

LIETUVOS HIDROBIOLOGŲ DRAUGIJA

TVIRTINU:

Pareigos LHD prezidentas

Gintautas Vaitonis

2025 m. lapkričio mėn. 10 d.

**PROJEKTAS ĮGYVENDINTAS PAGAL ŽEMĖS ŪKIO, MAISTO ŪKIO,
ŽUVININKYSTĖS IR KAIMO PLĖTROS 2023–2027 METŲ MOKSLINIŲ TYRIMŲ IR
EKSPERIMENTINĖS PLĖTROS FINANSAVIMO TAISYKLES**

**NUSTATYTI VĖŽIŲ BEI KAI KURIŲ ŽUVŲ LIGŲ SUKĖLĖJUS
LIETUVOS VANDENYSE IR PATEIKTI REKOMENDACIJAS DĖL
VANDENS TELKINIŲ, LABIAUSIAI TINKAMŲ VĖŽIŲ
REINTRODUKCIJAI, NUSTATYMO**

2025 m. GALUTINĖ ATASKAITA

**Tyrimo vadovas
Gintautas Vaitonis**

**Vilnius
2025**

Turinys

Įvadas	3
Tyrimo metodai	4
Rezultatai.....	11
Mikroskopinių grybų mikromorfologijos tyrimas šviesinę mikroskopiją	11
Filogenetinių ryšių tarp identifikuotų mikroskopinių grybų nustatymas.....	20
Mikroskopiniai grybai rasti vėžių raumenų ir kepenų audiniuose	25
Mikroskopiniai grybai vandens telkiniuose	29
Mikroskopinių grybų metagenominė analizė vėžių kepenų ir raumenų audiniuose.....	32
Mikroskopinių grybų, išskirtų iš vėžių audinių, patogeniškumo vėžiams įvertinimas ..	38
Bakterijos	40
Sukeliamų ligų anamnezė	46
Apibendrinimas, išvados, rekomendacijos	58
Literatūros sąrašas	62
Projekto tema publikuoti straipsniai ir tyrimų viešinimas	67

Ivadas

Pastaruoju metu stebimas žymus plačiažnyplių vėžių žuvimas ar net visiškas buvusių gausių populiacijų išnykimas, dėl to rūšis buvo įrašyta į Lietuvos Raudonąją knygą. Dažniausiai plačiažnypliai vėžiai žūsta tuose vandens telkiniuose į kuriuos patenka invaziniai vėžiai, bet būna, kad vėžių išmiršta ir dėl kitų, nenustatytų priežasčių. Dažniausi ligų sukėlėjai yra mikroskopiniai grybai bei bakterijos. Dėl jų nyksta ne tik vietinės vėžių rūšys, bet ir didelė invazinių rainuotųjų vėžių dalis. Dalis ligų yra bendros ir vėžiams, ir žuvims, todėl labai svarbu nustatyti ligų sukėlėjus, kad būtų galima parinkti įveisimu tinkamus vandens telkinius, kuriuose būtų galima sėkmingai atkurti vėžių populiacijas ir/arba užtikrinti jų sėkmingą auginimą akvakultūroje.

Tyrimams pasitelktas metagenominės sekoskaitos (kai nuskaitomi visų vėžių organizme esančių patogenų genomai) tyrimas, leidžiantis išsamiai, objektyviai ir praktiškai ištirti mikrobiomą, suteikiantis išsamią informaciją apie rastus mikroorganizmus, jų funkcionalumą. Metagenominės sekoskaitos būdu galima analizuoti visą ėminio mikrobiomą. Taikant NGS technologiją (Next Generation Sequencing), sekvenuojama visa substrate (organizme) gyvenančių mikroorganizmų bendruomenių genetinė medžiaga (DNR), todėl galima tirti kolektyvinius genomus ir nustatyti jų sekas. Metagenominiam tyrimui pasirinkti viso genomo RNR ir DNR naujos kartos sekoskaitos metodai ir SURPITTM duomenų analizės programa.

Tikslas: nustatyti vėžių bei kai kurių žuvų rūšių ligų sukėlėjus vėžiuose ir vandenyje ir parengti rekomendacijas, kokie vandens telkiniai labiausiai tinka vėžių reintrodukcijai

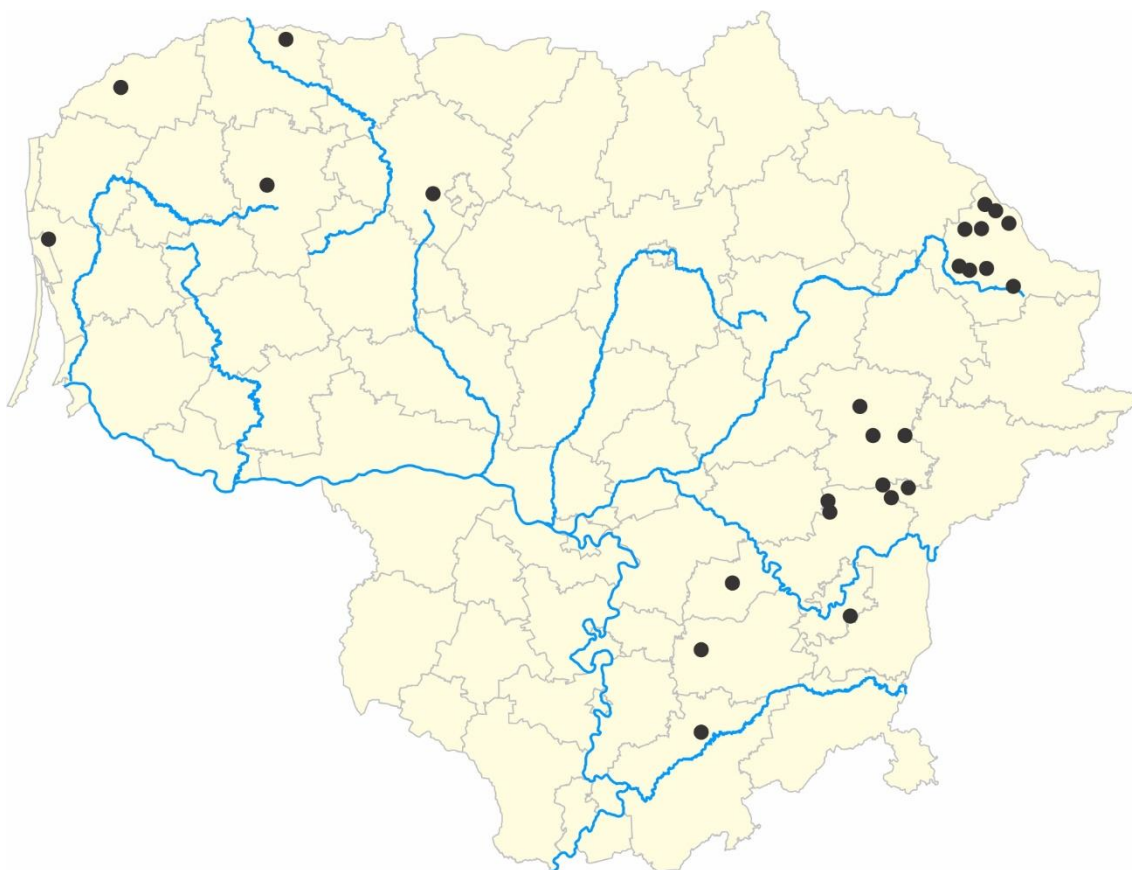
Uždaviniai:

1. Naudojant metagenetinius tyrimus nustatyti galimus vėžių bei kai kurių žuvų rūšių ligų sukėlėjus.
2. Laboratoriniais eksperimentais nustatyti dažniausiai paplitusių sukėlėjų vėžiams sukeltamų ligų anamnezę.
3. Parengti rekomendacijas, leidžiančias įvertinti vandens telkinių tinkamumą vėžių reintrodukcijai.
4. Parengti rekomendacijas, padedančias minimizuoti ligų poveikį akvakultūroje.

Tyrimo metodai

Tirti mėginiai

Mėginiai tyrimams, siekiant gauti kiek galima pilnesnę informaciją, buvo imami skirtingose Lietuvos vietose – santykiniai išskirtose kaip Lietuvos šiaurės rytai, rytai–pietryčiai ir Žemaitija. Tirta: plačiažnypliai vėžiai (*Astacus astacus*) (iš visų trijų regionų), rainuotieji vėžiai (*Faxonius limosus*), siauražnypliai vėžiai (*Pontastacus leptodactylus*) (tik iš šiaurės rytų ir rytų–pietryčių), žymėtieji vėžiai (*Pacifastacus leniusculus*) (tik iš rytų–pietryčių) (Asveja, Vilnius). Ne visos rūšys iš šių regionų surinktos dėl vėžių paplitimo ypatumų – šiaurės rytinėje dalyje ir Žemaitijoje nežinomos žymėtųjų vėžių populiacijos, taip pat Žemaitijoje nepavyko rasti siauražnyplių vėžių. Sugauti vėžiai buvo atvežami gyvi, laboratorijoje užmigdomi ir iš karto preparuojami. Tyrimams medžiaga buvo imama iš kepenų bei raumenų. Tokį pasirinkimą nulėmė tai, kad tiek virškinamajame trakte, tiek ir ant vėžio kiauto ar žiaunų gali būti daugybė bakterijų ir mikroskopinių grybų, nesusijusių su vėžių ligomis. O vėžiams susirgus dažniausiai yra pažeidžiamos kepenys ir raumenys.



1 pav. Mėginių ėmimo vietos

Mikroskopinių grybų išskyrimas ir identifikavimas

Mikroskopiniams grybams iš vėžių raumenų ir kepenų audinių išskirti buvo naudojamos 4 mitybinės terpės. 1 – IM terpė (mielių ekstraktas – 1,0 g, gliukozė – 5,0 g, oksalo rūgštis – 10 mg, penicilinas G – 1,0 g, agaras – 12,0 g, ežero vanduo – 1000 ml) (Makkonen, 2013); 2 – Bulvių dekstozės agaras (Liofilchem, Italija) papildytas ampicilinu 1 g l^{-1} ir oksalo rūgštimi 1 g l^{-1} ; 3 – Bengalo rožinio agaras (Liofilchem, Italija) papildytas ampicilinu $0,01 \text{ g l}^{-1}$ ir oksalo rūgštimi $0,01 \text{ g l}^{-1}$; 4 – terpė su susmulkintu vėžiu (vėžio masė – 20 g; penicilinas G – 1,0 g; oksalo rūgštis – 0,5 g, agaras – 20 g, ežero vanduo – 1000 mL). Visoms terpėms gaminti buvo naudojamas ežero vanduo.

Prieš preparuojant vėžiai buvo šaldomi -20°C temperatūroje 1 val. Vėžių paviršiaus dezinfekavimui, vėžiai buvo nardinami į 70 % etanolį 1–2 minutėms, vėliau nuplaunami steriliu fiziologiniu tirpalu (0,85% NaCl). Vėžių raumenys ir kepenys aseptiškai preparuojami steriliose lėkštelėse ir maždaug 16 mm^2 kiekvieno audinio fragmentai buvo talpinami į Petri lėkšteles su skirtingomis mitybinėmis terpėmis. Petri lėkštelės buvo inkubuojamos termostate $17 \pm 1^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 14 dienų. Išaugusios mikroskopinių grybų kolonijos gryninamos ir saugomos mėgintuvėliuose salyklo ekstrakto (salyklo ekstraktas – 20 g, gliukozė – 20 g, peptonas – 1 g, cinko sulfato heptahidratas – 0,01 g, vario sulfato pentahidratas – 0,005 g, agaras – 20 g, distiliuotas vanduo – 1000 mL) (Frisvad, 2011) terpėje, šaldytuve 4°C temperatūroje.

Mikroskopinių grybų išskyrimas iš vandens telkinių

Mikroskopiniai grybai iš vandens buvo išskiriami membraninių filtrų metodu. Tiriamas vanduo perfiltruojamas per $0,45 \mu\text{m}$ filtrą. Filtras dedamas ant bulvių dekstrozės agarą (Liofilchem, Italija) papildyto ampicilinu 1 g l^{-1} ir oksalo rūgštimi 1 g l^{-1} . Petri lėkštelės su filtrais inkubuojamos termostate $17 \pm 1^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 14 dienų. Išaugusios mikroskopinių grybų kolonijos gryninamos ir saugomos mėgintuvėliuose šaldytuve esant 4°C temperatūrai.

Mėginių paruošimas metagenominiams tyrimams

Vėžių kepenų ir raumenų audiniai (apie 1 g) buvo konservuojami specialiame skystyje. DNR buvo išskiriama naudojant ZymoBIOMICS®-96 MagBead DNR rinkinį (Zymo Research, Irvine, CA). DNR mėginiai buvo paruošiami tiksliniam sekos nustatymui naudojant Quick-16S/ITS™ NGS rinkinį (Zymo Research, Irvine, CA). Realus laiko PGR buvo atliekama naudojant Quick-16S™ V3-V4 ir ITS2 pradmenų rinkinius (Zymo Research, Irvine, CA).

Amplikonų bibliotekos buvo paruoštos ir sekvenuotos naudojant Illumina® NextSeq 2000™ platformą.

Mikroskopinių grybų mikromorfologijos nustatymas naudojant šviesinę mikroskopiją

Mikroskopiniai grybai buvo kultivuojami ant bulvių dekstrozės agaro 5-7 dienas esant $26 \pm 1^\circ\text{C}$ temperatūrai termostate. Praėjus nustatytam laikotarpiui buvo daromi mikroskopinių grybų preparatai. Lipni juostelė (2×2 cm) buvo priglaudžiama prie mikroskopinio grybo kultūros krašto ir dedama ant objektinio stiklelio su mikroskopavimo skysčiu, kurio sudėtis: etilo alkoholis, glicerinas ir distiliuotas vanduo santykiu 1:1:1. Mikroskopiniai grybai buvo stebimi LEICA DM750 (Leica, Vokietija) mikroskopu $\times 40$ objektyvu. Vaizdai tolimesnei analizei fiksuojami kamera Leica DFC450 (Leica, Vokietija). Stebimi hifai, susidariusios konidijos, jų forma bei dydis.

Mikroskopinių grybų, išskirtų iš raumenų ir kepenų audinių, DNR išskyrimas

Atsižvelgiant į mikroskopinių grybų izoliatų augimo ypatumus, dalis mikroskopinių grybų buvo kultivuojami skystose Sabūro dekstrozės (Liofilchem, Italija) ir bulvių dekstrozės (Liofilchem, Italija) terpėse, o likusi dalis ant agarizuotos bulvių dekstrozės mitybinės terpės. Optimali mikroskopinių grybų kultivavimo trukmė buvo nuo 5 iki 7 dienų: skystose terpėse aeruojant kratyklėje (Multi Bio RS-24, Latvija) $26 \pm 1^\circ\text{C}$, ant agarizuotos terpės kultivuojant termostate $26 \pm 1^\circ\text{C}$ temperatūrose. Mikroskopinių grybų DNR išskyrimui buvo naudojamas “ZR-Fungal/Bacterial DNA MiniPrep” (Zymo-Research, JAV) rinkinys. DNR išskyrimas buvo atliekamas pagal gamintojo pateiktą metodiką su nedidelėmis modifikacijomis. Tiriamo mikroskopinio grybo 100 mg dedama į mėgintuvėlį ir įpilama 750 μL lizuojančio buferio. Mėgintuvėlis gerai užsukamas ir ląstelės suardomos homogenizatoriumi Precellys-24 (Prancūzija) naudojant ciklą: $5000 \times g - 2$ kartus, su 20 sekundžių pertrauka. Po homogenizavimo, mėgintuvėliai centrifuguojami naudojant centrifugą Sigma 2-16PK (Vokietija) esant $10\,000 \times g - 1$ minutę. Susidaręs lizatas (400 μL) pilamas į specialų Zymo-Spin™ IV mėgintuvėlį su filtru, kuris yra patalpinamas į surinkimo mėgintuvėlį. Centrifuguojama esant $7\,000 \times g - 1$ minutę, į susidariusį filtratą pilama 1200 μL surišimo buferio. 800 μL šio mišinio perpilama į Zymo-Spin™ IIC kolonėlę kuri įdedama į naują surinkimo mėgintuvėlį ir centrifuguojama esant $10\,000 \times g^{-1}$ minutę. Susidaręs skystis išpilamas ir procedūra pakartojama. Į Zymo-Spin™ IIC kolonėlę pilama 200 μL pirminio plovimo buferio ir centrifuguojama esant $10\,000 \times g - 1$ minutę. Tuomet į Zymo-Spin™ IIC kolonėlę pilama 500

μL plovimo buferio, centrifuguojama esant $10\,000 \times g$ – 1 minutę. Aukščiau minėti plovimo etapai kartojami du kartus. Kolonėlė Zymo-Spin™ IIC perkeliama į švarų 1,5 mL mėgintuvėlį. Tiesiogiai ant kolonėlės matricos užpilama 100 μL išplovimo buferio, centrifuguojama esant $10\,000 \times g$ – 30 sekundžių.

Kokybinė ir kiekybinė DNR analizė

Išgryninus DNR visada reikia patikrinti švarumą ir koncentraciją. Išgautos DNR koncentracija ir švarumas buvo analizuojamas matuojant DNR tirpalo sugertį esant 280 nm bangos ilgiui, kurią lemia baltymai ir sugertis ties 260 nm, naudojant spektrofotometrą (Implen, Vokietija).

Mikroskopinių grybų taikinių DNR sekų pagausinimas PGR metodu

Mikroskopinių grybų genčiai ir (ar) rūšiai nustatyti buvo pasirinkta analizuoti ITS regiono sekas, nes jos yra naudojamos daugelyje taksonominių ir rūšių nustatymo tyrimuose, jos yra priimtose kaip oficialus grybų DNR analizavimo metodas (Shoch et al., 2012). Mikroskopinių grybų rūšinės priklausomybės nustatymas buvo atliktas polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu. PGR buvo atlikta naudojant ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') ir ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') pradmenis (White et al., 1990). Amplifikaciniame mėgintuvėlyje buvo paruoštas reakcijos mišinys (25 μL): KAPATaq Ready-Mix (KAPABiosystems, JAV) mišinio 12,5 μL , po 1 μL kiekvieno ITS4 ir ITS5 pradmens, 9,5 μL dist. H_2O bei 1 μL mikroskopinio grybo DNR. PGR reakcija buvo vykdoma naudojant Techne TC-5000 termociklerį (Bibby Scientific Ltd, JK). Amplifikacija buvo atliekama pradiniu DNR denatūravimu 95°C temperatūroje 2 minutes. Po to sekė 35 padauginimo ciklai: denatūracija – 30 sekundžių 95°C temperatūroje; pradmenų prilydimas – 30 sekundžių 55°C temperatūroje; polimerizacija – 1 minutę 72°C temperatūroje. Galutinis sintezės etapas – 10 minučių 72°C temperatūroje. PGR metu gauti produktai buvo analizuojami vykdant elektroforezę 0,7% agarozės gelyje, į kurią buvo įpilta 2 μL Midori Green Advance (Nippon Genetics, Vokietija) dažo. Suformavus šulinėlius į juos supilama: DNR dydžio standartas – ZR 50 bp DNA (Zymo-Research, JAV), amplifikacijos mišinys su DNR, teigiama ir neigiama kontrolės. Elektroforezė vykdoma 30 minučių 80 V įtampoje. Baigus elektroforezę gelis buvo perkeliamas ant UV transluminatoriaus ekrano ir analizuojamas. Gelis fotografuojamas išmaniojo telefono iPhone 14 Pro 48MP kamera PGR produktai buvo valomi naudojant egzonukleazę I (Thermo Scientific, JAV) ir šarminę fosfatazę (Thermo Scientific, JAV) pagal Stepien et al., (2019) metodiką.

Išvalyti PGR produktai siunčiami sekvenavimui į BaseClear B.V. (Leidenas, Nyderlandai). Gautos sekos buvo redaguojamos naudojant BioEdit programą, versija 7.0.5.3. Norint nustatyti rūšį, sekos (fragmento dydis ~500 bp) buvo palygintos su viešai prieinama duomenų baze MycoBank (https://www.mycobank.org/Pairwise_alignment) internetiniame puslapyje (žiūrėta 2024-08-30). Sekos buvo laikomos priklausančiomis tai pačiai rūšiai, jei jos rodė bent 99% panašumą.

Mėginių paruošimas sekoskaitai ir bioinformatinė analizė

PGR produktai buvo valomi naudojant egzonukleazę I (Thermo Scientific, JAV) ir šarminę fosfatazę (Thermo Scientific, JAV) pagal Stepien et al., 2019 metodiką. Išvalyti PGR produktai siunčiami sekvenavimui į BaseClear B.V. (Leidenas, Nyderlandai).

Gavus rezultatus, kiekvieno mikroskopinio grybo DNR seka buvo analizuojama, naudojant DNR LaserGene SeqMan Pro (DNASTAR, Madisonas, JAV) programinę įrangą. Sekos buvo sujungiamos, analizuojamos naudojant MEGA 11 su Cluscal W numatytais parametrais (Tamura et al., 2021) ir pateiktos filogenetinei analizei.

Kamienai buvo identifikuoti naudojant BLASTn paiešką ir atliekant MEGABLAST nr/nt algoritmą NCBI duomenų bazėje (National Center for Biotechnology Information database: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Genčiai ir (ar) rūšiai nustatyti buvo atsižvelgta į turimos sekos identiškumą referentinei sekai (98–100 %), E reikšmę (tikėtina reikšmė) ($<e^{-50}$) ir referentinės sekos padengimą ($> 98\%$).

Mikroskopinių grybų filogenetinė analizė

Filogenetinė mikroskopinių grybų analizė buvo paremta didžiausio tikėtimumo (ML) metodu. ITS geno analizei evoliucinis metodas buvo parenkamas automatiškai, MEGA 11 programos. Didžiausio tikėtimumo medžiai buvo sudaryti naudojant 1000 iteracijų (angl. bootstrap) su numatytais parametrais, siekiant parodyti ir (ar) įrodyti gautų mikroskopinių grybų panašumą. Šiame tyrime naudotos reprezentatyvios sekos buvo atsisiųstos iš NCBI duomenų bazės (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, žiūrėta 2025-02-20). ITS sekų visiems mikroskopiniams grybams evoliucijos istorija buvo nustatyta taikant Kimura 2 – parametrinį modelį (Kimura, 1980).

Mikroskopinių grybų, išskirtų iš vėžių audinių, patogeniškumo vėžiams įvertinimas

Tyrimai buvo atlikti su keturiomis mikroskopinių grybų padermėmis išskirtomis iš plačiažnyplių vėžių kepenų (*Phoma herbarum*) ir raumenų (*Fusarium avenaceum*, *Phoma macrospora*) bei rainuotųjų vėžių raumenų (*Fusarium equiseti*) audinių modelinėmis sąlygomis su visomis vėžių rūšimis. Buvo tirti plačiažnypliai, siauražnypliai, žymėtieji ir rainuotieji vėžiai buvo sugauti įvairiuose Lietuvos vandens telkiniuose. Kiekvienos rūšies vėžių buvo tirta po 10 individų.

Tyrimams reikalingai infekcinei medžiagai gauti, mikroskopiniai grybai buvo auginami ant bulvių dektrozės agarų terpės (PDA, Liofilchem, Italija) 7 paras termostate, esant $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ temperatūrai. Fiziologiniame tirpale buvo paruošiamos mikroskopinių grybų suspensijos, kurių koncentracija buvo 10^6 KSV/ml. Kiekvienam vėžiui buvo suleista po 0,5 ml šviežiai paruoštos mikroskopinių grybų suspensijos. Kontrolė – sterilus fiziologinis tirpalas (0,5 ml). Skirtingomis mikroskopinių grybų suspensijomis užkrėsti vėžiai buvo laikomi atskiruose 10 L talpos akvariumuose. Vėžiui nugaišus jie buvo sveriami, preparuojami, fiksuojami jų vidaus organų morfologiniai pakitimai ir atsėjami jų raumenų ir kepenų audiniai ant PDA agarų terpės.

Patogeninių bakterijų analizė

Patogeninių bakterijų analizė atlikta remiantis metogenominių tyrimų rezultatais.

Sukeliamų ligų anamnezės tyrimas

Buvo parenkami panašaus svorio vėžiai (26–36 g). Vėžiai buvo sužymimi vandeniui atspariu markeriu. Žymėjimas naudotas tam, kad stebėjimuose būtų galima nustatyti kuris iš vėžių stebimas. Sužymėti ir pasverti vėžiai buvo po 4 vienetus suleidžiami į 5 akvariumus. Akvariumuose vanduo buvo aeruojamas, vanduo viso eksperimentu metu nebuvo keičiamas. Po suleidimo į akvariumus, buvo paliekami parai laiko priprasti prie pasikeitusių sąlygų. Po paros buvo suleidžiama po 0,1 ml potencialaus patogeno. Injekcija buvo daroma į antrojo pilvo narelio šoną. Kontroliniam variantui buvo suleidžiama po 0,1 ml fiziologinio tirpalo. Bandytas buvo kartojamas 3 kartus.

Vėliau vėžiai buvo nuolat filmuojami. Nufilmuota medžiaga buvo peržiūrima ir aprašoma ligos eiga. Ligos eiga aprašoma skaičiuojant laiką nuo ligos pradžios iki žuvimo (arba eksperimento pabaigos). Taip pat aprašomi pasireiškiantys požymiai.

Sekančiame tyrimų etape, skirtingai nuo pirmojo etapo, buvo nuolatinis vandens pratekėjimas. Eksperimentų metu buvo natūralus fotoperiodizmas. Eksperimentas baseinuose užtruko 100 dienų.

Įvertinant išgyvenamumą buvo naudojamas Kaplano-Mejerio metodas:

$$S(t) = p_1 \cdot p_2 \cdot p_3 \cdot \dots \cdot p_t,$$

$$p_i = (r_i - d_i) : r_i$$

kur p_1 – dalis išgyvenusi pirmą periodą, p_2 – dalis išgyvenusi antrą periodą ir t.t.: r_i – gyvų individų skaičius periodo pradžioje, d_i – mirusių skaičius periodu i .

Nustačius labiausiai patogenišką užkratą, buvo atliktas bandymas siekiant nustatyti letalias užkrato koncentracijas. Jo metu vėžiai buvo užkrečiami skirtingos koncentracijos tirpalu – nuo 10^6 iki 10^1 ląst./ml. Vėžiams kritus buvo nustatomi pažeidimai, taip pat ar užkratas buvo pagrindinė žuvimo priežastis.



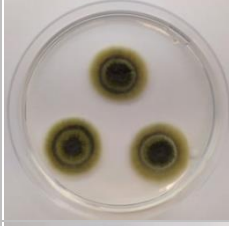
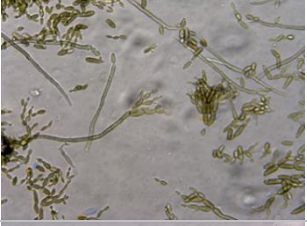
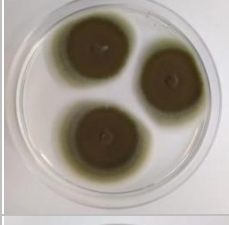
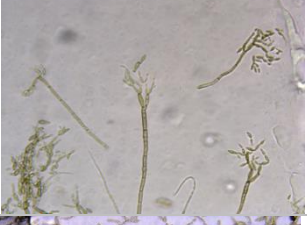
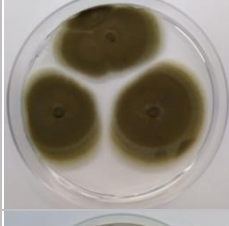
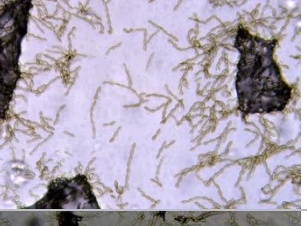

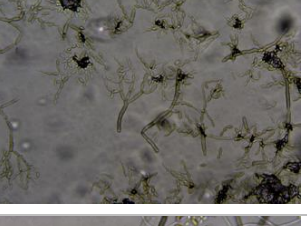


Statistiniai kitų duomenų analizei naudota regresinė analizė, Stjudento kriterijus.

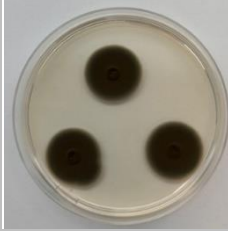
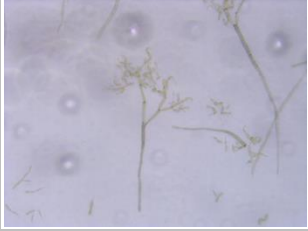
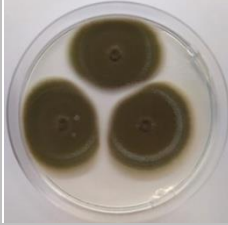

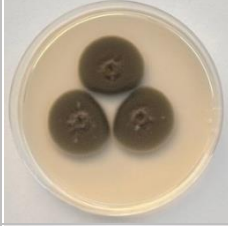
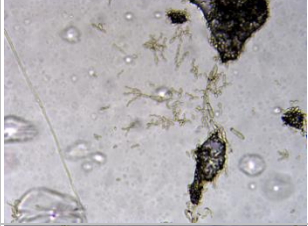
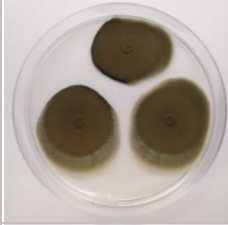

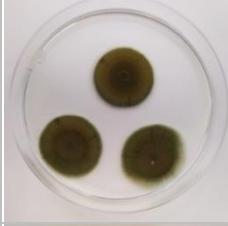

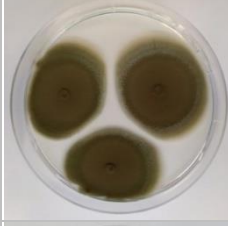

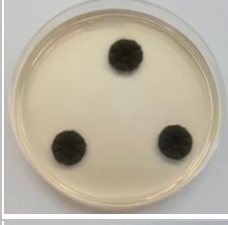

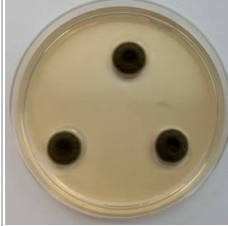
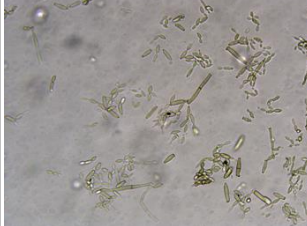
Rezultatai

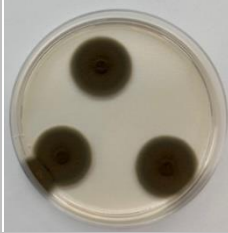

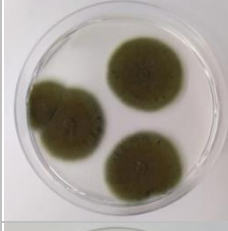

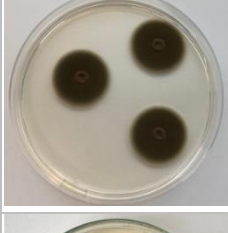
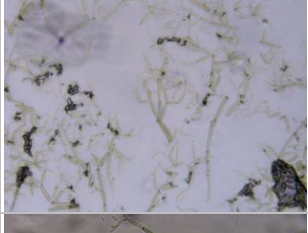
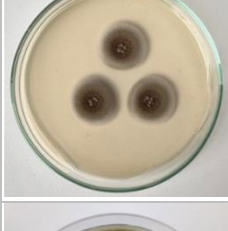

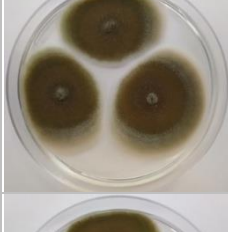
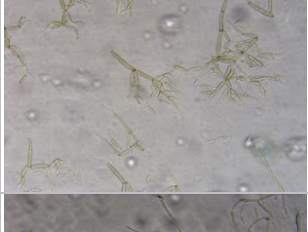
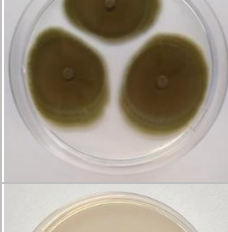
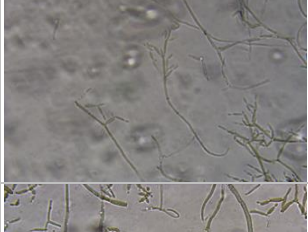
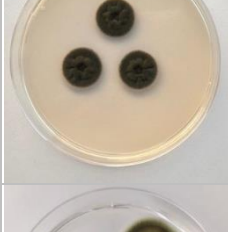


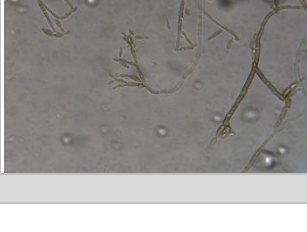
Mikroskopinių grybų mikromorfologijos tyrimas šviesinę mikroskopiją


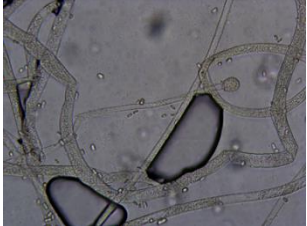
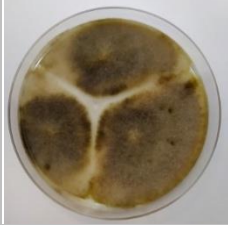







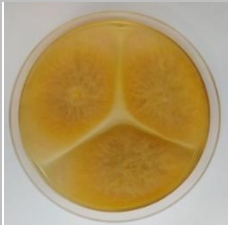
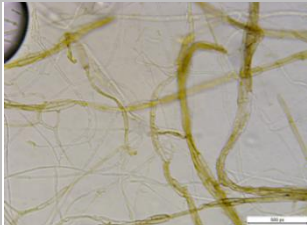


Buvo tirti visų išskirtų mikroskopinių grybų izoliatų makro ir mikro morfologiniai požymiai: hifų septuotumas, formuojamos struktūros (konidioforų šakotumas, sporų forma ir išsidėstymas), kolonijų spalva (1 lentelė).

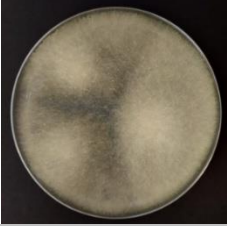



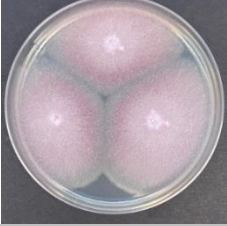


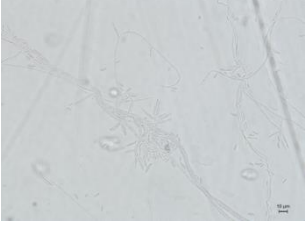
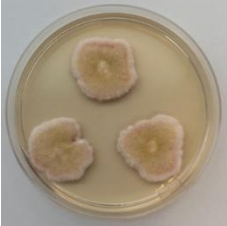


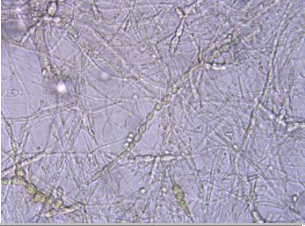




1 lentelė. Mikroskopinių grybų izoliatų makro ir mikro morfologiniai požymiai. Terpė bulvių dekstrozės agaras. Skalė – 10 μm


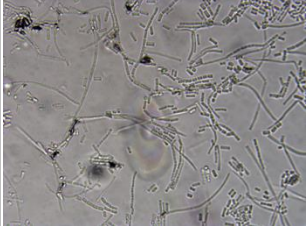
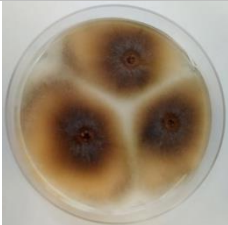
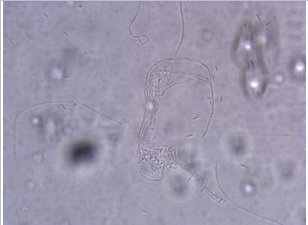

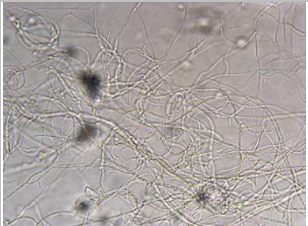



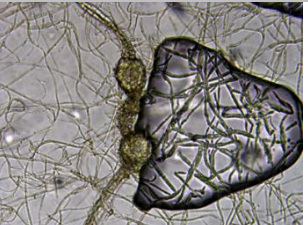
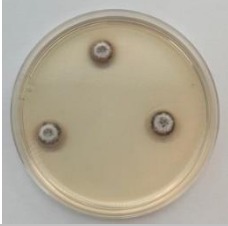
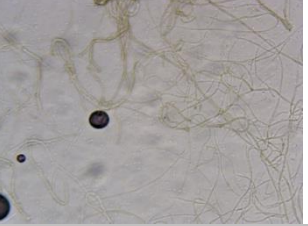
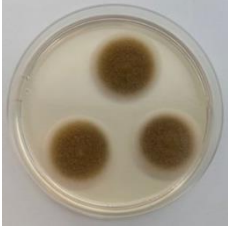
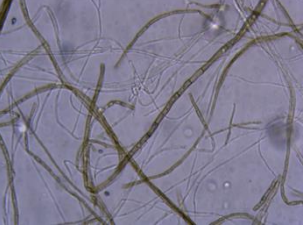
Mikroskopinių grybų rūšis, suteiktas identifikacinis numeris	Vėžio rūšis, išskyrimo vieta	Kolonijos spalva	Makromorfologiniai požymiai	Mikromorfologiniai požymiai
<i>Cladosporium</i> genties atstovai				
<i>Cladosporium allacinum</i> , G-229	Žymėtasis vėžys, kepenys	Tamsiai žalia		
<i>Cladosporium allacinum</i> , G-230	Siauriažnyplis vėžys, raumuo	Tamsios, šviesios žalios mišinys		
<i>Cladosporium cladosporioides</i> , G-225	Rainuotasis vėžys, kepenys	Tamsios, šviesios žalios mišinys		
<i>Cladosporium cladosporioides</i> , G-226	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Tamsios, šviesios žalios mišinys		
<i>Cladosporium cladosporioides</i> , G-227	Rainuotasis vėžys, raumuo	Tamsiai žalia		
<i>Cladosporium herbarum</i> , G-228	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Pilkšvai žalia		

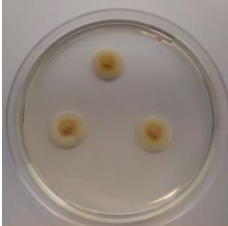
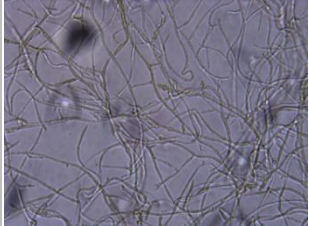

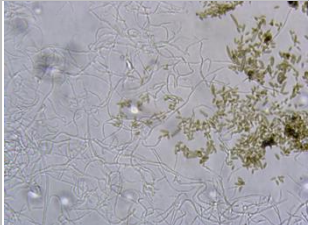
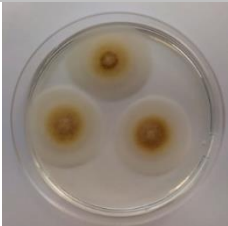


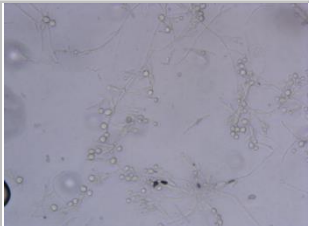

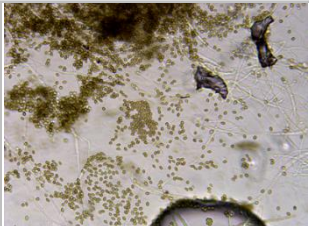
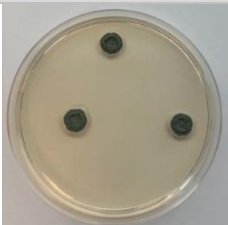

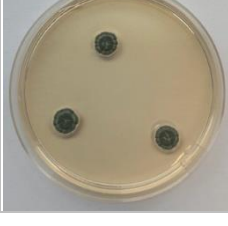

Mikroskopinių grybų rūšis, suteiktas identifikacinis numeris	Vėžio rūšis, išskyrimo vieta	Kolonijos spalva	Makromorfologiniai požymiai	Mikromorfologiniai požymiai
<i>Cladosporium</i> sp., G-233	Rainuotasis vėžys, kepenys	Tamsiai žalia		
<i>Cladosporium</i> sp., G-234	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Žalia		
<i>Cladosporium</i> sp., G-235	Rainuotasis vėžys, kepenys	Žalia		
<i>Cladosporium</i> sp., G-236	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Tamsiai žalia		
<i>Cladosporium</i> sp., G-237	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Žalia		
<i>Cladosporium</i> sp., G-238	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Žalia		
<i>Cladosporium</i> sp., G-240	Žymėtasis vėžys, kepenys	Tamsiai žalia		
<i>Cladosporium</i> sp., G-241	Siauriažnyplis vėžys, raumuo	Tamsiai žalia		

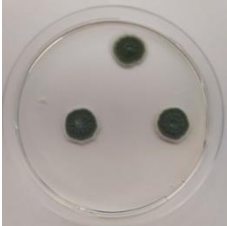
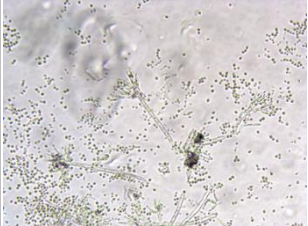
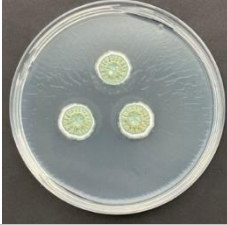
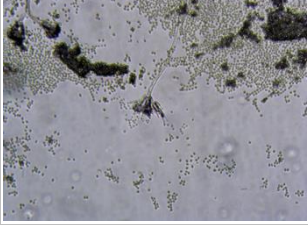
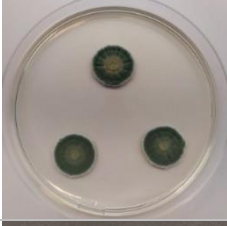
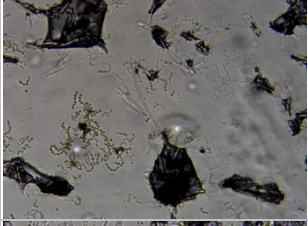
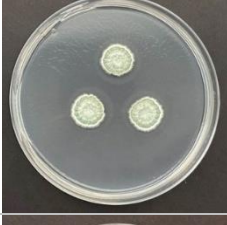
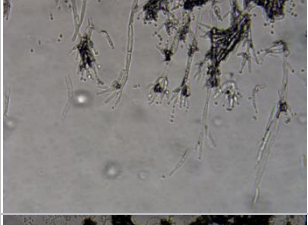



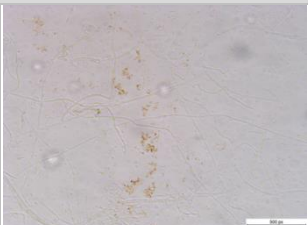
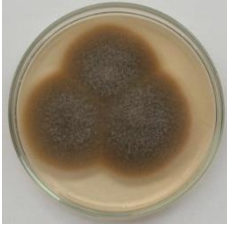

Mikroskopinių grybų rūšis, suteiktas identifikacinis numeris	Vėžio rūšis, išskyrimo vieta	Kolonijos spalva	Makromorfologiniai požymiai	Mikromorfologiniai požymiai
<i>Cladosporium</i> sp., G-242	Rainuotasis vėžys, raumuo	Tamsiai žalia		
<i>Cladosporium</i> sp., G-243	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Šviesi, sodri žalia		
<i>Cladosporium</i> sp., G-244	Siauriažnyplis vėžys, kepenys	Tamsiai žalia		
<i>Cladosporium</i> sp., G-245	Žymėtasis vėžys, kepenys	Pilkšvai balta ir žalsva		
<i>Cladosporium</i> sp., G-246	Siauriažnyplis vėžys, raumuo	Žalia		
<i>Cladosporium</i> sp., G-247	Rainuotasis vėžys, raumuo	Sodriai žalia		
<i>Cladosporium variabile</i> , G-231	Rainuotasis vėžys, kepenys	Tamsiai žalia		
<i>Cladosporium variabile</i> , G-232	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Šviesiai ir tamsiai žalia		
<i>Comoclathris typhicola</i>				

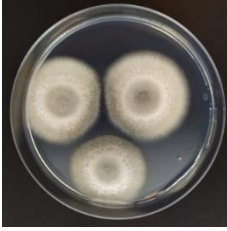
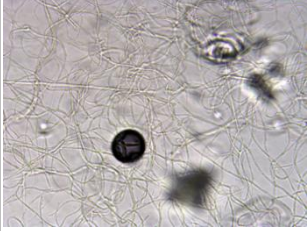

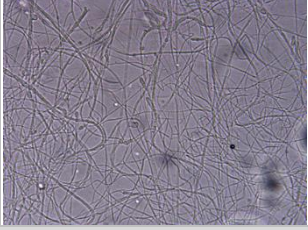
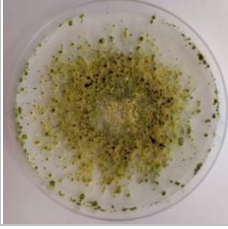
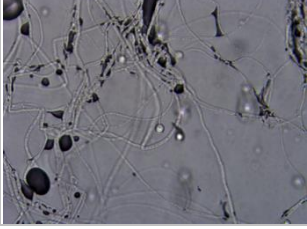
Mikroskopinių grybų rūšis, suteiktas identifikacinis numeris	Vėžio rūšis, išskyrimo vieta	Kolonijos spalva	Makromorfologiniai požymiai	Mikromorfologiniai požymiai
<i>Comoclathris typhicola</i> , G-269	Žymėtasis vėžys, kepenys	Pilkšvai balta		
<i>Didymella genties atstovai</i>				
<i>Didymella chlamydospora</i> , G-263	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Žalsvai ruda		
<i>Didymella chlamydospora</i> , G-264	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Žalsvai ruda		
<i>Didymella</i> sp., G-266	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Balkšva su rudomis dėmelėmis		
<i>Didymocyrtis pini</i>				
<i>Didymocyrtis pini</i> , G-280	Žymėtasis vėžys, kepenys	Balkšva		
<i>Epicoccum tritici</i>				
<i>Epicoccum tritici</i> , G-287	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Gelsvai oranžinė		
<i>Fusarium genties atstovai</i>				
<i>Fusarium avenaceum</i> , G-249	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Šviesiai rožinė su geltona		

Mikroskopinių grybų rūšis, suteiktas identifikacinis numeris	Vėžio rūšis, išskyrimo vieta	Kolonijos spalva	Makromorfologiniai požymiai	Mikromorfologiniai požymiai
<i>Fusarium equiseti</i> , G-252	Rainuotasis vėžys, raumuo	Pilkšva		
<i>Fusarium foetens</i> , G-253	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Rožinė		
<i>Fusarium foetens</i> , G-254	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Rožinė		
<i>Fusarium foetens</i> , G-255	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Rožinė		
<i>Fusarium</i> sp., G-248	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Gelsvai rožinė		
<i>Fusarium sporotrichioides</i> , G-250	Žymėtasis vėžys, raumuo	Šviesiai ruda, balta		
<i>Fusarium sporotrichioides</i> , G-251	Žymėtasis vėžys, kepenys	Ruda su šviesiu atspalviu		
Geotrichum genties atstovai				
<i>Geotrichum candidum</i> G-275	Siauriažnyplis vėžys, kepenys	Balta		

Mikroskopinių grybų rūšis, suteiktas identifikacinis numeris	Vėžio rūšis, išskyrimo vieta	Kolonijos spalva	Makromorfologiniai požymiai	Mikromorfologiniai požymiai
<i>Geotrichum</i> sp., G-276	Rainuotasis vėžys, raumuo	Balta		
<i>Microdochium bolleyi</i> <i>Microdochium bolleyi</i> , G-279	Žymėtasis vėžys, kepenys	Tamsiai ir šviesiai ruda		
<i>Mucor hiemalis</i> <i>Mucor hiemalis</i> , G-270	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Balkšva		
<i>Neocucurbitaria genties atstovai</i> <i>Neocucurbitaria cava</i> , G-272	Siauriažnyplis vėžys, kepenys	Ruda su šviesiais atspalviais		
<i>Neocucurbitaria cava</i> , G-273	Rainuotasis vėžys, raumuo	Ruda su šviesiais atspalviais		
<i>Neocucurbitaria cava</i> , G-274	Rainuotasis vėžys, raumuo	Ruda su šviesiais atspalviais		
<i>Neodidymelliopsis negundinis</i> <i>Neodidymelliopsis</i> sp., G-285	Rainuotasis vėžys, raumuo	Ruda		
<i>Neosetophoma</i> sp.				

Mikroskopinių grybų rūšis, suteiktas identifikacinis numeris	Vėžio rūšis, išskyrimo vieta	Kolonijos spalva	Makromorfologiniai požymiai	Mikromorfologiniai požymiai
<i>Neosetophoma</i> sp., G-283	Rainuotasis vėžys, kepenys	Šviesiai ir sodriai geltona		
<i>Ophiognomonina intermedia</i> <i>Ophiognomonina intermedia</i> , G-277	Rainuotasis vėžys, raumuo	Smėlio spalvos		
<i>Paracamarosporium fagi</i> <i>Paracamarosporium fagi</i> , G-282	Žymėtasis vėžys, raumuo	Geltona ir šviesiai ruda		
<i>Paramyrothecium humicola</i> <i>Paramyrothecium humicola</i> , G-271	Rainuotasis vėžys, raumuo	Geltona ir balkšva		
<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i> <i>Paraphaeosphaeria neglecta</i> , G-278	Siauriažnyplis vėžys, kepenys	Gelsva		
<i>Penicillium bialowiezense</i> <i>Penicillium</i> sp., G-256	Siauriažnyplis vėžys, raumuo	Žalia		
<i>Penicillium</i> sp., G-257	Rainuotasis vėžys, kepenys	Žalia		

Mikroskopinių grybų rūšis, suteiktas identifikacinis numeris	Vėžio rūšis, išskyrimo vieta	Kolonijos spalva	Makromorfologiniai požymiai	Mikromorfologiniai požymiai
<i>Penicillium</i> sp., G-258	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Žalia		
<i>Penicillium</i> sp., G-259	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Žalia		
<i>Penicillium</i> sp., G-260	Rainuotasis vėžys, raumuo	Žalia		
<i>Penicillium</i> sp., G-261	Rainuotasis vėžys, raumuo	Žalia		
<i>Penicillium</i> sp., G-262	Rainuotasis vėžys, kepenys	Žalia		
Phoma genties atstovai				
<i>Phoma herbarum</i> , G-268	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Šviesiai ir tamsiai ruda		
<i>Phoma macrostoma</i> , G-265	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Tamsiai ruda		
<i>Septoriella pseudophragmitis</i>				

Mikroskopinių grybų rūšis, suteiktas identifikacinis numeris	Vėžio rūšis, išskyrimo vieta	Kolonijos spalva	Makromorfologiniai požymiai	Mikromorfologiniai požymiai
<i>Septoriella pseudophragmitis</i> , G-286	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Pilka		
<i>Tolypocladium sp.</i> <i>Tolypocladium sp.</i> , G-281	Žymėtasis vėžys, kepenys	Balta		
<i>Trichoderma sp.</i> <i>Trichoderma sp.</i> , G-284	Rainuotasis vėžys, raumuo	Šviesiai ir tamsiai žalia		

Analizuojant makro, mikro morfologinius požymius ir sekoskaitos rezultatus buvo identifikuotas 61 mikroskopinių grybų izoliatas (1 lentelė). Didžiausia identifikuotų mikroskopinių grybų grupė priklausė *Cladosporium* genčiai. Iš viso buvo išskirti ir identifikuoti 22 šiai genčiai priklausantys atstovai. Buvo identifikuoti 8 *Cladosporium* genties atstovai, kurie priklausė *Cladosporium allicinum* (G-229; G-230), *Cladosporium cladosporioides* (G-225; G-226; G-227), *Cladosporium herbarum* (G-228) ir *Cladosporium variable* (G-231; G-232) rūšims. Likę 14 izoliatų buvo priskirti *Cladosporium* genčiai. Šios genties grybai dažniausiai buvo randami vėžių raumenų audiniuose – 12 mėginių, o daugiausiai *Cladosporium* mikroskopinių grybų – 8 mėginiai, buvo išskirti iš plačiažnyplių vėžių. Buvo identifikuoti 8 *Fusarium* genčiai priklausantys mikroskopiniai grybai. Kai kuriuos *Fusarium* genties grybus pavyko priskirti tam tikrai rūšiai, tai: *Fusarium avenaceum* (G-249); *Fusarium equiseti* (G-252); *Fusarium foetens* (G-253; G-254; G-255) ir *Fusarium sporotrichioides* (G-250; G-251), tačiau vienas *Fusarium* genties atstovas (G-248) liko neidentifikuotas. Šios genties grybų daugiausiai buvo rasti raumenų audiniuose – 5 mėginiuose, o kepenų audiniuose *Fusarium* genties grybų rasta 3 mėginiuose. Dauguma šios genties mikroskopinių grybų buvo rasti plačiažnypliuose vėžiuose – 5 mėginiai, o raumenų audiniuose – 3 mėginiai. Iš tirtų mikroskopinių grybų izoliatų, *Penicillium* genčiai buvo priskirti 8 izoliatai (G-256 – G-262). Visi *Penicillium* genties mikroskopiniai grybai buvo identifikuoti tik iki genties, dėl ITS pradmenų universalumo ir mikromorfologinių tarprūšinių požymių panašumo. Daugiausia *Penicillium* genties grybų buvo

išskirta iš rainuotųjų vėžių – 4 mėginių. Tirtuose vėžių audiniuose *Penicillium* genties grybai pasiskirstė panašiai, 4 šios genties grybų atstovai buvo išskirti iš raumenų audinių, o 3 atstovai – iš kepenų audinių. Pagal makro ir mikro morfologinius požymius buvo nustatyta, kad 3 mikroskopinių izoliatai priklauso *Didymella* genčiai. Identifikuota *Didymella chlamydospora* rūšis, kuriai priskirti du izoliatai (G-263; G-264), o likęs izoliatas buvo identifikuotas tik iki *Didymella* genties (G-266). Buvo nustatytos 2 *Phoma* genties rūšys, kurios priklauso *Phoma herbarum* (G-268) ir *Phoma macrostoma* (G-265) rūšims. Šios dvi gentys buvo išskirtos tik iš plačiažnyplių vėžių audinių mėginių. Tyrimo metu buvo nustatyti 2 mikroskopinių grybų izoliatai priklausantys *Geotrichum* genčiai. *Geotrichum candidum* rūšiai pavyko priskirti izoliatą G-276, o likęs izoliatas (G-275) buvo priskirtas *Geotrichum* genčiai. Izoliatai (G-272; G-273; G-274) buvo priskirti *Neucucurbitaria cava* rūšiai. Taip pat nustatyti *Comoclathris typhicola* (G-269), *Didymocyrtis pini* (G-280) mikroskopiniai grybai iš žymėtųjų vėžių kepenų audinių. Tyrimo metu buvo identifikuoti ir *Epicoccum tritici* (G-287), *Microdochium bolleyi* (G-279) ir *Mucor hiemalis* (G-270), *Ophiognomonium intermedia* (G-277), *Paracamarosporium fagi* (G-282); *Paramyrothecium humicola* (G-271); *Paraphaeosphaeria neglecta* (G-278) bei *Septoriella pseudophragmitis* (G-286) mikroskopinių grybų rūšys. Likę izoliatai buvo priskirti tam tikrai genčiai: *Neodidymelliopsis* sp. (G-285), *Neosetophoma* sp. (G-283), *Typocladium* sp. (G-281) bei *Trichoderma* sp. (G-284).

Filogenetinių ryšių tarp identifikuotų mikroskopinių grybų nustatymas

Naudojant ITS regiono pradmenis buvo atliktas 89 mikroskopinių grybų molekulinis identifikavimas. Iš viso buvo identifikuotas 61 mikroskopinių grybų izoliatas (2 lentelė), kitų mikroskopinių grybų identifikuoti nepavyko dėl per trumpų sekų, netikslumų jose ar galimo užkrato. Identifikuoti mikroskopiniai grybai priklauso Ascomycota ir Mucoromycota skyriams. Ascomycota skyriuje identifikuoti šių klasių atstovai: Dothideomycetes; Sordariomycetes, Saccharomycetes, Eurotiomycetes, o Mucoromycota skyriuje vienas – Mucoromycetes klasės atstovas. Izoliatai, turintys 100 % tapatumą su referentine seka buvo lyginami su mikroskopinių grybų mikro bei makro morfologiniais požymiais, o turintys mažesnę < 100 % tapatumą iš karto buvo priskirti tam tikrai mikroskopinių grybų genčiai.

Mikroskopinių grybų izoliatų G-229 ir G-230 sutapimas su referentine *Cladosporium allacinum* seka buvo 100 %. (Bensch et al., 2018) (2 lentelė). Mikroskopinių grybų izoliatų (G-225, G-226 ir G-227), tapatumas *Cladosporium cladosporioides* rūšiai buvo įvertintas 100 % (Vu et al., 2019). Išskirto izoliato G-228 referentinė seka rodė 100 % tapatumą *Cladosporium herbarum* rūšiai (Scoch et al., 2014). Izoliatų G-231 ir G-232 rodė 100 % tapatumą

Cladosporium variabile referentinei sekai. Likę *Cladosporium* izoliatai (nuo G-233 iki G-247) rodė 99 % panašumą į daugiau nei į vieną šios genties rūšį, todėl šie kamieniai buvo priskirti *Cladosporium* genčiai (Paul et al., 2012). Izoliatas G-269 buvo priskirtas *Comoclathris typhicola* rūšiai, tapatumas šiai rūšiai nustatytas 100 % (Panno et al., 2013). Izoliatai G-263 ir G-264 turėjo 100% tapatumą su *Didymella chlamydospora* (Das et al., 2020) rūšimi, tačiau kiti izoliatai – G-266 ir G-267, buvo nustatyti iki *Didymella* genties (Valenzuela-Lopez et al., 2018), tapatumas buvo 99 % su daugiau nei viena *Didymella* genties rūšimi. Izoliatas G-280 turėjo 100 % tapatumą su referentine *Didymocyrtis pini* seka (Monteiro et al., 2020). Izoliatas G-287 turėjo 100 % tapatumą su tik *Epicoccum tritici* rūšimi (Thambugala et al., 2017). Izoliato G-249 tapatumas su *Fusarium avenaceum* buvo 100 % (Zhang et al., 2019), o G-253, G-254, G-255 izoliatų kamienų tapatumas su *Fusarium foetens* referentine seka buvo 100 % (Vu et al., 2019). Izoliatų G-250, G-251 nustatytas tapatumas su *Fusarium sporotrichioides* taip pat rodė 100 % (Błońska et al., 2021), tačiau izoliatą G-248 pavyko priskirti tik *Fusarium* genčiai, tapatumas šiai referentinei sekai buvo 98 % (Glynou et al., 2016). Izoliatai nuo G-256 iki G-262 buvo priskirti *Penicillium* genčiai, nes šie izoliatai turėjo 99 % panašumą į daugiau nei vieną šios genties rūšį (2 lentelė).

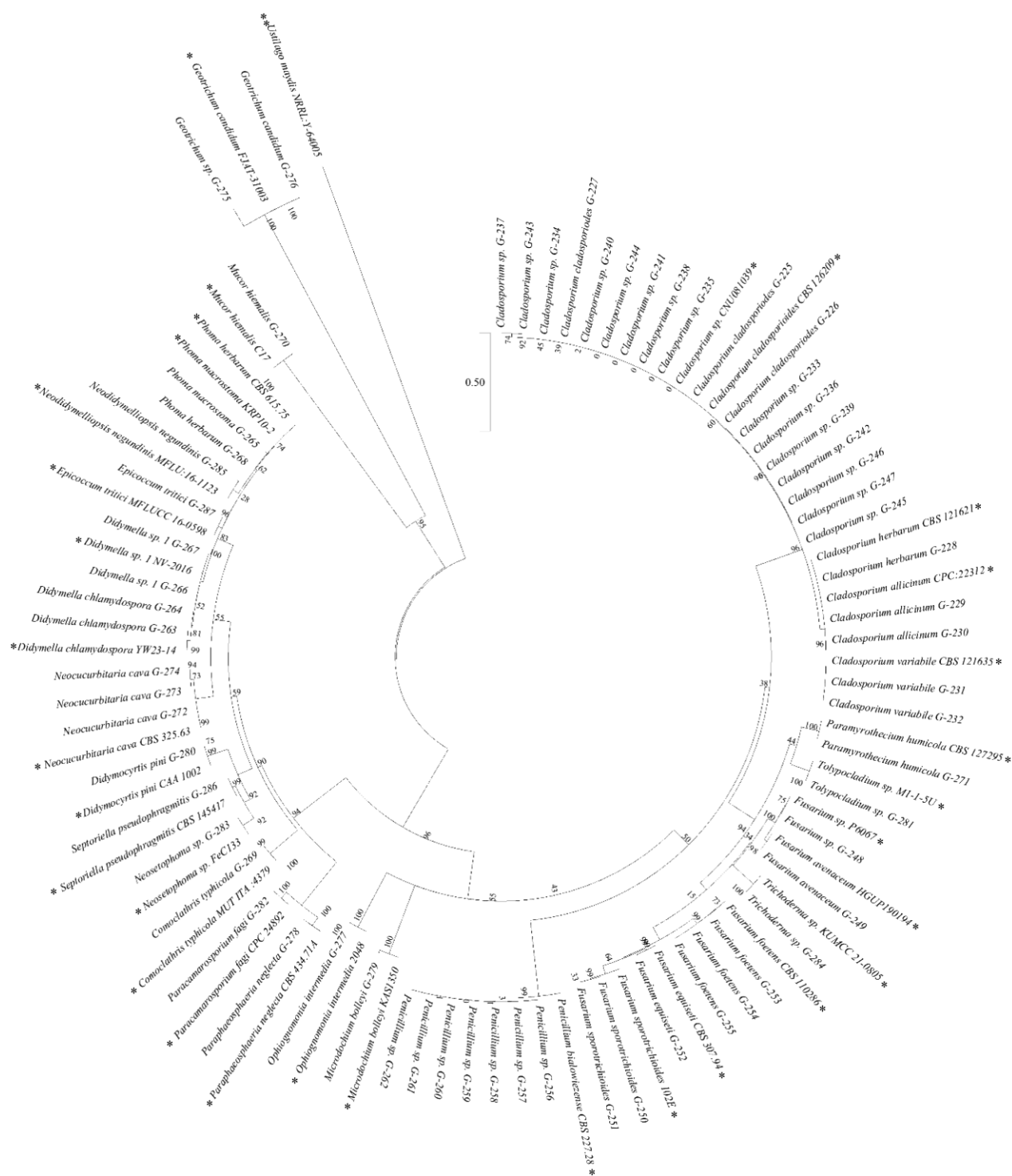
2 lentelė. Mikroskopinių grybų izoliatų, kurie buvo priskirti rūšims pagal referentines sekas, sąrašas. * žymi išorinės grupės seką.

Rūšis	Kamieno identifikacinis nr.	Vėžio rūšis	Šalis, kur buvo nustatytas kamienas	Tapatumas	Sekos numeris	Literatūra
<i>Cladosporium allcinum</i>	CPC:22312		Nyderlandai	100 %	MF472901	Bensch et al., 2018
<i>C. allcinum</i>	G-229	Žymėtasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>C. allcinum</i>	G-230	Siauriažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	CBS 126209		Nyderlandai	100 %	MH863979	Vu et al., 2019
<i>C. cladosporioides</i>	G-225	Rainuotasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>C. cladosporioides</i>	G-226	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>C. cladosporioides</i>	G-227	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium herbarum</i>	CBS 121621		Nyderlandai	100 %	OK445560	Schoch et al., 2014
<i>C. herbarum</i>	G-228	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	CNU081039		Pietų Korėja	99 %	KC339771	Paul et al., 2012
<i>Cladosporium sp.</i>	G-233	Rainuotasis vėžys, kepenys	Lietuva			Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-234	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-235	Rainuotasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-236	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-237	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-238	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-239	Siauriažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-240	Žymėtasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-241	Siauriažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-242	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-243	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-244	Siauriažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-245	Žymėtasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-246	Siauriažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Cladosporium sp.</i>	G-247	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas

Rūšis	Kamieno identifikacinis nr.	Vėžio rūšis	Šalis, kur buvo nustatytas kamienas	Tapatumas	Sekos numeris	Literatūra
<i>Cladosporium variabile</i>	CBS 121635		Nyderlandai	100 %	MH863131	Vu et al., 2019
<i>C. variabile</i>	G-231	Rainuotasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>C. variabile</i>	G-232	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Comoclathris typhicola</i>	MUT<ITA>;4379		Italija	100 %	KC339229	Panno et al., 2013
<i>C. typhicola</i>	G-269	Žymėtasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Didymella chlamydospora</i>	YW23-14		Pietų Korėja	100 %	MK836111	Das et al., 2020
<i>D. chlamydospora</i>	G-263	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>D. chlamydospora</i>	G-264	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Didymella sp.</i>	1 NV-2016		Ispanija	100 %	LT592901	Valenzuela-Lopez et al., 2018
<i>Didymella sp.</i>	G-266	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Didymella sp.</i>	G-267	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Didymocyrtis pini</i>	CAA 1002		Portugalija	100 %	MW732246	Monteiro et al., 2020
<i>D. pini</i>	G-280	Žymėtasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Epicoccum tritici</i>	MFLUCC 16-0598		Tailandas	100 %	KX965723	Thambugala et al., 2017
<i>E. tritici</i>	G-287	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Fusarium avenaceum</i>	HGUP190194		Kinija	100 %	MZ724839	Zhang et al., 2019
<i>F. avenaceum</i>	G-249	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Fusarium equiseti</i>	CBS 307.94		Nyderlandai	100 %	MH862468	Vu et al. 2019
<i>F. equiseti</i>	G-252	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Fusarium foetens</i>	CBS 110286		Nyderlandai	100 %	NR_159865	Vu et al., 2019
<i>F. foetens</i>	G-253	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>F. foetens</i>	G-254	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>F. foetens</i>	G-255	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Fusarium sp.</i>	P6067		Vokietija		98 %	KT270260.1
<i>Fusarium sp.</i>	G-248	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva	+		Šis darbas
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	102E		Lenkija	100 %	MT732817	Błońska et al., 2021
<i>F. sporotrichioides</i>	G-250	Žymėtasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>F. sporotrichioides</i>	G-251	Žymėtasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Geotrichum candidum</i>	FJAT-31003		Kinija	99 %	MF044044	Xiao et al., 2018
<i>Geotrichum sp.</i>	G-275	Siauriažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Geotrichum sp.</i>	G-276	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Microdochium bolleyi</i>	KAS1350		Nyderlandai	100 %	KP859018	Hernández-Restrepo et al., 2016
<i>M. bolleyi</i>	G-279	Žymėtasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Mucor hiemalis</i>	C17		Ispanija	99 %	PP151176	Martínez-Álvarez et al., 2016
<i>Mucor hiemialis</i>	G-270	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Neocucurbitaria cava</i>	CBS 325.63		Nyderlandai	100 %	MH858303	Vu et al., 2019
<i>N. cava</i>	G-272	Siauriažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>N. cava</i>	G-273	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>N. cava</i>	G-274	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Neodidymelliopsis negundinis</i>	MFLU:16-1123		Italija	98 %	MT185531	Li et al., 2020
<i>Neodidymelliopsis sp.</i>	G-285	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Neosetophoma sp.</i>	FeC133		Lenkija	98 %	MW446977	Bilański & Kowalski, 2022
<i>Neosetophoma sp.</i>	G-283	Rainuotasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Ophiognomonina intermedia</i>	2048		Didžioji Britanija	100 %	DQ323540	Green & Castlebury,

Rūšis	Kamieno identifikacinis nr.	Vėžio rūšis	Šalis, kur buvo nustatytas kamienas	Tapatumas	Sekos numeris	Literatūra
						2007
<i>O. intermedia</i>	G-277	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Paracamarosporium fagi</i>	CPC 24892		Nyderlandai	100 %	KR611887	Crous et al., 2015
<i>P. fagi</i>	G-282	Žymėtasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Paramyrothecium humicola</i>	CBS 127295		Nyderlandai	100 %	MH864508	Vu et al., 2019
<i>P. humicola</i>	G-271	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>	CBS 434.71A		Nyderlandai	100 %	JX496090	Verkley et al., 2014
<i>P. neglecta</i>	G-278	Siauriažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Penicillium bialowiezense</i>	CBS 227.28		Nyderlandai		NR_165994	Vu et al., 2019
<i>Penicillium sp.</i>	G-256	Siauriažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Penicillium sp.</i>	G-257	Rainuotasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Penicillium sp.</i>	G-258	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva	100 %	+	Šis darbas
<i>Penicillium sp.</i>	G-259	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Penicillium sp.</i>	G-260	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Penicillium sp.</i>	G-261	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Penicillium sp.</i>	G-262	Rainuotasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Phoma herbarum</i>	CBS 615.75		Nyderlandai	100 %	KF251212	Quaedvlieg et al., 2013
<i>P. herbarum</i>	G-268	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Phoma macrostoma</i>	KRP10-2		Lietuva	99 %	HM036611	Menkis & Vasaitis, 2011
<i>P. macrostoma</i>	G-265	Plačiažnyplis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Septoriella pseudophragmitis</i>	CBS 145417		Nyderlandai	100 %	MK560161	Marin-Felix et al., 2019
<i>S. pseudophragmitis</i>	G-286	Plačiažnyplis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Tolypocladium sp.</i>	M1-1-5U		Lenkija	98 %	MN096582	Cometto et al., 2023
<i>Tolypocladium sp.</i>	G-281	Žymėtasis vėžys, kepenys	Lietuva		+	Šis darbas
<i>Trichoderma sp.</i>	KUMCC 21-0805		Kinija	100 %	ON426894	Liu et al., 2023
<i>Trichoderma sp.</i>	G-284	Rainuotasis vėžys, raumuo	Lietuva		+	Šis darbas
* <i>Ustilago maydis</i>	NRRL: Y-64005		JAV		OQ540480.1	Kijpomyongpan et al., 2024

Iš molekuliniais tyrimais identifikuoto 61 mikroskopinio grybo izoliato – 33 buvo apibūdinti iki rūšies ir turėjo 100 % tapatumą su referentinėmis sekomis. Daugiausiai apibūdintų rūšių priklausė *Cladosporium* ir *Fusarium* gentims. Kiti, 28 mikroskopinių grybų izoliatai buvo apibūdinti iki genties, nes turėjo mažesnę nei <99 % tapatumą referentinei sekai ir (ar) priklausė daugiau nei vienai rūšiai. Išanalizavus gautus sekoskaitos rezultatus, filogenetiniai ryšiai tarp išskirtų mikroskopinių grybų buvo tiriami su Mega 11 programa, sudaromas filogenetinis medis (2 pav.)

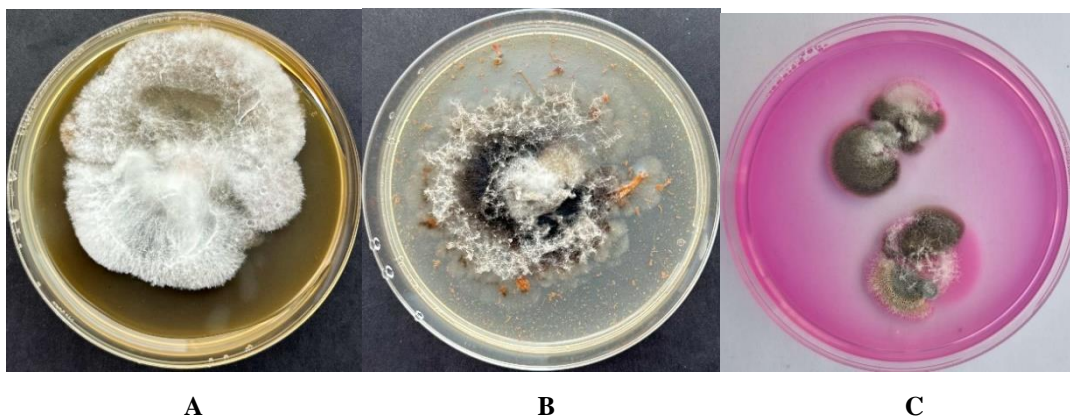


2 pav. Identifikuotų mikroskopinių grybų rūšių ir genčių filogenetinis medis, suformuotas remiantis ITS geno sekoskaita. Filogenetinis medis buvo braižomas naudojant maksimalaus tikėtimumo metodą ir naudojant Kimura-2 parametrinį modelį ir 1000 iteracijų (Kimura et al., 1980). Procentinis skaičius šalia šakų žymi taksonų panašumą. * – referentinė seka; ** – išorinė grupė

ITS regiono sekų analizė apėmė 96 nukleotidines sekas. Galutiniame duomenų rinkinyje iš viso buvo 536 nukleotidų ilgio sekos. Filogenetinėje analizėje naudotų kamienų identifikaciniai numeriai pateikti 2 lentelėje.

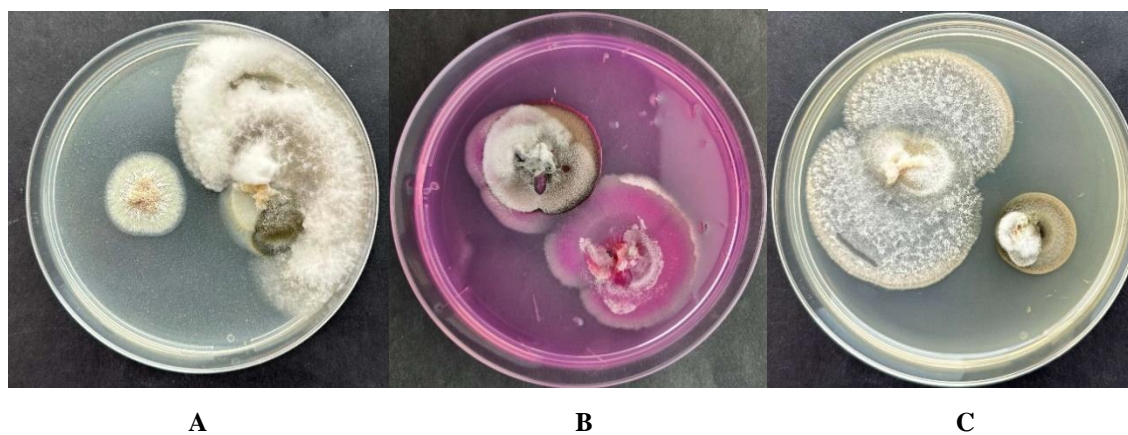
Mikroskopiniai grybai rasti vėžių raumenų ir kepenų audiniuose

Buvo tirti vėžiai iš įvairių Lietuvos vandens telkinių esančių skirtinguose regionuose (1 pav.). Iš tirtų vėžių buvo išskirta 70 mikroskopinių grybų padermių, 36 grybų padermės iš raumenų ir 34 – iš kepenų audinių. Mikroskopiniai grybai išskirti iš plačiažnyplių vėžių raumens audinių pateikiami 3 paveiksle.



3 pav. Mikroskopiniai grybai iš plačiažnyplio vėžio raumens audinių ant skirtingų mitybinių terpių: A – bulvių dekstrozės agaras, B – terpė su vėžio mase, C – bengalo rožinio agaras.

Mikroskopiniai grybai išskirti iš rainuotojo vėžio raumens audinių pateikiami 4 paveiksle.



4 pav. Mikroskopiniai grybai iš rainuotojo vėžio raumens audinių ant skirtingų mitybinių terpių: A – bulvių dekstrozės agaras, B – bengalo rožinio agaras, C – IM mitybinis agaras.

Mikroskopiniai grybai išskirti iš siauražnyplio vėžio raumens audinių pateikiami 5 paveiksle.



A

B

C

5 pav. Mikroskopiniai grybai iš siauražnyplio vėžio raumens audinių ant skirtingų mitybinių terpių: A – bulvių dekstrozės agaras, B – bengalo rožinio agaras, C – IM mitybinis agaras.

Mikroskopiniai grybai išskirti iš žymėtojo vėžio raumens audinių pateikiami 6 paveiksle.



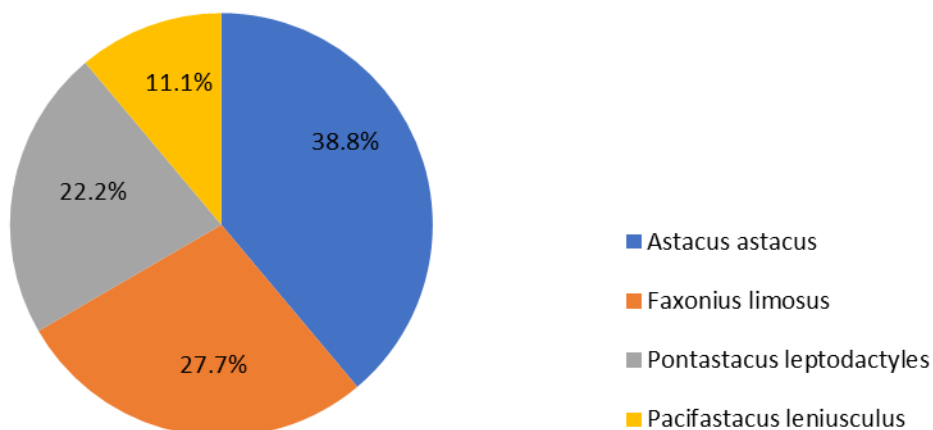
A

B

C

6 pav. Mikroskopiniai grybai iš žymėtojo vėžio raumens audinių ant skirtingų mitybinių terpių: A – terpė su vėžio mase, B – bulvių dekstrozės agaras, C – bengalo rožinio agaras.

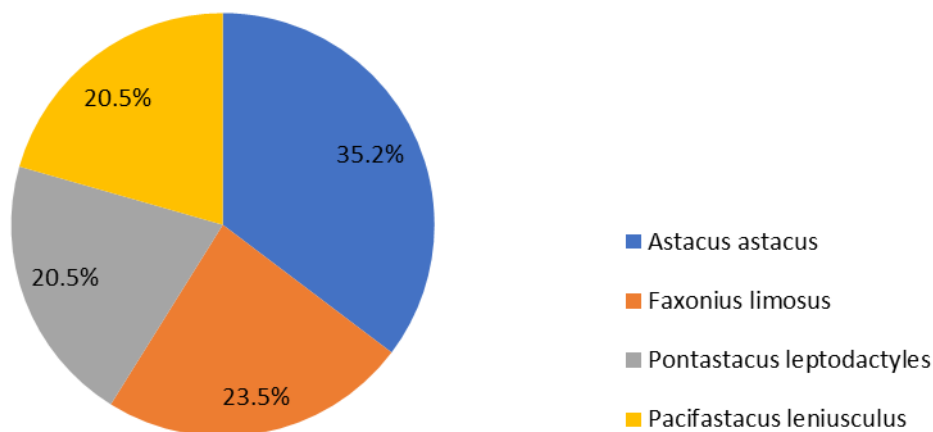
Daugiausiai grybų (38,8%) buvo aptikta plačiažnyplių vėžių raumenų audiniuose, mažiausiai grybų – žymėtųjų vėžių (11,1%) raumenų audiniuose (7 pav.).



7 pav. Mikroskopinių grybų paplitimas (%) tirtų vėžių raumenų audiniuose.

Literatūroje esama duomenų, apie Dragičević ir kt., (2020) mokslininkų atliktus tyrimus, kuriuose nurodoma, kad mikroskopiniai grybai buvo aptikti 11,8% tirtų vėžių raumenų audiniuose.

Daugiausiai grybų (35,2%) buvo aptikta plačiažnyplių vėžių kepenyse, mažiausiai grybų – žymėtųjų (20,5%) ir siauražnyplių (20,5%) vėžių kepenyse (8 pav.).

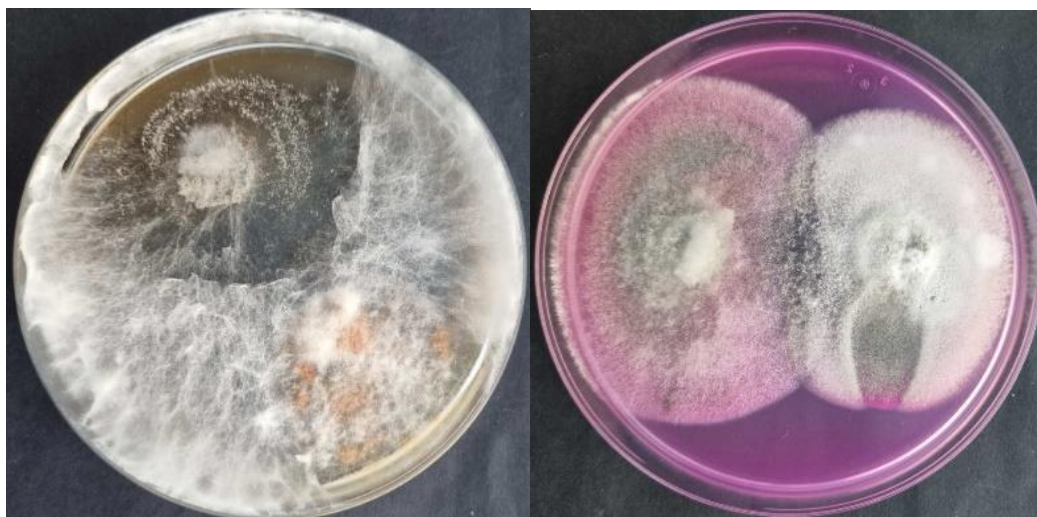


8 pav. Mikroskopinių grybų paplitimas (%) vėžių kepenų audiniuose.

Mikroskopiniai grybai išskirti iš tirtų vėžių kepenų audinių yra pateikiami 9–11 paveiksluose.



9 pav. Mikroskopiniai grybai iš rainuotojo vėžio kepenų audinių ant skirtingų mitybinių terpių: A – bulvių dekstrozės agaras, B – bengalo rožinio agaras, C – terpė su vėžio mase.



A

B

10 pav. Mikroskopiniai grybai iš žymėtojo vėžio kepenų audinių ant skirtingų mitybinių terpių: A – IM mitybinės terpės, B – bengalo rožinio agaras



A

B

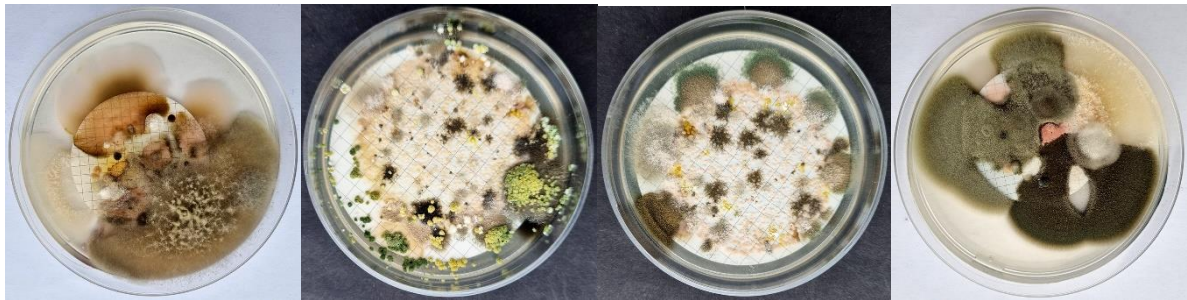
C

11 pav. Mikroskopiniai grybai iš siauražnyplio vėžio kepenų audinių ant skirtingų mitybinių terpių: A – IM mitybinės terpės, B – terpė su vėžio mase, C – bulvių dekstrozės agaras.

Infekuoti mikroskopiniais grybais vėžiai neturi ryškių ir išskirtinių klinikinių požymių, kurie akivaizdžiai skirtųsi nuo požymių, kuriuos sukelia virusinės ar bakterinės infekcijos. Mikroskopiniai grybai dažniausiai į vėžių organizmą patenka per žaizdas ir dažniausiai užkrečia egzoskeletą, ypač minkštąją kutikulą. Literatūroje esama duomenų apie tai, kad mikroskopiniai grybai dažnai yra išskiriami iš egzoskeleto (Dragičević ir kt., 2020). Įvairioms gentims priklausantys mikroskopiniai grybai buvo išskirti nuo *Procambarus clarkii* egzoskeleto (Dörr ir kt., 2012). Mikroskopiniai grybai taip pat gali sukelti antrines infekcijas sužeistiems ar imuniteto sutrikimų turintiems vėžiams.

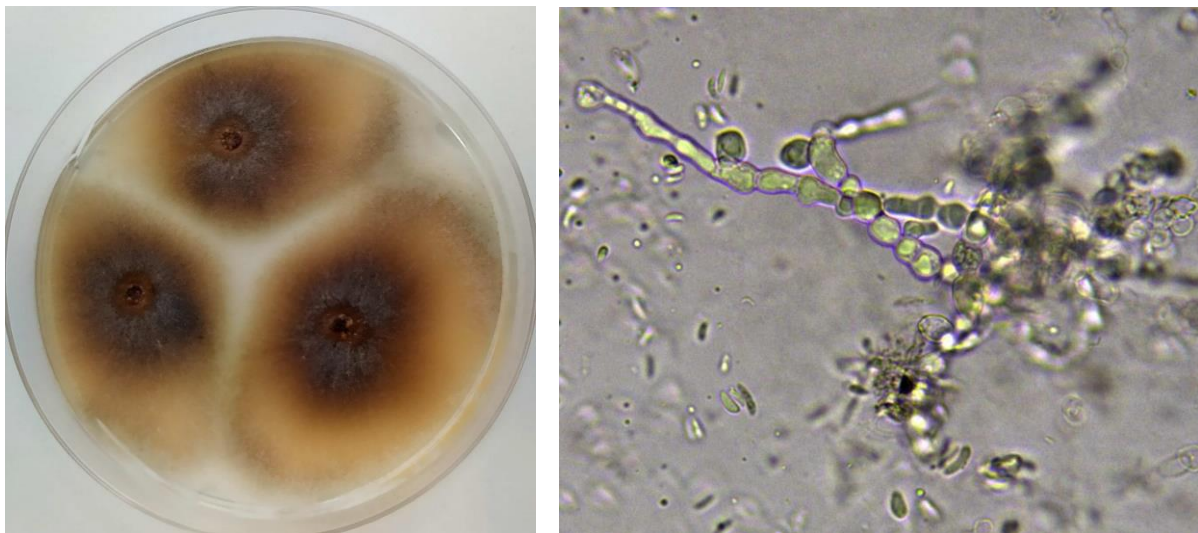
Mikroskopiniai grybai vandens telkiniuose

Mikroskopiniai grybai buvo išskiriami iš vandens telkinių, kuriuose gyvena tiriamos vėžių rūšys. Mikroskopinių grybų pradų rasta visuose tirtuose vandens telkiniuose (12 pav.). Ištyrus tiriamų vandens telkinių vandenį nustatyta, kad dominuoja *Aureobasidium melanogenum*, *Didymella glomerata*, *Trichoderma citrinoviride* mikroskopiniai grybai.



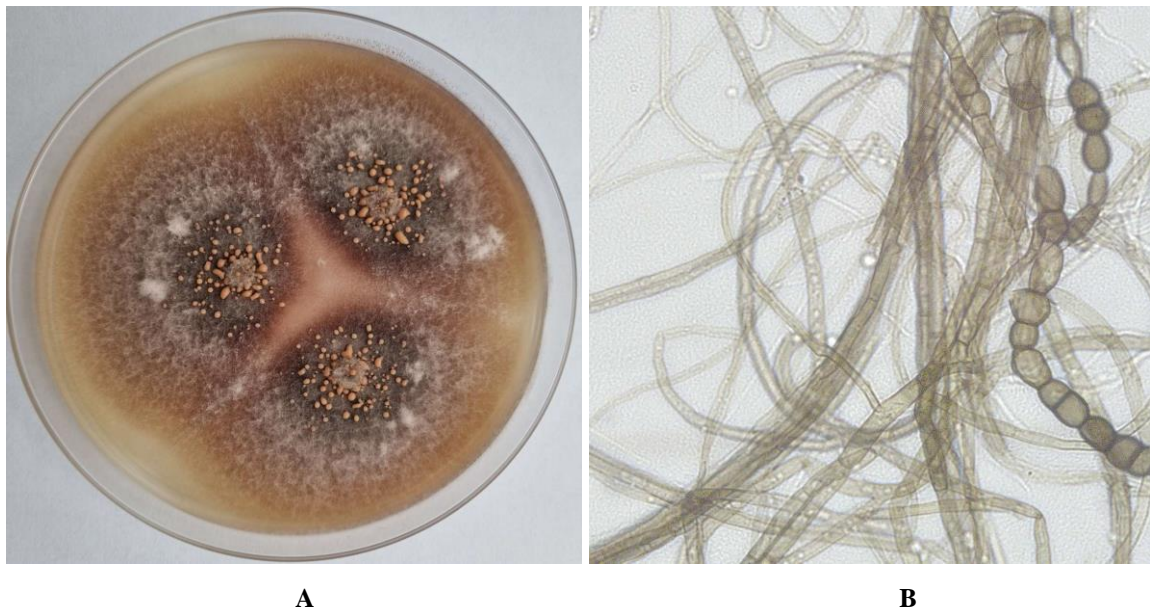
12 pav. Mikroskopiniai grybai išskirti ant bulvių dekstrozės terpės išfiltravus vandens telkinių vandenį, kuriuose aptinkami: A – siauražnypliai vėžiai, B – rainuotieji vėžiai, C – žymėtieji vėžiai, D – plačiažnypliai vėžiai.

Aureobasidium genčiai priklausantys grybai plačiai paplitę dirvožemyje, randami ant augalų liekanų, medienos atplaišų, popieriaus, grūdų ir pan. Šie grybai yra ypač atsparūs išorės veiksniams, ypač UV spinduliams. Gali toleruoti druskos (NaCl) koncentraciją, net iki 15 %. *Aureobasidium melanogenum* rūšies mikroskopiniai grybai ant salyklo ekstrakto agarą per 7 dienas pasiekia 40 mm dydį (13 pav. A). Grybo kolonijos paviršius lygus, greitai pasidengiantis lipnia sporų mase, kurios gali būti gelsvos, rausvos rudos arba juodos spalvos. Retkarčiais formuoja orinį micelį. Hifai 2–16 μm pločio plonasiiniai, kultūrai senstant gali susiformuoti tamsiai juodos spalvos storasiiniai hifai. Konidijos vienlaštės, lygiasienės. Kartais suformuoja antrines smulkias konidijas (13 pav. B).



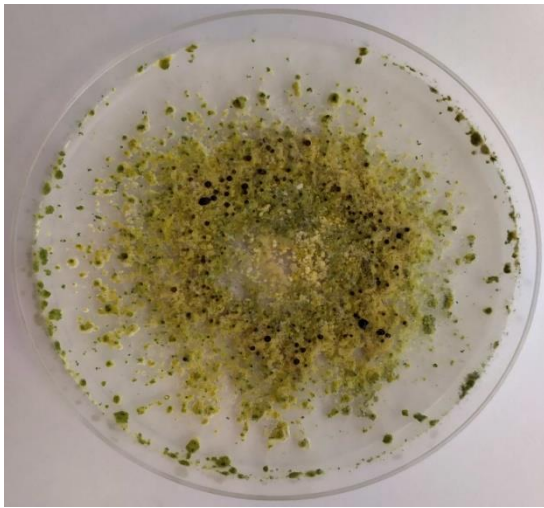
13 pav. *Aureobasidium melanogenum* mikroskopinio grybo kolonijos vaizdas ant bulvių dekstrozės terpės praėjus 7 dienoms (A), grybo mikroskopinis vaizdas didinimas $\times 400$ (B).

Didymella gentis priklauso labai plačiai pasaulyje paplitusiai *Sphaeropsidales* grybų eilei, šios eilės atstovai aptinkami dirvožemyje, nuokritose. Tarp šios genties atstovų gali būti patogeninių tiek žmogui tiek gyvūnams mikroskopinių grybų rūšių. *Didymella glomerata* rūšies mikroskopinių grybų kolonijos ant avižų agarą terpės per 7 dienas pasiekia 50–57 mm dydį (14 pav. A). Micelis retas, kartais su retais pilkais veltiniais intarpais, su gausiomis aiškiai matomomis piknidėmis. Piknidės gali būti kolonijos paviršiuje arba įsiterpusios į agarą, dažniausiai su viena ostiole, ovalios, nuo šviesiai juodos iki tamsiai rudos spalvos (14 pav. B). Šios rūšies grybai plačiai paplitę aplinkoje, ypač dažnai sutinkami ant įvairių rūšių augalų, augalinėje medžiagoje, miško paklotėje, dirvožemyje, drėgnoje aplinkoje: voniose ir įvairiuose vamzdynuose.



14 pav. *Didymella glomerata* mikroskopinio grybo kolonijos vaizdas ant bulvių dekstrozės terpės praėjus 7 dienoms (A), grybo mikroskopinis vaizdas didinimas $\times 400$ (B).

Trichoderma citrinoviride rūšies mikroskopinio grybo kolonijos auga greitai, pradžioje būna aiškiai matomas bespalvis micelis, kuris vėliau grybui pradėjus sporuliuoti tampa žalios, gelsvos ar šviesiai žalios spalvos, ant avižų agarą per 4 dienas pasiekia 80–90 mm dydį (15 pav. A). Micelis voratinkliškas. Konidijakočiai trumpi, neaiškiai diferencijuotų šakučių pavidalo. Konidijos žalios, nevienodo dydžio, nuo smulkių iki stambių, ovaliai cilindriškos arba elipsiškos $3,8\text{--}6 \times 2,2\text{--}2,8 \mu\text{m}$ (15 pav. B).



A

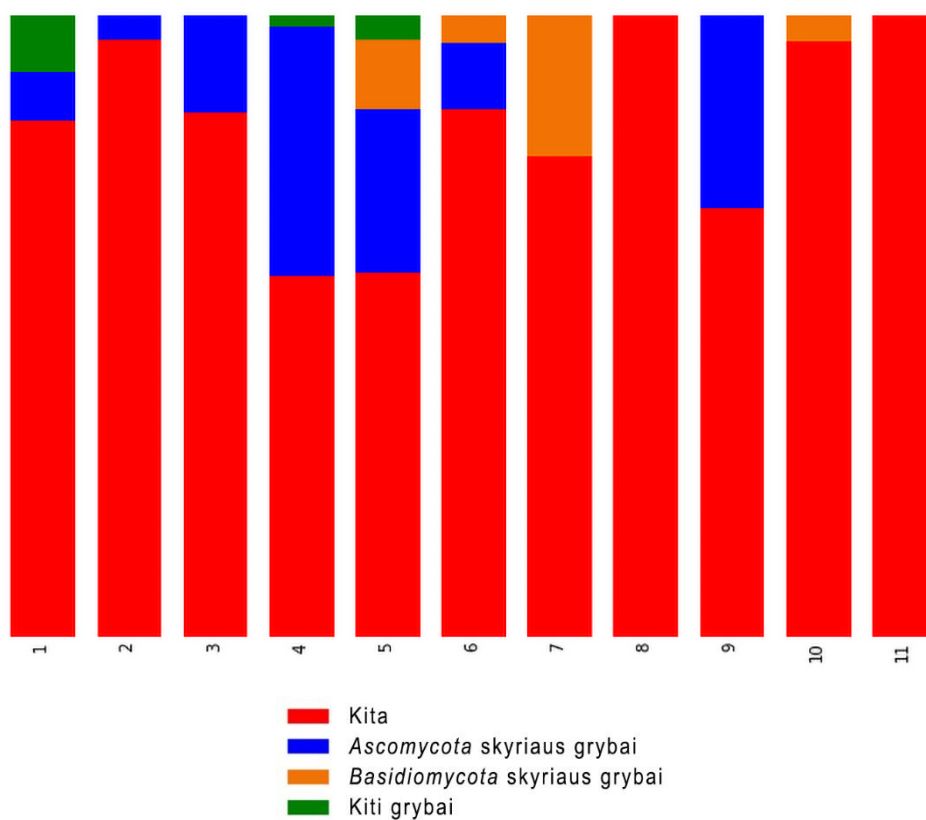


B

15 pav. *Trichoderma citrinoviride* mikroskopinio grybo kolonijos vaizdas ant bulvių dekstrozės terpės praėjus 7 dienoms (A), *Trichoderma citrinoviride* grybo mikroskopinis vaizdas didinimas $\times 400$ (B).

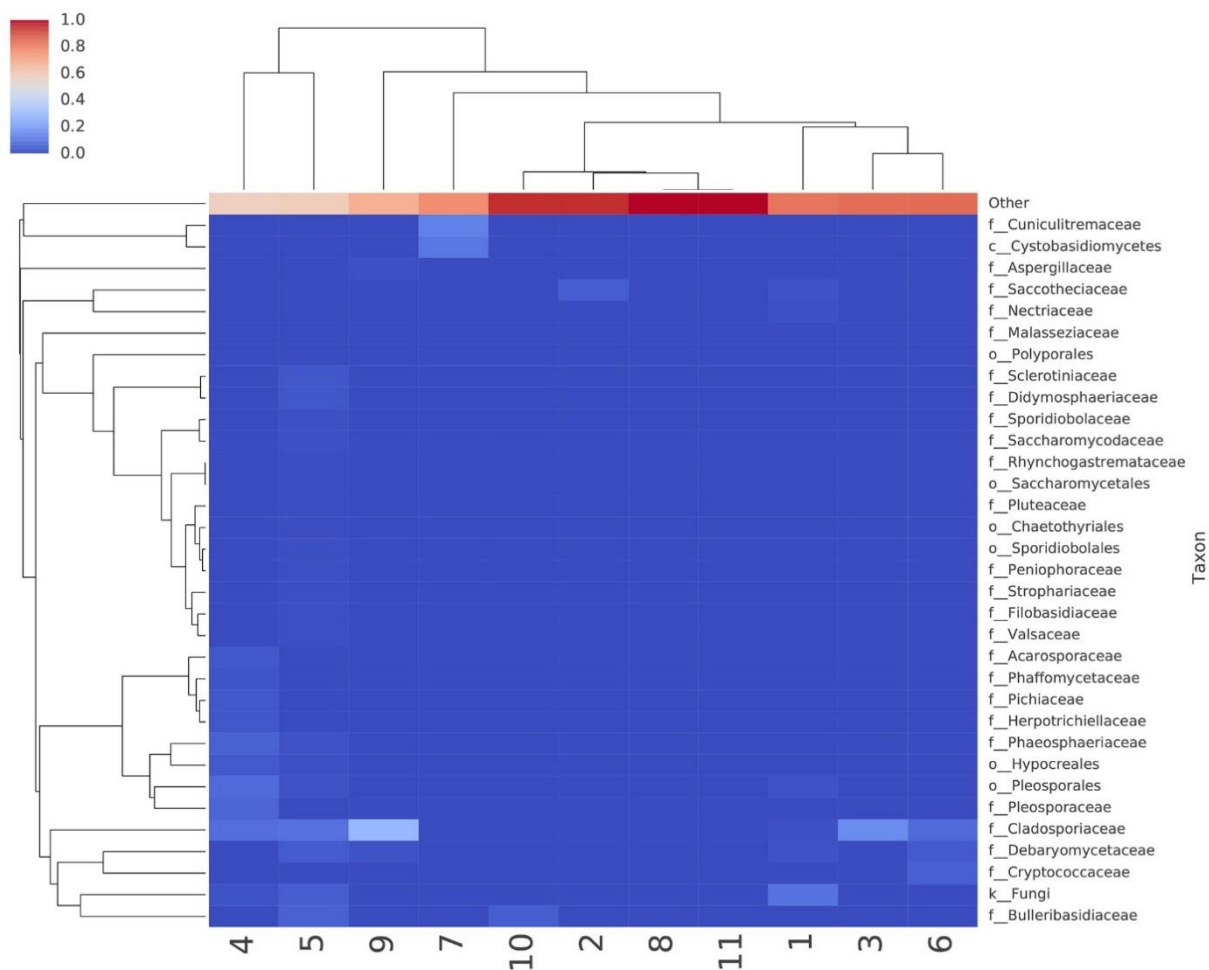
Mikroskopinių grybų metagenominė analizė vėžių kepenų ir raumenų audiniuose

Metagenominės analizės metu buvo gauta 164 aukštos kokybės sekų. Iš dviejų tirtų vėžių raumenų ir kepenų audinių mikroskopiniams grybams priklausančių sekų nepavyko išskirti. Plačiažnypliuose vėžiuose dominavo *Ascomycota* skyriaus atstovai (nuo 26,1% iki 40,0%), *Basidiomycota* skyriaus grybai sudarė (11,3%) (16 pav.). Rainuotuose vėžiuose *Ascomycota* skyriaus grybai sudarė – 31,0%, *Basidiomycota* skyriaus mikroskopiniai grybai vyravo žymėtuose vėžiuose – 22,7%.



16 pav. Tirtuose vėžiuose aptiktų mikroskopinių grybų skyrių atstovai. 1, 4, 5 – *Astacus astacus*, 2, 6, 9 ir 11 – *Faxonius limosus*, 3, 10 – *Ponastacus leptodactyles*, 7, 8 – *Pacifastacus leniusculus*.

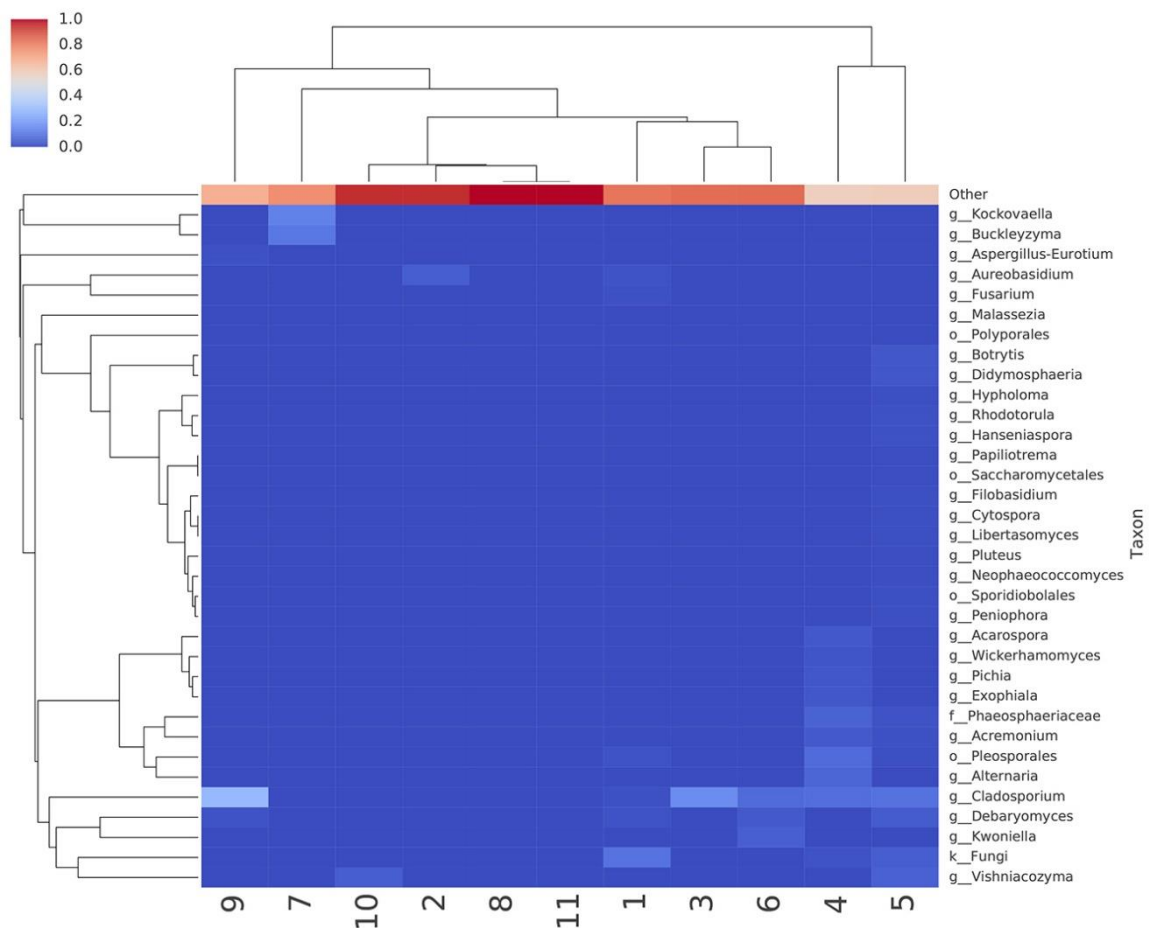
Atlikus metagenominę analizę, nustatyta, kad išskirtos sekos priklauso *Ascomycota* skyriaus 19 šeimų, o *Basidiomycota* skyriaus – 13 šeimų. *Ascomycota* skyriaus Cladosporiaceae šeimos grybai buvo aptikti visuose tirtuose vėžiuose (17 pav.). Debaryomycetaceae šeimos atstovai buvo paplitę rainuotuose ir plačiažnypliuose vėžiuose. Tirtuose vėžiuose taip pat buvo rasta Saccotheciaceae, Phaeosporiaceae šeimoms priklausančių mikroskopinių grybų atstovų.



17 pav. Taksonominė (eilės ir šeimos), mikroskopinių grybų išskirtų iš vėžių raumenų ir kepenų audinių, priklausomybė. 1, 4, 5 – *Astacus astacus*, 2, 6, 9 ir 11 – *Faxonius limosus*, 3, 10 – *Pontastacus leptodactyles*, 7, 8 – *Pacifastacus leniusculus*.

Pleosporales eilės atstovai rasti plačiažnypliuose vėžiuose ir sudarė nuo 1,0% iki 7,2%, šioje eilėje yra 23 šeimos, daugiau nei 330 genčių, kurioms priklauso daugiau nei 4700 rūšių. *Hypocreales* eilės atstovai taip pat rasti plačiažnypliuose vėžiuose, šioje eilėje yra 237 gentys ir 2647 rūšys.

Cladosporium genties grybai tirtuose vėžiuose sudarė nuo 1,4% iki 28,1% (18 pav.). *Aureobasidium* genties grybai buvo aptikti plačiažnypliuose ir rainuotuose vėžiuose ir sudarė atitinkamai 1,6% ir 3,9%. *Vishniacozyma* genčiai priklausančios mielės rastos plačiažnypliuose ir siauražnypliuose vėžiuose atitinkamai 4,7% ir 4,2%.



18 pav. Taksonominė (gentinė), mikroskopinių grybų išskirtų iš vėžių raumenų ir kepenų audinių, priklausomybė. 1, 4, 5 – *Astacus astacus*, 2, 6, 9 ir 11 – *Faxonius limosus*, 3, 10 – *Pontastacus leptodactyles*, 7, 8 – *Pacifastacus leniusculus*.

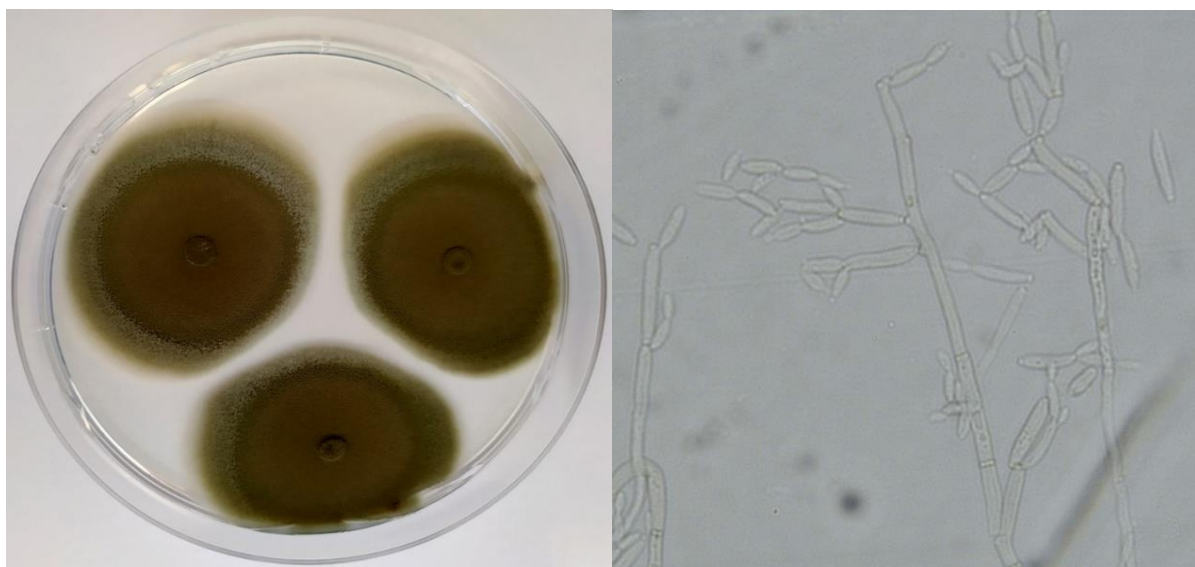
Rainuotuose ir plačiažnypliuose vėžiuose buvo aptiktos *Debaryomyces* genčiai priklausančios mielės, kurios sudarė atitinkamai nuo 1,6% iki 3,8%. *Acremonium* genties grybai buvo aptikti plačiažnypliuose vėžiuose (17 pav.).

Mikroskopiniai grybai nustatyti naudojant ITS regiono pradmenis

Atlikus mikroskopinių grybų išskirtų iš vėžių raumenų ir kepenų audinių ITS regiono sekoskaitą nustatyta, kad *Cladosporium* genties rūšys buvo aptinkamos visuose tirtuose vėžiuose. *Cladosporium* genties grybai yra kosmopolitai, paplitę įvairiuose kraštuose. Gentyje yra apie 240 rūšių. Šios genties grybai išskiriami iš įvairių dirvožemių, pašarų, augalų liekanų, oro, įvairiausių natūralių ir sintetinių polimerinių medžiagų. Šios genties grybai lengvai adaptuojasi prie įvairių substratų. Yra duomenų apie šios genties rūšių aptikimą patologinėje medžiagoje.

Cladosporium tenuissimum rūšies mikroskopiniai grybai buvo aptinkami tiek rainuotų, tiek plačiažnyplių vėžių raumenų ir kepenų audiniuose. *Cladosporium tenuissimum* kolonijos per 14

dienų auginant ant bulvių dekstrozės terpės pasiekia 70–80 mm dydį, spalva varijuoja nuo pilkai rudos iki pilkai alyvinės, reversas nuo tamsiai pilkos iki alyvinės juodos spalvos, pakraštys plunksniškas, micelis gausus, purus, be ryškaus eksudato, gausiai sporifikuojantis (19 pav. A). Išskiriamas iš oro, maisto produktų, dirvožemio ir vandens paplitęs visame pasaulyje. Hifai šakojasi visomis kryptimis, konidijos grandinėlėse, konidijų dydis: $(2-2.5-5(-6) \times (1.5-2-3 \mu\text{m}$. Hifai septuoti, grybui senstant septų daugėja (19 pav. B).



A

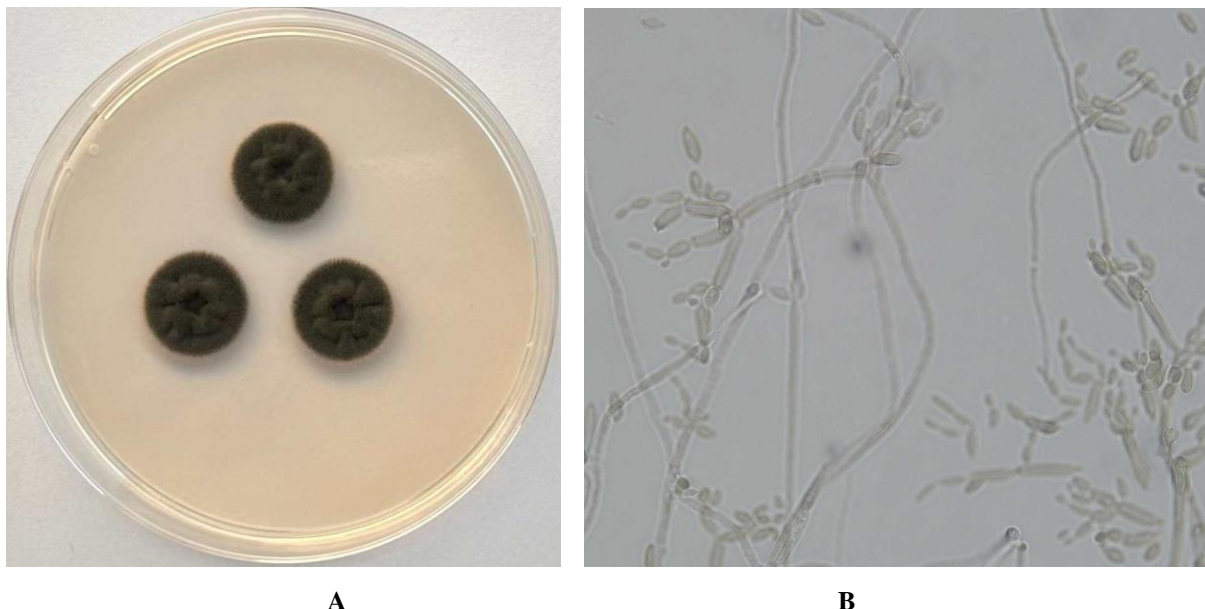
B

19 pav. *Cladosporium tenuissimum* mikroskopinio grybo kolonija ant bulvių dekstrozės terpės po 10 dienų (A), mikroskopinis *Cladosporium tenuissimum* vaizdas $\times 400$ (B).

Cladosporium cladosporioides mikroskopiniai grybai buvo aptinkami tiek rainuotuose, tiek siauražnypliuose vėžiuose. *Cladosporium cladosporioides* kolonijos ant bulvių dekstrozės agaru nuo pilkos iki pilkšvai alyvinės, neryškiai žalios arba alyviškai pilkos spalvos, pakraščiai nuo pilkai alyvinių iki baltos spalvos (20 pav. A), micelis retas, išsisklaidęs arba gausiai susiformavęs, tankus, augimas plokščias arba mažai išgaubtas, be išryškėjusio eksudato, o kartais su keliais mažais ryškiais eksudato lašeliais. Konidijų suformuoja daug, dydis $3-6(-7) \times (1.5-2-2.5(-3) \mu\text{m}$, hifai septuoti dažniausiai su dviem septomis (20 pav. B).

Rūšies grybai yra kosmopolitai, išskiriami iš įvairių dirvožemių, pašarų, augalų liekanų, oro, įvairiausių natūralių ir sintetinių polimerinių medžiagų bei daugybės kitų substratų. Lengvai įsisavina įvairius anglies šaltinius, tačiau celiuliozę ir chitiną kai kurios padermės skaido lėtai. Lengviau utilizuoja aromatinius junginius, ypač tuos, kuriuose yra chloro. Šie grybai labai atsparūs įvairioms cheminėms medžiagoms ir išoriniams fizikiniams veiksniams. Tai siejama su gebėjimu produkuoti tamsios spalvos pigmentus – melaninus. Aktyviai produkuoja alkoholius, esterius, poliketidą – kladosporiną, kuriam būdingos mikotoksinio antibiotiko savybės. Optimali augimo temperatūra apie 25°C , minimali – apie 3°C , maksimali – apie 37°C . Šie grybai

aptinkami sergančių žmonių ir gyvulių organuose. *C. cladosporioides* kartu su *Phialophora verrucosa* buvo akių ragenos opos priežastis. Žinomas kaip liežuvio išopėjimo, odos, dantų granulomos sukėlėjas. Plačiai išplitęs gyvenamosiose ir darbo patalpose, todėl gali sukelti kvėpavimo organų ligas, alergiją (Lugauskas ir kt., 2022).



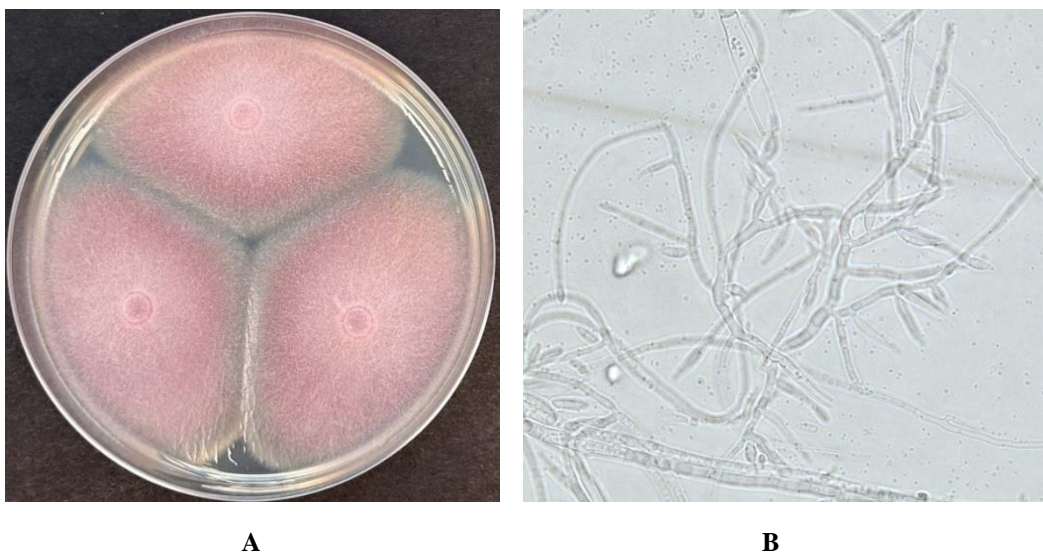
20 pav. *Cladosporium cladosporioides* mikroskopinio grybo kolonija ant bulvių dekstrozės terpės po 10 dienų (A), mikroskopinis *Cladosporium cladosporioides* vaizdas $\times 400$ (B).

Gozlan ir kt., 2014 teigia, kad *Cladosporium sphaerospermum* mikroskopiniai grybai yra galimi *Lutjanus campechanus* žuvų ligų sukėlėjai.

Fusarium genties grybai yra plačiai paplitę ant įvairių substratų, todėl laikomi kosmopolitais. Ilgai išlieka gyvybingi dirvožemyje, ant augalinių substratų. Tarp šios genties rūšių yra žmogaus, gyvūnų ir augalų patogenų. Gamina ir išskiria gausybę mikotoksinų (zearalenonas, deoksinivalenolas, toksinas T-2, fumonisinas ir daugelis kitų). *Fusarium oxysporum* rūšies mikroskopinių grybų kolonijos ant bulvių dekstrozės agaru per 10 dienų pasiekia 70–80 mm. Jiems būdingas plėviškas voratinkliškas neaukštas, rožinės karmino spalvos su ryškiai violetiniu atspalviu micelis, tačiau pasitaiko ir balkšvos ar gelsvos spalvos kamienų (21 pav. A). Makrokonidijos susidaro daugiausia išoriniame micelyje. Dauguma jų tiesios, su pamažu siaurėjančia, bet nepailgėjusia viršutine ląstele. Makrokonidijos su 3–5 pertvarėlėmis. Jų dydis $25\text{--}40 \times 3,7\text{--}5 \mu\text{m}$. Gausu vienaląsčių ar dviląsčių chlamidosporų (21 pav. B).

Šios rūšies grybai – kosmopolitai. Paplitę visame pasaulyje, dažniausiai dirvožemyje, ant įvairių augalų bei jų liekanų, augalų rizosferoje, ant šaknų ir kitų lignino bei celiuliozės turtingų substratų. Gana dažnai aptinkami ant specifinių substratų: gumos, pagamintos iš butadieninio

kaučiuko, naftos angliavandenilių, gerai auga ant medžiagų, kuriose yra baltymų, pavyzdžiui, ant natūralių odų. Rūšies grybai pažeidžia per 150 rūšių augalų. Dažniausiai sukelia augalų tracheomikozinį vytulį, ypač dažnai pasireiškiantį auginant gėles bei daigynuose spygliuočių ir lapuočių sodinukus. Optimali augimo temperatūra apie 24°C, minimali – apie 6°C, maksimali – 37°C. Tačiau pasitaiko didelių nukrypimų į vieną ar kitą pusę priklausomai nuo individualių padermės savybių ir kilmės. Grybai aktyviai produkuoja ir išskiria į aplinką įvairios sudėties antrinius metabolitus: fuzarenoną, nivalenolo diacetatą, oksisporiną, enantiną A ir B, likomarazminą. Šios rūšies grybų produkuojamos medžiagos: fuzaro rūgštis, moniliforminas, eniatinas B, naftokvinonai yra pripažintos stipriais toksiniais (Lugauskas ir kt., 2022).



21 pav. *Fusarium oxysporum* mikroskopinio grybo kolonija ant bulvių dekstrozės terpės po 10 dienų (A), mikroskopinis *Fusarium oxysporum* vaizdas $\times 400$ (B).

Fusarium oxysporum genties mikroskopiniai grybai atliktų tyrimų metu buvo aptikti plačiažnypliuose ir rainuotuose vėžiuose. Taştan, ir Çağatay, 2022, *Fusarium oxysporum* yra išskyrę iš žiaunų ir sukelia juodųjų žiaunų ligą. Kita šios genties rūšis *Fusarium solani* yra aptinkama rainuotųjų vėžių žiaunose ir galimai gali sukelti vėžių ligas (Longshaw, 2011; Mahmoud, 2019). Siauražnypliuose vėžiuose buvo rasta *Geotrichum candidum*, *Scopulariopsis brevicaulis* mikroskopinių grybų, tačiau iš kitų tirtų vėžių rūšių jų išskirti nepavyko. Plačiažnypliuose vėžiuose buvo rasta ir *Acremonium* genčiai priklausančių rūšių, tačiau tiksli rūšis dar nenustatyta reikalingi detalesni tyrimai. Literatūroje esama duomenų apie tai, jog *Acremonium* genčiai priklausančios mikroskopiniai grybai buvo aptikti siauražnypliuose vėžiuose Turkijoje esančiame Egirdir ežere (Diler ir Bolat, 2001).

Mikroskopinių grybų, išskirtų iš vėžių audinių, patogeniškumo vėžiams įvertinimas

Nustatyta, kad *Fusarium avenaceum* ir *Fusarium equiseti* buvo išskirti iš visų tirtų užkrėstų vėžių kepenų ir raumenų audinių (3 lentelė). Tuo tarpu *Phoma herbarum* buvo išskirtas tik iš užkrėstų siauražnyplių vėžių kepenų ir raumenų audinių, o *Phoma macrospora* neaugo nei viename iš užkrėstų vėžių audinių paimtame mėginyje.

3 lentelė. Mikroskopiniai grybai, išskirti iš užkrėstų vėžių kepenų ir raumenų audinių.

Vėžiai	<i>Fusarium avenaceum</i>		<i>Fusarium equiseti</i>		<i>Phoma herbarum</i>		<i>Phoma macrospora</i>	
	Kepenys	Raumenys	Kepenys	Raumenys	Kepenys	Raumenys	Kepenys	Raumenys
Plačiažnypliai vėžiai	+	+	+	+	–	–	–	–
Siauražnypliai vėžiai	+	+	+	+	+	+	–	–
Rainuotieji vėžiai	+	+	+	+	–	–	–	–
Žymėtieji vėžiai	+	+	+	+	–	–	–	–

Mikroskopiniai grybai, kuriais buvo užkrėsti ir kurie vėliau išskirti iš plačiažnyplių, siauražnyplių, rainuotųjų ir žymėtųjų vėžių kepenų ir raumenų audinių, pateikiami 22–27 paveiksluose.



A

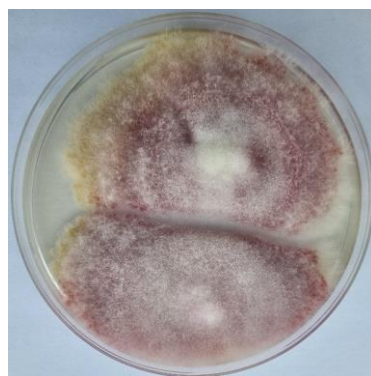


B

22 pav. Iš užkrėstų siauražnyplių vėžių kepenų išskirti: A – *Fusarium equiseti*; B – *Fusarium avenaceum*.

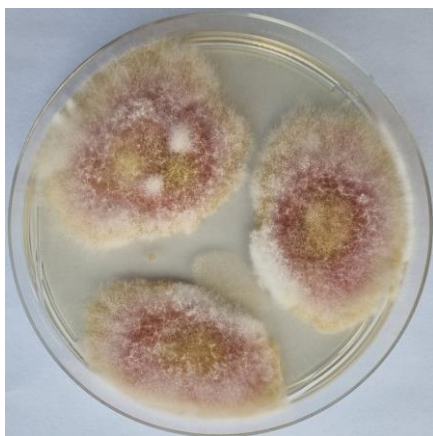


A

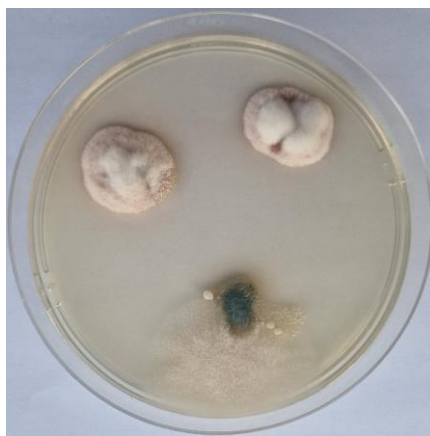


B

23 pav. Iš užkrėstų siauražnyplių vėžių raumenų išskirti: A – *Phoma herbarum*; B – *Fusarium avenaceum*.



A



B

24 pav. Iš užkrėstų žymėtųjų vėžių kepenų išskirtas A – *Fusarium avenaceum* ir siauražnyplių vėžių raumenų išskirtas (B) *Phoma herbarum*.



A



B

25 pav. Iš užkrėstų žymėtųjų vėžių raumenų išskirti: A – *Fusarium avenaceum*; B – *Fusarium equiseti*.



A



B

26 pav. Iš užkrėstų rainuotųjų vėžių raumenų išskirti: A – *Fusarium avenaceum*; B – *Fusarium equiseti*.



A



B

27 pav. *Fusarium avenaceum*, išskirtas iš užkrėstų plačiažnyplių vėžių: A – kepenų; B – raumenų.

Bakterijos

Tyrimų metu registruotos **34 genčių bakterijos**. Didžiausia bakterijų įvairovė pasižymėjo rainuotieji vėžiai, mažiau rūšių registruota žymėtuosiuose, o mažiausia įvairovė būdinga siauražnypliams ir plačiažnypliams vėžiams.

Būtina pažymėti, kad tiriamoje vėžių mikrobiotoje aptinkamos ne tik jiems būdingos bakterijos, bet ir vandenyje cirkuliuojančios bakterijos, kurių tarpe gali būti tiek būdingų vandens, grunto, sedimentų aplinkai, tiek ir įvairių bestuburių ir stuburinių gyvūnų, augalų, dumblių ar net nebūdingų atsitiktinai patekusių į vandenį organizmų mikrobiotai bei jų patogenų. Todėl dalis bakterijų gali būti patogeniškos kitiems vandens organizmams, žmogui, bet ne patiems vėžiams. Dar vienas svarbus aspektas yra susijęs su oportunistiniais patogenais, kurie sveikame organizme gali būti aptinkami mažais kiekiais ir neigiamo poveikio nedaro, bet susilpnėjus imunitetui ar sergant, jų gausumas smarkiai išauga ir patogeninis poveikis gali pasidaryti reikšmingas. Žemiau pateikiamas bakterijų sutinkamumas vėžiuose.

Tipas Bacteroidetes

Flavobacteriaceae

Flavobacterium

	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pontastacus leptodactylus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Faxonius limosus</i>
<i>Flavobacterium columnare</i>				+
<i>Flavobacterium dankookense</i>				+
<i>Flavobacterium chungnamense / koreense</i>				+
<i>Flavobacterium macrobrachii</i>				
<i>Flavobacterium sp.</i>		+	+	+

***F. columnare* yra žuvų patogenas**, spėjama, kad yra patogeniškas (galimai mirtinas) ir raudonajam pelkiniui vėžiui, (Jiravanichpaisal ir kt. 2009, Declercq ir kt. 2013). Apie *F. dankookense*, *F. chungnamense / koreense* patogeniškumą duomenų nėra, šios rūšys buvo registruotos gėlame vandenyje (Lee ir kt. 2011, 2012). *F. macrobrachii* registruota gėlavandenėse krevetėse (Sheu ir kt. 2011). Deja, daugeliu atvejų literatūroje rūšys nenurodomos, tačiau visa gentis įvardijama kaip esamas ar tikėtinas patogenas (Longshaw ir kt. 2011, Dragevič ir kt. 2020).

Weeksellaceae

Chryseobacterium

	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pontastacus leptodactylus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Faxonius limosus</i>
<i>Chryseobacterium carnis</i>			+	+
<i>Chryseobacterium haifense</i>				+
<i>Chryseobacterium koreense</i>		+	+	+
<i>Chryseobacterium palustre</i>		+	+	+
<i>Chryseobacterium piscicola</i>		+	+	+
<i>Chryseobacterium balustinum</i> <i>/piscium/scophthalmum</i>		+	+	+
<i>Chryseobacterium antarcticum/palustre</i>		+	+	+
<i>Chryseobacterium antarcticum/carnis</i>			+	+
<i>Chryseobacterium haifense/koreense</i>			+	

Chryseobacterium gentyje yra rūšių, genetinių linijų (*C. balustinum*, *C. piscicola*, *Chryseobacterium* sp. B2), kurios priskiriamos žuvų ir vėžių (žymėtojo vėžio) patogenams (Ilardi ir kt. 2009, Jiravanichpaisal ir kt. 2009, Mallik ir kt. 2023).

Tipas Pseudomonadota

Aeromonadaceae

Aeromonas

	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pontastacus leptodactylus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Faxonius limosus</i>
<i>A. allosaccharophila</i>	+	+	+	+
<i>A. popoffii</i>		+	+	+
<i>A. sobria</i>		+	+	+
<i>A. veronii</i>	+	+	+	+
<i>A. bestiarum/salmonicida</i>			+	+
<i>Aeromonas</i> sp.		+	+	+

Tyrimų metu identifikuotos 6 *Aeromonas* genties rūšys. ***A. allosaccharophila* įvardijamas kaip žuvų patogenas, dėl patogeniškumo vėžiagyviams įvertinimo trūksta duomenų** (Huang ir kt. 2022). *A. popoffii* yra registruota gėluose ir sūriuose vandenyse, patogeniškumas vėžiams nežinomas (Soler ir kt. 2002). ***A. veronii* yra žinomas kaip žuvų ir kai kurių vėžiagyvių** (pvz. raudonojo pelkininio vėžio *Procambarus clarkii*) **oportunistinis patogenas** (Su ir kt. 2023, Zhu ir kt. 2021). Minėtam raudonajam pelkiniam vėžiui gali smarkiai paveikti gyvūnų virškinimo sistemos, žiaunų audinius (Zhu et al. 2021). *Apie šios bakterijos rūšies patogeniškumą Lietuvoje aptinkamų vėžių rūšims informacijos nėra.* Ši bakterijų rūšis buvo registruota visose vėžių rūšyse. ***Aeromonas sobria*, *A. bestiarum* ir *A. salmonicida* yra žinomi žuvų patogenai**, apie jų patogeniškumą vėžiagyviams nėra duomenų (Park et al. 2020, Fuentes-Valencia ir kt. 2022). Kaip vienas neabejotinai daug žalos vėžiams darantis patogenas *Aeromonas hydrophila* tyrimų metu nebuvo registruotas (Jiravanichpaisal ir kt. 2009).

Enterobacteriaceae

Citrobacter

	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pontastacus leptodactylus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Faxonius limosus</i>
<i>C. freundii</i>		+	+	
<i>C. gillenbergii</i>				+
<i>C. murliniae</i>	+		+	
<i>C. braakii/freundii</i>			+	
<i>C. braakii/freundii/murliniae</i>		+	+	+
<i>C. freundii/gillenbergii</i>		+		
<i>C. freundii/werkmanii</i>		+		

Šioje gentyje galimai patogeniškos vėžiams (raudonajam pelkių vėžiui) yra *C. freundii* ir *C. werkmanii* rūšys (Chen ir kt. 2017, Dragevič ir kt. 2020). Tačiau reikia paminėti, kad ne visos *C. freundii* linijos yra patogeniškos. Tačiau galutiniam patogeniškumo įvertinimui aukščiau minėtai vėžių rūšiai trūksta duomenų.

Hafniaceae

Hafnia genties bakterijos registruotos siauražnypliuose ir rainuotuose vėžiuose.

Registruotos 2 rūšys- *H. alvei* ir *H. paralvei*. ***H. alvei* yra įvardijama kaip patogeniška žuvims** (Cao ir kt. 2016).

	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pontastacus leptodactylus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Faxonius limosus</i>
<i>H. alvei</i>		+		+
<i>H. paralvei</i>		+		+

Moraxellaceae

Acinetobacter

	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pontastacus leptodactylus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Faxonius limosus</i>
<i>A. harbinensis</i>			+	+
<i>A. johnsonii</i>				+
<i>A. lwoffii</i>	+	+	+	+
<i>A.r bouvetii johnsonii</i>	+		+	+
<i>A. haemolyticus/johnsonii/lwoffii</i>				+
<i>A.r johnsonii/lwoffii</i>				+

Kai kurie *Acinetobacter* štamai gali būti patogeniški žymėtiesiems vėžiams, deja nėra įvardinta konkreiti bakterijų rūšis (Jiravanichpaisal ir kt. 2009). Tikėtina, kad patogeninis poveikis pasireiškė ir kitoms vėžių rūšims. Tačiau būtina pažymėti, kad patogeniškumas buvo tirtas eksperimentinėmis sąlygomis, todėl lieka neaišku, ar gamtoje šios genties bakterijos turi patogeninį poveikį. ***A. johnsonii* yra žinomas oportunistinis žuvų patogenas** (Bi ir kt. 2023).

Pseudomonadaceae

Pseudomonas

	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pontastacus leptodactylus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Faxonius limosus</i>
<i>P. gingeri</i>			+	
<i>P. putida</i>			+	+
<i>P. alcaligenes/vranovensis</i>				+
<i>P. deceptionensi / fragi</i>				+
<i>P. flavescens/putida</i>		+	+	+
<i>P.fluorescens/jessenii/mandelii</i>			+	+
<i>P.baetica fluorescens</i>				+
<i>P.s fluorescens/fragi/psychrophila</i>				+
<i>Pseudomonas sp.</i>			+	+

Literatūroje kaip patogeninės rūšys yra nurodomos *P. gessardii*, *P. libanensis/gessardii BLT* bei genetinė linija *P. sp. N2* (Dragevič ir kt.2020). Šios rūšys tyrimo metu nebuvo registruotos. Taip pat *patogeniška gali būti (nurodoma, kad rūšis aptikta sergančiame individe) ir Lietuvoje rasta bakterija P. putida kitose vėžių rūšyse* (Edgerton ir kt. 2002). Kitos Lietuvoje aptiktos bakterijų rūšys nėra žinomos kaip vėžių patogenai.

Vibrionaceae

Vibrio

	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pontastacus leptodactylus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Faxonius limosus</i>
<i>V. ordalii</i>			+	+
<i>V. panuliri</i>	+		+	

***V. ordalii* yra žinomas kaip vibriozės sukėlėjas lašišinėse žuvyse**, antroji rūšis yra identifikuota omaruose (Kumari ir kt. 2014). Duomenų apie šių bakterijų rūšių patogeniškumą vėžiams nėra. Patogeninės vibriozę vėžiams sukeliančios bakterijų rūšys, *V. mimicus* ir *V. cholerae*, tyrimų metu nebuvo rastos (Longshaw ir kt. 2011).

Enterobacteriaceae

Plesiomonas

	<i>Astacus astacus</i>	<i>Pontastacus leptodactylus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Faxonius limosus</i>
<i>P. shigelloides</i>	+	+	+	+

Šios bakterijos yra žinomos kaip įvairių žuvų rūšių patogenai (Fuentes-Valencia ir kt. 2022). *Procambarus clarkii* vėžių tyrimų metu ši bakterijų rūšis yra įvardijama kaip oportunistinis patogenas, kurio padaugėja vėžiams sergant, susilpnėjus imuninei sistemai (Wu ir kt. 2021).

Kitos tyrimų metu registruotos bakterijų rūšys, apie kurių patogeniškumą vėžiams nėra duomenų

Tyrimų metu identifikuotos 6 *Acidovorax* genties rūšys: *A. radices*, *A. soli*, *A. temperans*, *A. valerianellae*, *A. delafieldii/temperans*, *A. radices/wohlfahrtii*. Šios bakterijų genties bakterijos dažniausiai aptinkamos dumble, vandenyje, taip pat kai kurių vėžiagyvių žarnyno mikrofloroje (Wei ir kt. 2020).

Arthrobacter genties bakterijos taip pat aptiktos visose tirtose vėžių rūšyse. Identifikuotos rūšys: *A. bambusae*, *A. creatinolyticus*, *A. kerguelensis*, *A. kerguelensis*, *A. stackebrandtii*, *A. psychrolactophilus /stackebrandtii*. Šios genties bakterijos žinomos kaip raudonojo pelkinio vėžio hemolimfos mikrofloros sudedamoji dalis, deja, nėra nurodomos rūšys (Scott ir Thune 1986). Anksčiau šiai genčiai buvo priskiriama daugiau bakterijų, kurios dabar priskirtos *Glutamicibacter* ir *Paeniglutamicibacter* gentims, apie kurių patogeniškumą vėžiams nėra duomenų.

Bacilloplasma genties bakterijos registruotos visose vėžių rūšyse. Šios genties bakterijos yra registruoto lygiakojų (Isopoda) vėžiagyvių žarnyne.

Clostridium genties bakterijos registruotos visose vėžių rūšys. Identifikuotos šios rūšys: *C. sardiniense*, *C. baratii/sardiniense*, *C. senegalense*, *C. botulinum*, *C. estertheticum*, *C. hydrogeniformans* ir *C. beijerinckii/diolis/saccharoperbutylaceticum*.

Crenothrix genties bakterijos aptiktos plačiažnypliuose, žymėtuosiuose ir rainuotuose vėžiuose, yra siejamos su vandens užteršimu.

Delftia genties bakterijos aptiktos plačiažnypliuose, žymėtuosiuose ir rainuotuose vėžiuose.

Exiguobacterium genties bakterijos aptiktos visų tirtų vėžių organizme. Šios genties bakterijos yra įvardintos kaip *dominuojančios sveikų raudonųjų pelkinių vėžių žarnynuose* (Feng et al. 2021).

Filimonas bakterijos registruotos siauražnypliuose, žymėtuosiuose ir rainuotuose vėžiuose.

Leadbetterella registruota plačiažnypliuose, rainuotuosiuose ir žymėtuose vėžiuose.

Methylomonas registruotas plačiažnypliuose, rainuotuosiuose ir žymėtuose vėžiuose. Identifikuotos rūšys: *M. lenta*, *M. methanica*, *M. paludis*.

Myroides registruotas tik invazinėse vėžių rūšyse. Šios genties bakterijos yra registruotos sveiko raudonojo vėžio žarnyne (Huang et al. 2022). Identifikuotos rūšys: *M. guanonis*, *M. injenensis*, *M. phaeus*, *M. odoratimimus/profundus*.

Paraclostridium /Peptoclostridium registruotos plačiažnypliuose, siauražnypliuose ir žymėtuose vėžiuose. *Paraclostridium* gentis registruota ir raudonuosiuose pelkiniuose vėžiuose (Hou et al 2023).

Pseudaminobacter aptiktas visų rūšių vėžiuose išskyrus siauražnyplį vėžį. Registruotos rūšys: *P. defliuvii*, *P. salicylatoxidans*.

Psychrobacter bakterijos registruotos visuose vėžiuose, išskyrus plačiažnyplį vėžį. Šios genties bakterijos siejamos su vandens aplinka, yra aptinkamos žuvyse. Identifikuotos rūšys: *P.cryohalolentis*, *P.pulmonis*, *P. alimentarius/aquaticus/vallis*, *P.maritimus*, *P.faecalis*, *P.proteolyticus*.

Rhodobacter bakterijos aptiktas visų rūšių vėžiuose.

Romboutsia bakterijos aptiktas visų rūšių vėžiuose. Identifikuota 1 rūšis *Romboutsia lituseburensis*.

Sphaerotilus bakterijos aptiktos plačiažnypliuose, rainuotuose ir žymėtuose vėžiuose. Identifikuotos 2 rūšys: *S. montanus* ir *S.natans*.

Staphylococcus bakterijos rastos plačiažnypliuose, rainuotuosiuose ir žymėtuose vėžiuose. Identifikuotos šios rūšys: *S. equorum*, *S. succinus* ir *S. vitulinus*. Literatūroje įvardijama dar viena vėžiuose aptinkama šios genties rūšis – *S. aureus*, kuris taip pat nėra jiems patogeniška (Jiravanichpaisal ir kt. 2009).

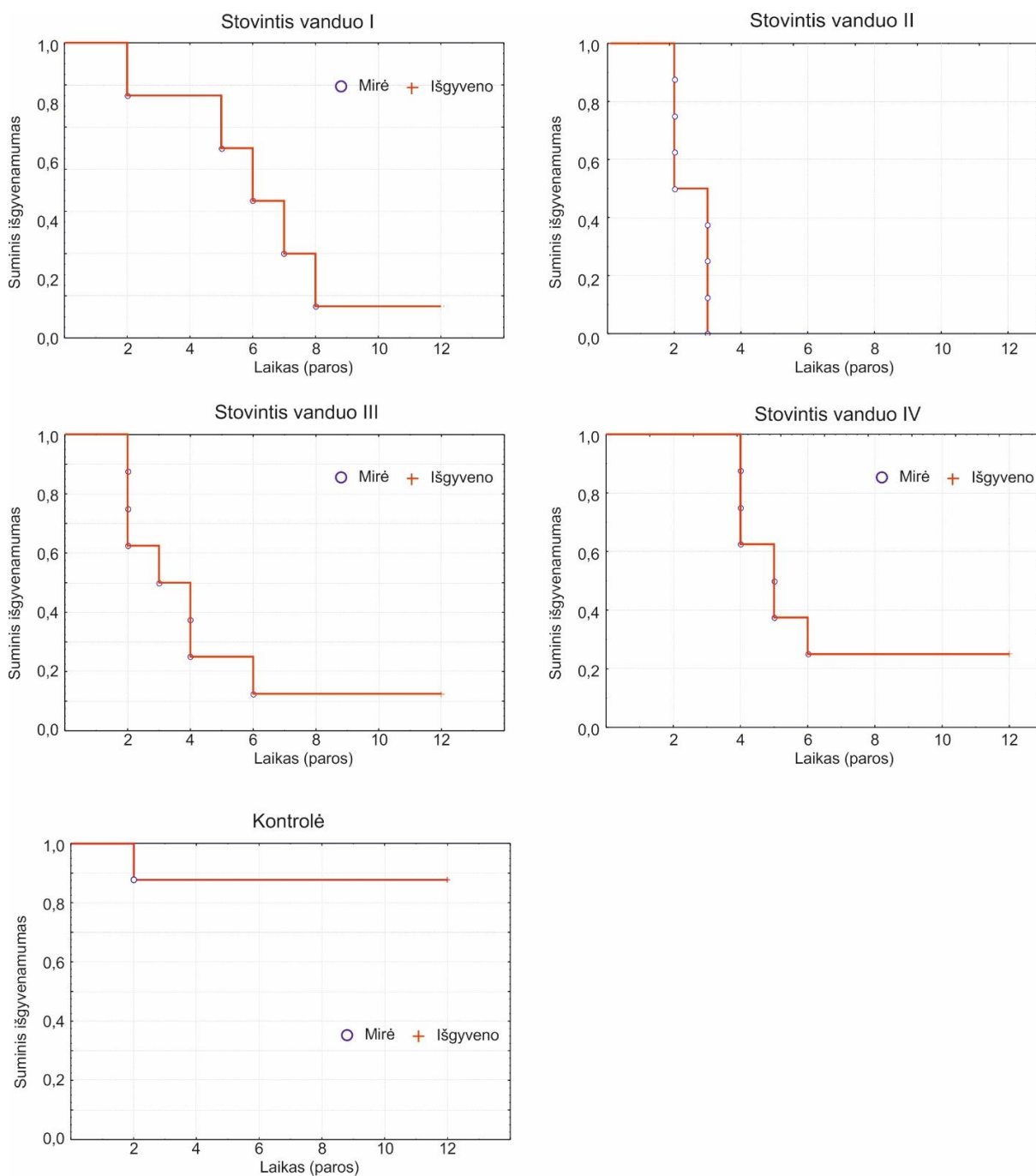
Thiothrix aptiktas visų rūšių vėžiuose išskyrus siauražnyplį vėžį. Aptinkamas ir kitų rūšių vėžių žarnyne, pvz. *Procambarus clarkii* (Xie et al. 2021). Identifikuotos rūšys: *T. eikelboomii*, *T. fructosivorans*.

Tomitella aptiktas visų rūšių vėžiuose išskyrus siauražnyplį vėžį. Identifikuota viena rūšis *T.biformata*.

Sukeliamų ligų anamnezė

Bandymas stovinčiame vandenyje

Bandymui buvo parinkti, labiausia tikėtini patogenai – *Fusarium avenaceum*, *Fusarium equiseti*, *Phoma herbarum*, *Phoma macrospora*. Gauti rezultatai buvo vertinami naudojant Kaplano-Mejerio metodą (duomenys gauti atlikus pilotinį tyrimą, 28 pav.). Matome, kad visais keturiais variantais išgyvenamumas buvo skirtingas. Kontroliniame variante per visą tyrimo laikotarpį žuvo 6 proc. vėžių.



28 pav. Išgyvenamumo vertinimas naudojant Kaplano-Mejerio metodą stovinčiame vandenyje.

1-ame variante mirimai prasidėjo po 2 parų. Po pusės bandymo laiko (6 parų) buvo mirę 50 proc. vėžių. Po viso bandymo išgyveno 6 proc. vėžių.

2-ame variante mirimai prasidėjo po 2 parų ir tolygiai. Jau po dviejų parų mirė 50 proc. vėžių, o likę 50 proc. mirė per sekančią parą. Pusės bandymo laiko neišgyveno nė vienas individas.

3-ame variante mirimai taip pat prasidėjo po 2 parų. Po pusės bandymo laiko (6 parų) buvo mirę 94 proc. vėžių. Po viso bandymo išgyveno 6 proc. vėžių.

4-ame variante mirimai prasidėjo po 4 parų. Po pusės bandymo laiko (6 parų) buvo mirę 75 proc. vėžių. Po viso bandymo išgyveno 25 proc. vėžių.

Kontroliniame variante mirimas buvo po 2 parų, mirė 2 individai. Visi likę individai išgyveno iki bandymo pabaigos.

Peržiūrėjus stebėjimų medžiagą buvo aprašyta ligos anamnezė.

Visi susirgę vėžiai turėjo kai kuriuos bendrus ligos požymius, tačiau nemažai požymių buvo ir skirtingi. Bendri požymiai visiems susirgusiems vėžiams buvo koordinacijos sutrikimas, raumenų tonuso susilpnėjimas ar praradimas.

Dažniausia pirmieji ligos požymiais pasireikšdavo gana nežymiai. Vėžio judėjime buvo galima pastebėti iš pradžių nedidelius sutrikimus. Pirmas pastebėtas požymis buvo **silpnas koordinacijos sutrikimas**. Ropojantis vėžys pradėdavo svyruoti į šonus kaip „girtas“. Atsirasdavo staigūs pakrypimai į šoną, pasvyrimai, vaikščiojamųjų kojų nevalingi trūkčiojimai. Šie požymiai buvo išreikšti gana silpnai ir dauguma jų sunkiai atskiriami nuo natūralaus elgesio.

Šie požymiai mūsų stebėjimuose pradėdavo pasireikšti skirtingu laiku. Pirmiausia stebėti 2-ame variante, praėjus maždaug 4–6 valandoms po užkrėtimo. Vėliausia 4-ame variante – praėjus beveik 3 parom po užkrėtimo.

Sekantis pasireiškiantis požymis buvo staigus **raumenų tonuso praradimas**. Jis pasireiškė ne visiems užkrėtimams. Dažniausia buvo būdingas tik 1–3 variantams, o 4-ame variante nepastebėtas. Jis prasidėdavo gana staigiai. Dažniausia judėdamas, vėžys staigiai apvirsdavo ant nugaros, ir likdavo gulėti išsitiesęs. Skirtingai nuo natūralaus apvirtimo, šiais atvejais vėžio judesiai buvo daugiau trūkčiojantys, nevalingi, nepanašūs į tokius, kai natūraliai apvirtęs vėžys mėgina atsiversti. Taip apvirtę vėžiai išbūdavo nuo 40 min. iki 26 valandų. Pradžioje po apvirtimo, maždaug 50 proc. atvejų stebimas aktyvus pilvo kojelių judėjimas. Vėliau dingsta bet koks judėjimas ir vėžys guli visiškai ramiai. Raumenų tonusas beveik dingsta.

Išimtas iš akvariumo toks vėžys nerodo jokio pasipriešinimo, žnyplės ir uodega laisvai svyra. Gyvybiniai požymiai sunkiai pastebimi.

Šis požymis įdomus tuo, kad dauguma atvejų praeina taip pat staigiai, kai ir prasideda. Ilgą laiką gulėjęs visai nejudrus vėžys, nereaguojantis į aplinkos dirgiklius, pavyzdžiui, visai nereaguojantis į kitą vėžį, kuris eidamas perlipa per jį, staiga pradeda judėti ir atsiverčia. Dažniausia prieš atsiverčiant pradėdavo aktyviai judėti ir po kelių minučių atsiversdavo, tačiau kartais (stebėti 7 atvejai) atsivertimas buvo žaibiškas, tetrunkantis ne ilgiau kaip 1–5 sekundes. Vėliau vėžio elgsena būdavo visai natūrali, nepastebėta skirtumų nuo sveiko vėžio elgsenos. Tačiau po kurio laiko šis požymis vėl pasireiškėdavo daugumai susirgusių vėžių, ir vystantis ligai pradėdavo kartotis dažniau, bet nei jo trukmės, nei dažnumo, patikimai susiesi su ligos baigtimi nepavyko. Iš kitų atliktų bandymų žinoma, kad po tokių požymių pasireiškimo vėžys gali išgyventi kelis mėnesius daugiau nepasireiškiant jokiems požymiais, tačiau taip pat gali mirti ir mažiau nei per kelias valandas.

Sekančiu stebimu požymiu galima būtų pavadinti **stipriu koordinacijos sutrikimą**. Šis požymis skiriasi nuo pirmojo tuo, kad koordinacija sutrinka labai smarkiai. Judėjimas darosi visai nekryptingas, dalis vaikščiojamųjų kojų nelinksta, eidamas smarkiai svyruoja į šonus. Šis požymis pasireiškia visuomet kai vėžys mėgina judėti. Mūsų stebėtais atvejais jo trukmė buvo nuo 10–30 min. iki 3–4 valandų. Tikslų laiką apibrėžti sunku, nes dažni visiško nejudrumo tarpai, kai vėžys tiesiog nejuda. Šis nejudėjimas nesiskiria nuo paprasto vėžio nejudrumo.

Kepenų trūkimas. Šis požymis pastebėtas tik 2–4 variante. 2-ame variante pasireiškė 88 proc.; 3-ame variante – 50 proc. ir 4-ame – 12 proc. vėžių. Dažniausia vėžys kiek pasvyra į šoną (pasvyrimas būna nedidelis) ir išsilieja 2–3 cm pločio gelsvo ar žalsvo skysčio dėmė (29 pav.). Nustatyti išsiliejusio skysčio tikslią kilmę sudėtinga, nes ši dėmė ištirpsta vandenyje nepalikdama žymių po 60–90 min. Didžiausia tikimybė, kad tai trūkusių kepenų skystis. Tokią prielaidą darome remdamiesi tuo, kad visiems mirusiems vėžiams būna pažeisto kepenys.



29 pav. Iš trūkusių kepenų išsiliejęs skystis.

Šio požymio ypatybė yra tai, kad po jo pasireiškimo miršta 100 proc. vėžių. Nuo šio požymio pasireiškimo iki mirties praeina nuo 20 min. iki 7 val.

Virtimas ant šono. Šis požymis pasireiškė 92 proc. visų mirusių vėžių. Sąlyginai šį požymį dar galima būtų pavadinti mirimu. Jis pasireiškia tuo, kad vėžys sulenkia pilvelį, žnyples pritraukia ir palenkia link kūno ir susirietęs virsta ant šono. Judėjimas paprastai iškart nutrūksta. Stebimi tik pavieniai, reti trūkčiojantys judesiai. Dalis vėžių, praėjus kuriam laikui palengva ištiesia uodegą, bet tai gali būti ir mirusio vėžio raumenų atsipalaidavimo rezultatas.

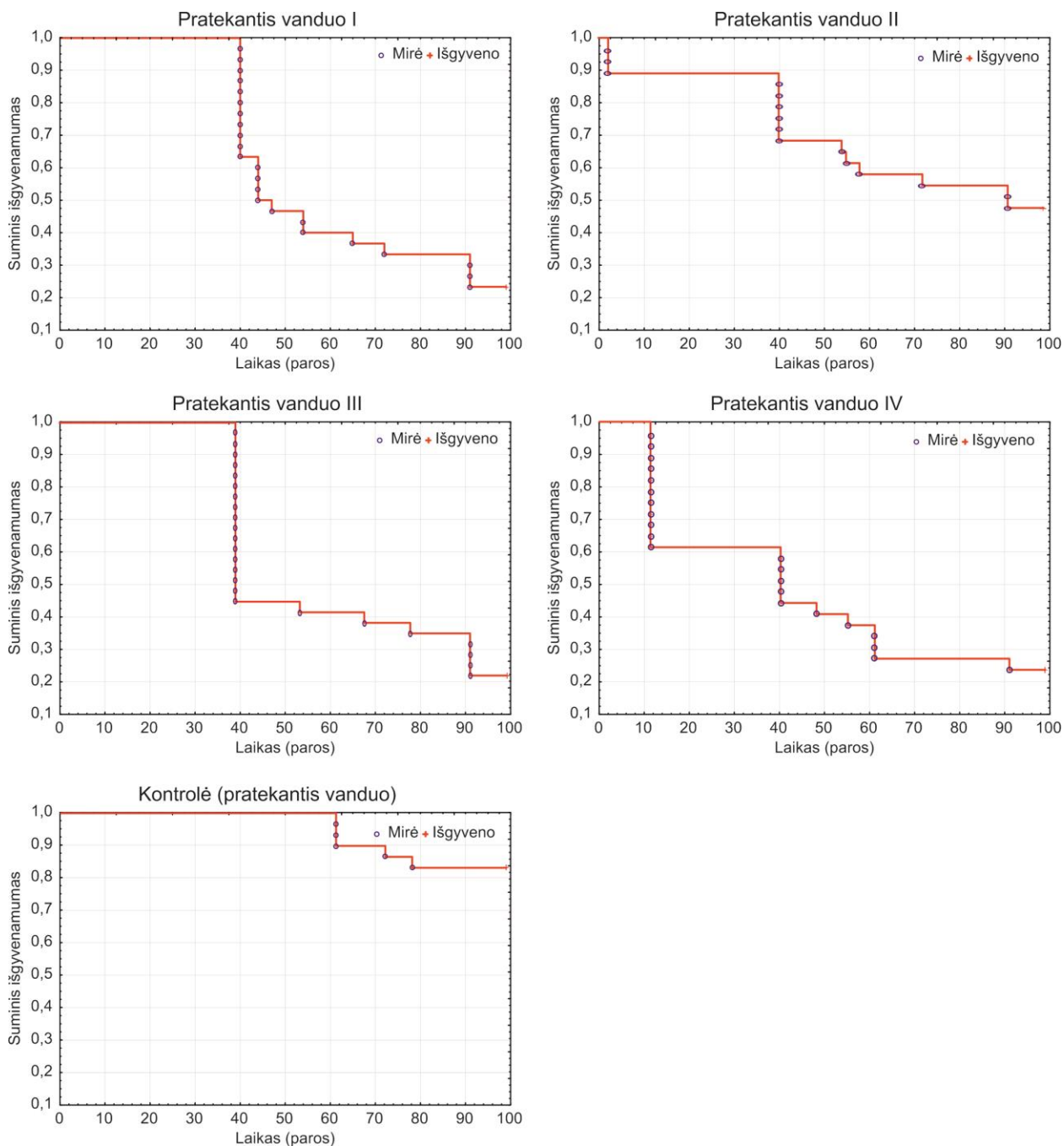
Nustatyti laiką nuo šio požymio pasireiškimo iki mirties sudėtinga, nes gyvybinės funkcijos sunkiai pastebimos ir visiškai išnyksta palaiptu.

Nors yra daug panašumų tarp eksperimento variantų, tačiau stebimi ir gana žymūs skirtumai. Pirmame variante susirgimo požymiai pastebimi maždaug po 4 parų (išskyrus vieną atvejį, kai vėžys mirė po 2 parų). Mirimai prasideda po 5 parų, bet nebūna staigūs ir masiniai. Šiame variante nepastebėtas nė vienas skysčių išsiliejimo atvejis. Išgyvena apie 6 proc. vėžių, paskutiniai mirimai užfiksuoti praėjus 8 paroms po užkrėtimo. Antras variantas iš kitų išsiskiria labai trumpa ligos eiga ir 100 proc. vėžių mirimu. Liga prasideda labai greitai – pirmieji požymiai pastebimi jau maždaug po 4–6 valandų. Pirmieji mirimai prasideda po 2 parų, o per 3 paras miršta visi vėžiai. Tai vienintelis mūsų tirtas variantas kai mirimai būna 100 proc. Trečio varianto pradžia panaši į antrąjį variantą. Požymiai pasireiškia greitai, per pirmas 3 paras miršta 50 proc. vėžių. Vėliau mirtingumas išlieka aukštas, tačiau po 6 parų jis baigiasi. Išgyvena apie 6 proc. vėžių. Ketvirtam variantui būdinga tai, kad gana ilgai nepasireiškia ligos požymiai. Pirmieji silpni ligos požymiai pastebimi tik 3-ą parą. Staigus mirimas prasideda praėjus keturioms paroms ir trunka dvi paras. Po 6 parų mirimai baigiasi ir likę vėžiai išgyvena. Išgyvenamumas 25 proc.

Bandymas pratekančiame vandenyje

Kitame tyrimų etape bandymą kartojome pakeitę laikymo sąlygas. Užkrėsti vėžiai buvo suleisti į 2×1×0,5 m plytelėmis išklotus baseinus. Baseinuose buvo nuolatinis silpnas vandens pratekėjimas. Kadangi vanduo buvo gruntinis, iš grėžinio, baseinuose buvo pastovi temperatūra. Taip pat vyko nuolatinė baseinų aeracija. Skirtingai nuo bandymo akvariumuose, čia taip pat buvo natūralus fotoperiodizmas. Į kiekvieną baseiną buvo suleista po 30 vėžių. Stebėjimas vyko 100 dienų. Čia vėžiai, kadangi nebuvo techninių galimybių, nebuvo stebimi nuolat, t.y. nebuvo

filmuojama. Vėžiai buvo kas 1–2 d. Skaičiuojami, išimami mirę individai, jie matuojami ir sveriami. Gauti rezultatai skyrėsi nuo rezultatų gautų atliekant bandymą akvariumuose. Jie parodyti 30 pav.



30 pav. Išgyvenamumo vertinimas naudojant Kaplano-Mejerio metodą baseinuose.

1-ame variante mirimai prasidėjo po 40 parų. Po pusės bandymo laiko (50 parų) buvo mirę 53 proc. vėžių. Po viso bandymo išgyveno 22 proc. vėžių.

2-ame variante mirimai prasidėjo po 2 parų, tačiau mirė tik 3 vėžiai. Vėliau ilgą laiką nebuvo pakitimų ir vėl vėžiai pradėjo žūti tik po 40 parų. Pusę bandymo laiko išgyveno 68 proc. vėžių. Po viso bandymo išgyveno 48 proc. vėžių.

3-ame variante ilgą laiką nebuvo stebima pokyčių ir tik po 40 parų vyko staigus ir, palygint didelis vėžių mirimas. Iškart žuvo 55 proc. vėžių, tačiau vėliau mirimo atvejai jau buvo pavieniai. Po pusės bandymo laiko buvo mirę 60 proc. vėžių. Po viso bandymo išgyveno 20 proc. vėžių.

4-ame variante mirimai prasidėjo po 10 parų. Po pusės bandymo laiko (6 parų) buvo mirę 60 proc. vėžių. Po viso bandymo išgyveno 22 proc. vėžių.

Kontroliniame variante mirimai pastebėti po 60 parų. Visą bandymo laiką išgyveno 84 proc. vėžių.

Rezultatų stovinčiame ir tekančiame vandenyje palyginimas

Atlikus abu bandymo variantus, matome rezultatų didelius skirtumus, priklausomai nuo vėžių laikymo sąlygų ir užkrato

1-ame variante skirtingose bandymo sąlygose labai skyrėsi vėžių išgyvenamumas. Jei akvariumuose išgyveno tik 6 proc., tai baseinuose išgyveno 22 proc. vėžių. Bendra tarp abiejų bandymų yra tik tai, kad pusę bandymo laiko, tiek vienu, tiek ir kitu atveju išgyveno apie 50 proc. vėžių

2-ame variante matome labai didelius skirtumus tarp abiejų bandymų. Nors mirimai abiem atvejais prasidėjo po 2 parų, tačiau toliau bandymo eiga visiškai skyrėsi. Jei akvariumuose nė vienas individas neišgyveno pusės bandymo laiko, tai baseinuose visą bandymą išgyveno net 48 proc. vėžių. Taip pat baseinuose stebimi keli mirimų padidėjimai, kai tuo tarpu akvariumuose mirimai buvo beveik tolygūs.

3-ame variante taip pat matome didelius skirtumus. Akvariumuose mirimo procentas net 94 proc., tuo tarpu baseinuose – tik 80 proc. Jei akvariumuose mirtingumas buvo maždaug tolygus, tai baseinuose matome staigų mirtingumo protrūkį po 40 parų, tačiau toliau jau stebimi tik pavieniai mirimai.

4-ame variante stebime skirtingą rezultatą, tačiau lyginant su pirmaisiais variantais jis visiškai skiriasi. Pirmais trimis atvejais, akvariumuose mirtingumas buvo žymiai didesnis nei baseinuose. Šiuo atveju yra atvirkščiai. Akvariumuose išgyvenamumas buvo 25 proc., o

baseinuose tik 22 proc. Staigus mirtingumo baseinuose padidėjimas stebimas po 10 parų, bet tai greičiausia prasidėjęs mirtingumas lyginant su kitais variantais (išskyrus 3 vėžius mirusius antrą bandymo parą antrame variante).

Kontroliniai variantai abiem atvejais buvo panašūs. Išgyveno nuo 84 iki 94 proc. vėžių.

Kaip matome, pasikeitus bandymo sąlygoms, rezultatai smarkiai skiriasi. Didžiausias bendrumas tiek vienu, tiek ir kitu atveju – jei lyginsime su kontrole, užkrėstų vėžių mirtingumas žymiai didesnis, nei neužkrėstų. Vadinasi užkratas sukelia ligas, kurios didele atvejų dalimi sukelia vėžių mirtį. Tačiau esant geresnėms laikymo sąlygoms (laikant juos baseinuose), mirtingumai žymiai sumažėja, ir didelė dalis vėžių išgyvena.

Žymiai geresnį išgyvenimą baseinuose galėjo lemti tai, kad baseinuose, kur vyko nuolatinė vandens kaita, dalis užkrato, patekusi į vandenį, pasišalindavo. Tuo tarpu akvariumuose, į vandenį patekęs užkratas galėjo pakartotinai veikti vėžius, į jų organizmą patekdamas per žiaunas kvėpuojant. Pakartotinis užkrėtimas per virškinimo traktą mažai tikėtinas, nes požymiai akvariumuose pasireikšdavo palyginti su baseiniais labai greitai, tuo labiau, kad akvariumuose vėžiai nebuvo maitinami. Vandens temperatūrų skirtumas akvariumuose ir baseinuose buvo maždaug 2 °C. Akvariumuose vandens temperatūra buvo 10–11 °C, baseinuose – 8 °C. Šaltesniame vandenyje grybas galėjo vystytis lėčiau, tačiau dėl mažo skirtumo, vargu ar tai galėjo turėti lemiamos reikšmės. Rainuotieji vėžiai nėra labai reiklūs deguonies kiekiui vandenyje, todėl vargu ar vandens aeracija galėjo daryti įtaką ligos eigai. Nelabai aiški ir fotoperiodizmo įtaka. Atliekant bandymą akvariumuose buvo nuolatinis (netiesioginis ir silpnas) dirbtinis apšvietimas. Bandymas baseinuose buvo atliekamas esant natūraliam apšvietimui. Galbūt natūralus apšvietimas gyvūnams mažina stresą, tačiau tokio poveikio įtaka būtų nelabai aiški.

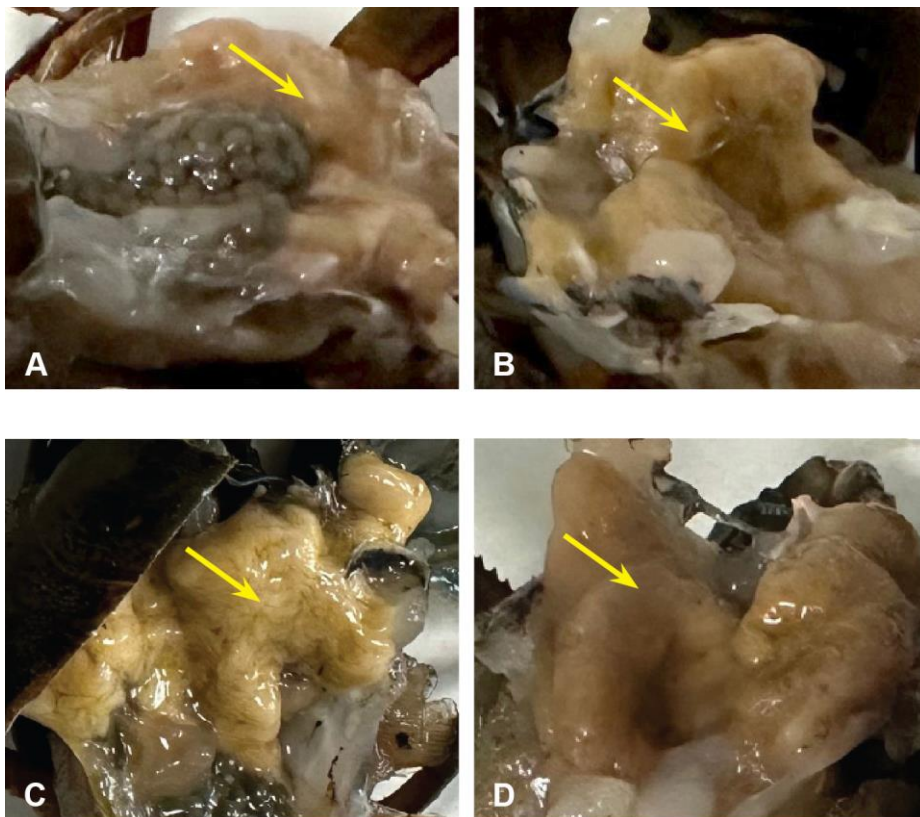
Apibendrinant galima teigti, kad vėžių sergamumui labai didelę reikšmę turi aplinkos sąlygos. Tuo pačiu užkratu užkrėsti vėžiai, esant vienoms sąlygoms gali 100 proc. žūti per kelias paras, tuo tarpu esant kitoms sąlygoms – gali beveik pusė vėžių išgyventi ir kelis mėnesius.

Vėžių kritimo priežastys ir užkrato poveikis skirtingoms vėžių rūšims

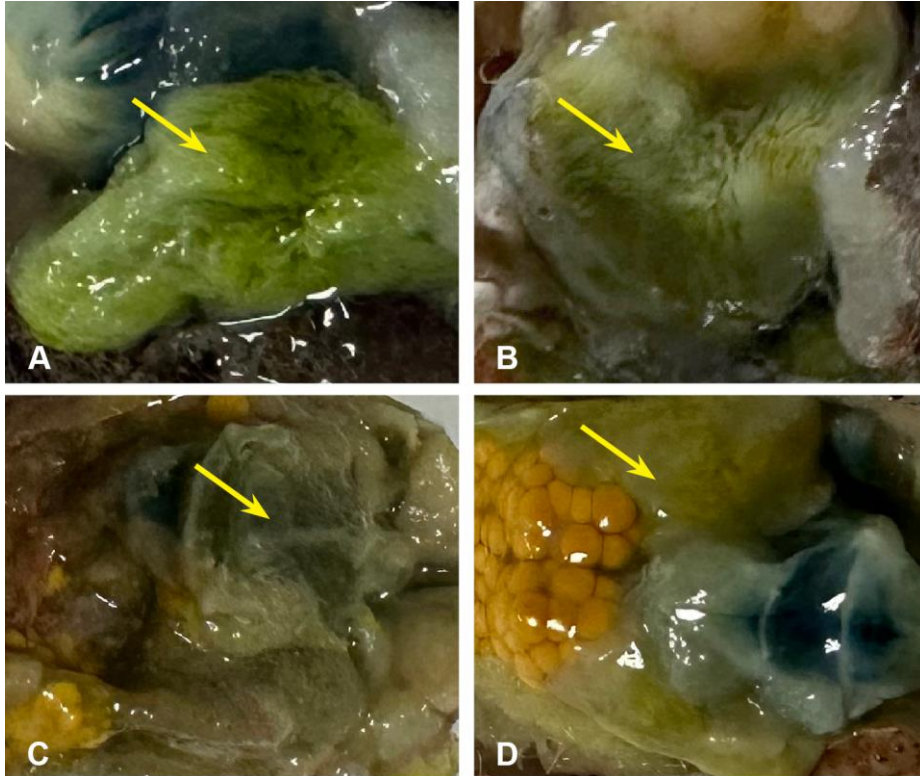
Bandymai buvo atliekami su visomis keturiomis Lietuvoje sutinkamomis vėžių rūšimis. Iš pradžių bandomieji vėžiai buvo užkrečiami 10^6 ląst./ml koncentracijos užkratu. Kritę vėžiai buvo skrodžiami, nustatomi vizualiai matomi pokyčiai bei tikrinama ar kritusiuose vėžiuose randamas užkratas, kuriuo ir buvo užkrėsti vėžiai. Kritusiems vėžiams buvo pažeisto kepenys. Natūraliai vėžių kepenų spalva būna labai įvairi, tikėtina, priklausomai vyraujančio maisto. Ji kinta nuo šviesiai rudos, rudos, iki žalsvos, tamsiai žalios. Kritusių vėžių kepenų spalva skyrėsi, tačiau visai atvejais kepenys buvo stipriai pažeistos, ne tvirtos kaip kontroliniame variante (31 pav.), o drebučių konsistencijos (32–35 pav.).



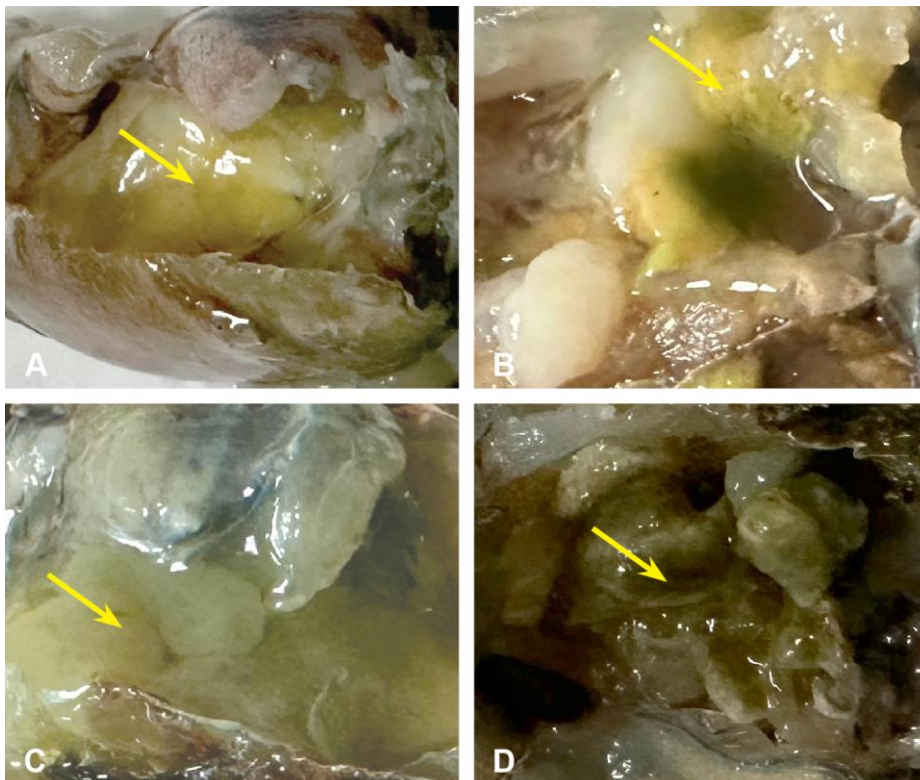
31 pav. Nepažeistos kepenys



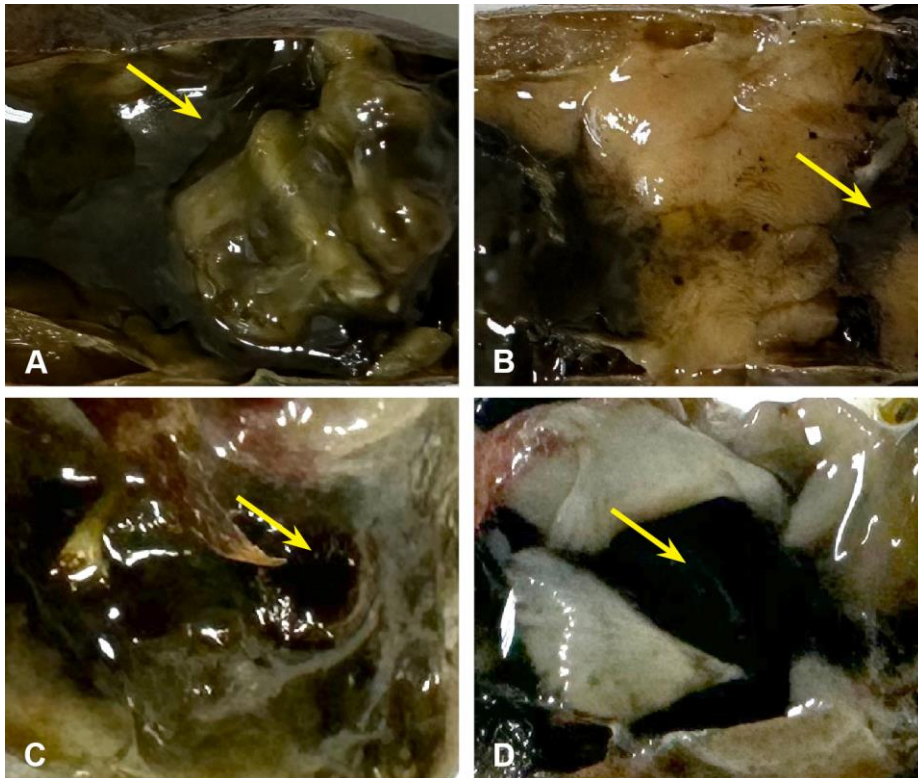
32 pav. Kritusių plačiažnyplių vėžių kepenys (patoginai: 1 – *Fusarium avenaceum*, 2 – *Fusarium equiseti*, 3 – *Phoma herbarum*, 4 – *Phoma macrospora*).



33 pav. Kritusių siauražnyplių vėžių kepenys (patoginai: 1 – *Fusarium avenaceum*, 2 – *Fusarium equiseti*, 3 – *Phoma herbarum*, 4 – *Phoma macrospora*).

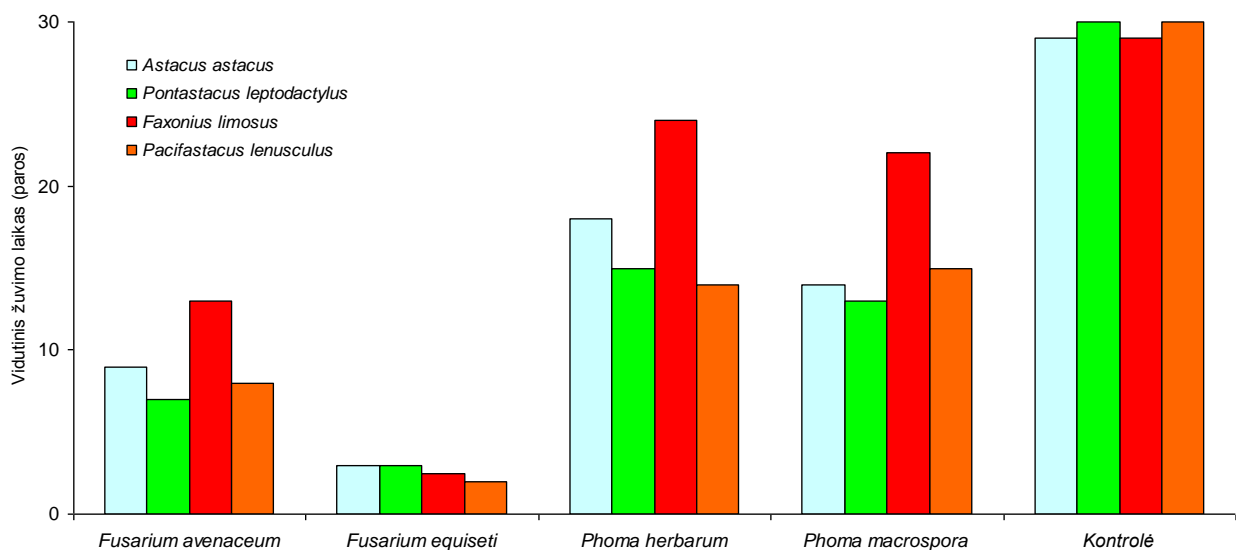


34 pav. Kritusių rainuotųjų vėžių kepenys (patoginai: 1 – *Fusarium avenaceum*, 2 – *Fusarium equiseti*, 3 – *Phoma herbarum*, 4 – *Phoma macrospora*).



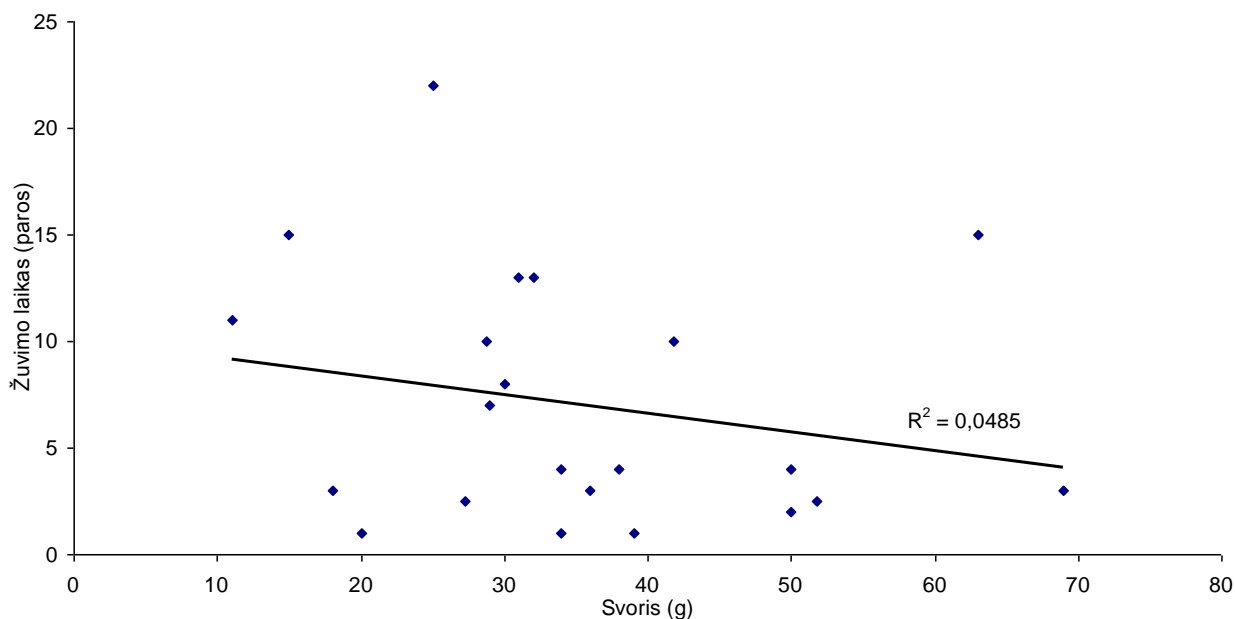
35 pav. Kritusių žymėtųjų vėžių kepenys (patoginai: 1 – *Fusarium avenaceum*, 2 – *Fusarium equiseti*, 3 – *Phoma herbarum*, 4 – *Phoma macrospora*).

Bandymui buvo parinkti panašaus dydžio vėžiai – vidutinis patinų svoris $34,5 \pm 3,40$ g, patelių – $36,4 \pm 7,21$ g. Statistiškai patikimo skirtumo tarp patinų ir patelių svorio nebuvo ($p = 0,41$). Analizuojant rezultatus buvo nustatyta, kad, mūsų tirtais atvejais, priklauso tik nuo užkrato, bet nepriklauso nuo vėžio rūšies (36 pav.). Nors skirtingų rūšių vėžių žuvimo laikas ir skiriasi, tačiau šis skirtumas nėra statistiškai patikimas ($p = 0,21$).



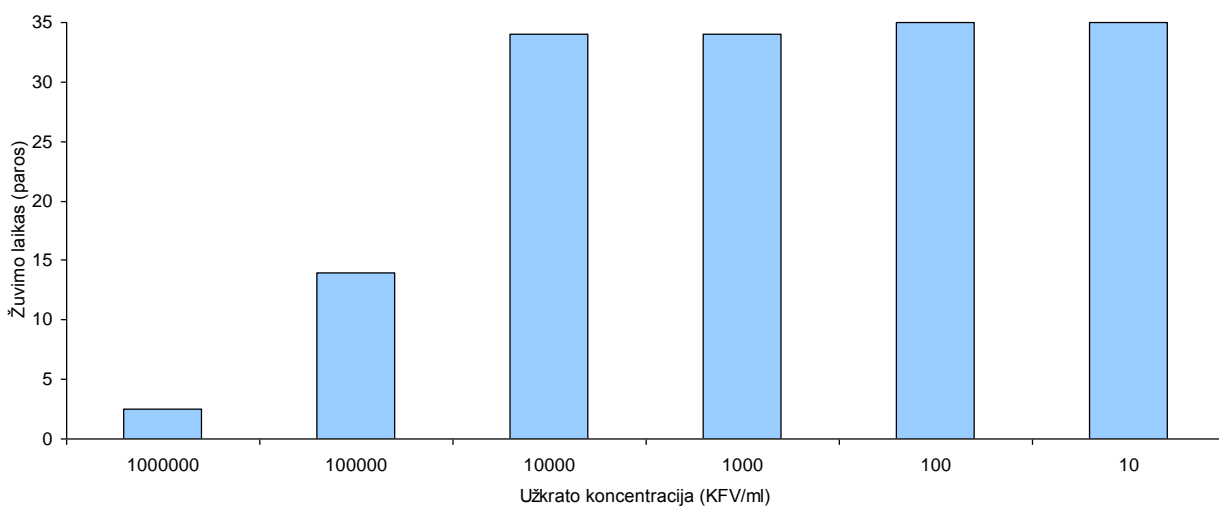
36 pav. Skirtingų rūšių vėžių žuvimas nuo skirtingų užkratų (kontrolės rezultatai bandymo pabaigoje).

Įvertinus užkrato poveikį priklausomai nuo vėžio svorio, skirtumo taip pat nebuvo, determinacijos koeficientas $R^2 = 0,0485$ (37 pav.).



37 pav. Vėžių žuvimas priklausomai nuo vėžio svorio.

Vertinant vėžių žuvimo priežastis, iš kritusių vėžių kepenų bei raumenų buvo atliekamas kontrolinis mikrogrybų sėjimas. Iš rezultatų pateiktų 3 lentelėje (žr. aukščiau, 38 p.), galime teigti, kad patvirtinta žuvimo priežastis tik *Fusarium* genties grybai, tuo tarpų *Phoma* aptikta tik siauražnypliuose vėžiuose. Kadangi kaip agresyviausias užkratas buvo nustatyta *Fusarium equiseti* su juo buvo atliktas bandymas keičiant mikrogrybų koncentraciją užkrate. Bandymui buvo papildomai pasirinktos 5 koncentracijos – 10^6 (pradinis bandymo variantas), 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 KfV/ml ((Kolonijas Formuojantys Vienetai/ml)). Bandymo rezultatai matyti 38 pav.



38 pav. Vėžių žuvimas laikas priklausomai nuo užkrato koncentracijos.

Bandydas buvo tęsiamas 35 dienas. Visą bandymo laikotarpį išgyveno vėžiai, kurie buvo užkrėsti 10^2 , 10^1 užkrato koncentracijomis. Kai koncentracijos buvo 10^4 , 10^3 krito tik po vieną vėžį 34-ą bandymo dieną. Tuo tarpu, kai užkrato koncentracija buvo 10^5 vėžiai išgyveno 14 parų, o koncentracija pasiekus 10^6 visi vėžiai žūsta vidutiniškai per 2,5 paros, nepriklausomai nuo vėžio rūšies.

Susirgimai vėžiams neriantis

Atliekant bandymus su sugautais, o ne išaugintais, vėžiais nustatyti laiką kada vėžys nersis yra labai sudėtinga, todėl suplanuoti tokio bandymo beveik neįmanoma. Gaudant bandymams invazines vėžius buvo sugauta 3 vnt. šiūmečių rainuotųjų vėžių (3–6 g svorio). Kadangi šie vėžiai buvo per maži bandymui, jie neužkrėsti buvo suleisti į bandymo akvariumus, kuriuose buvo vėžiai užkrėsti *Fusarium* genties grybais ir užsikrėsti jie galėjo tik jei užkratas bus perduotas per vandenį. Visais atvejais vėžiai žuvo sekančią dieną po nėrimosi – *Fusarium avenaceum* po 16 parų, *Fusarium equiseti* po 4 parų. Taip pat sekančią dieną po nėrimosi žuvo ir vienas suaugęs rainuotasis vėžys užkrėstas *Phoma macrospora*. Rezultatų yra per mažai, kad būtų gautos statistiškai patikimos išvados, bet galima daryti loginę prielaidą, paremtą šiais atvejais, kad nėrimosi metu vėžiai yra labiau pažeidžiami. Akvakultūroje, auginant vėžius, atsižvelgiant į šią prielaidą reiktų nėrimosi laikotarpiu minimizuoti galimo užkrato patekimą į vandenį.

Apibendrinimas, tyrimo uždaviniai, išvados, rekomendacijos

Tyrimo tikslas buvo nustatyti vėžių bei kai kurių žuvų rūšių ligų sukėlėjus vėžiuose ir vandenyje ir parengti rekomendacijas, kokie vandens telkiniai labiausiai tinka vėžių reintrodukcijai.

1 uždavinys. Naudojant metagenetinius tyrimus nustatyti galimus vėžių bei kai kurių žuvų rūšių ligų sukėlėjus.

Išanalizavus išskirtų mikroskopinių grybų makro ir mikro morfologinius požymius, identifikuotas 61 mikroskopinių grybų izoliatas: 33 izoliatai buvo identifikuoti iki rūšies, o 28 – buvo priskirti 9 gentims. *Cladosporium* ir *Fusarium* gentims priklausantys mikroskopiniai grybai dažniausiai buvo išskirti iš plačiažnyplių vėžių raumenų audinių, o *Penicillium* genties grybai dažniausiai išskirti iš rainuotųjų vėžių kepenų bei raumenų audinių. Taip pat nustatyta 34 bakterijų gentys (67 taksonai).

Daugiausia mikroskopinių grybų pradų buvo išskirta iš plačiažnyplio vėžio raumenų (38,8%) ir kepenų (35,2%) audinių. Jų kiekis abiejuose tirtuose audiniuose buvo beveik vienodas.

Siauražnyplių, rainuotųjų ir žymėtųjų vėžių kepenų audiniuose mikroskopinių grybų pradų kiekis buvo beveik vienodas ir sudarė atitinkamai – 20,5; 23,5 ir 20,5%. Siauražnyplių ir rainuotųjų vėžių raumenų audiniuose mikroskopinių grybų pradų kiekis buvo 22,0% ir 27,5% , o pas žymėtąjį vėžį jų buvo dvigubai mažiau.

Atlikus mikroskopinių grybų išskirtų iš vėžių raumenų ir kepenų audinių ITS regiono sekoskaitą nustatyta, kad *Cladosporium* genties grybai buvo aptinkami visuose tirtuose vėžiuose.

Nustatyta, kad *Fusarium oxysporum* genties mikroskopiniai grybai aptikti plačiažnypliuose ir rainuotuose vėžiuose. Mikroskopiniai grybai *Geotrichum candidum*, *Scopulariopsis brevicaulis* buvo rasti tik siauražnypliuose vėžiuose.

Atlikus sekoskaitos rezultatų analizę buvo nustatyti mikroskopinių grybų filogenetiniai ryšiai – didžiausias šakas sudarė *Cladosporium*, *Fusarium* ir *Penicillium* gentims priklausančios mikroskopinių grybų rūšys.

Atlikus mikroskopinių grybų patogeniškumo vėžiams tyrimus nustatyta, kad tirti *Fusarium avenaceum* ir *F. equiseti* grybai buvo išskirti iš visų kritusių vėžių kepenų ir raumenų audinių, tuo tarpu *Phoma* genties grybai buvo išskirti tik iš siauražnyplių vėžių raumenų.

Iš mikroskopinių grybų vėžiams pavojingiausi *Fusarium* genties grybai ir ypač *Fusarium equiseti*.

Tyrimo metu, pavojingiausiu laikomo vėžių maro sukėlėjo *Aphanomyces astaci*, nenustatyta nei vėžiuose, nei vandens telkinių vandenyje.

Dauguma tyrimo metu nustatytų bakterijų (kaip ir mikroskopiniai grybai) yra oportunistiniai patogenai. Jie organizmui nedaro pastebimos žalos, kol nesusidaro sąlygos kilti ligai. Tai gali būti jų koncentracijos padidėjimas, sąveika su mikrogrybais ar kitomis bakterijomis, organizmo atsparumo sumažėjimas (pvz., vėžiams po nėrimosi). Iš pavojingesnių aptiktų bakterijų reiktų išskirti *Flavobacterium columnare*, *Chryseobacterium balustinum*, *C. piscicola*, *Aeromonas sobria*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *Hafnia alvei*. Šios bakterijos žinomos kaip patogenai ne tik vėžiams, bet ir žuvims, todėl jas aptikus vandens telkinyje netikslinga planuoti tokio vandens telkinimo įvėžinimo ar intensyvesnio žuvinimo.

2 uždavinys. Laboratoriniais eksperimentais nustatyti dažniausiai paplitusių sukėlėjų vėžiams sukeliamų ligų anamnezę.

Ligos eigoje galima išskirti šiuos pagrindinius požymius, kurie pasireiškia daugumai susirgusių vėžių. Tai silpnas koordinacijos sutrikimas, griuvimas ant nugaros, stiprus koordinacijos sutrikimas, kepenų skysčių išsiliejimas, griuvimas ant šono ir mirtis. Liga pažeidžia kepenis, dėl to įvyksta organizmo apsinuodijimas toksiniais ir baigiasi vėžio mirtimi. Staigus tokių požymių, kaip griuvimas ant nugaros, pasireiškimas leidžia teigti, kad yra pažeidžiama ir nervų sistema.

Vėžių mirtingumas laboratorinėmis eksperimento sąlygomis labai kinta priklausomai nuo eksperimento sąlygų ir gali svyruoti nuo 100 proc. žuvimo iki visai nepastebimo poveikio. Tokie faktoriai kaip vandens kaita, bei užkrato koncentracija stipriai įtakoja vėžių išgyvenamumą. Padidinus vandens kaitą vėžių mirtingumą galima sumažinti iki 50 proc. Nėrimosi metu vėžiai pasidaro labiau pažeidžiami.

Iš visų tirtų ligų sukėlėjų reikia išskirti *Fusarium equiseti*. Jis pasirodė agresyviausias iš visų tirtų užkratų, tačiau kaip ir dauguma kitų atvejų, jis yra oportunistinis patogenas. Ligos prasideda užkratui viršijus 10000 KfV/ml, o pasiekus 1000000 KfV/ml visi vėžiai žūna nepriklausomai nuo jų svorio, lyties ir net vėžio rūšies.

Kiti tirti ligų sukėlėjai, natūraliose sąlygose, vėžių populiacijoms gali padaryti didesnę įtaką tik susidarius kelioms sąlygoms kartu – turėtų būti aukšta vandens temperatūra, mažas vandens pratekamumas ar užsistovėjimas, didelis vėžių tankis. Tai labiausiai būtų pavojinga vėžiams besineriant.

3 uždavinys. Parengti rekomendacijas, leidžiančias įvertinti vandens telkinių tinkamumą vėžių reintrodukcijai.

Planuojant vandens telkinio įvėžinimą tikslinga atlikti mikrobiologinius bei molekulinis vandens tyrimus. Jų tikslas būtų nustatyti ar vandens telkinyje yra invazinių vėžių, bakterijų *Flavobacterium columnare*, *Chryseobacterium balustinum*, *C. piscicola*, *Aeromonas sobria*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *Hafnia alvei*, taip pat *Fusarium* genties mikroskopinių grybų. Šie sukėlėjai nebūtinai sunaikins vėžių populiaciją, bet tokia tikimybė smarkiai padidėja.

Reikia įvertinti telkinio vandens kaitos greitį (jei jis yra). Vandens pratekėjimas turi dvejopą reikšmę. Viena vertus spartesnė vandens kaita sumažina ligų pavojų, kita vertus pratekamuose vandens telkiniuose didesnė tikimybė, kad ten pateks invaziniai vėžiai, unguariai, karpiai, todėl BŪTINA įvertinti jų patekimo galimybę.

Reikia atkreipti dėmesį į dar kelis veiksnius. Jie nebuvo šio tyrimo tikslas, bet yra labai svarbūs įvėžinant vandens telkinius. Pirmiausia įžuvinimas unguariais bei galimybė unguariams patekti į vandens telkinį. Jei tokia galimybė yra ar, juo labiau, vandens telkinys įžuvintas unguariais jis netinkamas vėžiams. Įžuvinimas unguariais lėmė apie 30 proc. plačiažnyplių vėžių populiacijų išnykimą.

Kita svarbi vėžių populiacijų formavimuisi turinti įtaką žuvis yra karpiai. Tiesiogiai jie gali paveikti tik vėžių jaunikius, tačiau jie didina vandens drumstumą, ardo dugno paviršių, sukelia dumblą kuris užkemša vėžių slėtuves. Priklausomai nuo konkrečių vandens telkinio savybių, juose gali išgyventi vėžiai, tačiau gausių populiacijų (ypač plačiažnyplių vėžių) susiformavimas mažai tikėtinas.

Ribotas potencialių slėptuvių vėžiams kiekis taip pat turi dvejopą reikšmę. Viena vertus, jei yra ribotas slėptuvių skaičius neverta tikėtis labai gausių populiacijų, tačiau jei įvėžinimo tikslas yra ne populiacijos gausumas, o vėžių kaip rūšies populiacijų gausinimas, tuomet toks vandens telkinys yra tinkamas įvėžinimui. Negausios populiacijoms, jei jos gyvybingos, didina galimybę susiformuoti ilgaamžems populiacijoms dėl nedidelės ligų kilimo tikimybės.

Dar vienas faktorius į kurį reikia atsižvelgti – žemės ūkio dirbamų laukų buvimas netoli planuojamo įvėžinti vandens telkinio. Padidėja tikimybė, kad iš arti esančių dirbamų laukų su lietaus vandeniu į vandens telkinį mikroskopinių grybų sukeliančių vėžių ligas.

4 uždavinys. Parengti rekomendacijas, padedančias minimizuoti ligų poveikį akvakultūroje.

Akvakultūroje pagrindinis tikslas būtų apsaugoti auginamus vėžius nuo užsikrėtimo mikroskopiniai grybais bei bakterijomis. Pageidautina imti vandenį iš grežinių, sumažinus jame esantį geležies kiekį. Sterilizuoti vandenį patenkantį iš paviršinių vandens šaltinių gana sudėtinga

ir ekonomiškai būtų nenaudinga. Tai galima pasiekti nakinant mikroorganizmus apdorojant termiškai, paveikiant ultravioletiniais spinduliais. Antibiotikų panaudojimas galimas, ypač pastebėjus pirmus ligos požymius, tačiau žymus teigiamas poveikis mažai tikėtinas dėl to, kad ligos požymiai pasireiškia jau stipriai pažeidus vėžių kepenis bei nervų sistemą.

Pastebėjus ligos pradžią galima mėginti išgelbėti bent dalį vėžių. Tam reiktų kuo galima labiau padidinti vandens kaitą ir vanduo turėtų keistis nuolat. Taip pat reiktų, kiek tik imanoma, sumažinti laikomų vėžių tankumą.

Vėžių nėrimosi metu taip pat reikia padidinti vandens pasikeitimą, nes iš karto po nėrimosi vėžių atsparumas ligoms būna sumažėjęs.

Jei akvakultūroje naudojamas paviršinis vanduo, reiktų nustatyti ar vandenyje nėra *Aphanomyces astaci* bei *Fusarium* genties (ypač *Fusarium eguisei*) grybų. Jei jų būtų aptikta, toks vanduo vėžių auginimui netinkamas ir susidarius tinkamoms sąlygoms vėžių ligų išvengti nepavyktų. Kiti sukėlėjai kelia gerokai mažesnę riziką.

Siekiant išvengti užkrato patekimo su maistu, pašarai turėtų būti apdorojami termiškai. Terminis jų apdorojimas sunaikintų *Fusarium* genties mikroskopinių grybų sporas.

Dar reiktų paminėti keletą bendrų dalykų, kurie galėtų būti prevenciniai siekiant išvengti mikroskopinių grybų bei bakterijų sukeltų ligų plitimo.

Negalima žvejojant masalui naudoti vėžių (negyvų ar gyvų), ypač jei jie sugauti kitame vandens telkinyje. Žvejybos įrankiai po žvejybos turi būti dezinfekuojami ar bet jau gerai išdžiovinami. Išdžiovinimas padėtų išvengti ligų sukeltų mikroskopinių grybų, bet bakterijų sukeltų ligų plitimui to neužtektų. Kiek imanoma turėtų būti saugoma, kad lietaus vanduo iš dirbamų laukų nepatektų tiesiai į vandens telkinius, todėl dirbami laukai neturėtų patekti į vandens telkinių apsaugines zonas.

Literatūros sąrašas

- Alexandrova, E.N., Tarasov, K.L. 2020. Biology of causative agents of crayfish mycoses in connection with environmental protection in crayfish producing reservoirs. *Earth and Environmental science*, 421: 082027.
- Assefa, A., Abunna, F. 2018. Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Veterinary medicine international*, article ID 5432497.
- Bensch, K., Groenewald, J. Z., Meijer, M., Dijksterhuis, J., Jurjević, Ž., Andersen, B., Samson, R. A., 2018. *Cladosporium* species in indoor environments. *Studies in mycology*, 89, 177–301.
- Bi et al. 2023. Identification and pathogenicity of emerging fish pathogen *Acinetobacter jonsonii* from a disease outbreak in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research* 1995494.
- Bilański, P., Kowalski, T., 2022. Fungal endophytes in *Fraxinus excelsior* petioles and their in vitro antagonistic potential against the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus*. *Microbiological Research*, 257, 126961.
- Biology of freshwater crayfish. Ed. David M. Holdich.. UK, 2002. 377–438 p.
- Błońska, E., Lasota, J., Jankowiak, R., Michalcewicz, J., Wojas, T., Zbyryt, A., Ciach, M., 2021. Biological and physicochemical properties of the nests of White Stork *Ciconia ciconia* reveal soil entirely formed, modified and maintained by birds. *Science of the Total Environment*, 763, 143020.
- CABI, 2019. *Aphanomyces astaci*. In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB.
- Cao et al. 2016. *Hafnia alvei*: a pathogen causing infectious intussusception syndrome (IIS) in farmed channel catfish *Ictalurus punctatus*. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh, IJA_68.2016.1305*.
- Cometto, A., Leavitt, S. D., Grube, M., De Hoog, S., & Muggia, L., 2023. Tackling fungal diversity in lichen symbioses: molecular and morphological data recognize new lineages in Chaetothyriales (Eurotiomycetes, Ascomycota). *Mycological Progress*, 22(8), 53.
- Crous, P. W., Schumacher, R. K., Wingfield, M. J., Lombard, L., Giraldo, A., Christensen, M., Groenewald, J. Z., 2015. Fungal systematics and evolution: FUSE 1. *Sydowia*, 67:81–118.
- Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., Houbraken, J. (2019). *Fungal Biodiversity*. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands.
- Cukerzis J. 1989. *Upiniai vėžiai*. Vilnius, „Mokslas“, 140 pp.
- Das, K., Lee, S. Y., Jung, H. Y., 2020. Molecular and morphological characterization of two novel species collected from Soil in Korea. *Mycobiology*, 48(1), 9–19.
- Declercq et al 2013 Columnaris disease in fish A review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary Research* 44:27.
- Diler, O. Bolat, Y. (2001). Isolation of *Acremonium* species from crayfish, *Pontastacus leptodactylus* in Egirdir Lake. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 21(4), 164.
- Domsh, K. H., Gams, W., Anderson, T. H. (2007). *Compendium of soil fungi*. IHW-Verlag, Eching.

- Dörr, A. J. M., Rodolfi, M., Elia, A. C., Scalici, M., Garzoli, L., Picco A. M. (2012). Mycoflora on the cuticle of the invasive crayfish *Procambarus clarkii*. *Fundamental and Applied Limnology*, 180(1), 77–84.
- Dragicevic et al .2020 Microbial pathogens of freshwater crayfish A critical review and systematization of the existing data with directions for future research. *Journal of Fish Diseases*.00:1–27.
- Dragičević, P., Bielen, A., Petrić, I., Hudina S. (2020). Microbial pathogens of freshwater crayfish: A critical review and systematization of the existing data with directions for future research. *Journal of Fish Diseases*, 00:1–27.
- Edgerton B. F., Paasonen P., Henttonen P., Owens L. 1996. Description of a bacilliform virus from the freshwater crayfish, *Astacus astacus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 68: 187–190.
- Edgerton et al. 2002. Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms. *Aquaculture* 206L 57–135.
- Frisvad, J. C. Media and growth conditions for induction of secondary metabolite production (2012). *Methods in Molecular Biology*, 944, 47–58. Prieiga per internetą: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-122-6_3.
- Fuentes-Valencia et al. 2022. Bacterial and parasite co-infection in Mexican golden trout *Oncorhynchus chrysogaster* by *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria*, *Plesiomonas shigelloides* and *Ichtyobodo necator*. *BMC Veterinary Research* 18:137.
- Garda et al. 2003. *Acidovorax valerianellae* sp.nov., a novel [athogen of lamb's lettuce (*Valerianella locusta* L. Lterr.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 795–800.
- Glynou, K., Ali, T., Buch, A. K., Haghi Kia, S., Ploch, S., Xia, X., Maciá-Vicente, J. G., 2016. The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. *Environmental microbiology*, 18(8), 2418–2434.
- Gozlan, R. E., Marshall, W. L., Lilje, O., Jessop, C. N., Gleason, F. H., Andreou, D. (2014). Current ecological understanding of fungal-like pathogens of fish: what lies beneath? *Frontiers in Microbiology*, 5: 62.
- Green, S., Castlebury, L. A., 2007. Connection of *Gnomonia intermedia* to *Discula betulina* and its relationship to other taxa in Gnomoniaceae. *Mycological Research*, 111(1), 62–69.
- Halder M., Ahne W. 1988. Freshwater crayfish *Astacus astacus* – a vector for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Diseases of Aquatic Organisms* 4: 205–209.
- Hernández-Restrepo, M., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., 2016. Taxonomic and phylogenetic re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella* and *Idriella*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 36(1), 57–82.
- Holdich, D. M., Reynolds, J. D., Souty-Grosset, C., Sibley, P. J. (2009). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 11, 394–395.
- Huang et al. 2022. *Aeromonas allosaccharophila*, an emerging opportunist pathogen for farmed hybrid sturgeon *Acipenser baerii* x *Acipenser schrencki* in southwest China. *The Israel Journal of Aquaculture*. 1605429.
- Huang et al. 2022. Isolation, molecular characterisation, and microbial resistance of selected culturable bacteria from crayfish (*Procambrus clarkii*). *Frontiers in Microbiology* 13:911777.

- Ilardi et al. 2009. *Chryseobacterium piscicola* sp. Nov., isolated from diseased salmonid fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 3001–3005.
- Jiravanichpaisal et al. 2009. A highly virulent pathogen *Aeromonas hydrophila* from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 101:56–66.
- Kijpornyongpan, T., Noble, M. C., Piątek, M., Lutz, M., & Aime, M. C., 2024. Elucidation of intragenomic variation of ribosomal DNA sequences in the enigmatic fungal genus *Ceraceosorus*, including a newly described species *Ceraceosorus americanus*. *IMA fungus*, 15(1), 42.
- Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111–120.
- Kostannšek R. et al. 2007. „Candidatus Bacilloplasma“, a novel lineage of Mollicutes associated with the hindgut wall of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda).
- Lee et al. 2011. *Flavobacterium koreense* sp. Nov., *Flavobacterium chungnamense* sp.nov., and *Flavobacterium cheonanense* sp.nov. isolated from a freshwater reservoir. *The Journal of Microbiology* 49 (3):387–392.
- Lee et al. 2012. *Flavobacterium dankookense* sp. nov., isolated from a freshwater reservoir, and emended descriptions of *Flavobacterium cheonanense*, *F. chungnamense*, *F. koreense* and *F. Aquatile*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 2378–2382.
- Li, W. J., McKenzie, E. H., Liu, J. K., Bhat, D. J., Dai, D. Q., Camporesi, E., Hyde, K. D., 2020. Taxonomy and phylogeny of hyaline-spored coelomycetes. *Fungal Diversity*, 100, 279–801.
- Liu, X., Tibpromma, S., Hughes, A., Chethana, K., Wijayawardene, N., Dai, D., Mortimer, P., 2023. Culturable mycota on bats in central and southern Yunnan Province, China. *Mycosphere*, 14(1):497–662.
- Longsha M., Bateman K., Stebbing P., Stentiford G.D., Hockley F.A. 2012. Disease risk associated with the importation and release of non-native crayfish species into mainland Britain. *Aquatic Biology* 16: 1–15.
- Longshaw M. 2011. Diseases of crayfish: A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106: 54–70.
- Lugauskas A., Paškevičius A., Repečkienė J., 2002. Patogeniški ir toksiški mikroorganizmai žmogaus aplinkoje. *Aldorija*, p. 434.
- Mackevičienė G. (ats.red.), Cukerzsis J., Šeštokas J., Tamkevičienė R. 1979. Lietuvos vandenių upinių vėžių biologija. Vilnius, „Mokslas“, 148 pp.
- Mackevičienė G., Mickėnienė L., Mažeika V. Vėžių veisimas ir auginimas. Vilnius, 2005. 80 p.
- Mahmoud, M. M. (2019). *Fusarium solani* infection of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Assiut Veterinary Medical Journal*, 65(161):50–59.
- Makkonen, J., Jussila, J., Koistinen, L., Paaver, T., Hurt, M., Kokko, H., (2013). *Fusarium avenaceum* causes burn spot disease syndrome in noble crayfish (*Astacus astacus*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 113:184–190.
- Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M., Iturrieta-González, I., García, D., Gené, J., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., 2019. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 3. *Studies in mycology*, 94, 1–124.

- Martínez-Álvarez, P., Fernández-González, R. A., Sanz-Ros, A. V., Pando, V., Diez, J. J., 2016. Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biological Control*, 94, 1–10.
- Menkis, A., Vasaitis, R., 2011. Fungi in roots of nursery grown *Pinus sylvestris*: ectomycorrhizal colonisation, genetic diversity and spatial distribution. *Microbial Ecology*, 61, 52–63.
- Monteiro, P., Gonçalves, M. F., Pinto, G., Silva, B., Martín-García, J., Diez, J. J., Alves, A., 2022. Three novel species of fungi associated with pine species showing needle blight-like disease symptoms. *European Journal of Plant Pathology*, 1–20.
- Mrugała A., Kozubikova-Balcarova E., Chucholl C., Cabanillas Resino S., Viljamaa-Dirks S., Vukic J., Petrussek A. 2014. Trade of ornamental crayfish in Europe as possible introduction pathway for important crustacean diseases: crayfish plague and white spot syndrome. *Biological Invasions* 17: 1313–1326.
- Oidtmann B., Geiger S., Steinbauer P., Culas A., Hoffmann R.W. 2006. Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Diseases of aquatic organisms* 72: 53–64.
- Panno, L., Bruno, M., Voyron, S., Anastasi, A., Gnani, G., Miserere, L., Varese, G. C., 2013. Diversity, ecological role and potential biotechnological applications of marine fungi associated to the seagrass *Posidonia oceanica*. *New biotechnology*, 30(6), 685–694.
- Park et al. 2020. Recent insights into *Aeromonas salmonicida* and its bacteriophages in aquaculture: A comprehensive review. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(10)L 1443–1457.
- Paul, N. C., Deng, J. X., Sang, H. K., Choi, Y. P., Yu, S. H., 2012. Distribution and antifungal activity of endophytic fungi in different growth stages of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 28(1), 10–19.
- Quaedvlieg, W. G. J. M., Verkley, G. J. M., Shin, H. D., Barreto, R. W., Alfenas, A. C., Swart, W. J., Crous, P. W., 2013. Sizing up septoria. *Studies in mycology*, 75(1), 307–390.
- Salighehyadeh et al. 2019. Molecular and clinical evidence of *Aeromonas hydrophila* and *Fusarium solani* co-infection in narrow-clawed crayfish *Astacus leptodactylus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 132: 135–141.
- Sarkar, P., Stefi Raju, V., Kuppusamy, G., Aminur Rahman, M., Elumalai, P., Harikrishnan, R., Arshad, A., Arockiaraj, J. 2022. Pathogenic fungi affecting fishes through their virulence molecules. *Aquaculture*, 548: 737553.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., White, M. M., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246.
- Scott and Thune. 1986. Bacterial flora of hemolymph from red swamp crawfish *Procambarus clarkii* from commercial ponds. *Aquaculture* 58: 161–165.
- Sheu et al. 2011. *Flavobacterium macrobrachii* sp. nov., isolated from a freshwater shrimp culture pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 1402–1407.
- Soler et al. 2002. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32: 243–247.

- Stępień, Ł., Gromadzka, K., Chelkowski, J., Basińska-Barczak, A., & Lalak-Kańczugowska, J., 2019. Diversity and mycotoxin production by *Fusarium temperatum* and *Fusarium subglutinans* as causal agents of pre-harvest *Fusarium* maize ear rot in Poland. *Journal of applied genetics*, 60, 113–121.
- Su et al. 2023. Identification and characterization of *Aeromonas veronii* and *Vibrio cholerae* from naturally diseased red swamp crayfish (*Procambrus clarkia*). *Aquaculture Reports* 30:101614.
- Šeštokas J. 1969. Vėžių paplitimas, išteklių būklė ir jų atstatymo galimybės Lietuvoje. Disertacija. Vilniaus universitetas. 281 p. (Crayfish distribution, status of stock and possibilities of its restoration. Manuscript of thesis of doctoral dissertation. University of Vilnius. 281 p.
- Šeštokas J. 1973. Minijos ir kai kurie kiti upių baseinų vėžingi vandens telkiniai ir jų apsauga. Ataskaita.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Taştan, Y., Çağatay, I. T. (2022). *Fusarium oxysporum* causes black gill disease in narrow-clawed crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Diseases of aquatic organisms*, 148: 19–27.
- Taugbol T., Skurdal J., Burba A. 1998. Gėlavandeniai vėžiai Lietuvoje. Rytų Norvegijos Tyrimų institutas – Ataskaita Nr 12/1998.
- Thambugala, K. M., Wanasinghe, D. N., Phillips, A. J. L., Camporesi, E., Bulgakov, T. S., Phukhamsakda, C., Hyde, K. D., 2017. Mycosphere notes 1–50: grass (Poaceae) inhabiting Dothideomycetes. *Mycosphere*, 8(4), 697–796.
- Uleckas O. Rainuotojų vėžių (*Orconectes limosus*) ligos. (2013). Bakalauro darbas (vadovas Gintautas Vaitonis). Vilnius.
- Valenzuela-Lopez, N., Cano-Lira, J. F., Guarro, J., Sutton, D. A., Wiederhold, N., Crous, P. W., Stchigel, A. M., 2018. Coelomycetous Dothideomycetes with emphasis on the families Cucurbitariaceae and Didymellaceae. *Studies in mycology*, 90(1), 1–69.
- Vu, D., Groenewald, M., De Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Verkley, G. J. M., 2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in mycology*, 92(1), 135–154.
- Wu et al. 2021. Association of the microbiota dysbiosis in the hepatopancreas of farmed crayfish (*Procambrus clarkii*) with disease outbreaks. *Aquaculture* 536:736492
- Xie et al. 2021 Comparison of the intestinal microbiota during the different growth stages of red swamp crayfish (*Procambrus clarkii*). *Frontiers in Microbiology*. 12:696281
- Zhang, H., Wei, T. P., Li, L. Z., Luo, M. Y., Jia, W. Y., Zeng, Y., Tao, G. C., 2021. Multigene phylogeny, diversity and antimicrobial potential of endophytic Sordariomycetes from *Rosa roxburghii*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 755919.
- Zhu et al. 2021. The related immunity response of red swamp crayfish (*Procambrus clarkii*) following infection with *Aeromonas veronii*. *Aquaculture reports* 21: 100849.

Projekto tema publikuoti straipsniai ir tyrimų viešinimas

Švedienė, J., Vaitonis, G., Raudonienė, V., Paškevičius, A. (2024) Vandens telkiniuose gyvenančių vėžių ligas sukeliančių mikroskopinių grybų paieška (Search for microscopic fungi that cause crayfish diseases in water bodies). *Žmogaus ir gamtos sauga* 2024. Kaunas, 241–244. <https://doi.org/10.7220/2538-9122.2024>

Kasputis, S., Švedienė, J., Raudonienė, V., Paškevičius, A., Vaitonis, G. (2025) *Fusarium* genties grybai, išskirti iš Lietuvos vandens telkiniuose gyvenančių vėžių (Fusarium Genus Fungi Isolated from Crayfishes Living in Lithuanian Water Bodies). *Žmogaus ir gamtos sauga* 2025. Kaunas, 372–377. <https://doi.org/10.7220/2538-9122.2025>

Švedienė J., Vaitonis G., Raudonienė V., Kasputis S., Paškevičius A. 2026. Biodiversity of microscopic fungi in crayfish living in Lithuanian waters. (Baigiamas rengti).

Vaitonis G. 2024-10-19. LRT laida Gimtoji žemė. Invazinius vėžius galima gaudyti visus metus.

Vaitonis G. 2025-07-22. LRT laida Labas rytas, Lietuva. Specialistas įspėja vėžiautojus: iš Lietuvoje gyvenančių 4 rūšių gaudyti galima ne visas

Vaitonis G. 2025-08-12. Interviu leidiniui Kupiškėnų mintys. Adomynėje prisiveisė invazinių vėžių. <https://kmintys.lt/2025/08/13/adomyneje-prisiveise-invaziniu-veziu/>

Vaitonis G. 2025-07-11. Paskaita visuomenei apie vėžius. Pavilnių ir Verkių regioninių parkų renginys „Vėžiavimo naktis“

SUDERINTA:

(Tyrimų priežiūros komisijos pirmininkas)

(Vardas, Pavardė)

(Data)