
Toksinus gaminančių rūšių mikromicetai žuvų pašaruose

**Albinas Lugauskas,
Jurgita Stakėnienė**

*Botanikos institutas,
Žaliųjų ežerų g. 49,
LT-2021 Vilnius, Lietuva*

Vytautas Kemėža

*Lietuvos valstybinis žuvininkystės ir
žuvininkystės tyrimų centras,
Juozapavičiaus g. 9,
LT-2005 Vilnius, Lietuva*

2000–2001 m. tirtas žuvims šerti skirtų grūdų ir kombinuotųjų pašarų užterštumas mikroskopinių grybų pradais. Panaudojus įvairias mitybos terpes, išskirti grybų izoliatai, gautos grynos jų monokultūros, nustatyta sisteminė priklausomybė. Iš ištirtų pašarų buvo išskirta ir identifikuota 26 gentims bei 65 rūšims priklausantys grybai. Identifikuotų rūšių grybų pradų gausumas tirtuose pašaruose buvo skirtingas. Vienuose pašaruose vyravo *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, kituose – *Fusarium*, *Exophiala*, *Scolecobasidium*, *Alternaria*, *Cladosporium* bei kitoms gentims priklausančių grybų pradai.

Kai kurie išskirtų rūšių grybai intensyviai sintetina ir į aplinką išskiria toksiškus antrinius metabolitus, kurie blogina pašarų kokybę, aplinkos ekologinę būklę ir tampa žuvų blogo augimo priežastimi. Remiantis atliktų tyrimų rezultatais, tokiems priskirtinos iš žuvų pašarų išskirtų rūšių grybų kai kurios padermės: *Aspergillus penicilloides* GR-11, *A. fumigatus* M-22, *A. niger* LR-7, *Penicillium variable* S-11, *P. chrysogenum* SL-4, *P. expansum* KO-6, *P. viridicatum* BL-77, *P. steckii* PS-3, *Fusarium sporotrichioides* BA-4, *F. moniliforme* S-29, *Alternaria alternata* SLV-3, *Sclerotinia sclerotiorum* BR-19.

Iš žuvų šėryklų pavyko išskirti pavienius *Scolecobasidium* genties grybus, kurie, ypač priklausantys *S. tshawytschae* rūšiai, kitose šalyse laikomi pavojingais žuvų parazitais. Jų paplitimas tvenkiniuose gali tapti didele ekologine ir ūkine problema.

Raktažodžiai: mikroskopiniai grybai, toksinai, pašarai, parazitai

ĮVADAS

Žuvims šerti naudojamų pašarų užterštumas mikroskopinių grybų pradais yra įdomus dviem aspektais: ekologiniu ir ūkiniu. Žuvims šerti dažniausiai naudojami įvairios sudėties kombinuotieji pašarai. Jie ruošiami atsižvelgiant į maitinamų žuvų poreikius, pašarų gamybai naudojamų komponentų sudėtį, bet dažnai mažai dėmesio skiriama pašarų komponentų ir ruošimo aplinkos sanitarinei būklei. Dėl to į pašarus iš oro ir kitų aplinkos šaltinių patenka įvairių mikroskopinių grybų pradų, kurie vėliau tampa potencialiais pašarų gadintojais, blogo žuvų augimo ir vandens telkinių sanitarinės būklės pablogėjimo, o kartais ir žuvų žuvimo priežastimi. Žuvų augintojai tokiomis sąlygomis gali patirti nemažų ekologinių nuostolių, nes kai kuriais grybais užkrėsti vandens baseinai gali būti mažai tinkami sėkmingai žuvininkystei bei tapti žuvų ligų plitimo židiniu. Tokių rūšių mikroskopiniai grybai drėgnomis aplinkos sąlygomis geba intensyviai sintetinti ir išskirti į aplinką įvairios cheminės sudėties toksiškus antrinius metabolitus. Grybų išskiriamos toksiškos medžiagos gali greitai

susijungti su vandenyje esančiais organiniais komponentais ir virsti žuvų funkcionavimui nepalankiais junginiais. Todėl šis išorės ekologinis veiksnys, realiai egzistuojantis žuvininkystėje, turi būti ištirtas ir tinkamai įvertintas.

Šio darbo tikslas – ištirti žuvims skirtų grūdų ir kombinuotųjų pašarų užterštumą mikroskopinių grybų pradais, išskirti ir identifikuoti jų rūšis, nustatyti kai kurių rūšių grybų gebėjimą gaminti toksiškus metabolitus ir įvertinti potencialų pavojų žuvims.

DARBO VIETA, OBJEKTAI IR METODAI

Tyrimai atlikti 2000–2001 m. Lietuvos valstybinio žuvininkystės ir žuvininkystės tyrimų centro bazėje ir Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje. Tirtas įvairių žuvims skirtų pašarų užterštumas mikroskopinių grybų pradais prieš naudojant pašarus ir įvairiais jų naudojimo etapais. Pašarų mėginiai buvo imami ir analizuojami, naudojantis literatūros šaltiniuose [19, 27, 35, 45] aprašytomis metodikomis. Petri lėkštelės su pasėliu 5–7 paras buvo laikomos termostate $26 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūroje. Iš iš-

augusių grybų kolonijų išskiriamos monokultūros, iš-tiriami jų kultūriniai ir morfologiniai požymiai ir identifikuojamos, vadovaujantis literatūros šaltiniuose [3, 4, 8, 16, 18, 24, 28, 29, 33, 37, 43, 44] pateiktais rūšių aprašymais.

Grybų gebėjimas gaminti toksiškus antrinius metabolitus buvo nustatytas aprašytais metodais [7, 32], grynas mikroskopinių grybų kultūras auginant ant agarizuotos mielių ekstrakto-sacharozės ir Čapeko–mielių ekstrakto terpių, kontrolei tos pačios grybų kultūros buvo auginamos ant standartinės Čapeko terpės. Pagal kolonijų spalvos pakitimo ir pigmento išskyrimo į terpę intensyvumą buvo sprendžiama apie ieškomų toksinių medžiagų sintezės galią. Intensyviausiai terpes nudažiusiųjų mikromicetų padermių toksiškumas toliau buvo tikrinamas laboratorinėmis sąlygomis, naudojant 12 savaičių amžiaus abiejų lyčių laboratorines peles. Eksperimentų metų pelės buvo laikomos prisilaikant Europos konvencijos, skirtos eksperimentams ir kitiems tikslams naudojamų stuburinių gyvulių apsaugai, taisyklių [5, 31]. Ūminiam toksiškumui įvertinti pelės mikroskopinių grybų pradais buvo užkrečiamos per burną, suleidžiant į skrandį kartą per parą 0,3 ml fiziologiniame tirpale pagamintos grybų suspensijos (titras 1,0–3,0 · 10⁷) ir parenteraliai – suleidžiant į pilvo ertmę 3 kartus per parą po 1 ml fiziologiniame tirpale pagamintos grybų suspensijos (titras 2,0–10,0 · 10⁷). Po minėtų injekcijų pelės buvo stebimos 2 savaites [23, 35, 40–42, 46]. Sukelti ūmią toksikozę žuvims buvo siekiama taip: 1 ml tiriamojo grybo suspensijos (titras 200 · 10⁶) buvo duodama vie-

ną kartą per burną ir tiesiog suleidžiant į pilvo ertmę. Po injekcijų žuvis buvo stebimos 16 parų, vėliau skrodžiamos bei analizuojami morfologiniai ir anatomiciniai karpių organizmo pokyčiai [5, 31]. Siekiant išaiškinti žuvų reakciją į toksinus gaminančiais grybais užkrėstus pašarus, bandymas buvo organizuotas 3 variantais. Bandymui buvo parinkti dvivasariai karpiai, kurie po 5 buvo dedami į 30 l aeruojamus akvariumus ir 30 parų šeriami: 1 var. – pašarais, užkrėstais *Aspergillus fumigatus* Fresen. grybo M-22 padermės pradais, 2 var. – pašarais, užkrėstais *A. niger* Tiegh. grybo LR-7 padermės pradais, 3 var. – neužkrėstais pašarais. Šis bandymas atliktas, vadovaujantis V. Kurasovos ir kt. aprašytais metodais [42]. Karpių reakcija į užkrėstus pašarus buvo vertinama pagal karpių elgsenos, svorio ir patologinius pokyčius.

TYRIMŲ REZULTATAI

Iš žuvims naudojamų kombinuotųjų pašarų išskirti ir identifiuoti mikroskopiniai grybai nurodomi 1 lentelėje. Pažymėtina, kad 1 lentelėje nurodytų rūšių grybų pradų gausumas tirtose pašarų partijose buvo skirtingas. Vienuose pašaruose ženkliai vyravo *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, kituose – *Fusarium*, *Exophiala*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Scolecobasidium* bei kitoms gentims priklausančių grybų prada. Daugeliui išskirtų rūšių grybų būdinga savybė sintetinti ir į substratą išskirti įvairios cheminės sudėties toksiškus antrinius metabolitus. Tokiomis sąlygomis visų pirma pasižymi *Aspergillus* genties gry-

1 lentelė. Mikroskopiniai grybai, išskirti iš žuvų pašarų
Table 1. Micromycetes spread on fodder of fish

Eil. Nr.	Išskirtų mikroskopinių grybų gentis	Išskirtų mikroskopinių grybų rūšis	Aptinkamumas %
1	2	3	4
1.	<i>Absidia</i> Tiegh.	<i>A. coerulea</i> Bainier	<10
2.	<i>Alternaria</i> Nees	<i>A. alternata</i> (Fr.) Keissl.	<30
3.	<i>Aspergillus</i> Link	<i>A. flavus</i> Link, <i>A. fumigatus</i> Fresen., <i>A. niger</i> Tiegh., <i>A. niveoglaucus</i> Thom et Raper, <i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn, <i>A. penicilloides</i> Speg., <i>A. restrictus</i> G. Sm., <i>A. terreus</i> Thom, <i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	<50
4.	<i>Botrytis</i> P. Micheli ex Pers.	<i>B. cinerea</i> Pers. et Fr.	<30
5.	<i>Chaetomium</i> Kunze	<i>Ch. globosum</i> Kunze	<30
6.	<i>Cladosporium</i> Link	<i>C. cladosporioides</i> (Fresen.) G. A. de Vries, <i>C. herbarum</i> (Pers.) Link ex Gray	<50
7.	<i>Eurotium</i> Link	<i>E. herbariorum</i> (Wiggers) Link ex Gray	<30
8.	<i>Exophiala</i> J. W. Carmich.	<i>E. jeanselmei</i> (Langeron) McGinnis et A. A. Padhye, <i>E. pisciphila</i> McGinnis et Ajello.	<30
9.	<i>Fusarium</i> Link	<i>F. moniliforme</i> J. Sheld, <i>F. oxysporum</i> Schltld., <i>F. poae</i> (Peck) Wollenw., <i>F. solani</i> (Mart.) Appel et Wollenw., <i>F. sporotrichioides</i> Sherb.	<30

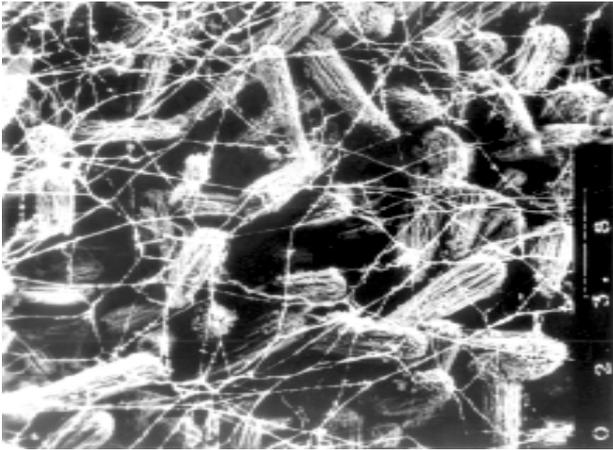
1 lentelė (tęsinys)
 Table 1 (continued)

1	2	3	4
10.	<i>Mucor</i> P. Micheli ex Fr.	<i>M. circinelloides</i> Tiegh., <i>M. hiemalis</i> Wehmer, <i>M. mucedo</i> Fresen., <i>M. racemosus</i> Fresen.	<50
11.	<i>Paecilomyces</i> Bainier	<i>P. farinosus</i> (Holmsk. ex Gray) A. H. S. Br. et G. Sm., <i>P. variotii</i> Bainier	<30
12.	<i>Penicillium</i> Link	<i>P. brevicompactum</i> Dierckx, <i>P. canescens</i> Sopp., <i>P. chrysogenum</i> Thom, <i>P. claviforme</i> Bainier, <i>P. commune</i> Thom, <i>P. decumbens</i> Thom, <i>P. expansum</i> Link, <i>P. funiculosum</i> Thom, <i>P. islandicum</i> Sopp., <i>P. janthinellum</i> Biourge, <i>P. lanosum</i> Westling, <i>P. paxilli</i> Bainier, <i>P. spinulosum</i> Thom, <i>P. steckii</i> K. M. Zalesky, <i>P. stoloniferum</i> Thom, <i>P. variable</i> Sopp, <i>P. verrucosum</i> Dierckx, <i>P. viridicatum</i> Westling	<50
13.	<i>Phoma</i> Sacc.	<i>Ph. herbarum</i> Westend.	<10
14.	<i>Pythium</i> Nees	<i>P. irregulare</i> Buisman	<10
15.	<i>Pseudeurotium</i> J. F. H. Beyma	<i>P. zonatum</i> T. H. Beyma	<5
16.	<i>Rhizomucor</i> Lucet et Costantin	<i>Rh. pusillus</i> (Lindt) Schipper	<30
17.	<i>Rhizopus</i> Ehrenb.	<i>Rh. stolonifer</i> (Ehrenb. ex Fr.) Vuill., <i>Rh. oryzae</i> Went et Prinsen Geerl.	<50
18.	<i>Sclerotinia</i> Fuckel	<i>S. sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	<30
19.	<i>Scolecobasidium</i> E. V. Abbott	<i>S. humicola</i> Barron, <i>S. tshawytschae</i> (Doty et Slater) McGinnis et Ajello	<30
20.	<i>Scopulariopsis</i> Bainier	<i>S. brevicaulis</i> (Sacc.) Bainier	<30
21.	<i>Sordaria</i> Ces. et de Not.	<i>S. fimicola</i> (Rob.) Ces. et de Not.	<10
22.	<i>Torula</i> Pers.	<i>T. herbarum</i> Pers. ex Gray	<30
23.	<i>Trichoderma</i> Pers.	<i>T. viride</i> Pers. ex Gray	<30
24.	<i>Trichothecium</i> Link	<i>T. roseum</i> (Pers.) Link ex Gray	<5
25.	<i>Ulocladium</i> Preuss	<i>U. consortiale</i> (Thün) E. G. Simmons	<5
26.	<i>Verticillium</i> Nees	<i>V. dahliae</i> Kleb.	<30
27.	<i>Volutella</i> Fr.	<i>V. ciliata</i> Alb. et Schwein. ex Fr.	<10
28.	<i>Wallemia</i> Johan – Olsen	<i>W. sebi</i> (Fr.) Arx	<10

bai. Kai kuriuose žuvų kombinuotuosiuose pašaruose buvo gausu *Aspergillus flavus* rūšies grybų pradų. Pastarieji grybai yra aktyvūs toksiškų metabolitų, visų pirma aflatoksinų producentai. Šios grupės junginių yra keliolika rūšių (P_1 , D_1 , B_3 , B_1 , Q_1 , G_1 , M_1 , A , B , G_2 , M_2 , B_{2a} , G_{2a} ir kt.). Jų cheminė sudėtis, pasigaminimo kelias, aktyvumas ir poveikis gyviams organizmams skiriasi. Pažymėtinas *A. flavus* gaminamo B_1 ($C_{17}H_{12}O_6$) aflatoksino stiprus poveikis upėtakiams, viščiukams ir kiaulėms. Mažiau jautrios šiems toksinams avys ir galvijai. Šio toksino mirtina dozė pelių patinėliams 5,5 mg/kg, patelėms – 7,4 mg/kg. Pastarasis toksinas dažnai yra piktybinių navikų atsiradimo vaivorykštinių upėtakių kepenyse priežastis [2, 7, 13, 36]. Šio grybo gaminamas aflatoksinas M_1 šiek tiek silpniau veikia gyvūnų kepenis negu aflatoksinas B_1 . Tačiau aflatoksinas M_1 nekrotizuoja vaivorykštinių upėtakių ir pelių inkstų sekrecinius ka-

nalėlius [2, 11, 15, 21]. Terpėse, kuriose auginami *Aspergillus flavus* grybai, galima aptikti gana daug toksiškų medžiagų: šalia aflatoksinų aptinkamas aflatremas, aflavininas, aspertoksicinas, aspergilo rūgštis, ciklozono rūgštis, 3-nitropropiono rūgštis, paspalininas ir kt. [2, 5, 21, 36]. Minėtos medžiagos slopina gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų, grybų vystymąsi, žudančiai veikia šiltakraujus gyvius, daro aplinką nepalankia augalams augti.

Žuvų kombinuotuosiuose pašaruose vyraudavo *Aspergillus fumigatus* rūšies grybai (1 pav.), kurie Lietuvos sąlygomis yra labai paplitę ant įvairiausių substratų, nes geba aktyviai ardyti lignino – celiuliozė, kitus sunkiai pasisavinamus junginius ir funkcionuoti nuo 5 iki 60°C temperatūroje. Auginant *Aspergillus fumigatus* rūšies grybus natūraliose ir sintetinėse agarizuotose terpėse aptinkami metabolitai, priklausantys fumigaklavinams, fumitoksinams, fumitremorgi-



1 pav. *Aspergillus fumigatus* rūšies grybų susiformavusių vaisiakūnių bendras vaizdas, $\times 200$
 Fig. 1. General view of fruiting body formation of *Aspergillus fumigatus* species fungi, $\times 200$

nams, gliotoksinams, triptokvivalinams, verukulogenams, organinėms rūgštims ir kt. Minėtos grybų sintetinės medžiagos neigiamai veikia šiltakraujų ir kitų gyvių organizmo funkcijas, jiems sukelia ryškius pakitimus, o kai kuriais atvejais būna ligų ar žūties priežastis [2, 9, 11, 15, 21, 24, 36]. Pastaruoju metu padaugėjo duomenų apie šios rūšies grybų patogeniškumą ir alergines savybes [9, 12, 14, 26, 37].

Iš žuvims šerti skirtų pašarų nuolat buvo išskiriamai *Penicillium* genties įvairioms rūšims priklausantys mikroskopiniai grybai, daug kurių aktyviai sintetina ir išskiria į aplinką toksinius antrinius metabolitus. Pavyzdžiui, plačiai žinomi antibiotiko penicilino producentai – *P. chrysogenum* rūšies grybai į mitybos terpę geba gausiai išskirti rokvafortinus, PR-toksina, ksantocilina, meleagrina, penicilino rūgštį, kurios letali dozė pelėms 200–300 mg/kg, triušiams – 100–200 mg/kg [2]. Daugelio *Penicillium* genties rūšių grybai į substratą išskiria toksiškus laktonus – vidinius ciklinius hidroksirūgšties esterius. Vienas tokių junginių yra patulinas ($C_7H_6O_4$), kurį gamina iš žuvims skirtų pašarų išskirtų *Penicillium* rūšių grybai: *P. expansum*, *P. claviforme*, *P. lanosum* ir *Aspergillus terreus*. Pastarąjį toksiną dažnai vadina kitais vardais: klaviforminu, klavitinu, klavycinu, ekspansionu, penicidinu, mikoinu, leukopinu, terciniu. Tai antibiotikas, slopinantis gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų vystymąsi. Letali dozė pelėms 5 mg/kg, viščiukams – 170 mg/kg. Šis junginys neigiamai veikia pirmuonis, grybus, žinduolius, augalus, audinių kultūras, virusus [2, 7, 36, 43]. Todėl jį produkuojančių grybų buvimas žuvų pašaruose yra rimtas signalas, kad pašarai užkrėsti nepalankių grybų pradais ir netinka žuvims šerti. Be to, patulina gaminančių grybų funkcionavimas aplinkoje nepalankiai veikia ir kitus ekologinių bendrijų narius.

Žuvims skirtuose kombinuotuose pašaruose randami *Alternaria alternata* rūšies grybai, išskirian-

tys *alternariolus*, *altertenolus*, tenuazono rūgštį ($C_{10}H_{15}O_3N$), kuri labai toksiška kai kuriems augalams. Nustatytas jos slopinantis poveikis baltymų sintezei, vykstančiai gyvulio ląstelėje [2, 3, 7, 36]. Kombinuotiesiems pašarams šiek tiek sudrėkus, jų paviršiuje galima aptikti greitai plintančių besidriekiančių *Rhizomucor pusillus* micelio siūlų, pro kuriuos grybas išskiria tetraciklinius triterpenus, obtusifoliolą, silucina. Pastarasis grybas žinomas gyvulių ir paukščių liežuvių ir įvairių vidaus organų mikozių sukėlėjas [2, 7, 25, 36]. Todėl jo vystymasis ant žuvims skirtų pašarų yra nepageidaujamas. Atkreiptinas dėmesys į *Exophiala* Carm. genties grybus, išskirtus iš tirtų žuvims skirtų kombinuotųjų pašarų. Jau gana seniai žinoma, kad šitai genčiai priklausantys grybai sukelia odos pūlinius Prancūzijos, Anglijos, Olandijos, Švedijos, Italijos, Kanados, JAV ir kitų šalių žmonėms. Dažnai tai siejama su darbais žuvininkystės srityje. *E. pisciphila* rūšies grybai buvo išskirti tiesiog iš puvių, atsiradusių žuvies organizme, laišos smegenų [3, 35, 36]. Tačiau šios rūšies grybai aptinkami ir ant medžių, žolių, dirvožemyje [18].

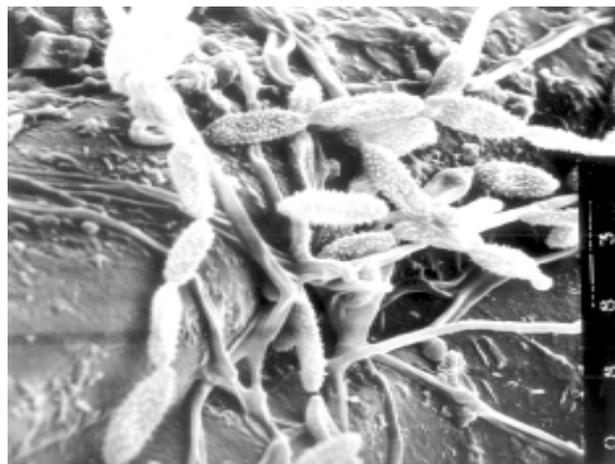
Kai mišiniai žuvų pašarui pagaminami iš miežių, kukurūzų ar kitų grūdų, kurie buvo gerai neišdžiovinoti ir juose buvo likę *Fusarium* Link ex Fr. genčiai priklausiančių mikromicetų pradų, po kurio laiko galima pastebėti ant mišinių masės balkšvai rausvą apnašą, kuris palaipsniui plečiasi, mišinio masę sulimpa į gumulėlius. Tokio pašaro be toksiškumo įvertinimo naudoti nereikėtų, nes kai kurių šios genties rūšių grybai gamina toksinus: moniliforminą, zearalenoną, fuzaro rūgštį, eniatinus, naftokvionus, trichotecinus, butenolidą [2, 3, 14, 22, 23, 34, 35]. Minėti ir kiti toksiški *Fusarium* genties grybų į aplinką išskirti antriniai metabolitai daro pašarą pavojingu žuvims. Tokiu pašaru mintančios žuvis nusilpsta, pradeda kisti jų svoris, blogėja apetitas, jos nustoja maitintis, sustiprėja jų žarnyno peristaltika, vėliau pasireiškia adinamija ir daugelis žuvų žūva. Tokių žuvų žiaunų srityje pastebimi ryškūs nekrozės požymiai. Atlikus skrodimą, matyti pokyčiai virškinamajame trakte ir parenchiminiuose organuose. Žuvų toksikozės simptomai ryškesni, kai vandens temperatūra nepakyla aukščiau kaip 15°C. Tokiais atvejais pastebimi aeromonozės simptomai, kurie siejami su organizmo imuninės sistemos toksiniais pažeidimais [2, 6, 10, 22, 23].

Dažnai ant žuvų pašarų aptikti *Mucor hiemalis* rūšies grybai (2 pav.) žmonių ir gyvulių patogenams nepriskiriami. Dėl didelio paplitimo, gebėjimo vystytis ant įvairių substratų, greitai keisti savo funkcines savybes rūšies grybai gali būti potencialūs alerginių ligų ir toksikozės sukėlėjai. Tai parodė atliktų tyrimų rezultatai. Pavieniais atvejais jie registruoti kaip viršutinių kvėpavimo takų mikozių sukėlėjai [39, 41]. Iš žuvų pašarų išskirti *Sclerotinia sclerotiorum* gen-



2 pav. *Mucor hiemalis* rūšies grybų sporangėkočiai ir sporangės, × 700

Fig. 2. Sporangium stalks and sporangia of *Mucor hiemalis* species fungi, × 700



3 pav. *Scolecobasidium tshawytschae* rūšies grybų konidijų išvaizda, × 2000

Fig. 3. Appearance of conidia of *Scolecobasidium tshawytschae* species fungi, × 2000

ties grybai išskiria į aplinką skleriną, izokumarino darinius – sklerotininą A ir B, skleroną ir izoskleroną, kurie stabdo aukštesniųjų augalų augimą [41, 46]. Tarp šio grybo metabolitų aptinkami 8-metoksipso-ralenas ir 4, 5, 8-trimetil-psaralenas, kurie sukelia žmonių odos dermatitus [41, 42]. Ypatingas dėmesys atkreiptinas į iš žuvų pašarų išskirtus *Scolecobasidium* genties dviejų rūšių grybus (3 pav.), kurie parazituoja vaivorykštinius upėtakius, lašišas, varles [3, 16, 41]. Jų išplitimas žuvų šėryklų zonose gali būti pavojingas žuvis ir aplinkai.

Iš žuvų pašarų išskirtų mikroskopinių grybų gebėjimo gaminti toksinius antrinius metabolitus pirminis įvertinimas buvo atliktas auginant juos ant antrinių metabolizmą skatinančių agarizuotų terpių: mielių ekstrakto + sacharozės (YES) ir Čapeko + mielių ekstrakto (CYA), kontrolei naudota standartinė

Čapeko terpė. Mikroskopinio grybo gebėjimas gaminti antrinius metabolitus buvo vertinamas pagal pigmento išskyrimą ant minėtų selektyvinių terpių bei neįprasto kolonijos spalvos pakitimo, palyginti su kolonijos spalva, augant šiam grybui ant agarizuotos standartinės Čapeko terpės. Aktyviausiai antrinius metabolitus gaminančios grybų padermės buvo atrinktos ir patikrintas jų poveikis laboratorinėms pelėms BALB/c. Šių tyrimų statistiškai apdoroti rezultatai pateikiami 2 lentelėje.

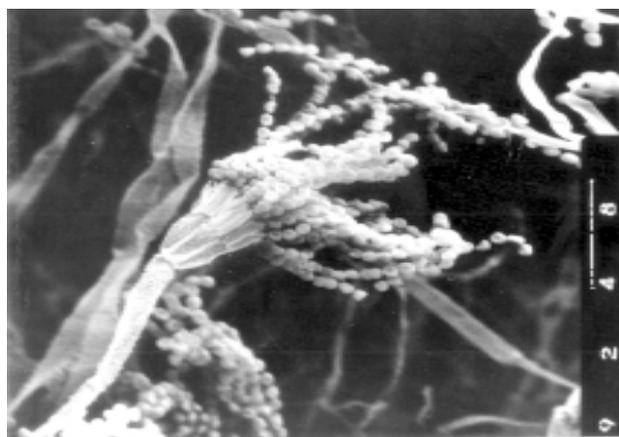
Iš 2 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad bandomuoju laikotarpiu pelių kūno svoris labiausiai sumažėjo veikiant: *Aspergillus fumigatus* M-22, *A. niger* LR-7, *Fusarium sprotrichioides* BA-4, *Mucor hiemalis* M-44, *Penicillium chrysogenum* SL-4, *P. commune* LR-10, *P. steckii* PS-3, *P. stoloniferum* M-51, *P. variable* S-11 (4 pav.), *Rhizopus stolonifer* SG-9 grybams.

2 lentelė. Mikroskopiniais grybais užkrėstų BALB/c pelių išgyvenimas, kūno ir blužnies svorio pakitimai (pagal ANOVA): NS – statistiškai nepatikimas skirtumas, palyginti su kontrole, * – statistiškai patikimas ($p < 0,05$) skirtumas, palyginti su kontrole, ** – statistiškai patikimas ($p < 0,01$) skirtumas, palyginti su kontrole, + – grupėje visos pelės krito, -/+ – kai kurios pelės grupėje krito, – – grupėje visos pelės išgyveno

Table 2. Survival of BALB/c mice infected by microscopic fungi and weight changes of their body and spleen (according to ANOVA): NS – difference compared with the control group is not statistically significant, * – difference compared with the control group is statistically significant ($p < 0.05$), ** – difference compared with the control group is statistically significant ($p < 0.01$), + – all mice in the group died, -/+ – some mice in the group died, – – all mice in the group survived

Tirtas grybas ir jo padermė	Kūno svorio pokytis	Blužnies svoris	Išgyvenimas
1	2	3	4
<i>Alternaria alternata</i> SLV-3	NS	**	–
<i>Alternaria alternata</i> PA-3	NS	NS	-/+
<i>Aspergillus fumigatus</i> M-22	**	**	+
<i>Aspergillus niger</i> LR-7	**	*	+
<i>Aspergillus niveoglaucus</i> PSK-4	*	NS	–
<i>Aspergillus penicilloides</i> GR-11	*	*	-/+

2 lentelė (tęsinys) Table 2 (continued)			
1	2	3	4
<i>Aspergillus restrictus</i> RA-1	*	**	–
<i>Cladosporium cladosporioides</i> PO-10	**	NS	–
<i>Fusarium moniliforme</i> S-29	NS	*	–
<i>Fusarium solani</i> JR-5	*	**	–
<i>Fusarium sporotrichioides</i> BA-4	**	**	+
<i>Fusarium sporotrichioides</i> M-62	*	NS	+
<i>Mucor hiemalis</i> M-44	**	**	+
<i>Penicillium paxilli</i> JR-4	*	**	–
<i>Penicillium canescens</i> V-6	*	**	–
<i>Penicillium chrysogenum</i> SL-4	**	**	–/+
<i>Penicillium claviforme</i> S-4	NS	**	–
<i>Penicillium commune</i> LR-10	**	*	+
<i>Penicillium expansum</i> KO-6	*	*	–/+
<i>Penicillium expansum</i> O-25	*	NS	+
<i>Penicillium italicum</i> MA-3	NS	**	–
<i>Penicillium spinulosum</i> S-22	NS	**	–
<i>Penicillium steckii</i> PS-3	**	*	+
<i>Penicillium stoloniferum</i> KO-15	*	0	+
<i>Penicillium stoloniferum</i> M-51	**	NS	–/+
<i>Penicillium variabile</i> S-11	**	**	+
<i>Penicillium verrucosum</i> M-1	NS	**	–
<i>Penicillium viridicatum</i> BL-77	*	**	+
<i>Rhizopus stolonifer</i> SG-9	**	**	–
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> BR-19	*	**	–



4 pav. *Penicillium variabile* rūšies grybų susiformavusių vaisiakūnių bendras vaizdas, × 1000

Fig. 4. General view of ripe fruiting bodies of *Penicillium variabile* species fungi, × 1000

Dėl *Alternaria alternata* SLV-3, *Aspergillus fumigatus* M-22, *A. restrictus* RA-1, *Fusarium solani* JR-5, *F. sporotrichioides* BA-4, *Penicillium paxilli* JR-4, *P. canescens* V-6, *P. chrysogenum* SL-4, *P. claviforme* S-4, *P. italicum* MA-3, *P. spinulosum* S-22, *P. variabile* S-11, *P. verrucosum* M-1, *P. viridicatum*

BL-77, *Rhizopus stolonifer* SG-9, *Sclerotinia sclerotiorum* BR-19 poveikio sumažėjo tirtų pelių blužnies svoris.

Dėl *Aspergillus fumigatus* M-22, *A. niger* LR-7, *Fusarium sporotrichioides* BA-4 ir M-62, *Mucor hiemalis* M-44, *Penicillium commune* LR-10, *P. expansum* O-25, *P. steckii* PS-3, *P. stoloniferum* KO-15, *P. variabile* S-11, *P. viridicatum* BL-77 grybų poveikio bandymo sąlygomis visos pelės krito. Kitų tirtų mikroskopinių grybų padermių poveikis BALB/c pelėms buvo silpnas: krito tik pavienės arba išgyveno visos.

Pasibaigus tyrimo laikotarpiui, išlikusios gyvos pelės buvo skrodžiamos, nustatomi jų vidaus organų morfologiniai ir anatomiciniai pokyčiai (3 lentelė). Iš 3 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad visais atvejais dėl grybų poveikio padidėja pelių limfmazgiai, organai pasidengia apnašu, kuriame susidaro grybo židiniai, organai tarpusavyje suauga, todėl negali normaliai funkcionuoti, mažėja jų svoris, atskiri individai žūva.

Mikroskopinių grybų toksiškumas šaltakraujams gyvūnams buvo patikrintas atliekant bandymus su karpiais. Šiam tyrimui buvo pasirinktos 4 mikromicetų padermės, sukėlusios ūmią toksikozę BALB/c

3 lentelė. Mikroskopinių grybų sukelti BALB/c pelių vidaus organų pokyčiai
Table 3. Changes of internal organs of BALB/c mice caused by microscopic fungi

Grybas ir padermė	Užkrėtimui naudotos grybo suspensijos 1 ml dozės titras (pradai /ml)	Bandymo variante kritusių pelių skaičius ir laikas	Nustatyti išorės ir vidaus organų pokyčiai
<i>Alternaria alternata</i> PA-3	$8,0 \cdot 10^7$	1 pelė – antrą parą	Iškritę plaukai kaklo ir pilvo srityje, padidėję limfmazgiai, blužnis priaugusi prie žarnyno ir pilvaplėvės, kepenys pabalusios, ant pilvaplėvės išsėtiniai grybo dariniai.
<i>Aspergillus penicilloides</i> GR-11	$6,0 \cdot 10^7$	1 pelė – vienuoliką parą	Išpūsti pilvai, padidėję limfmazgiai, blužnis priaugusi prie žarnyno arba inkstų, ant diafragmos, kepenų ir žarnyno apnašas arba pavieniai grybo židiniai.
<i>Aspergillus restrictus</i> RA-1	$6,0 \cdot 10^7$	Visos pelės išgyveno	Padidėję limfmazgiai, kepenys ir blužnis padengta baltu apnašu, ant kepenų pavieniai grybo židiniai, kai kurių pelių blužnis priaugusi prie žarnyno arba pilvaplėvės.
<i>Cladosporium cladosporioides</i> PO-10	$6,0 \cdot 10^7$	Visos pelės išgyveno	Padidėję limfmazgiai, blužnis nepakitusi, kai kurių pelių blužnyje ir kepenyse pavieniai grybo židiniai.
<i>Penicillium canescens</i> V-6	$7,0 \cdot 10^7$		Padidėję limfmazgiai, blužnis priaugusi prie žarnyno, ant blužnies ir kepenų baltas apnašas ir išsisklaidę grybo dariniai.
<i>Penicillium chrysogenum</i> KO-6	$6,0 \cdot 10^7$	1 pelė – keturioliką parą	Padidėję limfmazgiai, blužnis priaugusi prie žarnyno, ant blužnies, kepenų, žarnyno grybo židiniai.
<i>Penicillium expansum</i> KO-15	$7,0 \cdot 10^7$	1 pelė – dvyliką parą	Padidėję limfmazgiai, blužnis priaugusi prie žarnyno ar inkstų, ant blužnies, kepenų apnašas ir pavieniai stambūs grybo židiniai.
<i>Penicillium stoloniferum</i> M-51	$8,0 \cdot 10^7$	1 pelė – pirmą parą	Padidėję limfmazgiai, blužnis priaugusi prie žarnyno arba pilvaplėvės, ant blužnies, kepenų, žarnyno apnašas, pavieniai grybo židiniai.
<i>Rhizopus stolonifer</i> SG-9	$6,0 \cdot 10^7$	Visos pelės išgyveno	Padidėję limfmazgiai, blužnis ir kepenys priaugusios prie pilvaplėvės arba suaugusios su žarnynu, ant pilvaplėvės, kepenų, inkstų, blužnies apnašas.
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> BR-19	$6,0 \cdot 10^7$	Visos pelės išgyveno	Pilvai išpūsti, padidėję limfmazgiai, kepenys ir blužnis priaugusios prie žarnyno ir pilvaplėvės, kuri kartu su kepenimis, blužnimi, diafragma padengta apnašu, ant inkstų – grybo židiniai.

pelėms anksčiau atliktų bandymų metu: *Aspergillus fumigatus* M-22, *A. niger* LR-7, *Mucor hiemalis* M-44, *Penicillium variabile* S-11. Anksčiau aprašytais metodais užkrėtus po 5 analogiškais sąlygomis laikytus dvišarį karpį, po 16 parų karpiai buvo išskrosti, įvertinti jų organų morfologiniai ir anatominiai pakitimai (4 lentelė).

Iš 4 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad grybų paveiktų žuvų pilvo ertmėje padaugėja skysčio. 80% išskrostų žuvų vidaus organai tarpusavyje buvo suaugę, redukuoti, sunykę, kepenų spalva ir konstitucija pakitusi, dažnai kepenys buvo sustandėjusios,

peraugusios jungiamuoju audiniu. Kai kurių žuvų kepenys buvo degraduotos, suriebėjusios, jose nustatyta hepatocitų lipidinė infiltracija. Vidaus organuose – kepenyse, blužnyje, inkstuose rastos geltonai rudų granulių sancaupos, kai kurių individų organuose jos pavienės, difuziškai pasklidusios, kitų – gausios, apgaubtos jungiamojo audinio kapsulėmis ir sudaro incistuotas granulomas. Grybų pažeistų žuvų inkstai degraduoti. Nekrotiniai židiniai pasklidę po visą inkstų parenchimą. Nekrotinių židinių plote randami rausvai gelsvų suirusių ląstelių likučiai, apsupti limfoidinių ląstelių žiedu.

4 lentelė. Toksinus gaminančių mikroskopinių grybų poveikis dvivasariams karpiams, praėjus 16 parų po užkrėtimo grybais

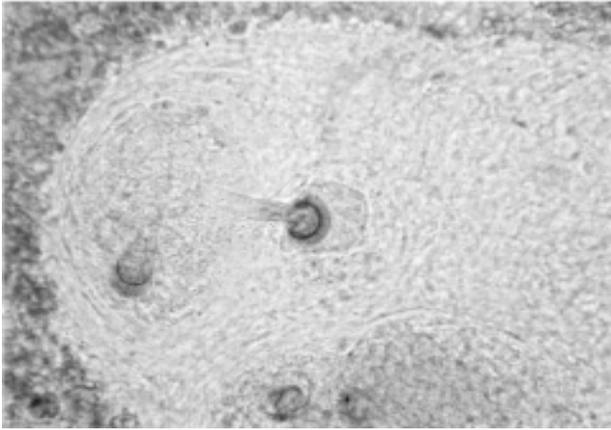
Table 4. Influence of microscopic fungi producing toxins on 1+ carp after 16 days of fungal infection

Grybas ir jo padermė	Žuvims suleistos vienkartinės grybų suspensijos 1 ml titras (pradai/ml)	Žuvies užkrėtimo būdas	Tirtų žuvų skaičius ir svorio vidurkis g: a) prieš bandymą, b) po bandymo	Morfologiniai ir anatomiciniai žuvų organizmo pakitimai
<i>Aspergillus fumigatus</i> M-22	2,0 · 10 ⁸	Per burną	po 5	Žuvų elgsena nepakitusi. Išskrodus nustatyta: vidaus organai tarpusavyje suaugę, redukuoti, kepenys tamsiai žalios spalvos, ceroidinės, pastebimi koaguliaciniai ir riebaliniai hepatocitų nekrozės židiniai
		Išvirkščiant į pilvo ertmę	a) 48,0 ± 0,26 b) 39,7 ± 0,83	
<i>Aspergillus niger</i> LR-7	2,0 · 10 ⁸	Per burną	po 5	Žuvų elgsena nepakitusi. Išskrodus nustatyta: vidaus organai tarpusavyje suaugę, preparuojant sunku blužnį atskirti nuo kepenų. Kepenys rusvos, kietos konsistencijos, blužnyje ir inkstuose geltonai rudos granulės
		Išvirkščiant į pilvo ertmę	a) 38,0 ± 0,11 b) 30,8 ± 0,74	
<i>Penicillium variabile</i> S-11	2,0 · 10 ⁸	Per burną	po 5	Žuvų elgsena nepakitusi. Išskrodus nustatyta: peritonitas, vidaus organų tarpusavio suaugimas, ant kepenų, plaukiojimo pūslės, inkstų, žarnyno – apvalios dėmės, kurias sudaro tamsios nedidelės grybo kolonijos, išsibarsčiusios ant visų organų paviršiaus
		Išvirkščiant į pilvo ertmę	a) 40,0 ± 0,08 b) 36,8 ± 0,53	
<i>Mucor hiemalis</i> M-44	2,0 · 10 ⁸	Per burną	po 5	Žuvų elgsena nepakitusi. Išskrodus nustatyta: kepenys degeneruotos, suriebėjusios, hepatocitų lipidinė infiltracija. Nekrotiniai židiniai pasiskleidę organų paviršiuje
		Išvirkščiant į pilvo ertmę	a) 38,0 ± 0,14 b) 30,7 ± 0,16	

Siekiant išaiškinti žuvų galimybes užsikrėsti mikroskopinių grybų pradais natūraliomis sąlygomis bei išaiškinti grybų pažeistų pašarų įtaką žuvims suorganizuotas specialus 30 parų trukęs tyrimas, kurio metu po 5 karpus buvo auginama 2 atskiruose aeruojamuose akvariumuose. Vieni karpiai buvo šeriami pašarais, užkrėstais *Aspergillus fumigatus* M-22, kiti – *A. niger* LR-7. Kontrolė – 5 karpiai šerti neužkrėstais pašarais. Vandens temperatūra aeruojamuose akvariumuose buvo palaikoma 18–21°C. Kitokio pašaro žuvys negavo.

Aspergillus fumigatus M-22 rūšies grybais užkrėstą pašarą karpiai ėdė nenoriai, du karpiai po dviejų savaičių taip nusilpo ir suliesėjo, kad 14 ir 15 parą žuvo nuo kacheksijos – bendro organizmo išsekimo. Išskrodus žuvusias žuvis ryškių grybų sukeltų pataloginių pakitimų nenustatyta. Tačiau diagnozuotas peritonitas, vidaus organai tarpusavyje buvo suaugę, kepenys žalsvai rudos, standžios, ceroidinės konsistencijos, inkstai rudi, purūs, vandeningi. Mikroskopuojant kepenų, blužnies ir inkstų audinių suspaustus preparatus rastos gausios geltonai rudų granuliu san-

kaupos. Galima teigti, kad jų atsiradimo priežastis yra grybo toksinų sukelti vidaus organų sistemoje vykstantys nekrozės procesai. 3 karpiai išgyveno visą bandymo laikotarpį. Bandymo pabaigoje karpiai buvo sulybę. Išskrostų žuvų vidaus ertmėse rasta nedaug skysčių, daugiau drebučių pavidalo skaidrios masės, sukibusios su vidaus organais ir pilvaplėve. Preparuojant parenchiminiuos organus buvo sunku atskirti nuo žarnyno. Kepenys tamsiai rudai žalios, kietos konsistencijos, ceroidinės, kepenų audinys peraugęs jungiamuoju audiniu. Tulžies pūslė pripildyta tamsiai rudai žalio skysčio. Blužnis tamsiai raudona, sunykusi, sunkiai atskiriama nuo kepenų. Blužnies audiniuose pastebėtas grybo vystymasis ir susiformavę vaisiakūniai (5 pav.). Inkstai vandeningi, ištižę, degeneruoti, parenchimoje nėra hemopoetinio – su kraujo gamyba susijusio audinio. Kepenų, blužnies ir inkstų parenchimos audinyje gausu rudai geltonų granuliu sankaupų, blužnyje jos sudarė ištistus konglomeratus. Čia buvo aptinkamos ir sferinės jungiamojo audinio kapsulėmis apgaubtos imuninės granulios (6 pav.).



5 pav. *Aspergillus fumigatus* vaisiakūniai, aptikti karpio blužnies audiniuose, praėjus 30 parų po parenteralinio grybų sporų suleidimo, $\times 150$

Fig. 5. Fruiting bodies of *Aspergillus fumigatus* found in splenic tissue of carps after 30 days of parental infection with spores, $\times 150$



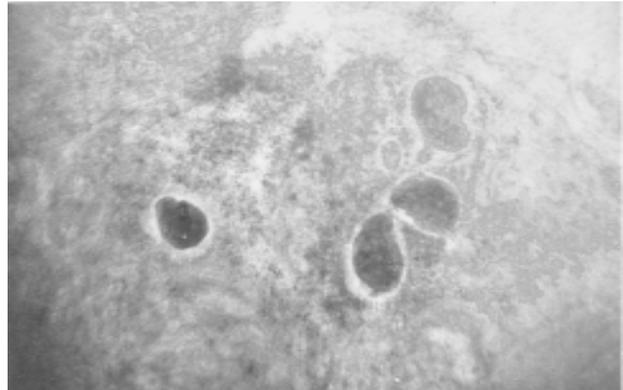
6 pav. Sferinė imuninė granuloma, susidariusi karpio inkstuose, $\times 400$

Fig. 6. Spherical immune granuloma formed in kidneys of carp, $\times 400$

Aspergillus niger LR-7 grybu užkrėstą pašarą karpiai ėdė noriau, negu *A. fumigatus* M-22 pažeistą pašarą. Duotą pašarų normą per parą suėsdavo ir atliekų palikdavo nedaug. Per visą bandymo laiką žuvis buvo judrios, gyvybingos, adekvačiai su kontrolinės grupės žuvimis reagavo į aplinkos dirgiklius. Tačiau jos palaipsniui liesėjo ir bandymo pabaigoje jų imitimo koeficientas buvo žemiau kritinės suliesėjimo ribos (0,92–1,54). Pasibaigus bandymo laikui ir žuvis išskrodus rasta: pilvo ertmėje nedidelis kiekis eksudato, organai sunykę, degeneruoti, tarpusavyje suaugę. Kepenys žaliai rudos, vietomis juodos, suaugusios su blužnimi, kuri sunykusi, tamsiai raudona. Inkstai vandeningi, purūs, degeneruoti. Tulžies pūslė pripildyta tamsiai žalio skysčio. Vidaus organuose aptikta difuziškai išsisklaidžiusių geltonai rudų granulų sancaupų, kurios matyt susiformuoja iš žuvusių

nekrotizuotų ląstelių (7 pav.). Šiuo atveju ląstelių nekrobiotinius procesus organų audiniuose ir ląstelių nekrotizaciją sukėlė mikotoksinai.

Atlikto eksperimento rezultatai parodė, kad nors tirti grybai karpiams ūmios toksikozės nesukėlė, bet stipriai pažeidė vidaus organus. Tai patvirtina nustatyti ryškiai išreikšti patomorfologiniai pakitimai vidaus organuose. *Aspergillus fumigatus* M-22 sukelti degeneraciniai, nekrotiniai parenchiminių organų pakitimai audiniuose buvo masiškesni, gilesni ir negrįžtami.



7 pav. Iš nekrotizuotų ląstelių susidariusios pigmentinių granulų sferulos šalia karpio kraujo indo, $\times 400$

Fig. 7. Pigmental granules formed from necrotic cells near blood vessel of carp, $\times 400$

REZULTATŲ APTARIMAS IR IŠVADOS

Žuvų pašaruose aptinkami skirtingų rūšių mikroskopinių grybų pradai, kurie į ruošiamus pašarus patenka iš įvairių aplinkos šaltinių. Paruoštus pašarus laikant sausomis sąlygomis grybų pradai yra ramybės būklėje ir didesnio pavojaus jais besimaitinančioms žuvims nekelia. Tačiau jeigu žuvims skirti pašarai bus paruošti iš grybų pradais užkrėstų ar pažeistų grūdų arba jau paruošti pašarai laikomi drėgnomis sąlygomis, kuriomis grybų pradai gali sudygti, pradėti vystytis ir išskirti į aplinką metabolitus, kurių dalis yra toksiški žuvims ir kitiems aplinkoje esantiems gyviems organizmams, kyla didelis ekologinis pavojus su neigiamomis ekonominėmis pasekmėmis.

Iš žuvims šerti skirtų kombinuotųjų pašarų buvo išskirti mikroskopiniai grybai, priklausantys 26 gentims bei 65 rūšims. Vienuose pašaruose ženkliai daugiau aptikta *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, kituose – *Fusarium*, *Botrytis*, *Exophiala*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Scolecobasidium* bei kitoms gentims priklausančių grybų pradų. Tai matyt priklausė nuo pašarų užkrato šaltinio bei tų aplinkos sąlygų, kuriomis pašarai buvo ruošiami ir naudojami. Pirminis išskirtų mikroskopinių grybų gebėjimo sintetinti ir išskirti į aplinką toksiškus antrinius

metabolitus įvertinimas parodė, kad tokias medžiagas gamina daugelis iš žuvų pašarų išskirtų padermių, dažniausiai priklausančių *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* gentims. Visos BALB/c pelės žuvo užkrėtus jas *Aspergillus fumigatus* M-22, *Aspergillus niger* LR-7, *Mucor hiemalis* M-44, *Fusarium sporotrichioides* BA-4 ir M-62, *Mucor hiemalis* M-44, *Penicillium commune* LR-10, *P. expansum* O-25, *P. steckii* PS-3, *P. stoloniferum* KO-15, *P. variabile* S-11, *P. viridicatum* BL-77. Pastarųjų rūšių grybai gali būti vienas ekologinių indikatorių, nurodančių pašarų kenksmingumą aplinkos gyviems objektams. Nustatyti ryškūs vidaus organų pakitimai mikroskopinių grybų pradais užkrėstų, tačiau išlikusių gyvų BALB/c pelių organizme. Būdingiausi vidaus organų pakitimai buvo: limfmazgių padidėjimas, vidaus organų padengimas apnašu, didesnių ar mažesnių grybo židinių audiniuose susidarymas, organų tarpusavio suaugimas. Be to, sumažėja grybo pažeistų pelių svoris, kai kurie individai žūva.

Kai kurių plačiai paplitusių grybų padermės pavojingos ir šaltakraujams gyvams. Bandyto sąlygomis karpis ryškiausiai paveikė *Aspergillus fumigatus* M-22 ir *Mucor hiemalis* M-44 rūšims priklausantys grybai. Minėtais grybais užkrėtus dvivasarius karpis, nustatyti ryškūs vidaus organų patologiniai pakitimai.

Toksikus gaminantys mikroskopiniai grybai yra svarbus ekologinis veiksnys, turintis įtakos kitų biologinių sistemų egzistavimui aplinkoje ir ribojantis sėkmingą žuvų veisimą tvenkiniuose. Kai kurie iš pašarų ir šėryklų aplinkos išskirti mikromicetai (*Scolecobasidium humicola*, *S. tshawytschae*) gali būti žuvų ligų priežastis.

Gauta
2002 05 15

Literatūra

1. Carlile M. J., Watkinson S. C. *The Fungi*. Academic Press. Horcourt Brace et Company Publishers. London. Boston. San Diego. New York, 1996. 482 p.
2. Cole R. J., Cox R. H. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. Academic press. New York. London. Toronto. Sydney. San Francisco, 1981. 937 p.
3. Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H. *Compendium of soil fungi*. Academic Press. London. New York. Toronto. Sydney. San Francisco, 1980. Vol. 1. 859 p.
4. Ellis M. B. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, England, 1976. 507 p.
5. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals for Experimental and Other Scientific Purposes*. Strasbourg: Council Directive (86/609/EEC), 1986.
6. Frisvad J. C., Samson R. A. Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. *Cereal grain. Mycotoxins. Fungi and Quality in Drying and Storage* (J. Chełkowski Ed.). Elsevier. Amsterdam. London. New York. Tokyo, 1991. P. 441–476.
7. Frisvad J. C. Fungal species and their specific production of mycotoxins. In: *Introduction to Food – borne Fungi. Third edition*. Eds.: Samson R. A. and van Reenen-Hoekstra E. S. Centralbureau voor Schimmelcultures, Baar. Delft., Institute of the Royal Netherland Academy of Arts and Sciences, 1988. P. 239–249.
8. Gams W. *Cephalosporium – Artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*. VEB Gustav Fischer Verlag. Jena, 1971. 262 s.
9. Garcia M. E., Blanco J. L., Kurup V. P. Immunochemical reactivity of *Aspergillus fumigatus* antigenus from different sources. *Rev Iberoam Micol.* 1997. Vol. 14. P. 55–59.
10. Gatenbeck S. et Sierankiewicz J. Microbial production of tenuazonic acid analogues. *Antimicrob. agents chemother.* 1973. Vol. 3. P. 308–309.
11. Kheiralla Z. H., Hassanin N. I. et Amra H. Effect of Incubation Time, Temperature and Substrate on a Growth and Aflatoxin Production. *International Biodeterioration et Biodegradation* 0964–8303. Elsevier Science Publisches Ltd. England. Printed in Great Britain, 1992. P. 17–27.
12. Krikstaponis A., Lugauskas A., Krysińska-Traczyk E., Prazmo Z., Dutkiewicz J. Enzymatic activities of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from the air at Waste Landfills. *Ann Agric Environ Med.* 2001. Vol. 8. P. 227–234.
13. Krikstaponis A., Stakėnienė J., Lugauskas A. Toxigenic fungi in human environmental. *Biologija.* 2001. Vol. 4. P. 10–12.
14. Krysińska-Traczyk E., Kiecana I., Perkowski J., Dutkiewicz J. Levels of fungi and mycotoxins in samples of grain and dust collected on farms in Eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2001. Vol. 8. P. 269–274.
15. Kwon-Chung K. J. and Bennett J. E. *Medical Mycology*. Lea et Febiger Philadelphia – London, 1992. 826 p.
16. Larone D. H. *Medically important Fungi. A guide to identification*. American Society for Microbiology. Washington, D. C., 1993. 230 p.
17. Lashin A. I. et Lechevalier H. A. (Eds.). *Handbook of Microbiology*. Vol. 3. Microbial Products. CRC Press. Cleveland. Ohio, 1973.
18. Lugauskas A. (darbo vadovas), Bridžiuvienė D., Levinskaitė L., Paškevičius A., Pečiulytė D., Repečkienė J., Salina O., Varnaitė R. Mikrobiologiniai medžiagų pažeidimai. UAB *Valstiečių laikraštis*. 1997. 469 p.
19. Lugauskas A., Stakėnienė J. Mikromicetai paplitę ant sandėliuose ir prekyboje esančių vaisių ir uogų. *Ekologija.* 2001. T. 1. P. 3–11.
20. McGinnis M. R., Ajello L. *Scolecobasidium tshawytschae*. *Trans. Br. Mycol. soc.* 1974. P. 202–203.
21. McGinnis M. R., Ajello L., Schell W. A. Mycotic diseases: a proposed nomenclature. *Int. J. Dermatol.* 1985. P. 9–24.
22. Moss M. O. et Frank M. Variability in the Production of Trichothecenes by *Fusarium sporotrichioides*. *International Biodeterioration* 0265–3036. Elsevier Scien-

- ce Publisches Ltd. England. Printed in Great Britain, 1988. P. 445–453.
23. Nelson P. E., Dignani M. C., and Anaissie E. J. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994. P. 479–504.
 24. Nelson P. E., Toussoun T. A., Marasas W. F. O. *Fusarium species*. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park and London, 1983. 193 p.
 25. Northolt M. D., Soentoro P. S. S. Fungal growth on foodstuffs related to mycotoxin contamination. *Introduction to food-borne fungi* Third edition (R. A. Samson and E. S. van Reener-Hoekstra Eds.). Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn. Delft., Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, 1988. P. 231–238.
 26. Perzigian R. W., Fraiss R. G. Primary cutaneous aspergillosis in a preterm infant. *Am. J. Perinatol.* 1993. Vol. 10. P. 269–271.
 27. Rabie C. J., Lübben A., Marais G. J., Jansen van Vauren H. Enumeration of fungi in barley. *International Journal of Food Microbiology.* 1997. Vol. 35. P. 117–127.
 28. Ramirez C. *Manual and Atlas of the Penicillia*. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam. New York. Oxford, 1982. 874 p.
 29. Samson R. A. and van Reenen-Hoekstra E. S. *Introduction to Food – borne Fungi. Third edition*. Centralbureau voor Schimmelcultures, Baar. Delft., Institute of the Royal Netherland Academy of Arts and Sciences, 1988. 299 p.
 30. Samson R. A., Hocking A. D., Pitt J. I., King A. D. *Modern Methods in Food Mycology*. Elsevier. Amsterdam, 1992. 312 p.
 31. Stakeniene J., Lugauskas A., Levinskaite L. Presence of Potential Toxin Producing Micromycetes on Fruit and Berries. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences Biological Sciences*. 2001. Vol. 49. N 4. P. 413–420.
 32. St-Germain G., Summerbell R. *Identifying filamentous fungi. A clinical Laboratory Handbook*. Star Publishing company. Belmont. California, 1996. 314 p.
 33. Sugiura Y., Barr J. R., Brock J. W., Elle Ch. M., Ueno Y., Patterson D. G., J. R., Potter M. E. Physiological characteristics and mycotoxins of human clinical isolates of *Fusarium* species. *Mycol Res.* Vol. 103(II). P. 1462–1468.
 34. Šimkevičienė V., Rukšėnas O. *Laboratorinių gyvūnų mokslo pagrindai*. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 2001. 237 p.
 35. Trojanowska K. Evaluation of cereal grain quality using mycological methods. *Cereal grain. Mycotoxins. Fungi and Quality in Drying and Storage* (J. Chełkowski Ed.). Elsevier. Amsterdam, 1991. P. 185–215.
 36. Turner W. B. and Aldrige D. C. *Fungal Metabolites II*. London: Academic Press, 1983. 631 p.
 37. Zabawski J., Baran E. Charakterystyka częściej występujących grzybów chorobotwórczych i grzybów oportunistycznych z podgromad: *Zygomycotina*, *Ascomycotina* i *Deuteromycotina*. *Zarys mikologii lekarskiej* (E. Baran Red.). Wrocław, 1998. N 8. S. 37–254.
 38. *Болезни рыб*. Справочник (Ред. В. С. Осетров). Москва: Колос, 1989. С. 56–57.
 39. Галаш В. Т. *Диагностика и профилактика трихотециновых микотоксикоза корма*. Экспресс-информация. Сер. рыб. использ. внутренних водоемов. Москва: Колос, 1990. Т. 7. С. 1–7.
 40. Грищенко Л. И. Микозы, микотоксикозы и алергические болезни рыб. *Итоги науки и техники. Серия ихтиология. Инфекционные болезни рыб*. ВНИИ. Москва, 1986. Т. 1. С. 161–189.
 41. Дайняк Л. Б., Кунелькая В. Я. Микозы верхних дыхательных путей. *Медицина*. Москва, 246 с.
 42. Курасова В. В., Костин В. В., Маминавская Л. С. *Методы исследования в ветеринарной микологии*. Москва: Колос, 1971. 312 с.
 43. Лугаускас А., Микулскене А. И., Шляужене Д. Ю. *Каталог микромицетов биодеструкторов полимерных материалов*. Москва: Наука, 1987. 286 с.
 44. Милько А. Л. *Определитель мукофильных грибов*. Киев: Наукова думка, 1974. 334 с.
 45. Семенов А. Я., Федорова Р. Н. *Инфекция семян хлебных злаков*. Москва: Колос, 1984.
 46. Юнусов М. Ю. Методы токсичности кормов, поражённых некоторыми видами грибов. *Тр. ВНИИ ветеринарной санитарии*. Москва, 1969. С. 76–83.

Albinas Lugauskas, Jurgita Stakėnienė, Vytautas Kemėža
TOXIN-PRODUCING MICROMYCETES ISOLATED FROM FISH FODDER

S u m m a r y

During 2000–2001, contamination of grains and mixed feed for fish feeding by propagules of microscopic fungi was investigated. Using various nutrient media, fungal strains were isolated, pure monocultures were gained and their taxonomic position was determined. Fungi isolated from fodder were determined to belong to 26 genera and 65 species. The abundance of fungal propagules in fodder varied. Fungi of the genera *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Mucor* prevailed in one of kind fodder, *Fusarium*, *Exophiala*, *Scolecobasidium*, *Alternaria*, *Cladosporium* and other genera increased slightly in another kind of fodder.

Some isolated fungal species synthesize intensively and excrete toxic secondary metabolites which affect the fodder quality, retard fish growth and negatively influence the ecological situation of the environment. According to the obtained results, such properties were observed for strains of the following species isolated from fish fodder: *Aspergillus penicilloides* GR-11, *A. fumigatus* M-22, *A. niger* LR-7, *Penicillium variabile* S-11, *P. chrysogenum* SL-4, *P. expansum* KO-6, *P. viridicatum* BL-77, *P. steckii* PS-3, *Fusarium sporotrichioides* BA-4, *F. moniliforme* S-29, *Alternaria alternata* SLV-3, *Sclerotinia sclerotiorum* BR-19.

In fish feeding-places, fungi of the genus *Scolecobasidium* were isolated. These fungi in other countries are known to be dangerous fish parasites, especially *S. tshawyschae*, which spreading in pounds can become a serious ecological and economic problem.

Key words: microscopic fungi, toxins, fodder, parasites