyvolává otázku, zda tedy v přírodě nemůže parazitovat i na jiných organismech. Bylo provedeno několik pokusů s přenosem *A. astaci* na jiné druhy živočichů, výsledky takových prací shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2 – Experimentální testování rezistence jiných živočichů vůči *A. astaci*

Citované práce jsou uvedeny číslem podle následujícího klíče: 1 - (Benisch 1940 podle Unestam 1969c a podle Alderman and Polglase 1986); 2 – (Unestam 1969c); 3 – (Unestam 1972)

organismus	stupeň rezistence	zařazení organismu	zdroj
krab čínský (<i>Eriocheir sinensis</i>)	Střední	Malacostraca: Decapoda: Brachiura	1
<i>Mysis relicta</i>	Vysoká	Malacostraca: Mysida	3
<i>Daphnia hyalina</i>	pravděpodobně vysoká	Branchiopoda: Cladocera	2
<i>Leptodora kindtii</i>	pravděpodobně vysoká	Branchiopoda: Cladocera	2
<i>Chydorus sphaericus</i>	pravděpodobně vysoká	Branchiopoda: Cladocera	2
<i>Bytotrephes longimanus</i>	pravděpodobně vysoká	Branchiopoda: Cladocera	2
<i>Bosmina</i> sp.	pravděpodobně vysoká	Branchiopoda: Cladocera	2
<i>Cyclops strenuus</i>	pravděpodobně vysoká	Maxillopoda: Cyclopoida	2
<i>Mesocyclops leuckarti</i>	pravděpodobně vysoká	Maxillopoda: Cyclopoida	2
<i>Eudiaptomus graciloides</i>	pravděpodobně vysoká	Maxillopoda: Calanoida	2
<i>Asplanchna priodonta</i>	pravděpodobně vysoká	Rotifera: Monogononta	2

Všechny uvedené práce zkoumaly růst *A. astaci* pomocí mikroskopického vyšetření organismů. Zástupci skupin Branchiopoda, Maxillopoda a Rotifera byly pozorováni jen šest dní od přidání spor. Za tuto dobu byla pozorována vlákna pouze na dvou jedincích rodu *Bosmina*, kde podle autora mohlo jít o jakoukoliv jinou „plíseň“. Ačkoliv během šesti dnů bylo při stejném uspořádání pokusů možné rozvinutí nemoci i na mnohem větším raku říčním, sám autor pochybuje o výpovědní hodnotě těchto dat kvůli krátké době sledování. Nejbližším příbuzným raků je z dosud testovaných živočichů krab čínský (*Eriocheir sinensis*), který patří stejně jako raci do řádu Decapoda. *Mysis relicta* byl vybrán pro svou příslušnost k řádu Mysida, skupině příbuzné právě s řádem Decapoda. Soudě podle výsledků uvedených v tabulce 2 je rezistence vůči moru vysoká mimo skupinu Decapoda, naopak v rámci této skupiny je rezistence malá (Unestam 1972). Vyšší rezistence v rámci skupiny Decapoda, jaká je pozorována u severoamerických raků, je možná jen v oblastech, kde se *A. astaci* vyskytuje z evolučního pohledu dostatečně dlouho (Unestam 1972).

Bez povšimnutí v pracích zabývajících se původcem račího moru zatím zůstala údajná pozorování vláken *A. astaci* na mnoha dalších živočiších, například na některých planktonních koryších (Czeczuga et al. 2000; Czeczuga et al. 2004; Czeczuga et al. 2002; Czeczuga et al. 1999). Protože však byly oomycety v těchto pracích determinovány pomocí morfologických znaků, nelze pokládat tyto práce za věrohodný důkaz růstu *A. astaci* na těchto živočiších. Jen ověření pozorovaných výskytů pomocí molekulárních metod by umožnilo rozhodnout s určitostí, zda šlo, či nešlo o *A. astaci*.

Často dochází k přehlížení pozorování infekcí kraba čínského a situace bývá zjednodušována ve formulaci, že jediní hostitelé *A. astaci* jsou raci (Söderhäll and Cerenius 1999; Souty-Grosset et al. 2006). Možná k tomu autory vedou pochybnosti o správné determinaci *A. astaci*, bohužel však nevím, zda byla v dotyčné práci *A. astaci* určena jen podle morfologických pozorování, či zda došlo i k infekčním pokusům s raky. Pro vyjasnění situace by asi bylo, kromě dohledání dotyčného článku, nejvhodnější pokusit se o infekci kraba čínského znovu, tentokrát již s určením *A. astaci* pomocí molekulárních metod. Následně by mohla být zkoumána schopnost *A. astaci* infikovat další sladkovodní kraby a krevety. Pozorování růstu mycelia *A. astaci* v rybí šupině *in vitro* (Häll and Unestam 1980) naznačuje, že by mycelium *A. astaci* mohlo růst i v „neračích“ tkáních. Nabízí se myšlenka, že by mycelium mohlo

růst i v dalších vodních organismech jako například v běžně se vyskytujících stejnonožcích a různonožcích, jako jsou berušky a blešivci, a sloužit jako rezervoár *A. astaci* i ve vodách, kde již raci nežijí. Údajně byly provedeny i další pokusy, zda právě berušky nejsou hostiteli *A. astaci*, výsledky však nebyly publikovány (Kozubíková and Petrusek in press).

Kvůli nedostatku přesvědčivých důkazů o parazitaci jiných organismů a absenci literatury, která by se týkala přenosu *A. astaci* takovými organismy, jsou ve zbytku práce raci až na výjimky uvažováni jako jediní přirození hostitelé *A. astaci*. Ověření pravdivosti tohoto tvrzení je velmi důležitým úkolem pro další výzkum, protože na tomto zjednodušení jsou zatím založena opatření a úvahy týkající se prevence přenosu moru.

3. Fyzikální a chemické limity přežití *A. astaci*

Stejně jako každý jiný organismus je i *A. astaci* schopen tolerovat jen určité rozmezí podmínek. Po překročení hranic tohoto rozmezí hyne, čehož se dá využít pro jeho likvidaci. Hodnota výsledků mnohých prací věnujících se životním podmínkám *A. astaci* je však pro tento účel omezená tím, že jde o zkoumání růstu v laboratorních kulturách. Tolerované hodnoty podmínek prostředí se mohou výrazně lišit u mycelia rostoucího v agaru a v račí kutikule (Oidtmann et al. 2002).

3.1. Teplota

Teplota *A. astaci* zcela závisí na teplotě prostředí. Prostředím cyst a zoospor je sama voda, prostředím mycelia je tělo hostitele. Známí hostitelé jsou však rovněž poikiloternní ektotermové. Uvedené informace lze tedy zjednodušit ve tvrzení, že změnou teploty vody v nádrži měníme i teplotu *A. astaci*.

Stěžejní pro prevenci moru jsou asi tyto dvě otázky: jakou teplotou musíme vodu ošetřit, abychom zamezili schopnosti zoospor a cyst infikovat hostitele? Jakou teplotou musíme ošetřit tkáň hostitele, abychom usmrtili *A. astaci* v nich rostoucí? Samozřejmě nezáleží pouze na hodnotě teploty, ale záleží též na době působení (CEFAS (Centre for Environment 2000; Oidtmann et al. 2002). Následující dvě kapitoly se pokusí na vytyčené otázky odpovědět. Bohužel jsou v nich uváděná fakta většinou odvozena od pokusů s jen některými známými kmeny *A. astaci*. Často nezahrnují kmen D izolovaný z *Procambarus clarkii* ve Španělsku, který je lépe přizpůsoben vyšším teplotám (Diéguez-Uribeondo et al. 1995), je proto pravděpodobné, že pro tento kmen budou kritické hodnoty teplot mírně posunuté. Navíc není vyloučeno, že ze Severní Ameriky byly nebo budou zavlečeny ještě další kmeny, které by mohly mít opět trochu jiné vlastnosti (Huang et al. 1994).

3.1.1. Usmrcení zoospor a cyst extrémními teplotami

Infekce raka probíhá mezi 0,2 a 25 °C (Unestam 1969a). Jestli však infekce probíhá i za těmito hranicemi, práce neuvádí. Podle práce (Diéguez-Uribeondo et al. 1995) jsou zoospory kmenu izolovaného z *Procambarus clarkii* pohyblivé do 26 °C. Nízké teploty (0 °C až 5 °C) reverzibilně imobilizovaly zoospory (Svensson and Unestam 1975), ale patrně tím autoři zamýšleli spíše teploty blízké 0 °C, protože při 4 °C byl podle práce (Diéguez-Uribeondo et al. 1995) pohyb zoospor normální. Každopádně zoospory ve vodě nemohou být trvale zneškodněny vystavením nízkým teplotám nad bodem mrazu.

Působením teplot pod bodem mrazu lze zoospory zneškodnit. Publikované práce uvádí následující hodnoty: 72 hodin při -5 °C, 20 minut při -15 °C (CEFAS 2000), 30 minut při -20 °C (Unestam and Weiss 1970).

Žádné propagule nepřežily 5 minut při aspoň 60 °C (CEFAS 2000). Tato studie neobsahovala testování nižších teplot, i sami autoři naznačují, že by pro zničení propagulí možná mohly stačit nižší teploty. To podporují i další

studie. Vystavení zoospor teplotě 30 °C po 5 minut působí pokles následné klíčivosti o 90 % (Svensson and Unestam 1975). Spory nepřežívají 30 °C po 30 hodin (Persson a Söderhäll nepublikováno podle (Smith and Söderhäll 1986), bohužel není jasné, zda byly testovány i jiné kombinace blízkých teplot a různých časů ani další podrobnosti studie.

3.1.2. Usmrcení mycelia extrémními teplotami

Pro usmrcení *A. astaci* v těle raka stačí uhynulého raka povařit 1 minutu (CEFAS (Centre for Environment 2000; Oidtmann et al. 2002). Možná by stačila i nižší teplota, neboť mycelium nepřežívá 5 minut při 60 °C (CEFAS 2000). Dalším způsobem, jak dekontaminovat tělo raka je vystavit jej 12 hodin teplotě 37 °C (Oidtmann et al. 2002). Zda je nutné trvání v délce 12 hodin, není jisté, neboť kratší časový úsek nebyl v uvedené studii vyzkoušen.

Mycelium na agaru rostlo i v 29,5 °C (Diéguez-Uribeondo et al. 1995). Vyšší teplota nebyla v této práci zkoumána, ale růst ve 29,5 °C naznačuje, že teplota 30 °C by na zabití mycelia nestačilo, jak se zdálo podle dříve provedených výzkumů, ve kterých ještě nebyl zahrnut kmen izolovaný z *Pracambarus clarkii*. – dle Unestama (1965) je teplota 30 °C pro mycelium letální, 30 °C po 30 hodin působí na mycelium letálně (Persson a Söderhäll nepublikováno podle Smith and Söderhäll 1986).

Po 48 hodinách při -20 °C byla v uhynulém rakovi stále přítomná živá stadia *A. astaci* schopná infikovat další raky, zatímco po třech dnech už k přenosu nedošlo ani nebyla živá stadia vykultivována (Oidtmann et al. 2002).

3.2. Vlhkost, pH a vliv chemikálií

Vlhkost

Sušení jako ošetření, jež zbavuje kontaminované předměty živých stadií *A. astaci*, bývá doporučováno v pracích, jež se snaží doporučit vhodné metody minimalizace přenosu račího moru při terénních činnostech (DAFF 2005; Kozák et al. 2007). V odborné literatuře týkající se *A. astaci* jsem však našel jen několik málo informací podporujících taková doporučení. Zoospory i mycelium po 48 hodinách sušení ztrácí životaschopnost (Persson a Söderhäll nepublikováno podle (Smith and Söderhäll 1986). Vysychání je pro *A. astaci* letální (Rennerfelt 1936 podle Söderhäll and Cerenius 1999). Podle výsledků laboratorní práce se zdá, že mycelium je velmi citlivé k vysychání (Smith and Söderhäll 1986). Přenos moru sítí z jedné nádrže do druhé se experimentálně podařil i po dvou hodinách osychání na vzduchu v suchém kbelíku při 15°C (Alderman et al. 1987). Z tohoto popisu však není zřejmé, zda došlo k proschnutí i mezi vlákny lan a provázků. Není ani uvedeno, zda byla síť aspoň na omak suchá. Vyvozovat z tohoto pokusu nějaká doporučení je tedy nesnadné. Pokusy s těly uhynulých raků nasvědčují, že pro jejich dezinfekci nestačí nechat tělo uhynulého raka oschnout dva dny (Oidtmann et al. 2002). Dva dny sušení totiž pravděpodobně nevedly ke kompletnímu proschnutí vnitřních povrchů kutikuly (například v prostoru žáber), natož pak k vysušení vnitřních tkání těla.

Ačkoliv tedy bývá sušení často doporučováno, experimentální podklady se zdají být nedostatečné. Ověření účinnosti sušení jakožto dezinfekčního postupu by vzhledem k doporučení pro praktické účely bylo příhodné. Formulování rad a doporučení by však patrně bylo komplikované, protože účinnost sušení je pravděpodobně ovlivňována v praxi těžko regulovatelnými faktory jako teplota vzduchu, vlhkost vzduchu a sluneční záření.

pH

Zoospory plavou přibližně v rozmezí pH 4,5 – 9,0 (Unestam 1966). Klíčení probíhalo ideálně při pH 7 až 8, ale již při pH 4,5 klíčila část cyst (Svensson and Unestam 1975). Podle dosavadních poznatků se tedy zdá, že běžně se vyskytující hodnoty pH nijak nebrání *A. astaci* v šíření.

Chemikálie

Testováním účinků různých chemikálií se zabývaly například práce (Alderman and Polglase 1984, 1985; Cerenius et al. 1992; Häll and Unestam 1980; Lilley and Inglis 1997; Rantamäki et al. 1992; Unestam 1965, 1966, 1969a, b). Salinita na úrovni brakické či mořské vody inhibovala pohyb zoospor a inhibovala sporulaci mycelia (Unestam 1969a), což podporuje hypotézu, že *A. astaci* je výhradně sladkovodní druh. Uvedené práce testovaly vliv velkého množství chemikálií, často spíše pro účely laboratorní práce. Pro účely prevence moru je však nutné posoudit i reálnost použití uváděných koncentrací dotyčných chemikálií v přírodě či v chovech. Takové posouzení je nejsnazší u látek, které se již používají v praktických terénních oborech a v chovech vodních organismů. Výhodou takových chemikálií by bylo také snazší zavádění do praxe ve srovnání s prostředky, které dosud nejsou v praxi uplatňovány. Z těchto důvodů používám jako vodítko při diskuzi využití chemikálií v prevenci moru seznam látek používaných v rybářské praxi v České republice. Pro snazší pochopení některých úvah je diskuze chemikálií zařazena až v části 5.2.2., za kapitolu o možných mechanismech přenosu moru.

4. Mechanismy šíření račího moru na nové lokality

Aby bylo možné navrhovat skutečně efektivní opatření proti šíření račího moru, musí být nejprve známy všechny mechanismy šíření. Odpověď na otázku, jakým způsobem se na určitou lokalitu *A. astaci* rozšířil, se bude lišit podle měřítka, v němž budeme situaci posuzovat. Ptáme-li se například na původ *A. astaci* v rybníčku v obci Směčno, kde žije populace raka pruhovaného s velkým podílem nakažených jedinců (Kozubíková et al. 2009), lze s vysokou mírou jistoty odpovědět, že výskyt infekce zde zavinil člověk. Právě lidé totiž nejspíš zavlekli do Evropy (Souty-Grosset et al. 2006). Pro účely této práce je však důležitější pohled v menším měřítku - dostal se *A. astaci* do Směčna migrací nemocných raků proti proudu potoka vytékajícího z rybníka, nebo nějak jinak? Možností disperze je více, jak bude postupně prezentováno v této kapitole.

4.1. Přenos vodou

Přenosem vodou je zde míněno šíření *A. astaci*, aniž by byl zapojen pohyb hostitelů či jiných organismů. Takové šíření je možné pouze v rámci jednoho povodí a ze stadií životního cyklu *A. astaci* jsou ho schopny zoospory a cysty.

Ačkoliv je zoospora opatřena bičíky, význam jejího vlastního pohybu pro šíření moru je omezený. Jakožto mikroskopický organismus je zoospora součástí planktonu. Klíčový je pro rozšiřování zoosporami a cystami vodou pasivní přenos prouděním. Šíření těmito stadii je proto zajištěno v tekoucích vodách jen po směru proudu. V rámci velkých jezer pak mor šíří spíše sami infikovaní raci (Nylund and Westman 1995), i když proudění vyvolávané větrem pravděpodobně má i v jezerech na šíření moru určitý podíl.

Z hlediska šíření je cysta na první pohled znevýhodněna nepřítomností bičíků a lepkavostí svého povrchu, na druhou stranu je díky vytvářené buněčné stěně pravděpodobně odolnější vůči nepříznivým podmínkám než zoospora. Navíc případné přilnutí k plovoucímu předmětu umožní i cystě značné šíření. Pro konkrétnější představu by bylo nutné znát dobu přežívání cyst, avšak ta, jak bylo ukázáno v kapitole 1.9., není dobře známa.

4.2. Přenos pomocí raků

I v této části se pokusím shrnout poznatky o šíření vlastním pohybem raků, tj. bez přímého podílu jiných organismů včetně člověka.

Račí mor postihuje americké a evropské druhy raků různou měrou, což se projevuje na rozdílech v jejich chování a délce přežívání. Možnosti šíření infekce pomocí těchto dvou skupin jsou proto velmi odlišné.

4.2.1. Přenos evropskými druhy raků

Šíření moru evropskými raky je pravděpodobně významnější během postupu první vlny moru sledovaným územím, protože vysoká hustota populací raků ve vodách umožňuje častý kontakt infikovaných a neinfikovaných jedinců, ještě než infikovaní raci nemoci podlehnou. Jakmile je ale krajina zasažena morem, velká část populací evropských raků je zdecimována a hustota populací výrazně poklesne. V důsledku řídkého výskytu populací raků v krajině pak nedochází tak často ke kontaktům mezi populacemi. Pokud se někde zachovají izolované populace raků, které nebyly zasaženy, mohou později expandovat na lokality, kde raci v důsledku nákazy vymřeli (Alderman 1993). Takové zvýšení hustoty populace však může být v důsledku nebezpečné, jak bude více diskutováno v kapitole 5.2.2.

4.2.2. Přenos severoamerickými druhy raků

Několik druhů raků původně žijících v Severní Americe bylo záměrně introdukováno do Evropy. V současné době jsou v Evropě nejrozšířenějšími druhy raků pruhozobý, rak signální a rak červený (Souty-Grosset et al. 2006). Ze všech těchto tří druhů byl potvrzen přenos račího moru na původní evropské druhy raků (Diéguez-Uribeondo and Söderhäll 1993; Vey et al. 1983; Vorburger and Ribi 1999).

V Evropě zatím méně rozšířené jsou další druhy původem z Ameriky: *Orconectes immunis*, *Orconectes virilis*, *Orconectes juvenilis* a rak mramorovaný („Marmorokrebs“, *Procambarus* sp.) (Chucholl and Daudey 2008; Souty-Grosset et al. 2006). Kvůli svému geografickému původu jsou tyto čtyři druhy důvodně podezřívány ze schopnosti přenášet mor. Experimentální důkaz pro toto tvrzení ale neexistuje.

Rak mramorovaný je v současné době šířen mezi akvaristy i na území České republiky. Jde o partenogeneticky se množícího raka (Martin et al. 2007; Scholtz et al. 2003), a tak pouhý jeden rak může založit celou populaci. Informace o jeho nárocích na prostředí zatím pramení pouze z chovů v akváriích, neboť není znám žádný jeho původní přírodní areál. Rak mramorovaný přežívá i několik týdnů při teplotách pod 8 °C a nad 30 °C a existují i hlášení, že přežívá v nádrži s hladinou pokrytou ledem (Souty-Grosset et al. 2006). Soudě podle těchto informací nelze vyloučit jeho invazi do našich vod. Ověření hypotézy o schopnosti raka mramorovaného a ostatních akvaristy chovaných raků přenášet *A. astaci* by bylo velmi vhodné pro lepší komunikaci s veřejností a přípravu legislativních opatření.

Prokázání schopnosti určitého druhu figurovat jakožto přenašeč neznámá, že všichni jedinci tohoto druhu slouží jako přenašeči moru. Existují i populace, které *A. astaci* nehostí. Ty pak mohou dlouhodobě koexistovat s citlivými druhy raků na jedné lokalitě. Aktuální zpracování této tematiky podává (Kozubíková et al. in press), kde jsou též citovány pozorované případy takové koexistence.

4.2.3. Význam vlastního pohybu raků pro šíření račího moru

Pohyb raků jako mechanismus disperze *Aphanomyces astaci* je probírán například v práci (Nylund and Westman 1995). Autoři z informací o šíření moru finskými povodími vyvodili, že mor proti proudu a v rámci velkých jezer šíří hlavně raci, neuvádí však, co ukazuje právě na šíření raky. Práci uzavírají tvrzením, že lidské aktivity jsou mnohem významnější a efektivně šíří mor v rámci povodí i do jiných povodí. Mezi povodími se skutečně mor přenáší díky pohybu jiných živočichů, těžko může dojít k přesunu raků po souši až do jiného povodí. V rámci jednoho povodí však posouzení významu vlastního pohybu raků není tak snadné. Z tohoto důvodu může leckdy docházet k nadhodnocování či podhodnocování významu vlastního pohybu raků v procesu šíření moru. Pro odlišení šíření dané migrací raků od šíření ostatními způsoby se nabízí porovnání pohybové aktivity raků s rychlostí šíření moru povodím.

Takové porovnání jsem však dosud v žádné studii nenalezl, ačkoliv rychlost postupu moru povodím proti proudu uvádějí například (Håstein and Gladhaug 1973; Nylund et al. 1993; Taugbol et al. 1993; Westman and Nylund 1978).

4.3. Přenos jinými organismy vyjma člověka

Předchozí odstavce naznačily, jakými způsoby se může mor šířit pomocí zoospor, cyst a raků bez účasti jiných organismů. V této kapitole se zaměřím právě na to, kdo další a jakým způsobem může v přírodních podmínkách *Aphanomyces* přenášet. Při zapojení informací o životním cyklu se můžeme ptát i konkrétněji. Můžeme se zaměřit na šíření myceliem nebo zoosporami a cystami. Nebude přitom uvažována činnost člověka, které bude věnována až následující kapitola.

4.3.1. Přenos zoospor a cyst *A. astaci*

Teoreticky může dojít k přenosu *A. astaci* na čemkoliv, co přišlo do styku s vodou se sporami či cystami, pokud nebyly propagule při přesunu usmrceny vysušením (ostatní fyzikální a chemické způsoby likvidace jako změny teplot a salinity nejsou pravděpodobně v přírodě tolik významné). Otázku tedy lze pozměnit a ptát se: kdo je v přírodě schopen přemístění z jedné sladkovodní lokality do druhé, než stačí oschnout? Představit si lze mnoho možností, včetně transportu v mokré srsti zvířete, např. divokých prasat. Někteří živočichové jsou v důsledku svého způsobu života lepšími potenciálními přenašeči moru. Například predátoři raků jsou v porovnání s dalšími organismy vystaveni většímu množství spor, protože s raky přímo manipulují, navíc se pohybují přednostně na lokalitách s výskytem raků. Vodní ptáci jsou další pro přenos moru vhodnou skupinou (Reynolds 1988), neboť jsou zvýhodněni svou schopností rychlých přesunů na velké vzdálenosti. Pohybu přímo ve vodách jsou schopni nektonní živočichové, zejména ryby.

In vitro bylo zkoumáno chování cyst *A. astaci* na šupinách lososa (*Salmo salar*). Spory na izolované šupině nejen vyklíčily, ale došlo i k růstu mycelia a do tří dnů od kontaktu se sporami i ke sporulaci, což naznačuje, že lososovité ryby by mohly šířit račí mor na svém povrchu (Häll and Unestam 1980).

Nicméně studie *in vivo* přenos povrchem ryb nezaznamenaly. Přenos moru pomocí amura bílého, který ale nepatří mezi lososovité ryby, nebyl pozorován (Ahne and Halder 1988 podle Oidtmann et al. 2002). V dalším pokusu byl pstruhům duhovým setřen sliz z malé části pokožky, pak byly ryby vystaveny zoosporám z kultur a z nemocných raků. Při následných pokusech nedošlo k přenosu na raky ani nebyla *A. astaci* vykultivována ze šupin, ani nalezena při mikroskopickém zkoumání (Oidtmann et al. 2002). Autoři si vysvětlují rozdíly mezi *in vitro* a *in vivo* experimenty následovně. Při experimentech *in vitro* byly šupiny vytrhány z kůže ryb, tím byly šupiny aspoň částečně zbaveny ochrany slizem a pokožkou. Navíc se na ochranné schopnosti slizu může podílet i kontinuální produkce slizu, která by mohla zajišťovat odstraňování přisedlých spor. Setření slizu z malé části těla (1cm²) patrně nebylo dostatečným narušením ochranné funkce tělního povrchu ryb (Oidtmann et al. 2002).

Ačkoliv pokusy *in vivo* přenos moru povrchem ryb neprokázaly, nelze jej vyloučit. Otazník visí nad přenosem rybami s ještě více poškozeným povrchem těla (Oidtmann et al. 2002) nebo může k přenosu docházet prostě jen velmi zřídka a uvedené studie tak malou frekvenci přenosu nemusely odhalit. Klíčení na povrchu šupin živých ryb, které je zpochybňováno (Oidtmann et al. 2002), není nutnou podmínkou pro přenos *A. astaci* na povrchu těl ryb. K tomu by stačilo, kdyby cysta ulpěla na rybím těle a po nějaké době byla uvolněna zpět do volné vody.

4.3.2. Přenos tkání hostitele s myceliem *A. astaci*

Mycelium roste v tkáních raků. Rak nemusí být pro přenos moru živý – *A. astaci* byla z těla vykultivována ještě po pěti dnech od úhynu raka a nákazy raků bylo tělo schopno i čtyři dny po úhynu (Oidtmann et al. 2002). Přenos

uchycením kousku takové tkáně na povrch pohybujícího se živočicha není na první pohled příliš pravděpodobný, natož případ náhodného přenosu celého raka.

Pokud zahrneme do úvah predátory raků, uvedené možnosti přenosu nabudou reálnější obrysy. Predátor přichází běžně do styku s kousky račích tkání, ulovený rak může být konzumován až po přenesení kořisti na jiné místo. Predátor může transportovat mor i uvnitř svého těla, trávicí soustavou a šířit mor svými exkrementy. Šíření moru predátory může být usnadněno chováním nemocných raků (denní aktivita raků, ztráta únikového reflexu), které činí raky snadnou kořistí (Oidtmann et al. 2002).

Zejména v prvních týdnech života jsou raci snadnou kořistí pro mnohé predátory vodních bezobratlých, jakými jsou například mnohé druhy bentofágních ryb. Raci větší velikosti bývají predováni již specializovanějšími predátory, například některými rybami - úhoř, okoun, štika, sumec, siven či pstruh. Mezi významné predátory raků patří i někteří ptáci (kachny, volavka, krkavec, vrána, ledňáček, kormorán) a savci (norek, ondatra, vydra, liška, mýval) (Nylund and Westman 1995; Souty-Grosset et al. 2006). Norci a vydry byli navrženi jako významní vektorů račího moru v Irsku (Reynolds 1988). Naopak (Nylund and Westman 1995) uvádějí, že přenosu pomocí norka amerického a vrány obecné nic nenaváděje a význam těchto živočichů v šíření je asi malý.

Žádné živé stadium *A. astaci* nebylo nalezeno na tělech čtyř uhynulých raků ponechaných aspoň 12 hodin při 37 °C ani nedošlo k přenosu moru na citlivé druhy raků, proto není pravděpodobný přenos moru zaživačím traktem ptáků a savců (Oidtmann et al. 2002). Toto zdůvodnění ale nepovažuji za dostatečné, protože zdržení potravy v trávicím traktu ptačích predátorů může být i kratší než 12 hodin (Charalambidou and Santamaria 2002) a význam disperze organismů zaživačím traktem ptáků bývá obecně spíše podceňován (Frisch et al. 2007). Avšak jezera vzdálená pouze několik kilometrů od „promořených“ vod nebyla zasažena morem, ačkoliv byl mezi oběma vodami čilý pohyb ptáků (Unestam 1973), což svědčí spíše o malých schopnostech ptáků přenášet mor.

Přenos trávicí soustavou ryb

Experimentálně byl zkoumán přenos moru trávicím traktem kapra obecného, okouna říčního, pstruha duhového a úhoře říčního (Oidtmann et al. 2002). Pokud byly rybám do trávicí soustavy podány kousky infikované kutikuly, byla později při pitvách pozorována živá stadia *A. astaci* ve střevech ryb. Podařil se i přenos moru z těchto ryb na raky. Jen pokud ryby tři dny po pozření kutikuly hladověly, a až poté byly vpuštěny do nádrže s raky, k přenosu nedošlo.

4.4. Role člověka

Zoospory a cysty se mohou šířit ve vlhkém prostředí či vodou. Takové příležitosti se objevují při mnoha lidských aktivitách - například jde o rybářskou (Reynolds 1988) a vodohospodářskou činnost, sportovní rybolov (Reynolds 1988), lov raků (Håstein and Gladhaug 1975; Jussila and Mannonen 2004; Nylund et al. 1993; Unestam 1973), potápění, vodáctví (Taugbol 2004), pohyb lodí obecně (Reynolds 1988; Taugbol et al. 1993) nebo hydrobiologický výzkum.

Šíření mycelia činností člověka je možné též přesunem těl hostitelů a možná i ryb. Problematika těchto způsobů je probrána v následujících kapitolkách.

4.4.1. Přemístování raků

Člověk hraje pravděpodobně hlavní roli v disperzi přenašečů moru, jak naznačuje například šíření raka signálního ve Španělsku (Diéguez-Urbeondo 2006). I pro šíření moru lidskými aktivitami postačí uhynulí raci, jak bylo dokumentováno v kapitole 4.3.2.

Vysazování raků na nové lokality se provádí, legálně či ilegálně, z několika různých důvodů. Za účelem pozdějšího lovu byli raci vysazováni ve velkých počtech zejména ve Skandinávii, ale v menším měřítku i jinde po Evropě, například ve Velké Británii (Alderman 1993) či ve Španělsku (Diéguez-Uribeondo and Söderhäll 1999). Vysazování probíhá i v rámci ochrany přírody (reintrodukce původních druhů), z estetických důvodů - vysazování potápěčů (Kozubíková and Petrusek in press), může docházet i k vypouštění raků z akvariálních chovů (Souty-Grosset et al. 2006). V některých případech dochází k šíření *A. astaci* vypouštěním raků jaksi omylem. Například pokud lidé zamění invazní raky za ohrožené původní druhy raků nebo když dojde k záměně úhynu původních raků působeného račím morem za otravu raků způsobenou znečištěním (Kozubíková and Petrusek in press). Uvedené možnosti jsou jedním z důvodů pro důkladné informování veřejnosti.

Obchod tvoří a zejména tvořil výraznou sílu pohánějící transport raků. Čilý obchod s raky, jaký byl ve Francii, Německu a Rusku, způsobil rozsáhlé přesuny raků, které byly zodpovědné za největší část, ne-li za všechno, šíření moru v kontinentální Evropě (Alderman 1996). Je asi vhodné upozornit, že slovo „obchod“ bývá používáno jako pojem, který zastřešuje vše od lovu raků až po jejich prodej. Dnes už obchod s raky není tak objemný jako dříve, a tak se i jeho podíl na šíření moru adekvátně snížil (Nylund and Westman 1995).

Raci jsou v některých oblastech Evropy přemísťováni i jako návnada pro lov ryb (Oidtmann et al. 2002; Reynolds 1988).

K neúmyslnému transportu raků může docházet při přesunu ryb (Oidtmann et al. 2002). Jiné způsoby neúmyslného transportu už asi nebudou tak obvyklé, i když si lze představit přesun malých raků například lodní dopravou či transport raků ve vegetaci pro osazování zahradních jezírek.

4.4.2. Převoz ryb

Dosud byly v této práci shrnuty možnosti šíření moru rybami přímo jejich tělem, což v případě migrací ryb pokrývá všechny možnosti. V případě převozu ryb člověkem však navíc hrozí převoz *A. astaci* ve formě zoospor a cyst vodou, ve které ryby převážíme, nebo vlhkým vybavením (podběráky, kesery, sítě, vlhké části dopravních prostředků, obuv atp.). Význam přenosu moru převozem ryb nemusí být malý, jak naznačují výsledky experimentů simulujících běžné zacházení s rybami (Alderman et al. 1987). Pstruzi duhový byli vystaveni zoosporám *A. astaci* 24 hodin v nádrži s raky bahenními hynoucími na mor. Po jedné hodině přepravy autem byly pstruzi i s částí vody, pocházející z nádrže s hynoucími raky, přesunuti do nové nádrže se zdravými raky – tito raci se morem nakazili a uhynuli. K přenosu moru došlo, i pokud byli pstruzi z infekční nádrže přeneseni podběrákem ke zdravým rakům. Při použitím uspořádání pokusu však není možné s jistotou rozlišit, zda k přenosu došlo trávicím traktem či na povrchu ryb. Úspěšné zabránění přenosu moru chemickým dezinfikováním pstruhů a převážené vody prováděné při dalším experimentu však naznačuje, že přenos se mohl dít spíše na povrchu ryb, neboť přenos trávicí soustavou nemohla dezinfekce narušit.

4.5. Hledání zdroje nákazy

Pokud se podaří na postižené lokalitě najít nějaké nepůvodní americké druhy infikované *A. astaci*, bývají američtí raci označeni za nejpravděpodobnější zdroj infekce, jak dokumentují (Alderman 1993; Diéguez-Uribeondo and Söderhäll 1999; Kozubíková et al. 2006).

Není přitom zcela jednoznačné, zda na lokalitu byl mor zavlečen americkými raky, nebo zda nejprve lokalitu osídlili američtí raci bez moru a až poté sem byla nějakým jiným způsobem dopravena *A. astaci* a nakazila raky. Výsledek je sice tentýž, ale případné nesprávné identifikování způsobu přenosu by mohlo mít závažné důsledky pro

preventivní opatření. Varianta „nevinné“ populace amerických raků nebývá zmiňována, protože první varianta je podstatně pravděpodobnější. A jak se američtí raci na lokalitu dostali? Odpověď je snadná, pokud šlo o zaznamenané vysazení, v jiných případech je situace složitější a přichází na řadu zvažování všech možností od ilegálního vysazení přes neúmyslný transport po migraci raků.

Pokud nejsou žádní američtí raci v postižené nádrži nalezeni, pátrání po zdroji nákazy pokračuje. Diskutována bývá možnost šíření pomocí zoospor a cyst. Dopátrat se nějakých důkazů ale bývá už z principu nemožné, a tak autoři často „jen“ posuzují veškerou činnost v okolí dané lokality, a pokud najdou nějaký významný pohyb vody či vlhkého materiálu, označí jej za nejpravděpodobnější zdroj infekce. Takový postup byl asi uplatněn například v práci (Reynolds 1988), zde byly za pravděpodobný zdroj infekce označeny manipulace s vlhkým vybavením lovců raků.

Často nebývá diskutována možnost přenosu moru migrací ryb (s *A. astaci* v šupinách či v trávicím traktu). V některých případech se asi jedná o lokality neumožňující přirozenou migraci (přehradní nádrže bez rybích přechodů, jezera, rybníky atp.). Ve starších studiích mohlo docházet k podcenění této cesty přenosu, protože experimentální ověření takového přenosu přišlo až již zmiňovanou prací (Oidtmann et al. 2002).

Využití zkoumání DNA

Díky zkoumání DNA *A. astaci* metodou náhodné amplifikace polymorfni DNA (RAPD, random amplification of polymorphic DNA) bylo zjištěno, že se na území Evropy vyskytují nejméně čtyři odlišné skupiny kmenů *A. astaci* (Diéguez-Uribeondo et al. 1995; Huang et al. 1994). Porovnáním DNA *A. astaci* izolované z různých račích populací lze vyloučit, že sdílí stejný zdroj infekce, pokud *A. astaci* z těchto lokalit náleží k odlišným genotypům (Oidtmann et al. 1999a).

Při interpretacích je vhodné zdůraznit, že příslušnost k například skupině kmenů izolované z raka signálního ještě neznamená, že mor byl na tuto lokalitu rozšířen přímo rakem signálním (Oidtmann et al. 1999a; Vennerstrom et al. 1998). Jde jen o příslušnost ke skupině kmenů, která se samozřejmě nijak nezmění, bude-li na konkrétní lokalitu kmen přenesen třeba s násadou pstruhů. Pro vypátrání zdroje infekce by bylo nutné provést detailní studie populací amerických raků a na nich parazitujících kmenů *A. astaci* v Evropě (Oidtmann et al. 1999a). Důkladněji toto téma diskutují (Kozubíková and Petrussek in press).

4.6. Minimální „dávka“ patogenu nutná pro infekci

Dosud jsem vyjmenoval mnoho různých mechanismů, při nichž by se aspoň malé množství propagulí moru mohlo dostat na novou lokalitu. Praktický význam jednotlivých mechanismů je ale dán i tím, zda se na novou lokalitu dostane množství propagulí dostatečné pro infekci raků. Například (Diéguez-Uribeondo 2006) naznačuje, že pravděpodobnost přenosu moru jinak (rybami, raky přenesenými ptáky) než introdukcí raků je minimální.

(Oidtmann et al. 2004) uvádějí, že podle jejich nepublikovaných dat rak říční může vydržet koncentraci 10 spor.ml⁻¹ při 10 °C bez rozvinutí račích moru. Objevily se i pokusy určit koncentraci spor, při níž uhynie polovina nakažených raků - LD50 (Alderman et al. 1987; Diéguez-Uribeondo et al. 1995; Unestam and Weiss 1970). Hodnota LD50 činila pro raka říčního asi 2,5 zoospor.ml⁻¹ a pro raka signálního 25 000 zoospor.ml⁻¹ (Unestam and Weiss 1970). Podobné experimenty byly provedeny i později a autoři článku (Alderman et al. 1987) diskutují také výsledky práce (Unestam and Weiss 1970). Upozorňují, že LD50 je nevhodný parametr pro organismus jako *A. astaci*. Potíže činí vymezení délky období od vystavení raků dávce zoospor, po které se mají zvířata sledovat, neboť jejich vlastní data ukazují, že čas potřebný pro rozvinutí moru až k úhynu raka může být u citlivých druhů různý, mj. v závislosti na

počáteční dávce zoospor a na teplotě vody. Závislost na teplotě vody podporují i výsledky dalších pokusů (Matthews and Reynolds 1990).

Dalším problémem stanovení LD50 je oběma pracemi použité uspořádání pokusu - všichni raci byli přechováni v jedné nádrži. Zoospory dodané na začátku pokusu infikovaly možná jen malou část raků. Jakmile však tito raci uhynuli, docházelo nejspíše k uvolňování dalších zoospor z jejich těl. Takto uvolňované zoospory působily šíření moru na další a další jedince v pokusu, až uhynuli všichni raci v nádrži (Alderman et al. 1987)

Pro prevenci přenosu moru je však možná otázka počtu spor nutných pro infekci raka zbytečná. Úspěšnost infikování raka záleží jistě i na mnoha faktorech prostředí a aktuálním fyziologickém stavu hostitele a jde do jisté míry o náhodný proces. Infekce jednou zoosporou sice není pravděpodobná, ale v jednotlivých případech nelze takový jev vyloučit. Navíc konkrétní počty spor lze prozatím studovat jen v laboratoři. Opatření proti přenosu moru by tedy měla být navržena tak, aby pokud možno byla minimalizována pravděpodobnost přenosu živých stadií *A. astaci*.

5. Opatření proti račímu moru

Prvním a nejdůležitějším opatřením je zmapování oblastí s výskytem *A. astaci* (Nylund and Westman 1995), což umožní soustředit některá účinná opatření právě do těchto oblastí (Kozubíková et al. 2009). Vždy hrozí, že se nepodaří objevit všechna ohniska, ale některá nákladnější nebo jinak obtížná opatření není možné aplikovat na území celých států. Jaká opatření již byla zavedena, navržena a o jakých možnostech lze do budoucna uvažovat se pokouší shrnout tato kapitola.

5.1. Léčba raků

Jedním způsobem, jak bojovat s nemocí či parazitem je léčba nemocných. Tato možnost však v případě račího moru není v současnosti reálná. Není totiž znám žádný postup, který by dokázal nemocného raka vyléčit. Dosavadní práce zabývající se účinky chemikálií na mycelium, které byly citovány v kapitole 3.2., uvádí mnoho látek účinně narušujících životní cyklus *A. astaci*. Jde však o pozorování účinku na mycelium *in vitro*, tedy obvykle o testování vůči myceliu v agaru. Mycelium však roste uvnitř tkání raka. I kdyby se podařilo látky vpravit přímo do těla raka, není jasné, zda by vůbec účinná látka dokázala v těchto podmínkách mycelium zničit. Dále by bylo nutné, aby použitá látka nepoškozovala raky. Kvůli těmto nevyřešeným problémům nebude nejspíš léčba raků přinejmenším v blízké budoucnosti možná.

5.2. Prevence šíření račího moru

Dalším způsobem boje s nemocí či parazitem je zastavit jeho šíření. Bránit šíření moru lze principiálně na dvou úrovních, jednak mezi jedinci v rámci jedné lokality, jednak mezi lokalitami.

5.2.1. Prevence šíření v rámci jedné lokality

Znemožnění přenosu moru na další raky v rámci jedné lokality lze pravděpodobně dosáhnout přerušením rozmnožování *A. astaci*, protože jinak než pomocí zoospor a cyst nejspíš k nákaze raků nedochází (kapitola 1.8.). Dosavadní výzkum, jehož zásadní práce byly citovány v kapitole 3.2., odhalil negativní vliv mnoha chemických látek. Aplikace chemikálií však připadá v úvahu spíše jen v chovech raků, protože ve volné přírodě by měla za následek změny v ekosystémech a mnohdy by ani nebylo použití reálné. Na druhou stranu by nebylo nutné ošetřovat vodu donekonečna. Kdyby se podařilo zcela zabránit šíření po

dobu nutnou k úhynu všech dosud nakažených raků, byla by nákaza z lokality odstraněna zcela (Rantamäki et al. 1992).

Nejvíce rozpracovaná je zatím myšlenka použití iontů hořčíku, jejichž zvýšené koncentrace inhibují životní pochody *A. astaci*. 30 minut v 50 mM roztoku $MgCl_2$ způsobilo lyzi 80 % cyst (Persson and Söderhäll 1986). Když byli nakažení raci chováni ve vodě s koncentrací aspoň 25 mM, infekce se nešířila na další raky. Pokud však dojde k přenesení mycelia do prostředí o nižších koncentracích, životní pochody *A. astaci* se znovu obnoví (Rantamäki et al. 1992), pro zamezení rozmnožování *A. astaci* by tedy bylo nutné udržovat uvedené koncentrace, dokud by byl na lokalitě mor přítomen. Zároveň by pravděpodobně bylo nutné zajistit dostatečně nízké koncentrace iontů vápníku. Podle práce (Cerenius and Söderhäll 1984b) působí ionty vápníku zvýšení uvolňování zoospor. Zdá se, že ionty vápníku mohou vyvažovat negativní působení iontů hořčíku, jak ukazují výsledky laboratorních experimentů při nízkých koncentracích - 1 mM (Söderhäll and Cerenius 1987). Uvažuje se tedy, že významným faktorem je poměr koncentrací těchto iontů.

V některých tureckých jezerech jsou raci bahenní stále komerčně loveni, přestože byly populace těchto jezer morem zasaženy (Harlioğlu 2008), což vyvolává otázku po příčině, jež zabránila vymření těchto raků. Autor uvádí tři taková jezera. Ve dvou případech (jezera Eğirdir a Çivril) však z dat plyne, že mezi dnešními úlovky a úlovky před nástupem *A. astaci* je období, kdy je v jezerech vykazován úlovek „0 tun“. V třetím případě (jezero İznik) není z prezentovaných dat možné ověřit, zda se podobná pauza mezi úlovky nevyskytuje též. Uvedená data tedy nevylučují asi nejjednodušší hypotézu, totiž že raci bahenní v jezerech vymřeli a jejich osud následovala i *A. astaci*. Následně mohlo dojít k rekolonizaci jezera raky bahenními bez moru. To by ale předpokládalo velmi rychlé vymření i obnovení populace raků.

(Fürst 1995) naznačuje alternativní vysvětlení - v jezerech došlo k ustanovení rovnováhy mezi řídkými populacemi raků bahenních a *A. astaci*, možná za přispění částečné odolnosti těchto raků.

Další možností je právě vysvětlení pomocí negativního vlivu vyšších koncentrací iontů hořčíku na *A. astaci* (Harlioğlu 2008). Voda z jezera İznik obsahuje abnormální poměr iontů vápníku a hořčíku, kde silně dominují ionty hořčíku. Stejný argument autor používá i pro jezero Akşehir, kde sice raci v roce 1990 vyhynuli, ale to bylo celých pět let po objevení prvních hromadných úhynů v nádrži.

Cenné by pro objasnění situace bylo porovnání chemismu jezer İznik a Akşehir mezi sebou a s koncentracemi uváděnými v práci (Rantamäki et al. 1992), provést pokusy s přenosem moru ve vodě z těchto jezer například na raky říční, vypátrat údaje o lovu raků v jezerech İznik po celé období od objevení se *A. astaci* v oblasti až po dnešní dobu, což by umožnilo odhalit případné raky bez úlovků, které by nasvědčovaly přechodnému vyhynutí *A. astaci* následkem vyhynutí raků. Již v práci (Harlioğlu 2008) bylo navrženo provedení laboratorní pokusů s raky bahenními z této oblasti, které by mohly odhalit případnou rezistenci raků nezpůsobenou podmínkami prostředí. A v neposlední řadě by bylo žádoucí analyzovat přítomnost *A. astaci* v dnešních populacích, nejlépe pomocí molekulárních metod. Zatím lze případ zmíněných jezer jen stěží přijmout jako doklad účinnosti vysokých obsahů iontů v potírání *A. astaci*.

5.2.2. Prevence šíření mezi lokalitami

Aplikovány byly zatím opatření, jež si můžeme pro přehlednost rozdělit do dvou kategorií. Jednu kategorii tvoří management lokality, na které je přítomna *A. astaci*. Druhou pak tvoří opatření zabraňující šíření moru na další lokality. Funkční celek pak vytváří spojení obou.

5.2.2.1. Management lokality s výskytem račiho moru

Situace se liší podle toho, zda máme na lokalitě přítomny severoamerické raky, nebo jen raky evropské.

Lokalita se severoamerickými raky

Severoamerické druhy raků a *A. astaci* dosáhly koevolucí určité rovnováhy, a tak není pravděpodobné, že by mohla být *A. astaci* přirozenými mechanismy z populace amerických raků odstraněna (Taugbol 2004). Infikovaná populace podle většiny současných poznatků znemožňuje výskyt původních evropských raků na dané lokalitě. Koexistence je možná jen pokud *A. astaci* není přítomna. Avšak práce (Kozubíková et al. 2009) naznačuje, že koexistence je v některých případech možná i pokud je *A. astaci* přítomna ve velmi malé míře (jen málo jedinců je nakaženo). Také v některých rakouských řekách nedošlo k úhynu všech jedinců citlivých druhů raků, přestože žijí na lokalitě s americkými raky (Pöckl and Pekny 2002). Autoři navrhuji vysvětlení, že za určitých podmínek může docházet i ke koexistenci evropských druhů raků s infikovanými americkými raky. Určitými podmínkami zamýšlí autoři faktory vedoucí k výskytu jen nízkých koncentrací spor *A. astaci* (velká variabilita habitatů v toku, velká rychlost proudu vody v toku nebo snížení hustoty račích populací predátory či člověkem). Pozorování z Rakouska však nejsou příliš spolehlivým dokladem takové hypotézy, protože autoři nedokládají přítomnost *A. astaci* v dotyčných populacích amerických raků.

Infikovaná populace amerických raků tedy ohrožuje evropské raky jakožto zdroj nákazy. Řešením by mohlo být úplné zlikvidování celé populace amerických raků i s jeho parazitem (*A. astaci*) (DAFF 2005). I přes dlouholetou snahu najít nějakou metodu šetrnou pro životní prostředí, je zatím jediným způsobem vyhubení raků použití biocidů (Peay et al. 2006). Dosud však není znám žádný biocid specifický pro raky a při aplikaci známých látek dochází k vyhubení značné části bezobratlých, což je v případě používání ve volné přírodě velmi kontroverzní.

Ale i kdyby byla dostupná metoda vyhubení pouze raků, nebyla by asi leckde její aplikace vítána. V některých oblastech nahradily americké druhy raků ty evropské po stránce zásobení trhu (Chiesa et al. 2006). Na takových místech by vyhubení amerických raků nebylo žádané, pokud by zároveň nebylo zaručeno okamžité nahrazení stejně hustou populací evropských raků, a to není reálné. Zbývá tedy jen bránit šíření *A. astaci* na další lokality. Možné mechanismy jsou uvedeny v kapitolách 5.2.2.2. a 5.2.2.3.

Lokalita pouze s evropskými raky

Zatím se v literatuře objevil v podstatě jeden způsob řešení, jehož princip lze shrnout následovně. Mor nepřežívá dlouhodobě bez hostitele (Söderhäll and Cerenius 1999), protože spory a cysty jsou jen krátce trvající stadia uzpůsobená k nalezení a infekci nového hostitele. Pokud tedy mor vyhubí všechny raky na lokalitě, *A. astaci* vyhyne záhy na této lokalitě také. Jakmile *A. astaci* zmizí, mohou se na místo navrátit evropské druhy raků (Taugbol 2004). Doba nutná pro vymření *A. astaci* se liší podle konkrétní situace. P dole případu jezera Immeln by postačovalo osm týdnů (Söderhäll and Cerenius 1999), naopak ani 4 měsíce nestačily na lokalitě v povodí řeky Avon (Alderman et al. 1987). Lze se domnívat, že nejkratší bude potřebné období v lokalitách s vysokou hustotou raků, zatímco delší bude v lokalitách s nízkou hustotou (Söderhäll and Cerenius 1999). Kvůli variabilitě potřebného času je vhodné před reintrodukcemi ověřit, zda již na lokalitě opravdu nehrozí nákaza *A. astaci*, například pomocí experimentů s citlivými druhy raků (Schulz et al. 2002; Taugbol 2004). Tematika reintrodukcí raků by určitě zasluhovala hlubší rozbor, který už však překračuje rámeček této práce.

K obnovení populací raků po vymření *A. astaci* může dojít i bez přičinění člověka, pokud mor vyhubí všechny své hostitele v dané lokalitě, a tu později osídlí raci přeživší v nějakém refugiu (ačkoliv nikdy nelze vyloučit nezaznamenané vysazení lidmi). K takovému přirozenému návratu nejspíše došlo v jezeře Immeln (Söderhäll and Cerenius 1999). Přibližně po roce od začátku masových úhynů na mor byli v tomto jezeře pozorováni živí raci říční (Smith and Söderhäll 1986) – autoři věří, že pokud po morové ráně pozorují raky říční, jde o zdravé jedince a populace se postupně rozroste na původní úroveň. Alternativní a méně optimistické vysvětlení předkládá (Fürst 1995). Mezi morem a populacemi citlivých druhů raků se podle něj může vytvořit rovnováha, která udržuje populace raků na nízké úrovni. Podle autora jen zřídka dochází k vymření *A. astaci* následkem vyhubení raků samotným morem, obzvláště těžko v rozsáhlých jezerech. Očekávání vymření celé populace raků vychází z nesprávného „zobecnění“ pozorovaných účinků *A. astaci* na jednotlivé raky při laboratorních pokusech. (Fürst 1995) navrhuje následující mechanismus udržující rovnováhu: v nádrži s málo hostiteli bude málo spor, a tak budou raci déle přežívat, jak ukázal (Alderman et al. 1987). Když populace raků vzroste, zvýšený počet spor způsobí rychlejší hynutí raků a populace se vrátí zpět na nízkou úroveň. Stejná myšlenka je v podstatě základem výše uvedené hypotézy o koexistenci evropských a infikovaných amerických raků (Pöckl and Pekny 2002). Fürst podporuje svou hypotézu rozbořením dat o 104 jezerech, kde probíhalo vysazování raků říčních po masových úhynech na mor. Jen ve čtyřech případech bylo vysazování úspěšné – vždy šlo o malá jezera s jednoduchou morfologií a souvislým výskytem raků před morovou ranou.

Dílčí neúspěchy reintrodukcí však přímo nevyvrací, že *A. astaci* na lokalitách vymřela a hypotéza rovnovah představuje pouze jedno z mnoha vysvětlení. Například mohlo docházet k reintrodukcím raků příliš brzy nebo byla jezera zbavená *A. astaci* znovu infikována. Učinění závěru o účinnosti vymření *A. astaci* následkem vlastní aktivity bude vyžadovat podrobnější rozbor dané problematiky, například vypátrání, nakolik byly úspěšné další reintrodukce, neboť od roku 1995 se určitě udály další a i jinde po Evropě.

Izolace nakažené populace

V komplexnějších vodních tělesech (tekoucí vody, jezera složité morfologie či velké rozlohy) je uplatnění principu vymření *A. astaci* následkem vyhynutí raků v celém vodním tělese komplikované (předchozí kapitola) a nežádoucí. Proto je potřeba nakaženou část populací raků nějakým způsobem izolovat. V tekoucích vodách se předpokládá snadná disperze moru po proudu pomocí zoospor a cyst, které neumíme ve vodě zlikvidovat způsobem šetrným ke zbytku ekosystému, a tak raky níže po proudu nemáme možnost uchránit, i kdyby tam ještě nějaké nenakažené populace zbývaly. Proto je obvykle snaha izolovat aspoň nenakažené raky v horní části toku. Pro tento účel byl navržen a použit následující postup. Pomocí vůči moru citlivých raků v klecích nalézt „frontu“ šíření moru tokem a někde nad frontou zabránit pohybu nemocných raků proti proudu pomocí elektrických bariér (elektrických plotů). Následně by v ideálním případě mělo v části níže od bariér dojít k vymření raků a *A. astaci*. Bezinfekčnost oblasti se ověřuje po několika měsících pomocí citlivých druhů raků v klecích. Pokud se již raci morem nenakazí, odstraní se bariéry a v ideálním případě raci z uchráněných oblastí sami rekolonizují postiženou část toku. Tento postup byl použit ve Švédsku (Söderhäll et al. 1977) a v Norsku (Håstein and Gladhaug 1973). Posledně jmenovaná aplikace nakonec nebyla vyhodnocena jako úspěšná a postup moru zastavila až betonová hráz. Tento případ je jeden z příkladů pozorování funkčnosti mechanických bariér, další příklad uvádí (Taugbol 2004). Uvedené příklady navozují myšlenku použít místo elektrických bariér mechanické bariéry, například narychlo montované jezy.

Metody izolace nakažené populace barierami však mají své nedostatky. Nezabrání přenosu moru některými predátory (vydra, norek, vodní ptáci), lze pochybovat i o spolehlivosti, s jakou přechodně postavené bariery brání migraci raků. Pochybnosti o samotném vymření raků a *A. astaci* byly již projednány výše.

Zastánci metody tvrdí, že žádná bariera sice není stoprocentně účinná, ale šíření moru se samovolně určitě nezastaví; pokud tedy chceme zachránit původní raky, měli bychom užít všechny dostupné prostředky, ačkoliv nejsou zaručené (Taugbol et al. 1993).

5.2.2.2. Dezinfekce

Co největší izolace infikované oblasti je jedním způsobem prevence přenosu moru mezi lokalitami. Veškeré činnosti lidí a pohyb s nimi spojený však v oblasti s výskytem račího moru zastavit nelze, proto by bylo vhodné najít metody, které by kontaminované objekty zbavily před jejich dalšími přesuny živých stadií *A. astaci*. Konkrétně jde o přesouvání nejrůznějšího vybavení, přesouvání raků a přesun jiných vodních organismů (nejčastěji živých ryb), jak bylo podrobněji uvedeno v kapitole 4.4.

Prvním krokem odstraňování jakéhokoliv patogenu je důkladné očištění a omytí, které by samozřejmě mělo být prováděno v místech, kde nehrozí přenos infekce na nové lokality smývanými nečistotami. Pokud očištění nestačí, musí dojít k použití dalších ošetření – zbylé živé formy patogenu musí být usmrceny. O kritických hodnotách některých faktorů prostředí pro *A. astaci* bylo již psáno v kapitolách 3.1. a 3.2., kde byly shrnuty především informace o vlivu teplot a vlhkosti. Kromě fyzikálních faktorů může být *A. astaci* likvidována i chemickými látkami.

Pro praxi je velmi důležité, aby používaná chemická látka měla následující vlastnosti: maximální účinnost vůči moru, maximální specifitu (co nejmenší vliv na ostatní organismy), minimální negativní působení na desinfikované předměty, minimální negativní působení na životní prostředí, co nejsnazší použitelnost, dobrou rozpustnost, vysokou stabilitu při uchovávání a v neposlední řadě i ekonomickou přijatelnost (Kubíček et al. 2000). V této práci byla snaha docílit požadovaných vlastností následovně. Účinnost je posuzována pomocí výsledků laboratorních testů vlivu látek na *A. astaci* (zásadní práce jsou citovány v kapitole 3.2.). Specifita je kontrolována podle koncentrací v současnosti používaných k léčebným koupelím ryb - je však nutné přiznat, že rybami tolerované hodnoty mohou být ve skutečnosti vyšší, protože k léčbě jsou používány spíše koncentrace právě postačující k likvidaci patogenů. Ostatní výše uvedené vlastnosti by měly splňovat látky již používané v rybářské praxi.

Desinfekce vybavení

Předměty, které přišly do styku s propagulemi, lze po omytí zbavit propagulí moru důkladným omytím horkou vodou a vysušením (Kozák et al. 2007). Sušením bývají v rybářství desinfikovány sítě a vybavení se síťovinou (kesery a podběráky) (Kolářová and Svobodová in press). Pokud není vhodné sušení či vystavování vysokým teplotám, jeví se v případě ošetřování předmětů použití chemikálií jako vhodná alternativa.

Pro dezinfekci rybářského vybavení jsou v současnosti používány tyto prostředky: vápenné mléko, formaldehyd, chlorové vápno, chloramin T, chlorseptol, roztok hydroxidu sodného, roztok chlornanu sodného a hydroxidu sodného (SAVO), glutaraldehyd, peroxid vodíku, kyselina peroctová, persoli, manganistan draselný, kvarterní amoniové sloučeniny (benzalkoniumchlorid), biguanidiny (chlorhexidin, hexetidin, alexidin) a jododetergentní přípravky (Kolářová and Svobodová in press).

Účinky většiny těchto látek vůči propagulím *A. astaci* nebyly dosud testovány. Výjimkou je formaldehyd, který se používá k desinfekci jako 1% roztok, tedy cca. 10 000 mg.l⁻¹. Inhibice následného klíčení zoospor *A. astaci* nastala po jedné hodině působení při koncentraci 60 mg.l⁻¹, pokud byly cysty na povrchu rybí šupiny, pak nestačilo k inhibici

ani 80 mg.l⁻¹ (Häll and Unestam 1980). Koncentrace používaná pro desinfekci je tedy více než stokrát větší a mohla by tak být dostatečná pro poškození propagulí. Na druhou stranu při omývání předmětů by této koncentraci byly propagule vystaveny jen po kratší dobu.

Doposud publikované práce hledající vhodné dezinfekční prostředky došly, kromě naměření vysoké účinnosti dnes již nepoužívané malachitové zeleně, k následujícím závěrům. Nejvhodnějším postupem dezinfekce předmětů je vše omýt a použít přípravky na bázi aktivního chloru, pokud to materiál s přihlédnutím ke korozivním účinkům dovoluje. V opačném případě použít jodofor, jehož použití vyžaduje delší expozice, asi 30 minut (Alderman and Polglase 1985). Avšak při velmi podobném uspořádání pokusu a stejné koncentraci se jako dostačující ukázalo vystavení jodoforu již po 10 s (Lilley and Inglis 1997), autoři bohužel tento poměrně velký rozdíl nediskutují. Nedostatkem uváděných návrhů je fakt, že uvedená opatření byla odvozena z testování chemikálií pouze vůči myceliu. Pro život mimo hostitele jsou však specializovány zoospory a cysty, a tak lze očekávat kontaminaci spíše těmito stadii, které mohou tolerovat jiné podmínky prostředí.

Z prezentovaných informací je zřejmé, že efektivita ničení propagulí *A. astaci* použitím většiny v rybářství užívaných dezinfekcí dosud nebyla experimentálně ověřena. Kromě provedení pokusů se ještě nabízí možnost aspoň vypátrat, zda nebyly dotyčné látky zkoumány proti propagulím jiných oomycetů a z případných publikovaných údajů se pokusit odhadnout účinnost vůči *A. astaci*

Dezinfekce při přesouvání raků

Není známá žádná metoda, kterou by bylo možné živé raky nákazy zbavit (podrobněji v kapitole 5.1.). Při přesunech mrtvých raků (například jako potraviny) není použití chemické dezinfekce vhodné, mj. protože mycelium roste uvnitř tkání raků, kam účinné látky těžko pronikají. Nejjednodušší je použít pro desinfekci těl raků var či dlouhodobé expozice teplotám pod bod mrazu (přesnější informace v kapitole 3.1.).

Dezinfekce při přesunech živých ryb

Jak bylo podrobněji uvedeno v kapitolách 4.3. a 4.4. hrozí při přesunech živých ryb přenos račího moru následujícími způsoby: propagulemi volně plovoucími ve vodě či ulpělými na povrchu ryb, trávící soustavou ryb a možná i myceliem rostoucím na šupinách. Proti přenosu trávící soustavou ryb není samozřejmě použití chemických přípravků vhodné. Na základě výsledků pokusů bylo navrženo ryby před vpuštěním na novou lokalitu nechat několik dní bez možnosti požírat raky. Výsledky pokusů naznačují, že by mohly postačit tři dny (Oidtmann et al. 2002).

Přenosu propagulemi a myceliem na šupinách by asi bylo nejvhodnější zamezit pomocí chemické dezinfekce. Doba potřebná pro samovolné uhynutí propagulí moru je totiž příliš dlouhá (1.9.) a použití ostatních známých extrémů podmínek prostředí, například extrémní teploty, by dříve zabilo spíše přesouvané ryby. Jaké chemikálie by byly účinné proti případnému myceliu rostoucímu na povrchu šupin je pravděpodobně možno zjistit testováním vlivu chemikálií na mycelium vypěstované v agaru. Výsledky testování fungicidů na myceliu rostoucím v agaru totiž dobře korelují s vlivem těchto látek na povrchové infekce ryb (Bailey 1983 podle Lilley and Inglis 1997).

Z látek používaných k léčebným koupelím ryb jsem kvůli zamýšlenému způsobu použití vybral jen ty prostředky, které bývají aplikovány pro krátkodobé a dlouhodobé koupele, tj. koupele trvající déle než pět minut. Kratší doba aplikace by totiž byla náročná na provedení, neboť by se muselo pracovat s rybami spíše po několika málo kusech, aby bylo možné dodržet časový limit. Jednodušší by bylo aplikovat látku do nádrže s rybami, například přímo do přepravní bedny během převozu, což lze provádět právě u látek pro delší expozice. Opomenuty zůstaly také dezinfekce namířené proti paraziticky žijícím mnohobuněčným živočichům a antibiotika užívaná proti bakteriím,

protože kvůli jejich zaměření není pravděpodobné, že by byly vhodnými prostředky proti fylogeneticky tak vzdálenému organismu, jakým je oomycet. Nevýhodou antibiotik je i vysoká cena (Kolářová and Svobodová in press). Těmto omezením vyhovují z užívaných látek, shrnutých v publikaci Kolářová a Svobodová (in press) tyto: sůl kamenná (NaCl), formaldehyd, modrá skalice (CuSO₄.5H₂O), chlorové vápno, chloramin T, peroxid vodíku uvolňující přípravek BioCareSPC, akriflavin, manganistan draselný (KMnO₄), metronidazol, bronopol (přípravek Pyceze), jodofory v přípravcích Wescodyne a Jodisol. Účinek některých těchto chemikálií vůči *A. astaci* byl již zkoumán - pro tyto látky uvádí tabulka 3 koncentrace používané v rybářství a koncentrace použité při laboratorních pokusech. Dříve v praxi hojně používaná (Čítek et al. 1997) a proti račímu moru velmi účinná (Alderman et al. 1987; Lilley and Inglis 1997) malachitová zeleň se už nesmí používat pro léčbu potravinových zvířat, tedy ani ke koupelím obvykle přesouvaných ryb, použití je totiž možné prakticky jen pro okrasné ryby (Kolářová and Svobodová in press). Proto v této práci necituji žádné z početných údajů týkajících se účinnosti a používání malachitové zeleně.

Tabulka 3 - chemikálie používané pro léčebné koupele ryb a zároveň testované proti *A. astaci*

Popisky sloupců se vztahují jen k informacím o *A. astaci*, kromě nich jsou v tabulce pro porovnání uvedeny udávané hodnoty koncentrací používaných pro koupele ryb.

Sloupec stadium: agar – mycelium pěstované v agaru, filtr – mycelium vypěstované na filtru, tedy bez ochrany agarem (více informací podává (Alderman 1982).

Sloupec koncentrace: údaje uvedené v závorkách jsou mnou vypočítaná převedení na jiné jednotky udávající složení roztoku, než jaké uvádí původní zdroj informace.

Sloupec účinek: NNPR – následně nebyl pozorován růst

Sloupec zdroj: 1 - (Alderman and Polglase 1984), 2 - (Alderman and Polglase 1985), 3 - (Häll and Unestam 1980), 4 - (Kolářová and Svobodová in press), 5 - (Lilley and Inglis 1997), 6 - (Persson and Söderhäll 1986), 7 - (Unestam 1966)

chemikálie	Stadium	koncentrace	doba působení	účinek	Zdroj
kuchyňská sůl	agar	2% roztok	1 hod.	NNPR	5
kuchyňská sůl	zoospory	3 - 7 mM	5 min.	encystace 50 % zoospor	7
kuchyňská sůl	zoospory	50 mM	30 min.	lyze 13 %	6
kuchyňská sůl		10 - 30 g.l ⁻¹ (cca. 1 - 3 %, 171 - 513 mM)	15 - 30 min.		4
kuchyňská sůl		1 - 2 g.l ⁻¹ (cca. 0,1 - 0,2 %, 17 až 34 mM)	1 - 2 dny		4
chlorový přípravek (chlornan sodný)	agar	100 ppm aktivního chloru	5 min.	NNPR	5
chlorový přípravek (chlornan sodný)	agar, filtr	100 ppm aktivního chloru	15 s	NNPR	2
chlorový přípravek (chlorové vápno)		15 kg.ha ⁻¹ .m ⁻¹ (cca. 0,4 ppm _w aktivního chloru)	aplikováno do rybníka		4
chlorový přípravek (chloramin T)		20 mg.l ⁻¹ (cca. 5 ppm _w aktivního chloru)	1 hod.		4
peroxid vodíku	agar	100 ppm peroxidu vodíku	1 hod.	NNPR	5
hydrogenperuhličitan sodný (přípravek BioCareSPC)		60 mg (přípravku).l ⁻¹ , přípravek uvolňuje peroxid vodíku	25 min.		4
jodofor (FAM 30, Wescodyne)	agar	100 ppm volného jodu	4 - 32 min.	NNPR	2
jodofor (FAM 30)	agar	100 ppm volného jodu	10 s	NNPR	5
jodofor (Wescodyne)	filtr	100 ppm volného jodu	30 min.	NNPR	1

jodofory (Wescodyne, Jodisol)					4
akriflavin	agar	5 mg.l ⁻¹	1 hod.	následná tvorba zoospor částečně redukována	3
akriflavin	zoospory	5 mg.l ⁻¹	1 hod.	následná klíčivost zoospor částečně redukována	3
akriflavin		10 mg.l ⁻¹	10 hod.		4
formaldehyd	zoospory	60 mg.l ⁻¹	1 hod.	úplná redukce následného klíčení	3
formaldehyd	cysty na šupině ryby	80 mg.l ⁻¹	1 hod.	nestačí na redukcí klíčení	3
formaldehyd	agar	80 mg.l ⁻¹	1 hod.	silná redukce sporulace	3
formaldehyd	naklíčené cysty	80 mg.l ⁻¹	1 hod.	nestačí na trvalé zastavení růstu hyfy	3
formaldehyd		(cca. 67 - 99 mg.l ⁻¹)	30 - 60 min.		4
formaldehyd		(cca. 10 - 12 mg.l ⁻¹)	neomezeně		4
modrá skalice	filtr	100 ppm	30 min.	NNPR	1
chlorid měďnatý	zoospory	50 mM	60 s	imobilizace zoospor	6
chlorid měďnatý	zoospory	8 - 13 μM	5 min.	encystace 50 % zoospor	7
modrá skalice		1,5 mg.l ⁻¹ (cca. 1,5 ppm, 6 μM)	> 12 hod.		4
manganistan draselný	agar	10 mg.l ⁻¹	1 hod.	bez vlivu na sporulaci	3
manganistan draselný	zoospory	10 mg.l ⁻¹	1 hod.	částečná redukce následné klíčivosti	3
manganistan draselný		10 mg.l ⁻¹	1 - 1,5 hod.		4
manganistan draselný		100 mg.l ⁻¹	5 - 10 min.		4

Pro chemikálie, u kterých se mi podařilo sehnat informace umožňující porovnání koncentrací používaných v rybářství a testovaných v laboratoři, uvádím krátký komentář.

Rybáři používané koncentrace kuchyňské soli mnohonásobně překračují koncentraci nutnou pro encystaci poloviny zoospor, koncentrace používané pro krátkodobé expozice převyšují tu, jež působila při srovnatelně dlouhém působení lyzi 13 % zoospor a vliv na mycelium při koncentraci používané při krátkodobé expozici je též silně negativní. Koncentrace formaldehydu používané pro krátkodobé koupele jsou srovnatelné s koncentracemi působícími výrazné poškození zoospor. Odhad vlivu v rybářství používaných koncentrací chlorových přípravků je znesnadněn tím, že laboratorně byly zkoumány daleko vyšší koncentrace chloru. Nevýhodou chlorových přípravků je relativně vysoká citlivost ryb vůči tomuto ošetření (Kolářová and Svobodová in press). Akriflavin se zatím v rybářství z důvodů finanční náročnosti a dlouhých dob expozice příliš neuplatňuje (Kolářová and Svobodová in press), ani údaje z tabulky nenasvědčují vhodnosti této látky pro likvidaci propagulí moru. Používané koncentrace iontů mědi vzniklé při rozpouštění modré skalice jsou srovnatelné s koncentracemi působícími částečnou encystaci zoospor. Porovnání koncentrací a vlivu manganistanu draselného naznačuje spíše nižší schopnost ovlivnění patogenu touto dezinfekcí.

V praxi však je účinnost mnoha fungicidů snižována například vysokým množstvím organických látek ve vodě (Lilley and Inglis 1997), použitím za nevhodné teploty (Smith and Söderhäll 1986) i nevhodným množstvím ošetřovaných ryb (Kolářová and Svobodová in press). Proto porovnáváním koncentrací používaných při laboratorním testování vlivu na *A. astaci* s koncentracemi užívanými k léčebným koupelím ryb není možné přesně určit vliv na *A. astaci* při použití v praxi. Srovnání tak spíše umožňuje pouze výběr chemikálií, jejichž účinky na *A. astaci* by bylo vhodné dále zkoumat – pátráním po informacích o vlivu těchto látek na příbuzné organismy či experimentálně. Podobně by bylo vhodné věnovat pozornost i chemikáliím testovaným proti *A. astaci* či druhům tomuto patogenu příbuzným (například *Saprolegnia parasitica* působící nemoci ryb). *A. astaci* je nejspíše obecně citlivější než příbuzné oomycety rodů *Aphanomyces* a *Saprolegnia* (Alderman and Polglase 1984; Lilley and Inglis 1997), což naznačuje, že by pátrání po účinných látkách, jejichž užití by bylo povoleno i pro koupele vysazovaných ryb, mohlo být korunováno úspěchem.

5.2.2.3. Regulace činnosti člověka

Tato kapitola si neklade za cíl rozbor současné legislativy, proto předkládá přehled opatření bez rozlišování, zda již bylo v nějakém státě zavedeno, či jde jen o návrh.

Sportovní rybolov a lov raků

Je žádoucí desinfikovat vybavení aspoň mezi různými sezonami a povodími. Pro zamezení přenosu mezi státy lze sáhnout i po zákazu používání již dříve v zahraničí použitého náčiní (Håstein and Gladhaug 1973; Taugbol et al. 1993). Stejný účel, ale v rámci jednoho státu má například zákaz lovu sítěmi (Gutiérrez-Yurrita et al. 1999) či zákaz používat raky jako nástrahu (Holdich et al. 1999)

V oblastech s rozšířeným lovem raků lze přikročit k jeho omezení. Úplný zákaz lovu však může mít i neblahé důsledky v podobě ztráty zájmu veřejnosti o problematiku raků (Taugbol and Skurdal 1999). Vyhlášení zákazu lovu pouze původních druhů raků může být také kontraproduktivní, protože lovci raků jsou tak „motivováni“ k vysazování nepůvodních druhů, navíc i v tomto případě hrozí ztráta zájmu veřejnosti (Taugbol and Skurdal 1999). Pokud není lov raků v oblasti zakázán, upravuje se aspoň zacházení s ulovenými raky - zákaz vypouštění nebo přechovávání raků jinde než v oblasti jejich nalovení (Håstein and Gladhaug 1973; Taugbol et al. 1993), povinnost vaření nalovených raků už na místě lovu (Cuéllar and Coll 1983; Håstein and Gladhaug 1973). Lov je též možno omezit například zákazem používání živých nástrah či zákazem lovu na více místech během jednoho dne (Cuéllar and Coll 1983).

Manipulace s vodou – převoz ryb

Nádoby s vodou nesmí být v některých státech vylévány přímo do jiného povodí (Taugbol et al. 1993). Opatření je to jistě oprávněné - pokusy (Alderman et al. 1987), ale například při transportu ryb se převozu vody mezi povodími zcela vyhnout nelze a v České republice bývá voda mezi různými lokalitami transportována právě kvůli převozu ryb. Řešením by bylo zakázat převoz ryb z oblastí s výskytem moru (Dehus et al. 1999), což by ale kladlo velké nároky na monitoring výskytu *A. astaci*. Částečnou alternativou by bylo důsledné dezinfikování převážené vody, „částečnou“ protože desinfekcí převážené vody nezamezíme přenosu moru v exkrementech ryb. Navíc ještě není jasné, která dezinfekce by měla být použita (kapitola 5.2.2.). Proti přenosu exkrementy bylo navrženo zavedení povinnosti ponechávat přesouvané ryby 3 dny v izolované nádrži (Oidtmann et al. 2002), ale toto opatření by jistě narazilo na odpor rybářů. Ve srovnání s úplným zákazem převozu je však kombinace desinfikování a 3 dnů izolace poměrně snesitelným řešením. Otázkou zůstává, zda by taková opatření byla skutečně dodržována.

Komerční chov raků

Komerční chovy jsou nebezpečné zejména jakožto zdroj infikované vody nebo přímo raků – chovány totiž často bývají americké druhy rak signální a rak červený (Souty-Grosset et al. 2006). Možnými opatřeními jsou omezení počtu licencí nezbytných pro legální chov (Gutiérrez-Yurrita et al. 1999; Skurdal et al. 1999) či zákaz chovu ve vybraných oblastech (Holdich et al. 1999; Skurdal et al. 1999).

Obchod s raky a akvaristika

V Norsku platí zákaz importu živých či mrtvých nepřevařených raků do země, a to i pro akvarijní raky (Skurdal et al. 1999). Podobný zákaz, převážet živé raky do Německa, však musel být z rozhodnutí evropského soudu (European Court of Justice) zrušen alespoň pro dovoz ze států Evropské unie, protože odporoval volnému obchodu (Dehus et al. 1999).

Chov raků v akváriích může být omezen nařízením, podle kterého nesmí být všechny nepůvodní druhy raků bez licence přechovávány, a to ani v akváriích (Gutiérrez-Yurrita et al. 1999), povolením dovozu raků jen pro konzumní účely (Skurdal et al. 1999) či úplným zákazem převážení exotických raků (Stucki and Staub 1999). Tato opatření by měla zabránit únikům akvaristy chovaných exotických raků a vypouštění těchto raků do přírody.

Zákony a nařízení vs. informační kampaň

Základem pro prevenci moru jsou sice legislativní opatření (Taugbol and Skurdal 1999), ale leckdy nejsou nařízení a zákazy tak funkční, jak by měly být (Dehus et al. 1999; Smietana et al. 2004). Alternativou může být kvalitní informování veřejnosti formou seminářů, brožur, přednášek, televizních a rozhlasových pořadů cílených na rozhodující skupiny obyvatel, jakými jsou rybáři, sportovní rybáři, potápěči, chovatelé, vodáci (Kozubíková et al. 2009; Kozubíková et al. 2006; Nylund and Westman 1995; Smietana et al. 2004; Taugbol and Skurdal 1999; Taugbol et al. 1993). Těžko se však informační kampaň zcela obejde bez podpory v zákonech. V současnosti navrhovaná opatření, tak jak jsem je nastínil výše, jsou mnohdy kontroverzní. Je však vhodné upozornit, že podobnými mechanismy jako *A. astaci* se šíří i mnoho dalších „nežádoucích“ organismů včetně nemocí ryb. Přínos opatření směřovaných proti *A. astaci* by tedy nespočíval jen v potlačení račího moru.

Závěr

Ze všech mechanismů šíření moru bývá rozhodující role připisována činnosti člověka (Alderman and Polglase 1985; Häll and Unestam 1980; Söderhäll et al. 1977; Souty-Grosset et al. 2006; Vogt 1999), konkrétní doklady ale obvykle nebývají uváděny. Hledání zdroje infekce je úkol podobný pátrání po pachateli zločinu – patrný je jen výsledek a dohledávání původce nákazy je přinejmenším nesnadné. V úvahu připadá mnoho způsobů, a o pravděpodobnosti některých z nich zatím nejsme schopni mnoho říci (přenos jinými koryši než raky, rybami, predátory raků). Ani dopátrat se všech lidských zásahů na lokalitě nebývá reálné, zejména uvažujeme-li nelegální činnost. Přesto byl v jednom případě za příčinu infikování raků na lokalitě označen nelegální lov raků (Nylund et al. 1993), v jiném bylo nejspíš zdrojem nelegální vysazování raků (Oidtmann et al. 1999a). Odhad významu takových „neoficiálních“ činností však je obecně zatížen velikou chybou, a tak může docházet k nesprávným závěrům. Dohledání možných zdrojů infekce v konkrétních případech považuji za důležitý úkol, který snad v budoucnu umožní lépe podložené odhady významu jednotlivých mechanismů v procesu šíření moru. Přesnější identifikování rozhodujících cest šíření pak umožní zdokonalit opatření proti šíření moru.

Dosavadní preventivní opatření trpí kromě nejistoty s vymezením veškerých způsobů šíření i nedostatkem znalostí o toleranci *A. astaci* k fyzikálním a chemickým faktorům prostředí – přesné kritické hodnoty teplot a účinky chemikálií používaných běžně k dezinfikování nejsou dobře známy. Potíže činí i nejasnosti ohledně doby přežívání propagulí. Práce v oblasti manipulací s životním cyklem by mohla vyústit i v léčbu infikované populace raků, byť spíše jen v chovech. Nepřímo by však léčba chovaných raků prospěla i situaci v přírodních lokalitách. Další výzkumy snad napomohou přiblížit se ideálnímu stavu, kdy by bylo vyloučeno šíření moru na další lokality.

Seznam literatury

Práce označené v seznamu literatury hvězdičkou jsou citovány nepřímou.

- *Ahne W and Halder M (1988) Virologische und mykologische Untersuchungen an Krebsbeständen verschiedener Herkunft. Berichte der Landesanstalt für Wasserforschung 1988, Munich
- Alderman DJ (1982) *In vitro* testing of fisheries chemotherapeutants. Journal of Fish Diseases 5: 113-123
- Alderman DJ (1993) Crayfish plague in Britain, the first twelve years. Freshwater Crayfish 9: 266-272
- Alderman DJ (1996) Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties 15: 603-632
- Alderman DJ and Polglase JL (1984) A comparative investigation of the effects of fungicides on *Saprolegnia parasitica* and *Aphanomyces astaci*. Transactions of the British Mycological Society 83: 313-318
- Alderman DJ and Polglase JL (1985) Disinfection for crayfish plague. Aquaculture and Fisheries Management 16: 203-205
- Alderman DJ and Polglase JL (1986) *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. Journal of Fish Diseases 9: 367-379
- Alderman DJ, Polglase JL and Frayling M (1987) *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. Journal of Fish Diseases 10: 385-393
- Andersson MG and Cerenius L (2002) Analysis of chitinase expression in the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. Diseases of Aquatic Organisms 51: 139-147
- *Bailey TA (1983) Screening Fungicides for Use in Fish Culture: evaluation of the Agar Plug Transfer, and Agar Dilution Methods. Progressive Fish-Culturist 45: 24-27
- Ballesteros I, Martín MP and Diéguez-Urbeondo J (2006) First isolation of *Aphanomyces frigidophilus* (Saprolegniales) in Europe. Mycotaxon 95: 335-340
- *Benisch J (1940) Küstlich hervorgerufener *Aphanomyces* Bafall bei Wollhandkrabben. Zeitschrift für Fischerei 38: 71-80
- Bohman P, Nordwall F and Edsman L (2006) The effect of the large-scale introduction of signal crayfish on the spread of crayfish plague in Sweden. Bull. Fr. Pêche Piscic.: 1291-1302
- Braband A, Kawai T and Scholtz G (2006) The phylogenetic position of the East Asian freshwater crayfish *Cambaroides* within the Northern Hemisphere Astacoidea (Crustacea, Decapoda, Astacida) based on molecular data. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 44: 17-24
- CEFAS (Centre for Environment Fisheries and Aquaculture Science) (2000) Summary final report: effects of exposure to high and low temperatures on the survival of the crayfish plague fungus *A. astaci* *in vitro* and *in vivo*., Australian Quarantine and Inspection Service, Canberra
- Cejp K (1959) Oomycetes I. Flora ČSR, řada B mykologicko-lichenologická, sv.2. Nakladatelství ČSAV
- Cerenius L, Bangyeekhun E, Keyser P, Soderhall I and Soderhall K (2003) Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. Cellular microbiology 5: 353-357
- Cerenius L, Laurent P and Edsman L (2002) Roundtable session 3A: Protection of natives in a plague situation. Bull. Fr. Pêche Piscic.: 909-910
- Cerenius L, Rufelt S and Söderhäll K (1992) Effects of Ampropylfos (RS)-1-aminopropylphosphonic acid) on zoospore formation, repeated zoospore emergence and oospore formation in *Aphanomyces* spp. Pest Management Science 36: 189-194
- Cerenius L and Söderhäll K (1984a) Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, an Arthropod-Parasitic Fungus. Journal of Invertebrate Pathology 43: 278-281
- Cerenius L and Söderhäll K (1984b) Repeated Zoospore Emergence from Isolated Spore Cysts of *Aphanomyces astaci*. Experimental mycology 8: 370-377
- Cerenius L and Söderhäll K (1985) Repeated zoospore emergence as a possible adaptation to parasitism in *Aphanomyces*. Experimental mycology 9: 259-263
- Cerenius L and Söderhäll K (1987) Controlled growth and development in filamentous oomycetes with special emphasis on *Aphanomyces* spp. In: Fuller MS and Jaworski A (eds) Zoosporic Fungi in Teaching and Research, pp 264–267, South Eastern Publishing, Athens, GA
- Cerenius L, Soderhall K, Persson M and Ajaxon R (1988) The crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* - diagnosis, isolation, and pathobiology. Freshwater Crayfish 7: 131-144
- Cuéllar L and Coll M (1983) Epizootiology of the crayfish plague (aphanomycosis) in Spain. Freshwater Crayfish 5: 345-348
- Czeczuga B, Godlewska A and Kozłowska M (2000) Zoosporic Fungi Growing on the Carapaces of Dead Zooplankton Organisms. Limnologia 30: 37-43
- Czeczuga B, Kiziewicz B and Gruszka P (2004) *Pallasea quadrispinosa* GO Sars specimens as vectors of aquatic zoosporic fungi parasiting on fish. Polish Journal of Environmental Studies 13: 361-366

- Czczuga B, Kozłowska M and Godlewska A (2002) Zoosporic aquatic fungi growing on dead specimens of 29 freshwater crustacean species. *Limnologica* 32: 180-193
- Czczuga B, Kozłowska M and Godlewska A (1999) Zoosporic Fungus Species Growing on Dead Benthos Crustaceans. *Polish Journal of Environmental Studies* 8: 377-382
- Čítek J, Svobodová Z and Tesarčík J (1997) Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb. *Informatorium*, Praha, 218 pp
- Dehus P, Phillipson S, Bohl E, Oidtmann B, Keller M and Lechleiter S (1999) German conservation strategies for native crayfish species with regard to alien species. In: Gherardi F and Holdich DM (eds) *Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?*, pp 149-159, A.A.Balkema, Rotterdam
- Department of Agriculture Fisheries and Forestry (2005) Disease strategy: Crayfish plague (Version 1.0). Australian Aquatic Veterinary Emergency Plan (AQUAVETPLAN), Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Canberra, ACT
- Diéguez-Uribeondo J (2006) The dispersion of the *Aphanomyces astaci*-carrier *Pacifastacus leniusculus* by humans represents the main cause of disappearance of the indigenous crayfish *Austropotamobius pallipes* in Navarra. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*: 1303-1312
- Diéguez-Uribeondo J, Cerenius L and Söderhäll K (1994) Repeated zoospore emergence in *Saprolegnia parasitica*. *Mycological research* 98: 810-815
- Diéguez-Uribeondo J, García MA, Cerenius L, Kozubíková E, Ballesteros I, Windels C, Weiland J, Kator H, Söderhäll K and Martín MP (2009) Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology* 46: 365-376
- Diéguez-Uribeondo J, Huang TS, Cerenius L and Söderhäll K (1995) Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycological research* 99: 574-578
- Diéguez-Uribeondo J, Rueda A, Castien E and Bascones JC (1997) A plan of restoration in Navarra for the native freshwater crayfish species of Spain, *Austropotamobius pallipes*. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*: 625-637
- Diéguez-Uribeondo J and Söderhäll K (1993) *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Aquaculture and Fisheries Management* 24: 761-765
- Diéguez-Uribeondo J and Söderhäll K (1999) RAPD evidence for the origin of an outbreak of crayfish plague in Spain. *Freshwater Crayfish* 12: 313-318
- Frisch D, Green AJ and Figuerola J (2007) High dispersal capacity of a broad spectrum of aquatic invertebrates via waterbirds. *Aquatic Sciences* 69: 568 – 574
- Fürst M (1995) On the recovery of *Astacus astacus* L. populations after an epizootic of the crayfish plague (*Aphanomyces astaci* Shikora). *Freshwater Crayfish* 8: 565-576
- Gutiérrez-Yurrita PJ, Martínez JM, Bravo-Utrera MÁ, Montes C, Ilhéu M and Bernardo JM (1999) The status of crayfish populations in Spain and Portugal. In: Gherardi F and Holdich DM (eds) *Crayfish in Europe as Alien Species*, pp 161-192, A.A.Balkema, Rotterdam
- Häll L and Unestam T (1980) The effect of fungicides on survival of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, Oomycetes, growing on fish scales. *Mycopathologia* 72: 131-134
- Harlioğlu MM (2008) The harvest of the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* Eschscholtz in Turkey: harvest history, impact of crayfish plague, and present distribution of harvested populations. *Aquaculture International* 16: 351-360
- Håstein T and Gladhaug O (1973) The occurrence of the crayfish plague in Norway and attempts to prevent further spread of the disease. *Freshwater Crayfish* 1: 181-184
- Håstein T and Gladhaug O (1975) The present status of the crayfish plague in Norway. *Freshwater Crayfish* 2: 273-276
- Holdich DM (1993) A review of astaciculture : freshwater crayfish farming. *Aquat. Living Resour.* 6: 307-317
- Holdich DM, Rogers WD and Reynolds JD (1999) Native and alien crayfish in the British Isles. In: Gherardi F and Holdich DM (eds) *Crayfish in Europe as Alien Species. How to make the best of a bad situation?*, pp 221-235, A.A.Balkema, Rotterdam
- Huang TS, Cerenius L and Söderhäll K (1994) Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* 126: 1-9
- Charalambidou I and Santamaria L (2002) Waterbirds as endozoochorous dispersers of aquatic organisms: a review of experimental evidence. *Acta Oecologica* 23: 165-176
- Chiesa S, Scalici M and Gibertin G (2006) Occurrence of allochthonous freshwater crayfishes in Latium (central Italy). *Bull. Fr. Pêche Piscic.*: 883-902
- Chucholl C and Daudey T (2008) First record of *Orconectes juvenilis* (Hagen, 1870) in eastern France: update to the species identity of a recently introduced orconectid crayfish (Crustacea: Astacida). *Aquatic Invasions* 3: 105-107
- Jussila J and Mannonen A (2004) Crayfisheries in Finland, a short overview. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*: 263-273

- Kolářová J and Svobodová Z (in press) Léčebné a preventivní postupy v chovech ryb. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, Vodňany
- Kozák P, Buřič M and Polícar T (2007) Metodika lovu raků. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, Vodňany
- Kozubíková E, Filipová L, Kozák P, Ďuriš Z, Martín MP, Diéguez-Uribeondo J, Oidtmann B and Petrusek A (2009) Prevalence of the Crayfish Plague Pathogen *Aphanomyces astaci* in Invasive American Crayfishes in the Czech Republic. Conservation Biology DOI: 10.1111/j.1523-1739.2009.01240.x
- Kozubíková E and Petrusek A (in press) Račí mor - přehled dosavadních poznatků o závažném onemocnění raků a zhodnocení situace v České republice. Bulletin VÚRH Vodňany
- Kozubíková E, Petrusek A, Ďuriš Z, Kozák P, Geiger S, Hoffmann R and Oidtmann B (2006) The crayfish plague in the Czech Republic - Review of recent suspect cases and a pilot detection study. Bull. Fr. Pêche Piscic.: 1313-1323
- Kozubíková E, Petrusek A, Ďuriš Z, Martín MP, Diéguez-Uribeondo J and Oidtmann B (2008) The old menace is back: Recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. Aquaculture 274: 208-217
- Kozubíková E, Petrusek A, Ďuriš Z and Oidtmann B (2007) *Aphanomyces astaci*, the crayfish plague pathogen, may be a common cause of crayfish mass mortalities in the Czech Republic. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 27: 79-82
- Kubíček K, Novák P, Kabeš R, Kočíšová A and Rodl P (2000) Dezinfekce, dezinfekce a deratizace ve schematech, tabulkách a obrazech. Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, 100 pp
- Lilley JH and Inglis V (1997) Comparative effects of various antibiotics, fungicides and disinfectants on *Aphanomyces invaderis* and other saprolegniaceous fungi. Aquaculture Research 28: 461-469
- López FR, Puñet OG, Giral IdB, Diéguez Uribeondo J and Moracho JLM (2002) Influencia de la edad en la susceptibilidad a la aphanomicosis del cangrejo señal *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). Boletín. Instituto Español de Oceanografía 18: 195-198
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S and De Poorter M (2004) 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG), a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the IUCN, Gland, Switzerland
- Martin P, Kohlmann K and Scholtz G (2007) The parthenogenetic Marmorokrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring. Naturwissenschaften 94: 843-846
- Matthews M and Reynolds JD (1990) Laboratory investigations of the pathogenicity of *Aphanomyces astaci* for Irish freshwater crayfish. Hydrobiologia 203: 121-126
- Momot WT, Gowing G and Jones PD (1978) The Dynamics of Crayfish and Their Role in Ecosystems. American Midland Naturalist 99: 10-35
- Nyhlén L and Unestam T (1980) Wound reaction and *Aphanomyces astaci* growth in crayfish cuticle. Journal of Invertebrate Pathology 36: 187-197
- Nylund V, Kirjavainen J, Tulonen J and Westman K (1993) The spread of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) and its effects on the noble crayfish (*Astacus astacus*) population in the Lake Ormajavi waterway in Finland in 1988-1991. Freshwater Crayfish 9
- Nylund V and Westman K (1995) The crayfish mortality register as an aid in the control of crayfish diseases in Finland. Freshwater Crayfish 10: 363-373
- Nylund V and Westman K (2000) The prevalence of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) in two signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) populations in Finland. Journal of Crustacean Biology 20: 777-785
- Oidtmann B, Cerenius L, Schmid I, Hoffmann R and Söderhäll K (1999a) Crayfish plague epizootics in Germany - classification of two German isolates of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* by random amplification of polymorphic DNA. Diseases of Aquatic Organisms 35: 235-238
- Oidtmann B, Geiger S, Steinbauer P, Culas A and Hoffmann RW (2006) Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms 72: 53-64
- Oidtmann B, Heitz E, Rogers D and Hoffmann RW (2002) Transmission of crayfish plague. Diseases of Aquatic Organisms 52: 159-167
- Oidtmann B, Schaefer N, Cerenius L, Soderhall K and Hoffmann RW (2004) Detection of genomic DNA of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* (Oomycete) in clinical samples by PCR. Veterinary Microbiology 100: 269-282
- Oidtmann B, Schmid I, Rogers D and Hoffmann RW (1999b) An improved isolation method for the cultivation of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. Freshwater Crayfish 12: 303-312
- Olson LW, Cerenius L, Lange L and Söderhäll K (1984) The primary and secondary spore cyst of *Aphanomyces* (Oomycetes, Saprolegniales). Nordic Journal of Botany 4: 681-696
- Peay S, Hiley PD, Collen P and Martin I (2006) Biocide treatment of ponds in Scotland to eradicate signal crayfish. Bull. Fr. Pêche Piscic.: 1363-1379

- Persson M and Söderhäll K (1983) *Pacifastacus leniusculus* (Dana) and its resistance to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci* Schikora. Freshwater Crayfish 5
- Persson M and Söderhäll K (1986) CaCl₂-induced germination and peptidase secretion in *Aphanomyces astaci*. Experimental mycology 10: 205-213
- Pöckl M and Pekny R (2002) Interaction between native and alien species of crayfish in Austria: Case studies. Bull. Fr. Pêche Piscic.: 763-776
- Rantamäki J, Cerenius L and Söderhäll K (1992) Prevention of transmission of the crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) to the freshwater crayfish *Astacus astacus* by treatment with MgCl₂. 104: 11-18
- *Rennerfelt E (1936) Untersuchungen über die Entwicklung und Biologie des Krebspestpilzes *Aphanomyces astaci*, Schikora. Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm 10: 1-21
- Reynolds JD (1988) Crayfish extinctions and crayfish plague in central Ireland. Biological Conservation 45: 279-285
- *Roy JS (1993) Effects of *Aphanomyces astaci* and *Aeromonas hydrophila* on the Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*, Department of Fisheries and Allied Aquaculture, Auburn University, Auburn, Alabama, USA, 79 pp
- Royo F, Andersson G, Bangyeekhun E, Muzquiz JL, Soderhall K and Cerenius L (2004) Physiological and genetic characterisation of some new *Aphanomyces* strains isolated from freshwater crayfish. Veterinary Microbiology 104: 103-112
- *Schäperclaus W (1935) Die Ursache der pestartigen Krebssterben. Z.Fisch. 33: 343-366
- *Schikora F (1916) Die Viederbevölkerung der deutschen Gewässer mit Krebsen. Neudamm 195
- Scholtz G (2002) Phylogeny and Evolution. In: Holdich DM (ed) Biology of Freshwater Crayfish, pp 30-47, Blackwell Science, Oxford
- Scholtz G, Braband A, Tolley L, Reimann A, Mittmann B, Lukhaup C, Steuerwald F and Vogt G (2003) Parthenogenesis in an outsider crayfish. Nature 421: 806
- Schulz R, Stucki T and Souty-Grosset C (2002) Management: Reintroductions and restocking. Bull. Fr. Pêche Piscic.: 917-922
- Skurdal J, Taugbol T, Burba A, Edsman L, Söderbäck B, Styrihave B, Tuusti J and Westman K (1999) Crayfish introductions in the Nordic and Baltic countries. In: Gherardi F and Holdich DM (eds) Crayfish in Europe as Alien Species. How to make the best of a bad situation?, pp 193-219, A.A.Balkema, Rotterdam
- Smietana P, Krzywosz T and Struzynski W (2004) Review of the national restocking programme "Active protection of native crayfish in Poland" 1999-2001. Bull. Fr. Pêche Piscic.: 289-299
- Smith VJ and Söderhäll K (1986) Crayfish pathology: an overview. Freshwater Crayfish 6: 199-211
- Söderhäll K and Cerenius L (1983) Protein and nucleic acid synthesis during germination of the asexual spores of the aquatic fungus, *Aphanomyces astaci*. Physiologie Plantarum 58: 13-17
- Söderhäll K and Cerenius L (1987) Controlled growth and development in filamentous oomycetes with special emphasis on *Aphanomyces* spp. In: Fuller MS and Jaworski A (eds) Zoospore Fungi in Teaching and Research, pp 264-267, South Eastern Publishing Corp, Athens, GA, USA
- Söderhäll K and Cerenius L (1999) The crayfish plague fungus: History and recent advances. Freshwater Crayfish 12: 11-35
- Söderhäll K, Svensson E and Unestam T (1977) An inexpensive and effective method for elimination of the crayfish plague: barriers and biological control. Freshwater Crayfish 3: 333-342
- Souty-Grosset C, Holdich DM, Noël PY, Reynolds JD and Haffner P (2006) Atlas of crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, 187 pp
- Stucki TP and Staub E (1999) Distribution of crayfish species and legislation concerning crayfish in Switzerland. In: Gherardi F and Holdich DM (eds) Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?, A.A.Balkema, Rotterdam
- Svensson E and Unestam T (1975) Differential Induction of Zoospore Encystment and Germination in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. Physiologie Plantarum 35: 210-216
- Taugbol T (2004) Reintroduction of noble crayfish *Astacus astacus* after crayfish plague in Norway. Bull. Fr. Pêche Piscic.: 315-328
- Taugbol T and Skurdal J (1999) The future of native crayfish in Europe: How to make the best of a bad situation? In: Gherardi F and Holdich DM (eds) Crayfish in Europe as Alien Species. How to make the best of a bad situation?, pp 271-279, A.A.Balkema, Rotterdam
- Taugbol T, Skurdal J and Håstein T (1993) Crayfish plague and management strategies in Norway. Biological Conservation 63: 75-82
- Unestam T (1965) Studies on Crayfish Plague Fungus *Aphanomyces astaci* I. Some Factors Affecting Growth in vitro. Physiologie Plantarum 18: 483-505
- Unestam T (1966) Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* II. Factors Affecting Zoospores and Zoospore Production. Physiologie Plantarum 19: 1110-1119

- Unestam T (1969a) On the Adaptation of *Aphanomyces astaci* as a Parasite. *Physiologie Plantarum* 22: 221-235
- Unestam T (1969b) On the Physiology of Zoospore Production in *Aphanomyces astaci*. *Physiologie Plantarum* 22: 236-245
- Unestam T (1969c) Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm 49: 202-209
- Unestam T (1972) On the host range and origin of the crayfish plague fungus. Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm 52: 192-198
- Unestam T (1973) Significance of diseases on freshwater crayfish. *Freshwater Crayfish* 1: 135-150
- Unestam T (1975) Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinean freshwater crayfish to European-crayfish-plague fungus. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 53: 349 - 359
- Unestam T and Weiss DW (1970) The Host-Parasite Relationship between Freshwater Crayfish and the Crayfish Disease Fungus *Aphanomyces astaci*: Responses to Infection by a Susceptible and a Resistant Species. *Journal of General Microbiology* 60: 77-90
- Vennerstrom P, Soderhall K and Cerenius L (1998) The origin of two crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) epizootics in Finland on noble crayfish, *Astacus astacus*. pp 43-46
- Vey A, Söderhäll K and Ajaxon R (1983) Susceptibility of *Orconectes limosus* Raff. to the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Freshwater Crayfish* 5: 284-291
- Vila M, Basnou C., Gollasch S. Josefsson M., Pergl J., Scalera R. (2009): One hundred of the most invasive alien species in Europe. In: DAISIE (eds.) Handbook of alien species in Europe, pp 400
- Viljamaa-Dirks S (2008) Research Seminar 3.9.2008. Retrieved from http://www.evira.fi/portal/en/research_on_animal_diseases_and_food/scientific_research/evira_s_research_seminars/crayfish_plague__a_challenge_for_diagnostics/ on 06.08. 2009
- Vogt G (1999) Diseases of European freshwater crayfish, with particular emphasis on interspecific transmission of pathogens. In: Gherardi F and Holdich DM (eds) Crayfish in Europe as Alien Species. How to make the best of a bad situation?, pp 87-103, A.A.Balkema, Rotterdam
- Vorburger C and Ribi G (1999) Aggression and competition for shelter between a native and an introduced crayfish in Europe. *Freshwater Biology* 42: 111-119
- Vrålstad T, Knutsen AK, Tengs T and Holst-Jensen A (2009) A quantitative TaqMan MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology* 137: 146-155
- Westman K and Nylund V (1978) Crayfish plague, *Aphanomyces astaci*, observed in the European crayfish, *Astacus astacus*, in Pihlajavesi waterway in Finland. A case study on the spread of the plague fungus. *Freshwater Crayfish* 4: 419-426