

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

# **Mütseeli elektrofüsioloogia mitteinvasiivse mõõtesüsteemi prototüüp**

Bakalaureusetöö  
(12 EAP)  
Hana Geara

Juhendajad MSc Kadri-Ann Valdur, PhD Leho Tedersoo

TARTU 2022

# INFOLEHT

## **Mütseeli elektrofüsioloogia mitteinvasiivse mõõtesüsteemi prototüüp**

Seente ainulaadne eluvorm – keerukas membraaniga ümbritsetud mikrofluidika süsteem – võimaldab mütseelis infol levida sarnaselt neuraalvõrgustikega – elektriliste impulssidena. Selle bakalaureusetöö teoreetiline osa annab ülevaate mütseeli anatoomilistest eripäradest ja füsioloogilistest protsessidest, mis panustavad seente elektrilisse aktiivsusesse. Käsitletakse ka bioloogilise elektri mõõtemetodeid ja mõõtetulemuste interpreteerimise võimalusi. Töö eksperimentaalosa pakub välja mõõterakkude prototüübi agarsöötmel kasvava mütseeli elektrilise aktiivsuse mõõtmiseks. Prototüübi testimiseks kasvatati mõõterakkudel austerserviku, *Pleurotus ostreatus* isolaate ja mõõdeti avatud ahela pinget. Mõõtmiste tulemusena tuvastati keskmiselt 20 tunni perioodiga tsüklilisus, mis viitab tsirkadiaanrütmile.

**Märksõnad:** *Pleurotus ostreatus*, elektrofüsioloogia, tsirkadiaanrütm

**CERCS kood:** B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

## **Prototype for Non-invasive Mycelial Electrophysiological Measurements**

Fungi can be considered microfluidic systems enclosed within a membrane that enables electrical activity in mycelium, similar to neural networks. The theoretical part of this bachelor's thesis gives an overview of the anatomical peculiarities and physiological processes giving rise to mycelial electrical activity. In addition, insight into bioelectrical measurement techniques is given, followed by a discussion about possibilities for interpreting measured data. The aim of the experimental part was to design a system for non-invasive electrical measurements for mycelium growing on fungal culture media. *Pleurotus ostreatus* was chosen for testing developed systems by measuring open circuit potential. The analysis of measured data showed cyclic behaviour in mycelial electrical activity with an average period of 20 hours, suggesting circadian rhythm in *Pleurotus ostreatus*.

**Keywords:** *Pleurotus ostreatus*, electrical activity, circadian rhythm

**CERCS code:** B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# SISUKORD

|   |           |
|---|-----------|
| <b>SISUKORD</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>SISSEJUHATUS</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>1.1. Seente olulisus</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>1.2. Seen kui sensoorne süsteem</b> .....                                    | <b>7</b>  |
| <b>1.3. Filamentsete seente anatoomia</b> .....                                 | <b>9</b>  |
| <b>1.4. Elektrofüsioloogia</b> .....  | <b>12</b> |
| 1.4.1. Hüdrauliline süsteem .....   | 12        |
| 1.4.2. Neuronid-sarnane aktiivsus .....   | 14        |
| <b>1.5. Elektrilised mõõtmismeetodid biotehnikas</b> .....                      | <b>15</b> |
| 1.5.1. Bioloogiline süsteem kui voluring.....                                   | 16        |
| 1.5.2. Avatud ahela pinge (OCV, open circuit voltage) .....                     | 18        |
| 1.5.3. Müraallikad ja müra vähendamise tehnikad.....                            | 18        |
| 1.5.3.1. Väline müra .....  | 19        |
| 1.5.3.2. Sisemine müra .....  | 19        |
| 1.5.3.3. Lokaalne müra .....  | 21        |
| 1.5.4. Elektroodid .....  | 21        |
| 1.5.4.1. Rakusisene mõõtmine.....   | 21        |
| 1.5.4.2. Rakuväline mõõtmine.....   | 22        |
| <b>1.6. Filamentsete seente elektriliste signaalide interpreteerimine</b> ..... | <b>23</b> |
| <b>2. TÖÖ EESMÄRK</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>3. EKSPERIMENTAALOSA</b> .....   | <b>26</b> |
| <b>3.1. Materjalid ja meetodika</b> .....                                       | <b>26</b> |
| 3.1.1. Austerservik, <i>Pleurotus ostreatus</i> .....                           | 26        |
| 3.1.2. Mõõteraku valmistamine .....   | 26        |
| 3.1.3. Avatud ahela pinge mõõtmine.....   | 28        |
| 3.1.4. Kasutatud tarkvara .....   | 28        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4. TULEMUSED JA ARUTELU .....</b>  | <b>29</b> |
| 4.1. Mõõteraku parameetrid.....   | 29        |
| 4.2. Avatud ahela pinge mõõtmiste interpreteerimine .....   | 29        |
| 4.3. Perioodilised muutused avatud ahela pinges .....   | 32        |
| 4.4. Edasiarendused/rakendused.....   | 35        |
| 4.5. Seente elektrofüsioloogia uurimise perspektiiv .....   | 36        |
| <b><i>KOKKUVÕTE</i>.....</b>  | <b>37</b> |
| <b><i>SUMMARY</i> .....</b>   | <b>38</b> |
| <b><i>TÄNUSÕNAD</i>.....</b>  | <b>39</b> |
| <b><i>KIRJANDUSE LOETELU</i>.....</b>   | <b>40</b> |
| <b><i>LISAD</i> .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>Lisa 1. Grafiitelektroodi ümber kasvav seeneliigi <i>Pleurotus ostreatus</i> mütseel .....</b> | <b>47</b> |
| <b>Lisa 2. Mõõteraku ja MEA söötme võimsuse spektraaltiheduse võrdlus .....</b>                   | <b>48</b> |
| <b><i>LIHTLITSENTS</i>.....</b>   | <b>49</b> |

## SISSEJUHATUS

Seente filamentne hulkraksuse vorm on looduses ainulaadne: ühtede esimeste maismaa asukadena tuli sessiilse, rakukestaga ümbritsetud tallusega ning osmotroofse toitumisviisiga seentel leida lahendus ebaühtlase toitainete jaotusega maismaal ellujäämiseks. Tubulaarsete seeneniitide ehk hüüfide apikaalne kasv ning seeläbi ruumi koloniseerimine oli tõenäoliselt optimaalseks lahenduseks pikkade vahemaade läbimiseks ning toitaineid imava pinna suurendamiseks (Nagy et al., 2020).

Seeneniidistikul ehk mütseelil on oluline ökoloogiline roll näiteks mullastiku toitainete ja vee ümberpaigutajana, süsiniku- ja lämmastikuühendite sidujana ja taimedevahelise kommunikatsiooniteena, vahendades eeskätt toitaineid. Suurim teadaolev seen hõivab üle 15 hektari maad (Smith et al., 1992). Märkimisväärsed on seente evolutsiooniliselt väljakujunenud mehhanismid sedavõrd suure ja interaktiivse organismi elutegevuse koordineerimiseks. Lisaks keemilisele ja mehhaanilisele kommunikatsioonimehhanismidele on seentes tuvastatud ka elektriline suhtlusviis, mis olemuselt sarnaneb loomade närvisüsteemi ja taimedes kirjeldatud elektrilise aktiivsusega (Olsson, 1999).

Käesolev uurimistöö keskendub seente elektrofüsioloogiale. Seente elektrilisi impulsse on seostatud mütseeli kasvu/diferentsiooni regulatsiooni ja kooskõlastamisega (Olsson, 1999). Viimastel aastatel on hakatud põhjalikumalt uurima seente elektrilisi reaktsioone erinevatele stiimulitele, näiteks mehaanilistele, keemilistele ja optilistele mõjutustele (Adamatzky, Gandia, et al., 2021; Dehshibi et al., 2021), kuid senised kasutatud meetodid on valdavalt invasiivsed (rakke vigastavad) või vajavad spetsiifilist aparatuuri ja kogemust (Adamatzky, Gandia, et al., 2021; Olsson & Hansson, 1995).

Erinevalt nimetatud meetoditest põhinevad siinse uurimuse aluseks olevad mõõtmised mitteinvasiivsel meetodil. Selleks valmistati kättesaadavatest materjalidest prototüüpsed mõõterakud, mis võimaldasid mitteinvasiivselt mõõta agarsöötmele kasvava mütseeli eri osade vahelisi avatud ahela pinge spontaanseid muutusi. Mõõterakkudel kasvatati austerservikut, *Pleurotus ostreatus*.

Bakalaureusetöö koosneb neljast osast. Esimeses osas antakse varasemate uurimuste ja kirjanduse baasil ülevaade seente elektrilist aktiivsust võimaldavatest anatoomilistest ja füsioloogilistest omadustest ning tutvustatakse bioloogilise elektri mõõtmise meetodeid. Teises

osas defineeritakse detailselt uurimuse eesmärk. Kolmandas osas kirjeldatakse mõõteraku prototüübi valmistamisprotsessi, mõõtmiste aparatuuri ja tulemuste tõlgendamiseks kasutatud tarkvara. Neljandas osas analüüsitakse ja seostatakse mõõtmistulemusi mütseeli füsioloogiaga. Lisaks pakutakse välja prototüübi edasiarendusvõimalusi ning arutletakse üldiselt seente elektrofüsioloogia uurimise perspektiivi üle.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Seente olulisus

Seened on levinud üle kogu biosfääri ning on suurimad ja vanimad elusorganismid Maal (Smith et al., 1992). Väikseimad seened on mikroskoopilised üherakulised organismid, samas kui suurim isend (*Armillaria bulbosa*) laiub üle 15 hektari ja kaalub 10 tonni (Smith et al., 1992). Seened on ökosüsteemis fundamentaalse tähtsusega lagundajad, patogeenid ja mutualistid (mükoriisa, endofüüdid, samblikud): nad osalevad süsiniku-, lämmastiku- ja paljudes teistes biogeokeemilistes aineringides nii vees kui ka maismaal (Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019).

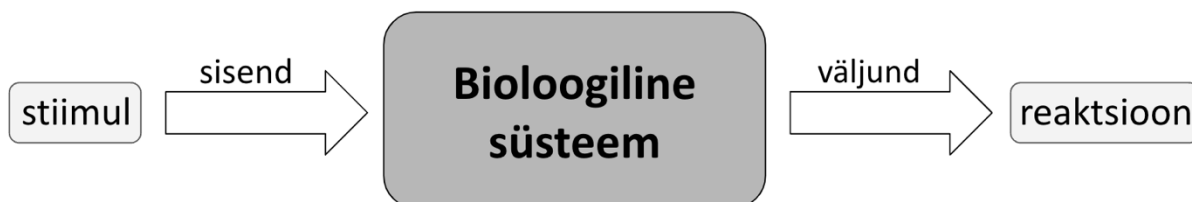
Maismaa asustasid seened 715-810 miljonit aastat tagasi (Bonneville et al., 2020), 200 miljonit aastat varem kui taimed (Pennisi, 2018). Esimesed seened maismaal toitunud tõenäoliselt bakterite ja rohevetikate orgaanilisest massist (Bonneville et al., 2020). Arvatakse, et juba esimesed maismaa seened võisid moodustada sümbiootilisi kooslusi tsüanobakteritega (Bonneville et al., 2020). Seente elutegevuse käigus moodustus sobiv pinnas taimede eluks maal ning juba esimesed maismaataimed olid seentega sümbionselt seotud (Pirozynski & Malloch, 1975). Sümbioosete seente laiaulatuslik mütseel ühendab taimi ja mullaorganisme ning toimib maa-aluse infovõrgustikuna.

Inimesed on läbi aegade tarvitanud seeni söögiks ja kääritusprotsessides. Seente metaboliidid on leidnud kasutust nii ravimitööstuses kui ka toorainena toiduainetööstuses ning seened on osutunud edukaks ohtlike tööstusjäätmete lagundamisel. Viimastel aastatel on neis hakatud üha enam nägema potentsiaali ka biomaterjalina ja elusa sensoorse komponendina tekstiili-, pakendi- ja ehitustööstuses (Adamatzky, Gandia, et al., 2021; Attias et al., 2020; Vandeloos et al., 2021)

## 1.2. Seen kui sensoorne süsteem

Elusorganismi definitsioon sisaldab võimet suhestuda keskkonnaga, mis on ellujäämise ja paljunemise eelduseks. Keskkonnaga suhestumise uurimiseks võib organismi vaadelda süsteemina, mis saab ümbritsevast infot ning reageerib sellele. Info kandjateks ja vahendajateks on signaalid (nn biosignaalid); sealjuures kasulikku informatsiooni mitte kandvad 'signaalid' on müra (Semmlow, 2018). Signaali ja müra suhe on subjektiivne ja oleneb vaatleja perspektiivist. Selles peatükis keskendutakse signaalidele, mis kannavad kasulikku informatsiooni seene jaoks.

Signaale, mis sisendina bioloogilisse süsteemi jõuavad, nimetatakse „stiimuliteks“. Süsteemi väljundvastus stiimulile on „reaktsioon“ (joonis 1). Organismi puhul on signaalid üldiselt muutused bioloogilistes ja füsioloogilistes näitajates.



Joonis 1 Skeem elusorganismist kui süsteemist, mis suhestub ümbritseva keskkonnaga. Kohandatud (Semmlow, 2018).

Kommunikatsioon seene eri osade vahel toimub keemiliste, mehaaniliste ja elektriliste signaalide kaudu (Olsson, 1999; Semmlow, 2018). Mehaaniline kommunikatsioon on enamasti protoplasma liikumine ning toitainete ja organellide ümberpaigutumine (Olsson, 1999). Keemiline signalisatsioon väljendub füsioloogiliselt oluliste molekulide eritamises ja retseptoritega seondumises. Signaalid, mille puhul on oluline kiirus, edastatakse elektriliselt (Semmlow, 2018).

Seente elukeskkonnad on mitmekesised ja muutlikud. Mulla tingimused nagu niiskus, temperatuur, pH, toitainete leidumine ja teiste organismide esinemine võivad suures ulatuses muutuda (Yu & Fischer, 2019), mistõttu on seente jaoks oluline tunnetada ja reageerida paljudele stiimulitele. Näiteks on kirjeldatud seente reageerimisvõimet **toitainetele** nagu glükoos, fosfaat, ammooniumioonid (Olsson, 1999) ja gaasidele, näiteks CO<sub>2</sub> ja O<sub>2</sub>-le (Tabak & Wm. Bridge Cooke, 1968). Seentel on mitmeid valgustundlikke retseptoreid, kuna **valgus** on indikaatoriks kokkupuutest avatud õhuruumiga, kus eosed e spoorid saavad levida, ning stimuleerib sporulatsiooni või viljakeha kasvatamist (Adamatzky, Gandia, et al., 2021; Yu & Fischer, 2019)]. Seened reageerivad **feromoonidele**, mis on eeskätt olulised paljunemisel, ja **hormoonidele**, ka inimese hormoonidele, näiteks hüdrokortisoonile (Dehshibi et al., 2021). Kõik seened vastavad **stressile**, milleks võib olla nii osmootne šokk, temperatuur, kõrge soola kontsentratsioon, UV-kiirgus kui ka mehaaniline mõjutus (Adamatzky, Gandia, et al., 2021)]. Seened, nagu ka taimed, tunnetavad **elektromagnetväljaid** ja kõik seened on võimelised erinevate mehhanismide kaudu **ära tundma potentsiaalseid peremeesorganisme** (Bahn et al., 2007; Olsson & Hansson, 1995).

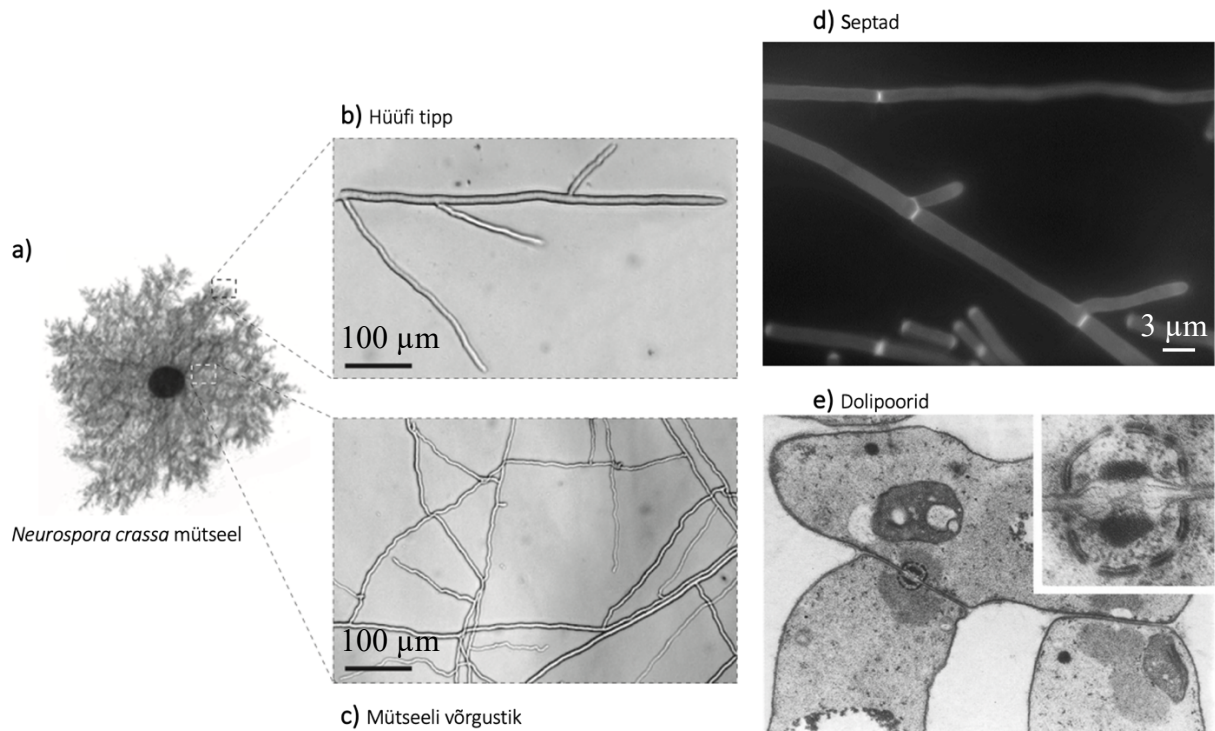
Käesoleva uurimuse fookus on seente elektrilisel signalisatsioonil. Kõikide nimetatud stiimulite vastusena on tuvastatud potentsiaalimuutused nii hüüfi kui ka hüüfivõrgustiku tasandil (Adamatzky, Gandia, et al., 2021; Adamatzky, Nikolaidou, et al., 2021; Dehshibi et al., 2021; Olsson & Hansson, 1995). On teada, et seened reageerivad taktiliselt ja troofiliselt nõrkadele välistele elektriväljadele, mis on võrreldavad taimejuurte tekitatud elektriväljadega. See annab alust oletada, et just taimesisesed elektrivoolud on seentele märgiks potentsiaalsest peremeesorganismist. (Gow & Morris, 1995) Seega on elektrivoolude tekitamine ja nendele reageerimine olulise tähtsusega seente elutegevuses.

### 1.3. Filamentsete seente anatoomia

Filamentsete seente kudesid nimetatakse **plektenhüümiks**. Plektenhüümis eristatakse kahte tüüpi kudesid: hõredalt põimunud hüüfidest **prosenhüüm** ja tihedatest hüüfikimpudest **pseudoparenhüüm**, mis meenutab taime kudesid ja kus hüüfiline ehitus pole esmapilgul ilmne, kuid on tuvastatav näiteks skanneeriva elektronmikroskoobiga. (Whittaker, 1969)

Filamentsete seente struktuuriüksus on hüüf (joonis 2b). Hüüfi võib kujutleda tugevalt polariseeritud membraanilise protoplasmaga täidetud silindrina, mille tipmine ehk apikaalne kasvukiirus võib ulatuda üle  $1\mu\text{m/s}$  (Seiler & Plamann, 2003). Lisaks membraanile katab hüüfi ka tugev ja sitke glükaani (71%) ja kitiini (9%) rohke kest (Kang et al., 2018). Leidub nii üherakuliste hulktuumsete hüüfidega seeni [mõned ikkeseente, *Zygomycota* sugukonna esindajad] kui ka mitmerakuliste hüüfidega seeni [kandseened, *Basidiomycota* ja kottseened, *Ascomycota*]. Mitmerakulise hüüfi protoplasma on ruumiliselt eraldatud hüüfi membraaniga risti moodustuvate vaheseintega ehk septadega (joonis 2d) (R. T. Moore & McAlear, 1962). Vaheseintega eraldatud sektsioonid on ühenduses pooride kaudu, läbi mille saavad liikuda tsütoplasma, organellid ning laenguga ja laenguta molekulid (Bueno & Silva, 2014).

Kuigi tsütoplasma pidevus organismi lõikes hõlbustab kasvu ja kommunikatsiooni, on see potentsiaalne kiire levimistee ka patogeenidele ning vigastuse korral võiks kogu organism tühjaks voolata. Üks mehhanism selle vältimiseks on kirjeldatud vaheseinaline liigendatus ja vaheseinte pooride avatuse ja suletuse autonoomne kontroll. Pooride kontrollitud sulgemine võimaldab reguleerida organellide ja tsütoplasma liikumist ning piki hüüfi kulgevat ionvoolu (Nagy et al., 2020) ning seeläbi hüüfi elektrilise juhtivuse vähenemist.



Joonis 2 Mütseeli struktuur. a) Inokulaadist (spoor või mütseeli tükk) hakkab mütseel radiaalselt välja kasvama, et maksimaliseerida toitainete omastamist. b) Kasvava hüüfi tipp kõrvalharudega c) Mütseeli võrgustik. Kohandatud (Lew, 2011). d) Septadega ehk vaheseintega sektsioonideks jagatud hüüf (Bueno & Silva, 2014) e) Poorid vaheseinas. Elektronmikroskoop, 19 000-kordne ja 57 000-kordne suurendus. Kohandatud (Patrignani & Pellegrini, 1986).

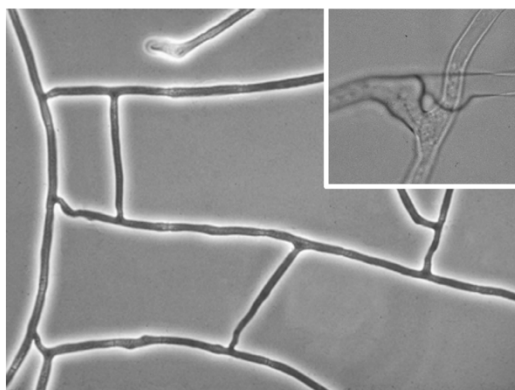
Vaheseinte pooride olemasolu ja ehitus on üheks iseloomulikuks tunnuseks seente süstemaatilistesse hõimkondadesse jagamisel (Moore, 1978). Kandseente poore hüüfi vaheseintes nimetatakse dolipoorideks (joonis 2e). Erinevalt kottseente tunneljatest lihtpooridest, kust mahuvad läbi nii tsütoplasma kui ka rakutuomad, on kandseente dolipoorid keskelt paksenenud ning ümbritsetud membraanilise perforeeritud parentosoomiga ehk poorimütsiga. Läbi sellise komplekssema struktuuri pääseb küll liikuma tsütoplasma väiksemate organellide, molekulide ja ionidega, kuid mitte tuumad. (Moore & McAlear, 1962)

Hüüfiline hulkrakulisus, mida iseloomustab polariseeritud tipmine kasv, on looduses eriline: sarnast kasvumehhanismi on kirjeldatud vähe, näiteks sugukonnas Oomycota ja tolmuniidis. Seente evolutsiooniliselt esimene väljakutse maismaale elama asudes oli jõuda ebäühtlaselt jaotunud toitaineteni. Tipmiselt pikenev ja harunev hüüf, mis võimaldas uusi piirkondi koloniseerida, võis olla optimaalseks lahenduseks. (Nagy et al., 2020)

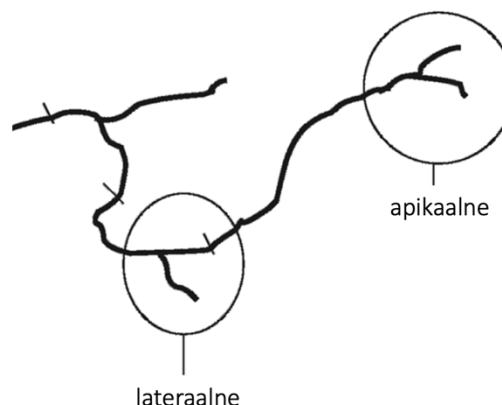
Hüüfi fraktsiooniline/rakuline jaotus panustab hüüfi diferentsiooni; apikaalsed rakud toimivad lähikeskkonna tunnetajatena ja toitainete omastajatena ning võivad tipmiselt haruneda, samas kui subapikaalsed rakud moodustavad eeskätt uusi hüüfe lateraalselt harunedes (joonis 3b).

Hüüfide harunemisel võib välja tuua kaks eesmärki: esiteks tagab hüüfide hargnemine mütseeli suurema pinna toitainete omastamiseks ning teiseks on harunenud hüüfid võimelised anastomoosiks ehk üksteisega kokkusulandumiseks (joonis 3a), mis on oluline toitainete ja signaalide vahendamiseks mütseeli eri hüüfide vahel. (Harris, 2008)

a) Anastomoos



b) Hüüfi apikaalne ja lateraalne harunemine



Joonis 3 a) Üldpilt anastomoosist ehk hüüfide kokkusulandumisest perekond *Sordaria* näitel. Kohandatud, algallikas: George Barron, Guelphi Ülikool, viidatud (Watkinson et al., 2015) kaudu. Üleval paremal lähivaates valgusmikroskoobi pilt *Glomus caledonium* hüüfide kokkusulandumisest. Kohandatud (Giovannetti et al., 1999). b) Lateraalne ja apikaalne harunemine. Hüüfiga risti joontega on tähistatud vaheseinad. Kohandatud (Harris, 2008).

Seentest rääkides kasutatakse tihti mõisteid 'koloonia' ja 'mütseel'. Stefan Olsson arutleb 1999. aasta artiklis, et mõisteid kasutatakse segamini nii erineva geneetilise taustaga hüüfimassi kui ka ühest spoorist arenenud hüüfivõrgustiku kirjeldamiseks. Olsson pakub välja neljamõistelise süsteemi hüüfivõrgustike iseloomustamiseks, kus lisaks botaanikast üle võetud 'genetile' ja 'rametile' on kaks uut mõistet hüüfivõrgustike funktsionaalsuse rõhutamiseks:

- Seene liikide isolaatide geneetiliste suhete rõhutamiseks
  1. **Genet** – kogum ühise geneetilise taustaga isolaatides (labori tingimustes inokuleeritakse söötmele enamasti mitu sama geneetilise taustaga isolaati, mis moodustavad geneti).
  2. **Ramet** – funktsionaalselt iseseisev geneti alamüksus, mis füüsilises kontaktis ja toitaineid vahetades teiste rametitega moodustavad geneti (söötmele inokuleeritud ühise geneetilise taustaga isolaadid genetist on rametid).
- Mütseeli funktsionaalsuse rõhutamiseks
  1. **Geneetiline mütseeli ühik (GMÜ)**– geneetiliselt identne hüüfide võrgustik, mis hõivab pidevat ruumi, kuid mille kõik osad ei pruugi olla dünaamilises ühenduses.

2. **Funktsionaalne mütseeli ühik (FMÜ)**– funktsionaalselt seotud hüüfide võrgustik, mis toimib ühtse organismina. FMÜ-d võivad ühineda anastomoosi kaudu ja moodustada suuremaid FMÜ-d. FMÜ maksimaalne suurus on kogu GMÜ.

FMÜ põhiline omadus on pidev suhtlus, mis tagab FMÜ kooskõlastatud käitumise. Seetõttu käsitletakse seente kui organismide toimimist uurides enamasti FMÜ-sid. (Olsson, 1999) Käesolevas uurimuses kasutatakse mõistet 'mütseel' funktsionaalse üksuse tähenduses, FMÜ sünonüümina.

## 1.4. Elektrofüsioloogia

Mütseelisisene suhtlus avaldub füsioloogilistes muutustes, toitainete ümberpaigutamises, organellide liikumises, tsütoplasma voolus (*Basidiomycota*) ja nii keemilises kui ka elektrilises kommunikatsioonis (Olsson, 1999). Elektrofüsioloogia on füsioloogia haru, mis keskendub bioloogiliste rakkude ja kudede elektrilistele omadustele.

Membraanipotentsiaali muutuste funktsiooniks mütseelis on pakutud mütseeli kasvu ja degeneratsiooni regulatsiooni (Olsson, 1999). Hüpooteesi toetavad uurimused, kus on leitud, et hüüfi tipp on depolariseerunud, samas kui natuke maad enne tippu on hüüf hüperpolariseerunud. Potentsiaalide vahe tekitab ioonvoolu, mis kaob, kui hüüf lõpetab kasvamise. (Gow & Morris, 1995)

Elektrit defineeritakse laetud osakeste suunatud liikumisena. Mütseelis on võimalik jälgida kahte mehhanismilt erinevat elektrofüsioloogia väljendusviisi: 1) piki hüüfe liiguvad laetud osakesed ehk ioonvool; 2) hüüfi membraaniga risti liiguvad ioonid ehk ioonvoog. Järgnevad alapeatükid 1.4.1. ja 1.4.2. keskenduvad kahe nimetatud elektrofüsioloogilise nähtuse mehhanismidele.

### 1.4.1. Hüdrauliline süsteem

Vesi moodustab ligi 90% seene kogumassist ning on oluline kogu elutsükli vältel (Kalberer, 1985), sealjuures enamus veest on tsütoplasma koosseisus. Peatükis 1.3.1. kirjeldatud hüüfide ehitus näitas, et tsütoplasma saab liikuda hüüfi ulatuses rakust rakku ja hüüfide vahel, mis teeb mütseelist keeruka mikrofluidika süsteemi (Lew, 2011), mille oluline funktsioon on kahesuunaline transport mütseeli apikaalse piirkonna varustamiseks kasvuks vajalike toitainetega ja apikaalselt omastatud ressursside transpordiks mütseeli keskmesse (Darrach et al., 2006). Toitainete ümberpaigutamisel saab eristada nelja mehhanismi:

## **1. Passiivne**

Toitaineid omastatakse vastavalt lokaalsele vajadusele difusiooni teel. Hüüfisiselt liiguvad omastatud toitained samuti difusiooni teel. Difusioon hüüfis on valdavalt ühedimensionaalne, mis tagab suurema toitainete voo võrreldes kolmedimensionaalse difusiooniga. Kirjeldatud mehhanism ei vaja lisaenergiat. (Olsson, 1999)

## **2. Passiivne + aktiivne toitainete omastamine**

Toitaineid omastatakse lokaalseid vajadusi ületades ülehulgas ja selleks kulutatakse energiat. Hüüfis tekib järsk toitainete gradient, mis kiirendab difusiooni ja toitainete jõudmist mütseeli kaugematesse piirkondadesse. Toitainete omastamine on aktiivne, kuid hüüfis liiguvad toitained passiivselt difusiooni teel. (Olsson, 1999)

## **3. Aktiivne, tsütoplasmaatiline**

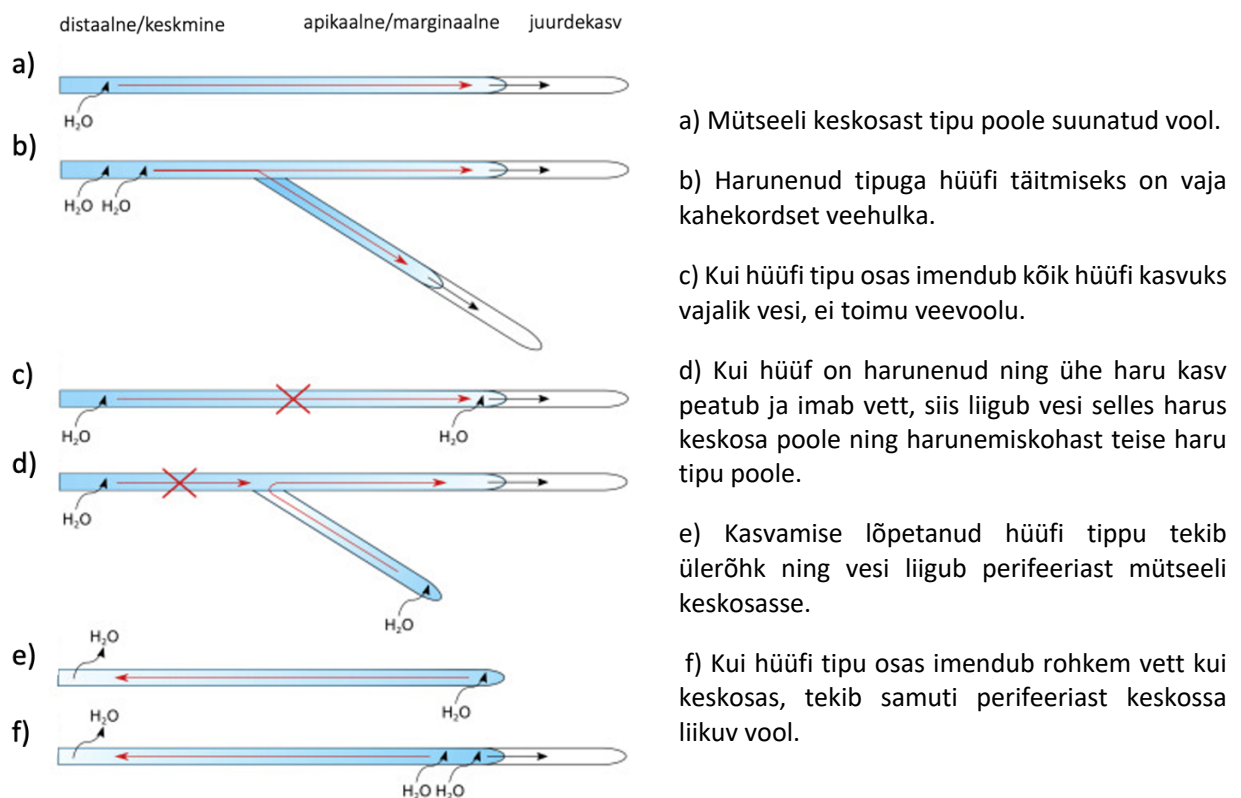
Toitainete liikumine on seotud tsütoplasmas organellide aktiivse liigutamisega ja peristaltiliste vakuoolsüsteemidega. Peristaltilised vakuoolid on tsütoplasmast eraldatud organelid, mis sisaldavad suures kontsentratsioonis põhiliselt fosfaat- ja lämmastikühendeid. Peristaltilised vakuoolid läbivad mitut rakku ja saavad rütmiliste kokkutõmmetega oluliselt kiirendada toitainete liikumist mõlemas suunas. Selline süsteem vajab energiat nii toitainete organellidesse paigutamiseks kui ka edasiseks liigutamiseks. (Darrah et al., 2006; Olsson, 1999)

## **4. Aktiivne, rõhust tingitud massivool**

Rakuturgor on seene jaoks oluline mehaaniline toena, raku kasvu ja substraadist läbi kasvamisel. Kuigi rakuturgori säilitamine on seene jaoks eluliselt oluline, ei ole rakusisene rõhk üle mütseeli konstantne. (Lew, 2011) Väikesed rõhumuutused tekivad üldjuhul osmolüütide absorptsiooni/sünteesi, väliste osmootiliste tegurite või hüüfi kasvamise tagajärjel (Herman & Bleichrodt, 2021; Lew, 2005, 2011). Kui aktiivse toitainete omastamise tulemusel tekib hüüfis kõrge osmootne rõhk, liigub vesi keskkonnast toitainete järel hüüfi ja tekitab hüüfis kõrgema rakuturgori. Vesi ja toitained voolavad hüüfis väikseima takistuse suunas (Olsson, 1999). Filamentsetel seentel on enamasti suurem rõhk mütseeli keskosas kui mütseeli perifeerias (Eamus & Jennings, 1986). Hüüfi tipu kasvades tekib madalama rõhuga vaba ruum, kuhu vesi ja toitained voolavad (Heaton et al., 2010) (joonis 4a ja 4b). Hüüfide laminaarse tsütoplasma vooluga süsteemis liiguvad metaboliidid nii tsütoplasma vooluga kaasa kui ka difusiooni teel. Suurte molekulide, näiteks valkude liikumisel on olulisem tsütoplasma voolust tingitud

liikumine, samas kui väikeste molekulide puhul on difusioon tsütoplasma voolust kiirem (Lew, 2011).

Kui substraat on lagundamiseks liiga kuiv, sünteesib seen lokaalselt osmolüüte juurde, et transportida vett mütseeli niiskematest kasvukohtadest kuivale substraadile (Herman & Bleichrodt, 2021). Osmolüüte sünteesitakse juurde ka juhul, kui rakuturgor langeb normist madalamale (Herman & Bleichrodt, 2021). Olenevalt vee ja toitainete hüüfi sisenemise piirkonnast ja apikaalsest kasvust, võivad vesi ja toitained liikuda hüüfi apikaalses kui ka tsentraalses suunas (joonis 4c, 4d, 4e, 4f).



Joonis 4 Voolu hulk ja suund sõltuvalt vee kaost ja omastamisest ning hüüfi kasvust. (Herman & Bleichrodt, 2021)

### 1.4.2. Neuronisarnane aktiivsus

Mõnedele stiimulitele reageerib mütseel kiiresti. Kiirete signaalide levimiseks on pakutud nii peatükis 1.4.1 kirjeldatud hüdraulilist voolu kui ka membraanipotentsiaali muutuste levikut. (Olsson, 1999)

1976. aastal mõõdeti esmakordselt tulemuslikult spontaanseid kvaasi-sinusoidiaalseid ja aktsioonipotentsiaali (AP) -laadseid membraanipotentsiaali muutusi seeneliigis *Neurospora*

*crassa* (Slayman et al., 1976). *Neurospora crassa* tasakaalupotentsiaaliks leiti umbkaudu -180 mV. AP -laadse aktiivsuse lävendiks leiti 5-20 mV depolarisatsioon tasakaalupotentsiaali suhtes. Mõõdetud AP-d kestsid kaua, 1-2 min (võrreldes loomade närvisüsteemiga, kus AP kestus võib jääda alla millisekundi), ja AP piigi maksimum oli ligi -40 mV. Mõõtmiste tulemusena kirjeldati 10-20 mV amplituudiga ja 3-4 min perioodiga kvaasi-sinusoidiaalseid potentsiaali võnkumisi, mis kestsid paarikümnest minutist mitme tunnini (Slayman et al., 1976). Sellega tõestati membraanipotentsiaali muutustest tulenevate elektriliste impulsside esinemine seentes.

1995. aasta uurimuses näitasid Olsson ja Hansson, et austerserviku, *Pleurotus ostreatus* ja külmaseene, *Armillaria bulbosa* mütseelis – ühtse membraaniga ümbritsetud pideva tsütoplasma võrgustik – levivad depolarisatsiooni-lained, mis on tundlikud stiimulile (värskest lõigatud kasepuidu – potentsiaalse toitainete allika asetamine mütseelile). Saadud potentsiaali kõverad olid analoogsed loomades ja taimedes mõõdetud aktsioonipotentsiaalidega. (Olsson & Hansson, 1995)

Ioonvoolu ja ioonvoo paralleelsete mõõtmiste tulemusena on leitud, et ionide koguvoogu ja seega membraanipotentsiaali muutustesse panustavad põhiliselt  $K^+$  ja  $Cl^-$  ionid. Võrreldes ionide koguvoogu ja voolu, mis membraanipotentsiaali muutuseid edasi kannab, on leitud, et ioonvool on suurem, kui oleks ainult ioonvoost tekkinud vool. Seetõttu on tõenäoline, et ioonvoolu panustavad lisaks  $K^+$  ja  $Cl^-$  ionidele ka näiteks  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $P_i$ ,  $NO_3^-$  ionid ja orgaanilised happed. (Lew, 2007)

2022. aastal näitas Andrew Adamatzky, et nagu kõigil teistel elektrilise aktiivsusega organismidel, on ka filamentsete seente elektrilist kommunikatsiooni võimalik takistada anesteesiaga. Katses mõjutati mütseeli kloroformi aurudega, mille tulemusena vähenes spontaanne elektriline aktiivsus märgatavalt. Elektriline aktiivsus taastus kloroformi eemaldamisel. (Adamatzky & Gandia, 2022)

## 1.5. Elektrilised mõõtmismeetodid biotehnikas

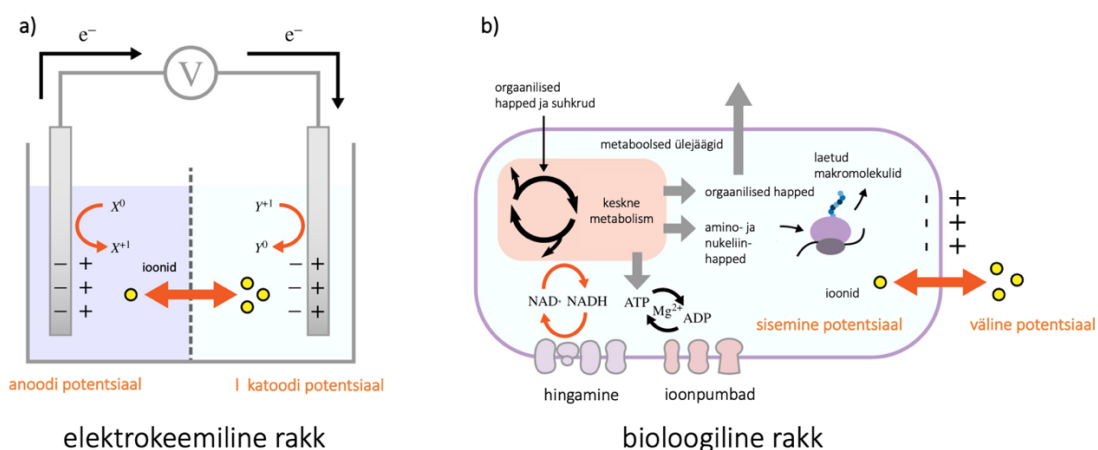
Võimalusi seente elutegevuse uurimiseks on palju. Kõige esimese informatsiooni seene kohta annab silmaga ja/või mikroskoobiga mütseeli kuju ja struktuuri muutuste jälgimine. Lisaks on võimalik uurida kõiki muutusi geenide aktiivsuse tasemel (Wilson & Talbot, 2009). Keemiliste meetodidega puhastatakse ja tuvastatakse teiseseid metaboliite (näiteks toksiid) (Hoeksma et

al., 2019) ja ainete liikumise jälgimiseks mütseelis kasutatakse märgistatud fosfori ja süsiniku isotoope ((Olsson, 1999)). Erinevate meetodidega on võimalik mõõta hüüfi rakuturgori muutusi (Money, 1990).

Elusorganismides avalduvad paljud füsioloogilised protsessid ionide liikumisena, mistõttu on neid võimalik tuvastada ka elektriliste mõõtmiste abil (Olsson & Hansson, 1995). Praeguseks ei ole teada kõik seente elektrofüsioloogiasse panustavad mehhanismid. Uue vaatepunkti annaksid elektrilised mõõtmised kombineeritult potentsiaalselt ionvoolu panustavate protsesside mõõtmistega nagu osmolüütide süntees ja sellest tulenevad rakuturgori muutused.

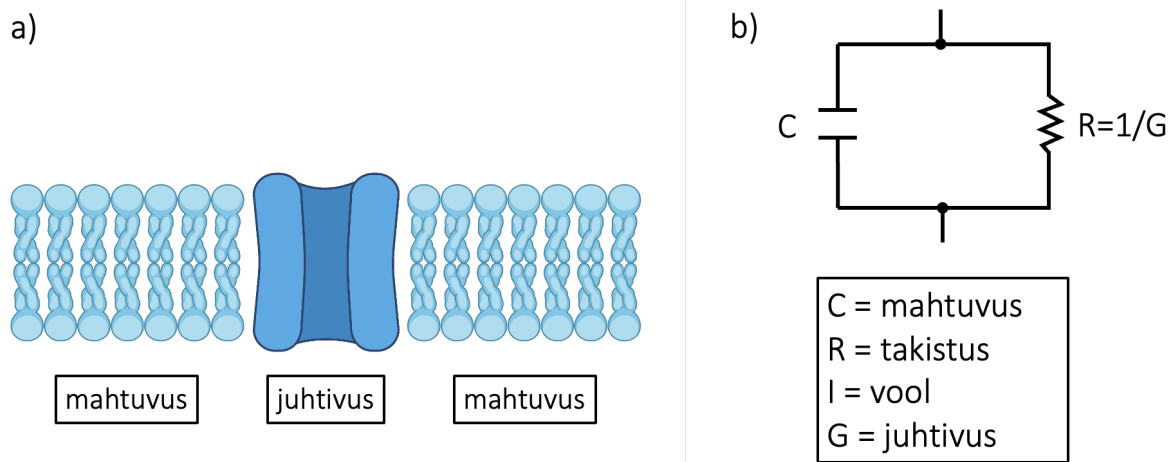
### 1.5.1. Bioloogiline süsteem kui vooluring

Bioelektri genereerimine bioloogilise raku tasemel on võrreldav patarei tööpõhimõttega: mõlemas toimuvad redoksreaktsioonid ja ionide liikumine (Schofield et al., 2020) (joonis 5). Bioloogilise raku membraanilistes struktuurides on ionikanalid, mis jaotavad laenguga ja laenguta molekule (ka makromolekule) nii organellide kui ka raku sise- ja väliskeskkonna vahel. Laetud osakeste ebavõrdne jaotamine membraani suhtes tekitab elektrokeemilise potentsiaali, mis on võrreldav patareis säilitatava energiaga ning tähendab potentsiaali teha tööd osakeste liigutamiseks, mida nimetatakse analoogselt elektromotoorjõuga ionmootorjõuks. Raku membraani potentsiaaliks nimetatakse kõikide laetud osakeste elektriliste potentsiaalide kombinatsiooni.



Joonis 5 Patarei ehk elektrokeemilise raku ja bioloogilise raku analoogia. Elektrokeemilises raku (a) ja bioloogilises raku (b) tuleneb laengukandjate liigutamiseks vajalik energia redoksreaktsioonidest. Redoksreaktsioonide tulemusena tekib patarei elektroodide ühendavas juhtmes elektronvool ning lahuses läbi membraani kompenseeriv ionvool. Bioloogilises raku tekib redoksreaktsioonide tulemusena elektronvool membraaniseoselistes valgulistest struktuurides ja ionvool läbi rakumembraani. Kohandatud. (Schofield et al., 2020)

Laengugradient paneb ionid liikuma rakusisemisest membraani poole. Tsütosooli viskoossus takistab ionide liikumist ja on seega vaadeldav takistusena. Osad ionid kogunevad rakumembraanile, mis mahtvusliku elemendina. Seejuures liiguvad ionid ka pidevalt passiivsete ionikanalite kaudu rakust sisse ja välja (joonis 6). Iga ionikanal on seega juhtiv element, mis olenevalt iooni läbilaskevõimest omab erinevat takistust. Lihtsustatult võib rakku kujutada elektriabelana, milles takistus ja mahtuvus on ühendatud paralleelselt ning vooluallikaks on aktiivsete ionikanalite töö tasakaalu potentsiaali vastu (joonis 6).



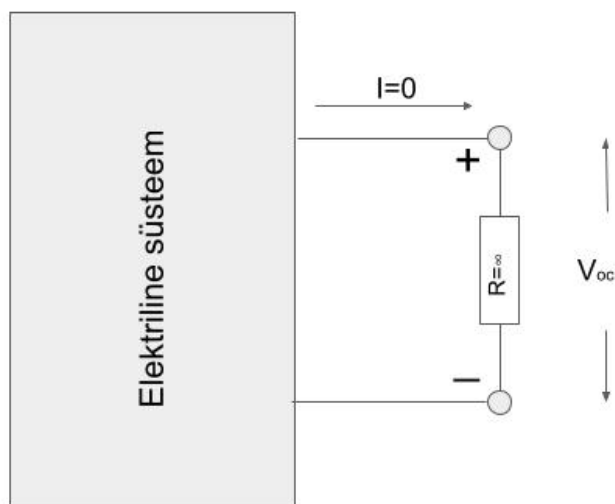
Joonis 6 Rakumembraani võrdlus elektriabelaga. a) Lipiidne kaksikkiht käitub kondensaatorina samas kui valgulised ionikanalid võimaldavad ionidel ühelt poolt membraani teisele poole liikuda ning käituvad juhtidena. b) Rakumembraan on analoogne elektriabelasse paralleelselt ühendatud kondensaatori, C ja takistiga, R.

Pärirakus on olukord keerulisem: rakusisemisest on lisaks tsütosoolile ka tuum ja organellid ning tihe valguline tsütoplasma võrgustik. Näiteks valgulised negatiivsed aktiini polümeerid tõmbavad ligi positiivseid ioone ja toimivad seetõttu kui raku bioloogilised elektrijuhtmed – ioongradiendis liiguvad ioonid ei liigu lahuses kaootiliselt, vaid mööda aktiini filamente (Lin & Cantiello, 1993). Ioone liikuma panevaid jõude on rohkem kui vaid ionikanalite aktiivne töö. Hüüfis ei teki potentsiaalide erinevused ainult kahel pool membraani, vaid ka piki hüüfi. Seente puhul on oluliseks näiteks peatükis 1.4.2. kirjeldatud hüdrauliline liikumine, osmolüütide süntees ja difusioon. Lisaks suurendavad dolipoorid oluliselt rakkude juhtivust.

On ilmne, et kõiki elektriabelate komponente rakus kirjeldada on keeruline ning veel keerulisem on seda teha rakkude süsteemi – organismi – korral. Paljudel juhtudel piisab aga lihtsustatud ettekujutusest – mudelist. Nii võib mõelda mütseelist kui elektrilisest süsteemist, millel on impedants (dünaamilisele elektriväljale mõju avaldavate elementide kooslus) jaioonmootorjõud (kõikide ioone liikuma panevate jõudude summa).

### 1.5.2. Avatud ahela pinget (OCV, open circuit voltage)

Avatud ahelaks nimetatakse elektrilist energiallikaga süsteemi, mis on vooluringist lahti ühendatud. Õhk on hea dielektrik ja seega võib avatud ahelat kujutada ka vooluringina, milles on lõpmata suure takistusega ( $R = \infty$ ) takisti. Sellises ahelas ei ole voolu ( $I = 0$ ) ja pinget mõõdetakse lõpmata suure takistusega takisti otste suhtes. (joonis 7)



Joonis 7 Avatud ahela pinget (open circuit voltage, OCV). Avatud ahel tähendab, et elektri ahel on katkestatud - takistus on lõpmata suur. Avatud ahelas ei ole voolu, vool  $I = 0$  ning süsteemi maksimaalset pinget  $V_{oc}$  avatud ahela + ja - otste suhtes.

Praktikas mõõdab mõõteriist avatud ahela pinget tagasisidestuse põhimõttel. Avatud ahela otstega ühendatud mõõteriist rakendab süsteemile vastu sellist pinget, et mõõteriista ei läbiks vool ja mõõdab rakendatud pinget. Praktikas on keeruline teha lõpmatu impedantsiga voltmeetrit, mistõttu läbib süsteemi enamasti siiski väike vool.

Avatud ahela pinget mõõtmine peaks uuritava süsteemi võrreldes teiste mõõtemetoditega võimalikult vähe mõjutama.

### 1.5.3. Mürallikad ja müra vähendamise tehnikad

Müra avaldub eriti tugevalt suure impedantsiga süsteemides. Suure impedantsiga süsteemis liigub laengukandjaid vähe ja vool keskistatakse üle väikese arvu laengukandjate, mistõttu on iga individuaalse laengukandja juhusliku liikumise panus pinget muutustesse suur. Teades mürallikaid on võimalik müra analüüsida ja vähendada nii mõõtmise ajal kui ka hilisema andmetöötlusega. Mürallikaid võib kategoriseerida kolmeks:

- 1) väline müra;
- 2) sisemine müra;

3) lokaalne müra.

Järgnevates peatükkides tutvustatakse lähemalt kõige levinumaid müraallikaid labori tingimustes mütseeli elektrilise aktiivsuse mõõtmise kontekstis ning võimalusi müra vähendamiseks mõõtmiste ajal.

### **1.5.3.1. Väline müra**

Kõik elektrilised süsteemid kiirgavad elektromagnetlaineid, mis interfereeruvad uuritava süsteemiga ja avalduvad mürana. Sellise müra allikad võivad olla näiteks raadio ja televisiooni lained, aga ka valgustid, arvutid ja muu laboritehnika. (Attri, 2015)

Uuritava süsteemi isoleerimiseks välistest elektromagnetlainetest kasutatakse Faraday varjestust. Faraday varjestus on juhtivast materjalist ümbris, milles interakteerudes elektromagnetlainetega paigutuvad laengud ümber nii, et varjestatud alast sisse ega välja elektromagnetlained ei jõua. Faraday varjestust, mis ümbritseb süsteemi kõikidest külgedest, nimetatakse Faraday puuriks. Laengu kuhjumise vältimiseks on turvalisuse huvides soovitatav Faraday varjestus maandada. (Attri, 2015)

Peatükis 1.2. käsitleti signaali ja müra suhtelisust. Nii võivad olenevalt kõrvalt vaatleja eesmärgist liigitutada müraks ka mütseeli signaalid vastusena näiteks toitainetele, feromoonidele, niiskuse ja pH muutustele. Vastavad seent stimuleerivaid faktorid on seega müraallikad.

#### **Elektrostaatiline laadumine**

Staatiline laeng võib koguneda ja põhjustada potentsiaali teket peaaegu kõikidel materjalidel. Nii laaduvad näiteks seintes olevad elektrijuhtmed (50 korda sekundis). Staatiline laadunud objekt võib indutseerida laengujaotuse mõõteobjektis või juhtmetes. Eriti oluline on staatilise laengu kuhjumist arvesse võtta kuiva õhuga keskkonnas ja õhukonditsioneeriga ruumides. (Attri, 2015) Mõõtmiste stabiilsuse tagamiseks on soovitatav hoida konstantset õhuniiskust.

### **1.5.3.2. Sisemine müra**

#### **Valge müra**

Valgeks müraks nimetatakse müra, mille võimsus ei sõltu sageduses ja on seega ühtlane üle kogu sagedusspektri. Logaritmilise skaalaga graafikul, kus y-teljel on võimsuse spektraaltihedus ( $V^2/Hz$ ) ja x-teljel sagedus (Hz), avaldub valge müra x-teljega paralleelse

sirgena. (Vandamme, s.a.) Nimetus „valge“ tuleneb analoogiast valgusega, kus ideaalses valges valguses on esindatud kõikide sagedustega laineid võrdset. Valge müra põhjustena elektrilistes süsteemides kirjeldatakse enamasti kahte mehhanismi:

1) **Elektroni diskreetsus (Shottky müra)**

Elektrivool on defineeritud laengu hulga kaudu, mis läbib mingit ristlõike pindala ajaühiku jooksul ( $I = \frac{Q}{t}$ , kus I on vool, Q on laeng ja t on aeg). Elektrivool ei ole pidev, vaid tekib diskreetsete elektronide liikumise tulemusena. Seetõttu on võimalik, et konstantse voolu korral läbib erinevatel ajahetkedel ristlõike pindala natuke erinev arv elektrone, ning seda nimetatakse müra vooluks. (Attri, 2015; Vandamme, s.a.)

2) **Soojusliikumine (soojusmüra ehk Johnsoni müra)**

Soojuslik müra tuleneb vabade laengukandjate korrapäratust soojusliikumisest, mille tulemusena võivad vastaslaenguga osakesed paigutada ebaühtlaselt ja tekitada pinget, mida nimetatakse ka müra pingeks. (Attri, 2015; Vandamme, s.a.) Soojuslik müra suureneb kõrgematel temperatuuridel, mistõttu tehakse suurt täpsust nõudvaid mõõtmisi võimalusel madalatel temperatuuridel. Elusorganismide puhul pole võimalik rakendada väga madalaid temperatuure, kuid süsteemi saab stabiliseerida hoides temperatuuri konstantsena.

Valget müra ei saa vältida, kuid selle vähendamiseks on võimalik rakendada näiteks filtreid, teades, et müra on jaotunud ühtlaselt üle kogu sagedusspektri. Mõõteaparatuuri komponendid peaksid olema valmistatud viisil, et valge müra oleks minimaalne. (Attri, 2015)

**1/f<sup>α</sup> sagedussõltuvusega müra**

Müra, mis sõltub sagedusest ja ei ole seega ühtlane üle sagedusspektri, kirjeldab logaritmilisel spektraaltihedus vs sagedus graafikul nullist erinev tõus. Madalsageduslike komponentide ülekaalul on sellise graafiku tõus negatiivne. Madalsageduslikku 1/f<sup>α</sup> sõltuvust on täheldatud erinevates valdkondades, näiteks füüsikas, bioloogias, majanduses. Selline suhe ilmneb nii jõe vooluhulga muutustes, majanduses, DNA lämmastikaluspaaride asetuses kui ka teistes keerukates süsteemides, mida iseloomustab iseorganiseerumisvõime. (Crilly et al., 1993; Gontis et al., 2004; Kobayashi & Musha, 1982; Vandamme, s.a.; Voss, 1992). 1/f<sup>α</sup> sagedussõltuvuse universaalsus viitab sellele, et tegemist pole mingi kindla vastastikmõju tulemusega, vaid üldise kompleksust iseloomustava omadusega. (Gontis et al., 2004)

### **1.5.3.3. Lokaalne müra**

#### **Kontaktid**

Kõik kontaktid võivad halva ühenduse korral olla müraallikateks. Halb kontakt tähendab enamasti ebaühtlast kontakti. See võib tuleneda näiteks ühenduse korrodeerumisest, mehaanilisest liigutamisest jne. Kontaktist tulenevat müra saab vähendada mõõtesüsteemi stabiliseerides ja sobivate elektrootide valikuga. (Attri, 2015)

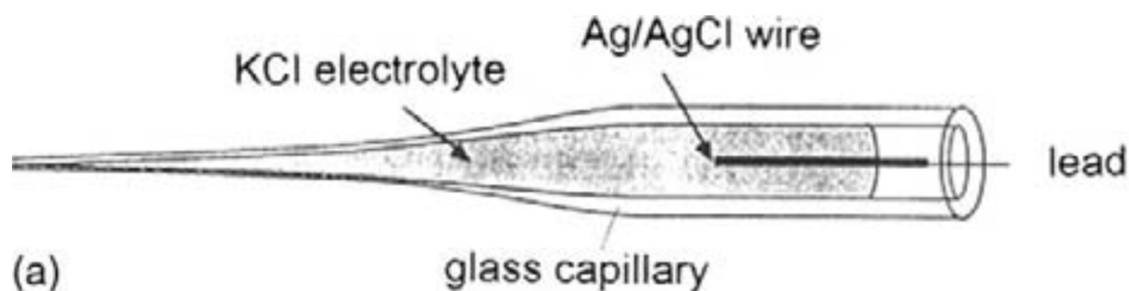
### **1.5.4. Elektrootid**

Bioloogilistes mõõtmistes on elektrootid elektrijuhid, mida kasutatakse ühenduslülina elektri ahela metalliliste komponentide (juhtmed, mõõteriist) ja bioloogilise koe vahel. Sõltuvalt elektrootide paigutusest jaotatakse elektrootid rakuväliseks ja rakusisesteks elektrootideks. Mõlemat tüüpi elektroode saab kasutada organismi tasemel mõõtmiste tegemiseks. Rakusisesed meetodid võimaldavad läbi viia täpseid mõõtmisi ühe raku tasemel. Kuigi rakusisesed meetodid, näiteks 'patch-clamp' meetod, on võimsad meetodid üksiku raku elektrofüsioloogia uurimiseks, eeldab nende rakendamise kogemust ja seente puhul tihedaid koelisi struktuure elektrootide raku paigutamiseks (Olsson & Hansson, 1995). Käesolev uurimus keskendub ennekõike rakuvälisele mõõtmismeetoditele, mida on lihtsam teostada (perspektiiv ka välismõõtmisteks) ja annab vaid lühikese ülevaate rakusisestest elektrootidest.

#### **1.5.4.1. Rakusisene mõõtmine**

Rakusisesed elektrootid torgatakse läbi membraani tsütoplasmasse, mis võimaldab mõõta raku membraani potentsiaali ja selle muutuseid. Rakusiseste elektrootidena on kõige levinumad ioonselektiivsed Ag|AgCl klaasmikroelektrootid. Klaasmikroelektroot koosneb paari mikromeetrise läbimõõduga klaaskapillaarist, mis on täidetud elektrolüüdiga, ning peenikesest Ag/AgCl traadist, mis on ühendatud välise vooluringiga. (joonis 8) Klaaskapillaari otsas on vastavalt uuritava iooni laengule fikseeritud vastaslaenguga agargeel, mis on ioonselektiivseks

barjääriks elektroodi elektrolüüdi ja tsütoplasma vahel. (Rettinger et al., 2022)



Joonis 8 Ioonselektiivne Ag|AgCl klaasmikroelektrood (Enderle & Bronzino, 2012)

Mõõtmisteks paigutatakse Ag|AgCl klaasmikroelektroodid nii, et üks elektrood on raku sees ja abielektrood on rakuvälises lahuses. Kuigi klaaskapillaari otsa diameeter on piisavalt väike, et raku sisse torkamisel olulisi vigastusi mitte põhjustada, nõuab rakusisese elektroodi korrektselt paigutamine suurt täpsust ja vilumust ning eeldab, et mõõdetav rakk on paigal.

#### 1.5.4.2. Rakuväline mõõtmine

Erinevalt rakusisestest elektroodidest, mis mõõdavad ühe raku membraanipotentsiaali muutusi, paigutatakse rakuvälised elektroodid rakuvälisesse ruumi, kus liikuvad ioonid on paljude läheduses olevate rakkude elutegevuse tulemus. Selgema signaali saamiseks tuleks rakuväline elektrood paigutada seega võimalikult lähedale huvipakkuva aktiivsusega rakkudele. Rakuvälised elektroodid on enamasti kergemad käsitleda kui rakusisised elektroodid ning võimaldavad olenevalt meetodist teha mõõtmisi tundidest kuudeni. Rakuväliseid mõõtemetodeid on kahte tüüpi: invasiivsed (elektrood on koe sees: paigaldamisel saavad paljud rakud kahjustada) ja mitteinvasiivsed (elektrood on koe pinnal).

Rakuväliseks invasiivseks mõõtmiseks kasutatakse tihti metallist nõelelektroode, mis torgatakse uuritava koe sisse. Selliste elektroodidega on mõõdetud näiteks erinevate puuliikide elektrilise potentsiaali muutuse ööpäevast ja aastast rütmilisust (Fensom, 1963; Xie et al., 2021), aga ka seente spontaanseid ja indutseeritud potentsiaali muutuseid nii seene viljakehadest kui ka tihedast mütseelist (Adamatzky, 2018a; Adamatzky, Gandia, et al., 2021). Kirjeldatud elektroodide käsitus kahjustab paratamatult kude ja põhjustab vähemalt lühiajaliselt kahjustusest tulenevaid lisasignaale. Alternatiivne elektroodi materjal on grafiit, mis võimaldab teha pikaajalisi mõõtmisi korrosiooni ohuta.

Vastukaaluks on koe pinnale keskenduvad mõõtmised mitteinvasiivsed ning annavad eelise näiteks vigastustega seotud signaalide uurimisel. Mitteinvasiivsete pinnaelektroodidena

kasutatakse enamasti Ag|AgCl elektroode, mis toimemehhanismilt sarnanevad peatükis 1.3.2.1. kirjeldatud klaaselektroodiga. Erinevus seisneb selles, et elektrood paikneb rakuväliselt ning kontakt koega saavutatakse elektrolüüdi kaudu. Elektrolüüdiks võib olla näiteks KCl agargeel (Luo, 2020; Mousavi et al., 2014). Elektrolüüt-kontakti miinuseks elektroodi ja mõõdetava pinna vahel on elektrolüüdi kiire kuivamine, mis piirab võimalikku mõõtmise ajavahemikku mõne tunnini, ja teatud elektrolüütide toksilisus (Volkov, 2006).

## **1.6. Filamentsete seente elektriliste signaalide interpreteerimine**

Seente elektriliste signaalide mehhanismidele ja tähendusele mütseelis ei ole täielikku selgitust leitud. Mütseeli elektriliste mõõtmiste interpreteerimine oleneb palju mõõtemetoodikast. Rakusiseste elektroodide mõõtetulemuste põhjal saab teha otseseid järeldusi raku membraanipotentsiaali muutuste kohta, samas kui rakuvälised meetodite mõõtetulemused on kombinatsioonid paljude rakkude potentsiaalimuutustest.

Signaali defineerimise järgi saab eristada kahte lähenemisviisi: 1) spontaanset aktiivsuse mõõtmine, 2) organismi teadlik stimuleerimine ning mõõtmistes stiimuli vastuse otsimine.

Müra ja signaali suhtelisust mainiti peatükis 1.2.. Mõõdetavat stimuleerides otsitakse mõõtmistulemustes signaali, mis mõõtja jaoks on antud juhul signaal. Stiimuliga mitteseonduvad seene spontaansed signaalid on sellisel juhul mõõtja jaoks müra.

Mütseeli spontaanset elektrilise aktiivsuse mõõtmisel võib seega kõiki mõõtmistulemusi käsitleda mürana, mida edasi analüüsida.

Andrew Adamatzky on rakuväliste meetoditega uurinud nii stimuleeritud signaale kui ka spontaanset elektrilist aktiivsust. (Adamatzky, 2018a). Stiimulite rakendamise tulemusena on Adamatzky kirjeldanud seeneliigis *Pleurotus ostreatus* iseloomulike elektrilisi signaale näiteks vastusena valgusele ja mehaanilisele survele (Adamatzky, Gandia, et al., 2021; Adamatzky, Nikolaidou, et al., 2021). Spontaansete signaalide /müra iseloomustamiseks võrdles Adamatzky nelja seeneliigi elektrilist aktiivsust ja leidis, et spontaanne aktiivsus erineb liigiti (Adamatzky, 2022).

## 2. TÖÖ EESMÄRK

Käesoleva uurimuse eesmärk on luua ja katsetada kättesaadavatest materjalidest ja kiiresti valmistatavat mõõterakku, mis võimaldaks mõõta söötmel kasvava mütseeli (ka hõreda mütseeli) elektrilist aktiivsust. Uurimuses kasutati austerserviku, *Pleurotus ostreatus* isolaate. Seeneliigi *Pleurotus ostreatus* elektrilist aktiivsust on varasemalt mõõdetud rakuväliste meetoditega (Dehshibi et al., 2021). Kiire kasvu ja vähenõudlikkuse tõttu on *Pleurotus ostreatus* isolaate laboritingimustes lihtne kasvatada. Mõõterakud 3D-prinditi PLA-st ja elektroodeks valiti grafiitelektroode.

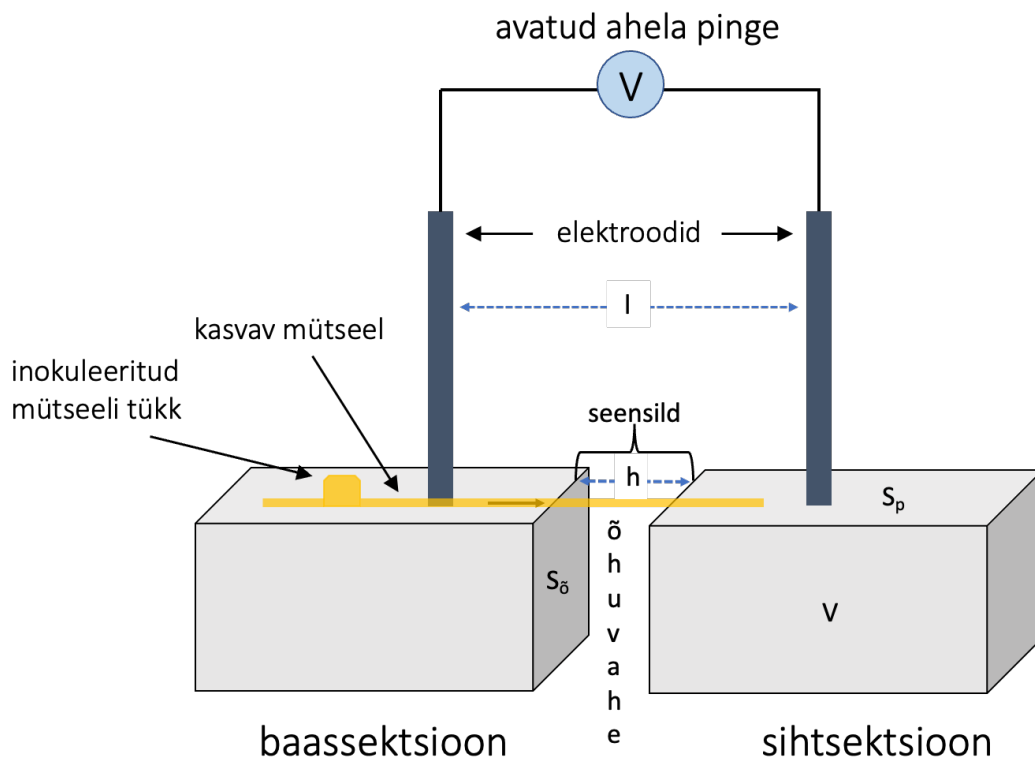
Uurimuses välja pakutud lahendus elektrilise aktiivsuse mõõtmiseks on uudne, kuna praegu puudub kergesti rakendatav mitteinvasiivne meetod mütseeli elektrofüsioloogia uurimiseks. Seente elektrilise aktiivsuse mõõtmisel on potentsiaali seente kohta andmete kogumiseks ja kaardistamiseks ka naturaalses raskesti visualiseeritavas keskkonnas (mullas, puutüves jne).

Uurimust on osa suuremast eesmärgist seente elektrofüsioloogia kaardistamiseks meetoditega, mis oleksid rakendatavad loomulikus kasvukeskkonnas ja võimaldaksid mütseeli võrgustikest infot koguda ja neid stimuleerida.

Uurimuse käigus kogutud mõõtmistulemuste analüüsiga loodetakse luua seoseid elektrilise aktiivsuse ja mütseeli elutegevuse vahel. Mõõtemetod ei ole võrreldav varasemate töödega, kuid mütseeli elektrofüsioloogia teooria baasil on oodatav näha potentsiaali kõikumisi mütseeli osade vahel.

### **Mõõteraku kontseptsioon**

Elektroodide mitteinvasiivse paigutamise mütseeli saab tagada, kui elektroodide mütseeli torkamise asemel lasta seenel elektroodidega varustatud ruumis kasvada. Agarsöötmega täidetud ja elektroodidega varustatud kasvuplaadil kasvava mütseeli elektrilise aktiivsuse mõõtmine ei oleks tulemuslik, kuna seene elutegevuse käigus tekkivad lokaalsed ioonkontsentratsiooni gradiendid ühtlustuksid juhtivas agarsöötmes difundeerudes. Lahenduseks on kahest agarsöötmega täidetud sektsioonist koosnev süsteem, mille vahele jääb suure takistusega õhuvahe. Mõlemasse sektsiooni on paigaldatud elektroodid ning sööde toimib lisäühendusena elektroodi ja mütseeli vahel. Ühte sektsiooni söötmele inokuleeritakse mütseeli tükk (edaspidi baassektsioon). Süsteem on valmis elektrilisteks mõõtmiseks, kui mütseel on jõudnud kasvada sillana üle õhuvahe (edaspidi seensild) teise sektsiooni (edaspidi sihtsektsioon) ja seeläbi ühendanud vooluringi (joonis 9).



Joonis 9 Mõõteraku kontseptsioon. Elektroodid sektsioonides, mille ainus ühendus on mütseelist seensild võimaldab mõõta potentsiaali muutuseid mütseeli eri osade vahel. Kasvav mütseel on skemaatiliselt kujutatud ühemõõtmeliselt, tegelikult kasvab mütseel kõigis ruumisuundades. Noolega on märgitud huvipakkuv mütseeli kasvusuund.

Kirjeldatud süsteem ei sobitu peatükk 1.4.4.2. toodud rakuväliste mõõtemetodite liigitusse. Traditsiooniline mitteinvasiivne rakuväline meetod loob lokaalse kontakti koega läbi elektrolüüdi. Selles uurimuses kirjeldatud katse ülesehituses on elektroodid kontaktis ennekõike küll elektrolüüdiga (agarsööde), aga ka mütseeliga, mis kasvab elektroodi ümber (Lisa 1). Selline ülesehitus võimaldab mõõta üldiseid erinevuseid mütseeli eri osade vahel, kusjuures mõõtmise ei eelda mütseeli otsest kontakti elektroodiga.

Uurimuses eeldati, et söötme ruumala ja koostis ja elektroodide kontaktpind on sektsioonides võrdsed, mistõttu võib söötmete ja elektroodide impedantsi lugeda võrdväärseks ja võib jätta arvestamata.

**Töö eesmärgi saavutamiseks sooritati järgmised sammud:**

1. loodi prototüüpne 3D-prinditud mõõterakk;
2. mõõdeti mõõterakus kasvava *Pleurotus ostreatus* mütseeli osade vahelist avatud ahela pinget;
3. mõõtmistulemused visualiseeriti „pinge vs aeg“ ja „võimsuse spektraaltihedus vs sagedus“ graafikutel ning analüüsiti võimalikke seoseid mütseeli elutegevusega.

### 3. EKSPERIMENTAALOSA

#### 3.1. Materjalid ja meetodika

##### 3.1.1. Austerservik, *Pleurotus ostreatus*

Katses kasutati Tartu Ülikooli loodusmuuseumi alamkodus säilitatavat austerserviku (*Pleurotus ostreatus*) seenetüve TFC202336. Tartu Ülikooli loodusmuuseumi alamkogu on osa Tartu Ülikooli ja Eesti Maaülikooli ühisest eluskultuuride kollektsioonist, mida käsitletakse ühise akronüümi TFC (Tartu Fungal Culture Collection) all. Seente eluskultuuride kogus säilitatakse eluskultuure katseklaasides +6 °C juures.

Töö jaoks külvati *Ostreatus pleuratus* tüvi TFC202336 Petri tassidele MEA söötmele (2% linnaseekstrakt + 2% agar + deioniseeritud vesi). Petri tasse hoiti kasvukapis +23 °C juures. Petri tass (läbimõõduga 19 cm) kasvas täis ca 7 päevaga. Täis kasvanud Petri tasse hoiti katsete tegemiseni temperatuuril +5 °C, et kasvu pidurdada ja mütseeli elujõulisena säilitada.

##### 3.1.2. Mõõteraku valmistamine

Mõõterakkude kokkupanemiseks kasutati 3D-prinditud baasvorme, kasvusubstraadina autoklaavitud MEA söödet (2% linnaseekstrakt + 1,5% agar + deioniseeritud vesi), 2 mm läbimõõduga grafiitelektroode (ErichKrause, mehaanilise hariliku pliiatsi 2 mm läbimõõduga, 2B süsi), läbipaistvaid plastikaatkatteid, Parafilmi ja kleeplinti.

Mõõterakkude baasvormid disainiti SolidWorks programmiga ja prinditi PLA-st (polüpiimhapest) Original Prusa i3 MK3S printeriga.

Mõõtmisteks sobivate dimensioonidega ja kujuga vormi leidmiseks tehti kolm prototüüpi, mille mõõtmed on toodud tabelis 1.

Tabel 1 Mõõterakkude parameetrid. Parameetrid on tähistatud joonisel 9.

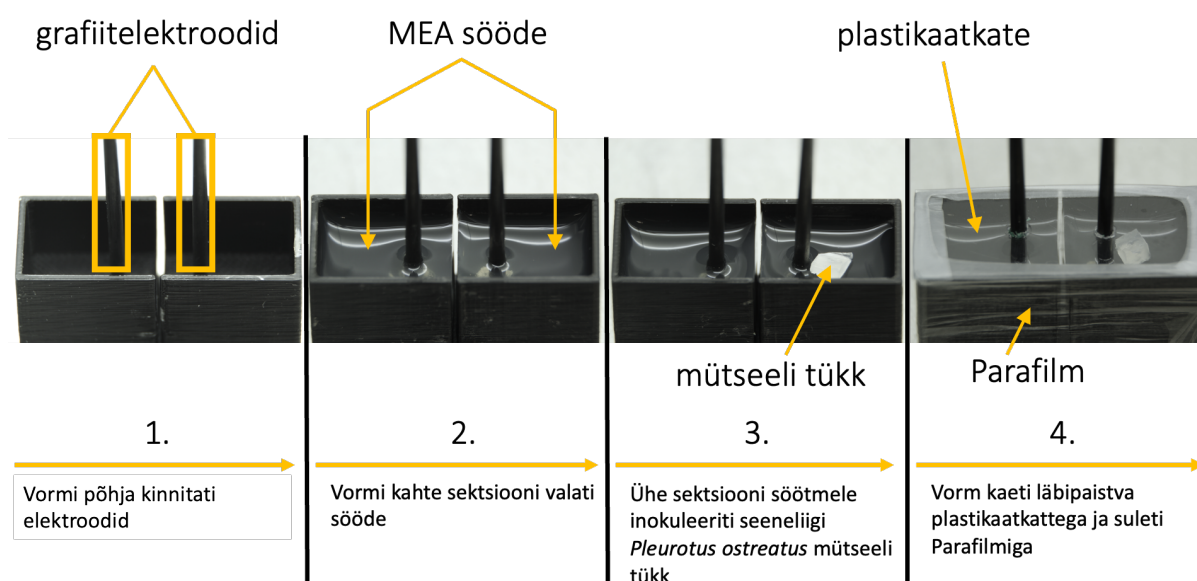
| Prototüüp | Sektsiooni ruumala, V (mm <sup>3</sup> ) | Sektsiooni kogu avatud pind, S <sub>δ</sub> +S <sub>p</sub> (mm <sup>2</sup> ) | Sektsiooni õhuvahesse avatud pind, S <sub>δ</sub> (mm <sup>2</sup> ) | Õhuvähe, h (mm) | Elektroodide kaugus, l (mm) |
|-----------|--|--|--|-----------------|-----------------------------|
| 1.        | 51000                                    | 3400   | 150  | 5               | 80                          |
| 2.        | 1810                                     | 2175   | 40   | 3               | 25                          |
| 3.        | 2520                                     | 392  | 140  | 1               | 12                          |

Mõõterakkudes katsetati nii standardse 2% kui ka 1,5% agari sisaldusega MEA söödet. Lõppmõõtmised tehti vormiga nr 3 ja 1,5% agari sisaldusega MEA söötmega.

3D-prinditud vormid, elektroodid ja plastikaatkatted desinfitseeriti enne mõõterakkude kokku panemist 70% etanooli lahusega.

Mõõteraku kokkupanemine toimus etappidena (joonis 10):

1. 3D-prinditud vormi sektsioonidesse fikseeriti identsed 2-mm läbimõõduga grafiitelektroodid. Tööelektroodi ja referentselektroodi vahekaugus oli 1 cm. (joonis 10.1);
2. vormi sektsioonide avatud küljed suleti ajutiselt kleplindiga ja sektsioonidesse valati MEA sööde. Kleplint eemaldati pärast söötme tardumist. (joonis 10.2);
3. baassektsiooni elektroodide sihis sektsiooni serva poole inokuleeriti kultuuri tükk. (joonis 10.3);
4. mõõterakk kaeti pealt läbipaistva plastikaatkattega. Avatud küljed suleti Parafilmiga, et vältida mõõteraku saastumist ja hoida mõõteraku sees küllastunud õhuniiskust. (joonis 10.4).



Joonis 10 Mõõteraku ettevalmistusprotsess.

Mõõterakke hoiti pimedas temperatuuril +22 °C kuni mütseel hakkas moodustama seensilda, aga ei olnud veel sihtsektsiooni söötmele jõudnud (joonis 12).

### **3.1.3. Avatud ahela pinge mõõtmine**

Mõõtmisteks kasutati BioLogic BP-300 potentsiostaati. Mõõdeti avatud ahela pinget, 1 mõõtmise sekundis, lahutusega 10  $\mu$ V. Müra vähendamiseks paigutati mõõdetav süsteem Faraday puuri. Faraday puurina kasutati viiest küljest suletud ja pealt avatud pappkasti, mis vooderdati hõbepaberiga. Faraday puur maandati mõõteaparatuuri maandusega. Sihtsektsoonis oli tööelektrood ja baassektsoonis abielektrood. Uurimuse käigus tehti kolm mõõtmist kolme kultuuri kordusega. Enne mõõtmiste alustamist tõsteti seemed vähemalt üheks tunniks mõõtmistingimustesse. Mõõtmisi tehti konstantse laelambi valgustusega, et mõõtmiste käigus oleks võimalik mütseeli kasvu jälgida ja jäädvustada. Mõõteraku-sisesele stabiilsele õhuniiskusele viitasid piisad läbipaistval plastikaatkattel. Mõõtmised kestsid keskmiselt 6 päeva.

### **3.1.4. Kasutatud tarkvara**

Signaali töötlemiseks ja visualiseerimiseks kasutati National Instruments LabVIEW 2021 tarkvara. Võimsuse spektraaltiheduse leidmiseks järjestati isolaat 1 ja isolaat 2 mõõtmistulemused mõõtmistevahelisi pause arvestamata. Pilte töödeldi Adobe Photoshop 2022 programmiga. Joonis 6 tegemiseks kasutati programmi BioRender.

## 4. TULEMUSED JA ARUTELU

### 4.1. Mõõteraku parameetrid

Kolme mõõteraku prototüübi positiivsed ja negatiivsed omadused on välja toodud tabelis 2. Mõõtmisteks kasutati minimaalse inkubatsiooniajaga prototüüpi 3, kus sööde püsis niiskena kogu mõõtmiste aja (7+ päeva) ning saastumistõenäosus oli väike.

2% agarisöötme kasvas mütseel üldiselt söötme pinnal, hüüfid tungisid vähe söötme sisemusse ja sööde kuivas võrdlemisi kiiresti; seensild moodustus alguses ühe sektsiooni pealispinnalt teisele (joonis 11). 1,5% mütseel kasvas söötme läbi ja sööde püsis pikemalt niiskena; seensild moodustus kohe kogu söötme õhuvahesse avatud pinna ulatuses (joonis 11). Mõõtmistes kasutati 1,5% agarsöödet kuna konstantsete niiskustingimuste tagamiseks oli oluline söödet värskena hoida.

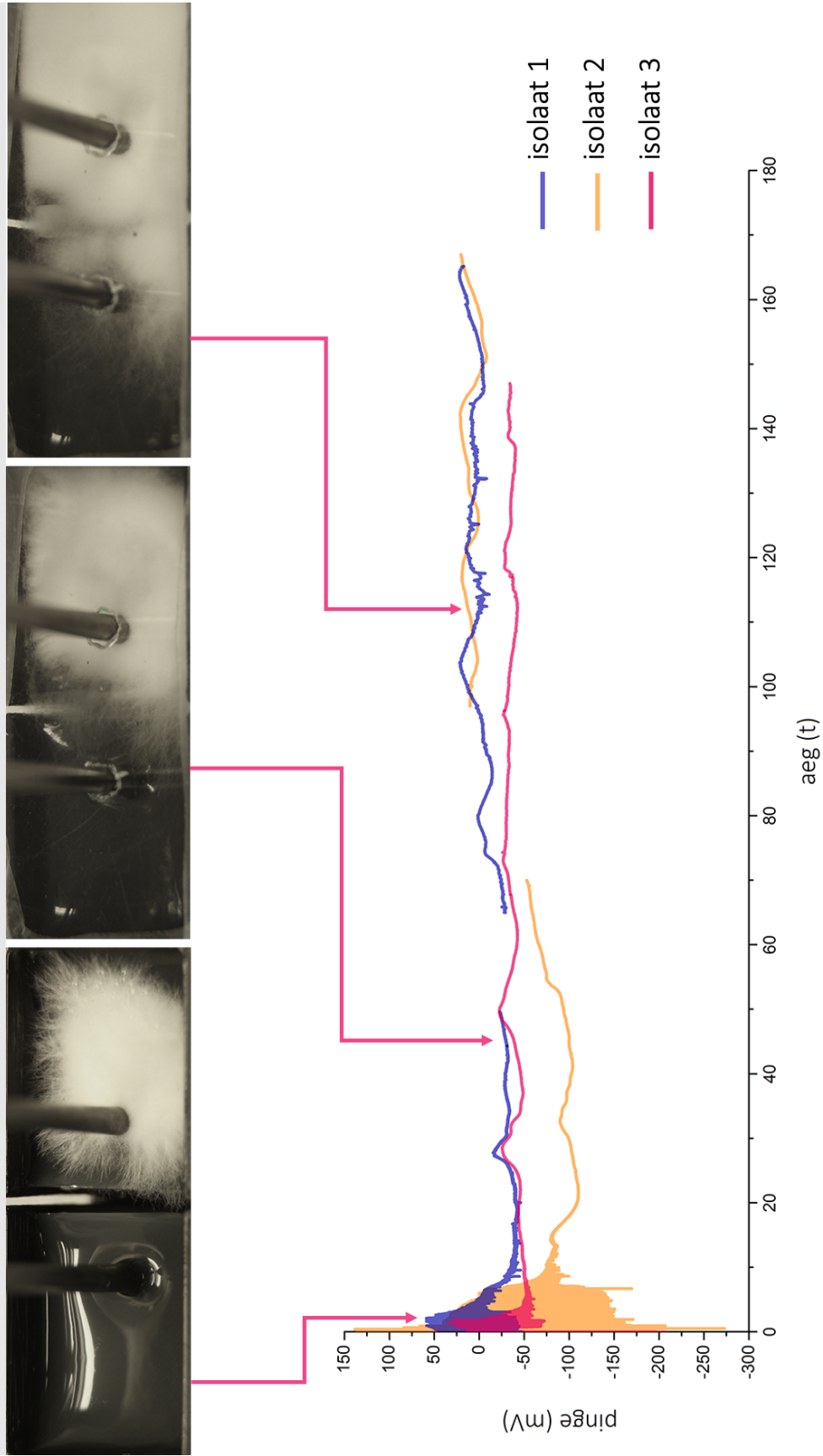
Tabel 2 Kolme prototüübi positiivsed ja negatiivsed omadused.

| Prototüüp | Positiivne   | Negatiivne   |
|-----------|--|--|
| 1.        | <ul style="list-style-type: none"><li>Sööde püsis niiskena mitu kuud</li></ul>   | <ul style="list-style-type: none"><li>Pikk inkubatsiooniaeg (7 päeva)</li><li>Suur saastumise tõenäosus</li></ul>    |
| 2.        | <ul style="list-style-type: none"><li>Sööde kitsas tunnelis kuivas kiiresti ja takistas seensilla moodustumist</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>Inkubatsiooniaeg lühike (3 päeva)</li><li>Väike saastumise tõenäosus</li></ul> |
| 3.        | <ul style="list-style-type: none"><li>Sööde ei kuivanud mõõtmiste vahemikus</li></ul>                                    | <ul style="list-style-type: none"><li>Inkubatsiooniaeg lühike (3 päeva)</li><li>Väike saastumise tõenäosus</li></ul> |

### 4.2. Avatud ahela pinge mõõtmiste interpreteerimine

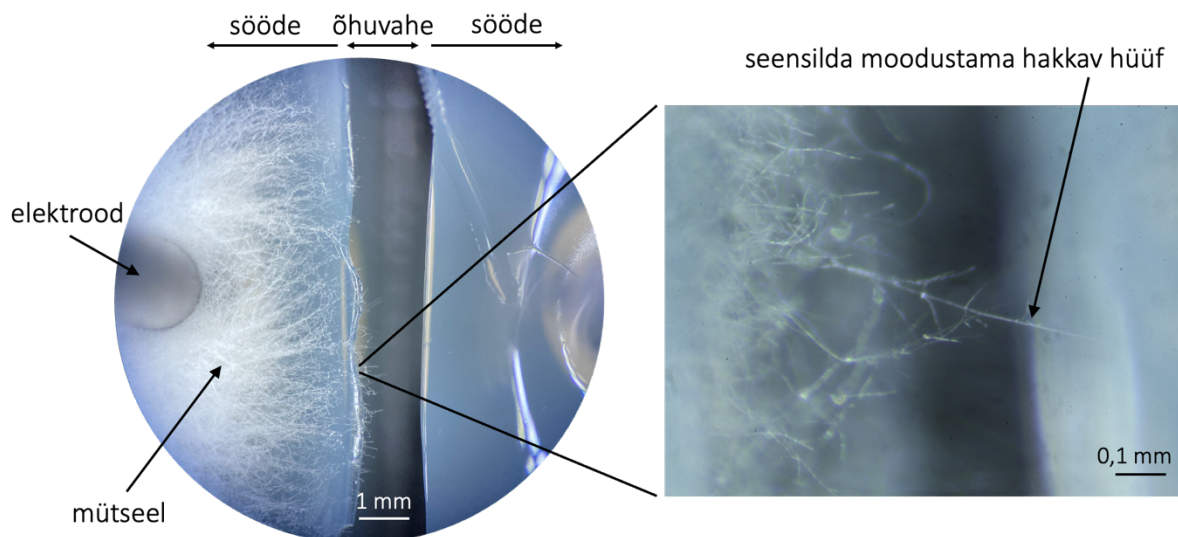
Mõõtmiste tulemusena saadi andmed avatud ahela pinge muutuste kohta ajas kolme inokulaadi jaoks, mis on kujutatud joonisel 13. Isolaatide 1 ja 2 mõõtmised olid katkendlikud: [isolaat1] 15-tunnine paus vahemikus 50 – 65 tundi; [isolaat 2] 27-tunnine paus vahemikus 70 – 97 tundi. Isolaat 3 mõõtmine oli pidev kuue päeva vältel ning mõõtmisperioodi illustreerivad pildid mütseeli kasvetappidest (joonis 11).

Kõigi kolme mõõtmise alguses on näha esimese 10 tunni jooksul suhteliselt suuri perioodilisi potentsiaali kõikumisi. See kirjeldab olukorda, kus mütseel ei olnud veel sillana



Joonis 11 Kolme mõõteraku avatud ahela pinge mõõtmise tulemused. Isolaatide 1 ja 2 elektrilist aktiivsust mõõdeti 7 päeva, rameti nr 3 elektrilist aktiivsust mõõdeti 6 päeva. Pildid kujutavad isolaat 3 kasvu ulatust 1) mõõtmise alguses, 2) 46 tunni möödudes, 3) 113 tunni möödudes.

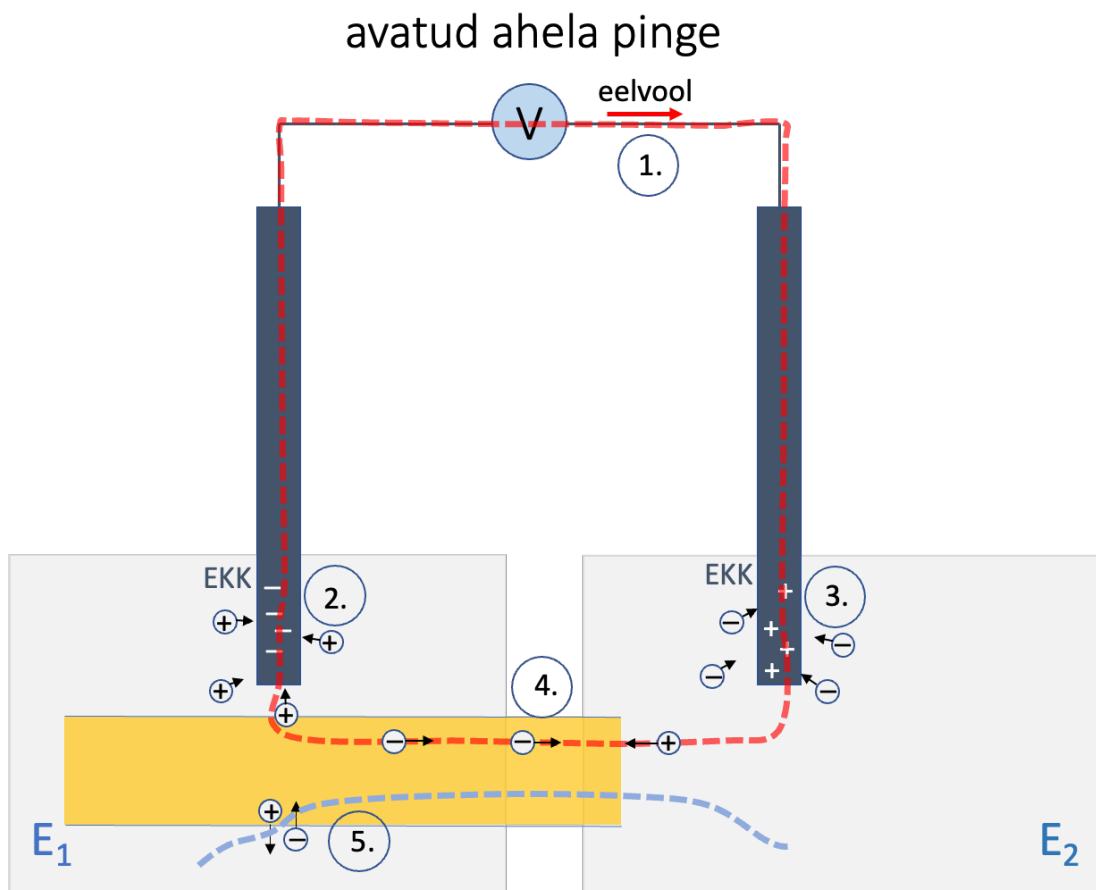
baassektsioonist sihtsektsiooni söötmega kontakti kasvanud ning elektrilise süsteemi takistus oli suur (joonis 12). Süsteemi sisemised ja varjestamata küljest mõjutavad välised tegurid avaldusid suurte potentsiaali kõikumistena.



*Joonis 12 Pealtvaade 1,5% agarsöötmeel seensilda moodustama hakkav mütseel. Vasakul on näha söötme pealiskihetidest sihtsektsiooni poole pürgivat mütseeli kasvuf fronti (külgsuunas näeks kogu õhuvahessesuunatud pinna ulatuses söötmet väljuvaid hüüfe). Paremalt suurendusega pilt seensilda moodustavast hüüfist. Elektrilise süsteemi takistus on suur kuna mütseel pole veel seensilda moodustanud.*

Avatud külge varjestades vähenes mürafoon kümneid kordi. Müra vähendav efekt on ka juhtivuse suurenemisel. Mürafooni vähenemisega (kõigil isolaatidel umbes 10 tunnise kasvuperioodi järel) on tuvastatav ajavahemik, kui mütseel kasvas kontakti sihtsektsiooniga ja tekkis uus väiksema takistusega tee vooluahelas – mütseelist seensild.

Avatud ahela potentsiaali mõõtmistes kasutatud mõõterakkudes kasvas mütseel aeglasemalt kui samal ajal inokuleeritud ja samades tingimustes hoitud mõõterakkudes, mis ei olnud vooluringiga ühendatud. See võis tuleneda potentsiostaadi ebatäpsusest – väiksest rakendatud eelvoolest. Tõenäoliselt tekkis eelvoolu tõttu kahe sektsiooni söötmete vahel potentsiaalide erinevus, mis mõjutas ühest sektsioonist teise kasvavat hüüfi. Eelvoolu suund ja suurus pole defineeritud (tuleneb potentsiostaadist), kuid mingil ajahetkel on voolul kindel väärtus ja suund. Joonisel 13 on skemaatiliselt kujutatud kujutatud seensilda moodustavat hüüfi teatud ajahetkel. Eelvool põhjustab elektroodide laadumise söötmete potentsiaalide erinevuse, mis kutsus esile väikse voolu ka hüüfis (joonisel 13 punane punktiirjoon). Samas võivad hüüfis liikuda ioonid, mille liigutamiseks teevad rakud tööd ka rakendatud voolust sõltumatult (joonisel 13 sinine punktiirjoon)



Joonis 13 Avatud ahela pinge mõõtmise mõju mütseeli kasvule. Kollasega on kujutatud esimest sihtseksiooni jõudvat hüüfi. 1) Mõõteriista ebatäpsusest rakendub süsteemile väike vool, mille suund teatud ajahetkel on tähistatud noolega. 2) ja 3) Väikese voolu tulemusena laaduvad elektrodid ja moodustub elektriline kaksikkiht (EKK), laengute ümberpaigutumine põhjustab erinevuse söötmete potentsiaalide  $E_1$  ja  $E_2$  vahel. 4) Potentsiaalide erinevuse tõttu liiguvad osad ioonid hüüfis eelvoolu suunas, moodustub punase punktiiriga tähistatud voluluring. 5) Sinise punktiirjoonega on tähistatud hüüfiioonvoolud jaioonvoolud, mis toimuvad potentsiaalide erinevusest sõltumatult.

### 4.3. Perioodilised muutused avatud ahela pinges

Mõõtmiste ajal olid mõõterakud pidevalt laelambiga valgustatud, kuid akendest paistva päevavalguse eest ei olnud mõõtesüsteeme võimalik täielikult isoleerida. Seega muutusid valgustingimused vähesel määral ööpäeva rütmis. Ööpäeva valguse muutusi arvesse võttes võrreldi mõõdetud avatud ahela pinge muutusi päikselloojangu ja -tõusu tsüklilisusega (joonis 13, 1a, 2a, 3a). Kuigi perioodilisus vastas umbkaudu ööpäeva tsüklile, ei tulnud välja selget sõltuvust pimedast ja valgust ajaperioodist. Mõõterakke ei stimuleeritud teadlikult, mistõttu käsitleti mõõdetud potentsiaalimuutuseid juhuslike protsessidena (mürana). Selle müra paremaks iseloomustamiseks visualiseeriti mõõtetulemused võimsuse spektraaltiheduse graafikul (joonis 13, 1b, 2b, 3b).

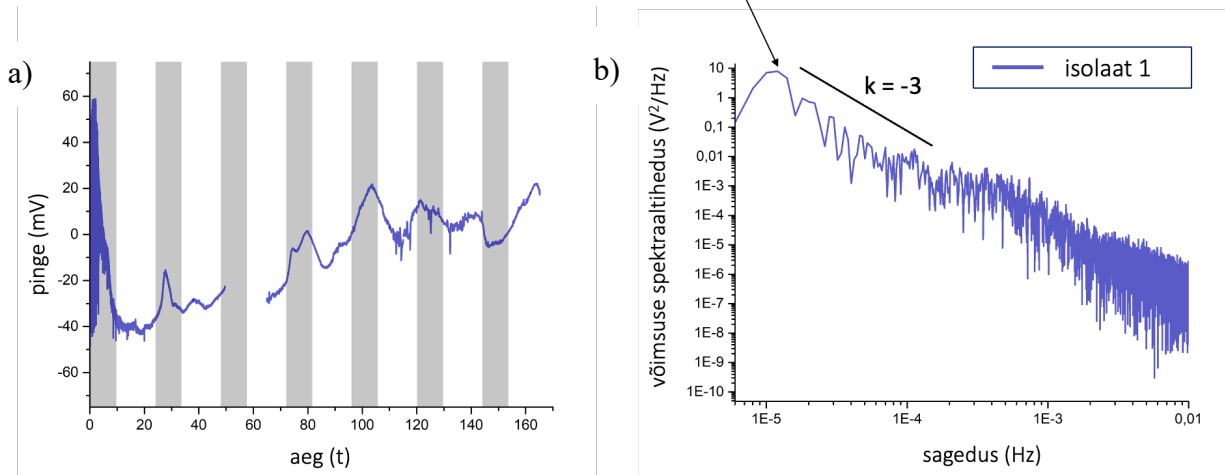
Võimsuse spektraaltiheduse graafikutel ilmnesid tõusud  $k = -3$  (joonis 13,1b),  $k = -4$  (joonis 13, 2b),  $k = -3$  (joonis 13, 3b), mis kirjanduse põhjal iseloomustab keerukaid iseorganiseerumisvõimega süsteeme (ptk 1.5.3.2.).  $1/f^x$  sagedussõltuvuse edasine analüüs jääb käesoleva uurimuse piiridest välja.

Võimsuse spektraaltiheduste graafikutel tuli kõikidel isolaatidel välja domineeriv madalsageduslik perioodilisus perioodiga keskmiselt 20 tundi (joonis 14, 1b, 2b, 3b). Negatiivse proovina mõõdeti avatud ahela pinget ühtlases agarsöötmes. Mõõtmiste tulemusena veenduti, et isolaatidele iseloomulikku madalsageduslikku piiki perioodiga ligi 20 tundi ei esinenud (lisa 2).

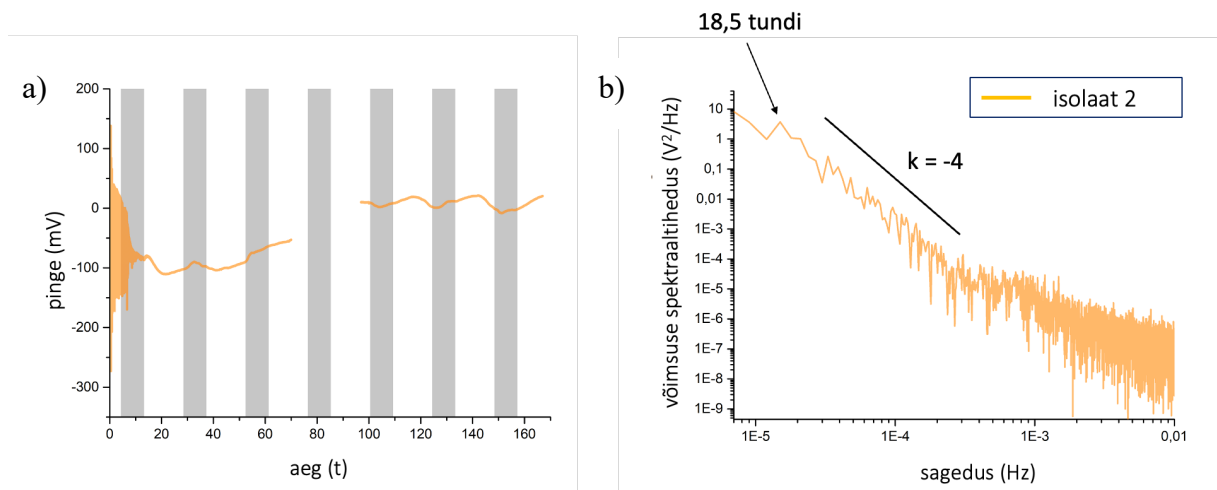
Kuigi seeneliigi *Pleurotus ostreatus* tsirkadiaanrütmi pole teadaolevalt uuritud, on seeneliik *Neurospora crassa* kujunenud tsirkadiaanrütmi uurimise mudelorganismiks, kellel on kirjeldatud füsioloogilist tsüklilisust perioodiga 22,5 tundi (Baker et al., 2012). Tsirkadiaanrütmina defineeritakse biokeemilisi, füsioloogilisi või käitumuslikke umbes 24 tunnise perioodiga võnkumisi, mis konstantsete valguse, temperatuuri ja muude keskkonna tingimuste korral on püsivad, kuid mille faasi saab lähtestada konstantse režiimi muutustega ning mille perioodi pikkus on normaalset kasvu tagavate füsioloogiliste muutuste piirides temperatuurist ja toitainetest võrdlemisi sõltumatu [(„Chronobiology“, 2004) viidatud (Dunlap & Loros, 2017) kaudu].

Varasemast pole teada uurimusi seente tsirkadiaanrütmi elektrilistest mõõtmistest, kuid elektriliste mõõtemetodidega on edukalt kirjeldatud puude ööpäeva ja aasta rütmilisi muutuseid (Fensom, 1963; Xie et al., 2021). Seente kasv ja elektrofüsioloogia on tihedalt seotud (ptk 1.4), mistõttu on oodatav, et ka seente tsirkadiaantsüklilisus on elektriliste mõõtemetoditega tuvastatav.

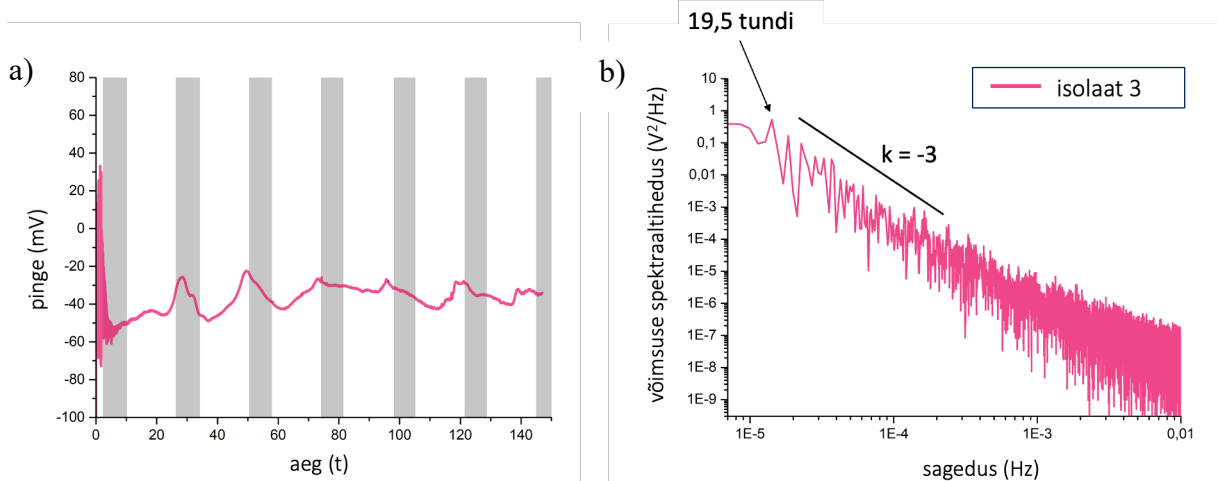
1.



2.



3.



Joonis 14 Mõõtmistel ilmnenud madalsageduslik perioodilisus. Vasakus tulbas on kujutatud kolme iselaadi avatud ahela pinge mõõtmised võrdluses öö ja päeva vaheldumisega (öö on arvestatud päikeseloojangust päiksetõusuni). Paremas tulbas on kujutatud mõõtmistulemusi võimsuse spektraaltiheduse graafikul madalsagedusliku perioodilisuse paremaks karakteriseermiseks. Kõigil isolaatidel ilmneb kesmiselt 20 tunnise perioodiga sageduspiik, mis võiks kirjeldada mütseeli kasvufrondi ja baasi vahelisi tsirkadiaanseid füsioloogilisi muutuseid. Võimsuse spektraaltiheduse graafikute alguses on näha ka tõusud 1.  $k = -3$ , 2.  $k = -4$ , 3.  $k = -3$ , mis viitavad peatükis 1.5.3.2. kirjeldatud  $1/f^\alpha$  sagedussõltuvusele.

## 4.4. Edasiarendused/rakendused

Avatud ahela pinge mõõtmise täiedusena annaksid lisainfot korduskatsed referentselektroodidega kummaski sektsioonis. Andmed sektsioonide potentsiaalide vahe muutuste kohta võimaldaksid edasi uurida joonisel 12 kujutatud hüpoteesi.

Seeneliigi *Pleurotus ostreatus* tsirkadiaanrütmi perioodi kinnitamiseks peaks *Neurospora crassa* tsirkadiaanrütmi uurimiseks kasutatud molekulaarseid meetodeid (Baker et al., 2012) rakendama austerservikul (*Pleurotus ostreatus*). Tsirkadiaanrütmi paremaks iseloomustamiseks käesolevas uurimuses käsitletud elektrilise mõõtemetodiga tuleks järgmised katsed teha pimedas, tagades konstantsed valgustingimused.

Selles uurimuses kokkupandud mõõterakk ei võimalda mõõta Andrew Adamatzky kirjeldatud lokaalseid varieeruva perioodiga aktsioonipotentsiaali-laadseid potentsiaali muutusi (Adamatzky, 2018a). Elektroodideni jõuab info läbi söötme väga paljude hüüfide elektrilisest aktiivsusest, millele lisanduvad difusioonist tingitud ebatäpsused. Seetõttu võimaldab uurimuses käsitletud mõõteraku ja mõõtemetodika kombinatsioon koguda infot vaid väga üldiste potentsiaali muutuste kohta mütseeli eri osade vahel. Uue vaatepunkti annaks voolu mõõtmine mõõterakus.

Selles uurimuses ei uuritud mütseeli elektrilisi vastuseid stiimulitele. Edasistes katsetustes stiimulitega oleks võimalik hinnata, kas, kuidas ja kui kiiresti muutub potentsiaal mütseeli osade vahel reaktsioonina stiimulile.

Katseid tehti ainult seeneliigi *Pleurotus ostreatus* isolaatidega, järgmised katsed tuleks teha erinevate seeneliikidega, et tuvastada, kui edukalt teised aeglasema kasvuga/nõudlikumad seeneliigid üle õhuvähe kasvavad ning kas mõõdetud elektriline aktiivsus erineb liigiti.

Uurimuses kasutatud põhimõtet elektrodide mütseeli torkamise asemel lasta mütseelil elektrodide ümber kasvada, saab rakendada ka edaspidi mitteinvasiivsetes rakuvälistes mõõtmistes.

Kirjeldatud põhimõttel oleks võimalik ka teistsuguse katseülesehituse korral hüüfide lokaalseid potentsiaalimuutuseid mõõta. Seda võimaldaks elektrodide süsteemi kombineerimine mikrofluidika kiipidega (Schmieder et al., 2019) või muld kiibil süsteemidega (Mafla-Endara et al., 2021). Mikroskaalas kapillaarid võimaldavad kapillaaris korraga kasvada paaril hüüfil, Sellisesse kapillaari elektroodi paigaldamine võimaldaks mõõta mitteinvasiivselt lokaalset rakuvälisest elektrilist aktiivsust.

Edasiarendamist vajav idee on poorsed elektroodid, millest mütseel või üksikud hüüfid kasvaksid läbi. See oleks uus lähenemine seene elektrilise aktiivsuse mõõtmisele elektroodi koloniseerimise põhimõttel.

Andrew Adamatzky on välja pakkunud idee seenmaterjalist tarkadest majadest, kus osa mütseelist elaks ning võimaldaks näiteks valgustundliku sensorina päikese tõustes ja loojudes tulesid automaatselt sisse ja välja lülitada (Adamatzky, Gandia, et al., 2021). Elusa mütseeli levikut elutus materjalis oleks võimalik jälgida väikeste elektroodidega varustatud kahest sektsioonis koosnevate mõõterakkudega. Joonisel 13 välja tulnud iseloomulik müra vähenemine mütseeli sihtsektsiooni jõudmisega annaks infot mütseeli jõudmisest mõõteraku teadaolevasse asukohta.

#### **4.5. Seente elektrofüsioloogia uurimise perspektiiv**

Seente elektrofüsioloogias orienteerumine avab uued võimalused seente sensoorsete omaduste kasutamiseks looduskoosluste toimimise uurimiseks ja heaolu hindamiseks. Mükoriisete seente olulisust taimede vastupanuvõimes kehvades keskkonnatingimustes (näiteks kuivus ja kõrge soolsus), paremas kahjuri resistentsuses ja võimekuses rohkem toitaineid omastada (Chaurasia & Bharati, 2021) on hakatud eriti rõhutama viimastel aastakümnetel. Põllumajanduses on võimalik pestitsiidid ja väetised asendada õigete seenekooslustega. Raielangetele uue terve metsa kasvamist toetavad samuti maa-alused mütseelivõrgustikud. Elektrilised meetodid võimaldavad uuest küljest liikide interaktsioonide ja koosluste uurimist uuest küljest.

Pehmerbootikas on uue suunana kerkinud küsimus ruumi hõivamisest ja haldamisest. Mütseeli omadus ruumi koloniseerida võimaldab uudse lähenemisena ruumi hõivamise asemel keskenduda võimalustele juba ruumi hõivanud võrgustikuga – mütseeliga ühenduse saamiseks. Seente elektrilise aktiivsusega manipuleerimisel on potentsiaal mütseeli kaudu ühendatud taimedele info saatmiseks, toitainete ümberjaotamise kontrollimiseks ja tehnilike süsteemidega sidumiseks – tervete looduskoosluste ümberprogrammeerimiseks.

Targad ja biolagunevad materjalid on aktuaalne teema. Seenmaterjalid võimaldavad mõlemat. Biolagunev mütseelimass toimib ühtlasi sensoorse üksusena. Esimesed prototüübid tekstiilina kantavatest seensensorites, mis reageerivad inimese hormoonidele ja mehaanilisele mõjutusele, on juba loodud (Adamatzky, Gandia, et al., 2021; Adamatzky, Nikolaidou, et al., 2021), kuid vajavad edasiarendamist.

## KOKKUVÕTE

Aineringluse olulise osana ja ökosüsteemi ühendava võrgustikuna on seente elutegevuse tundmaõppimine eeldus kogu ökosüsteemi toimimise paremaks mõistmiseks.

Seente üks märkimisväärsemaid omadusi on mullas laiuva mütseelivõrgustiku koordineerimine: seoses sellega on mütseelis tuvastatud nii keemilisi, mehaanilisi kui ka elektrilisi mehhanisme. Lähtudes seente anatoomilistest ja füsioloogilistest eripäradest ja varasemalt seente elektrofüsioloogia mõõtmiseks kasutatud meetoditest loodi uudse mõõtesüsteemi prototüüp.

3D-prinditud mõõteraku prototüüp võimaldas lihtsate vahenditega mõõta mitteinvasiivselt agarsöötmele kasvava austerserviku, *Pleurotus ostreatus* rakuväliseid pinge muutuseid mütseeli osade vahel. Varasemad lihtsasti käsitletavad rakuvälised meetodid kahjustavad kudet. Uurimuses loodud prototüübi uudsus seisneb seente koloniseeriva loomuse ära kasutamises lastes mütseelil ümber elektroodide kasvada kudet kahjustamata.

Prototüübiga mõõtmiste tulemusena tuvastati 20 tunni perioodiga tsüklilised potentsiaali muutused *Pleurotus ostreatus* isolaatides. Tulemusi seostati tsirkadiaantsüklilisusega, mis on märkimisväärne selle poolest, et varasemast pole teada seente tsirkadiaanrütmi mõõtmisi elektriliste meetoditega. Samuti pole teadaolevalt uuritud seeneliigi *Pleurotus ostreatus* tsirkadiaanrütmi. Tulemuste võrdlemiseks ja kinnitamiseks on vajalik *Pleurotus ostreatus* tsirkadiaanrütmi täiendav kontrollimine traditsiooniliste meetoditega.

Käesolevat uurimustööd, mille keskmes on seente mütseeli kasvu ja diferentsiooni reguleeriv elektrofüsioloogia, võib käsitleda osana suuremast eesmärgist seente elektrofüsioloogia kaardistamiseks ning mõõtmiste võimaldamiseks looduslikes tingimustes. Seente bioelektri mõõtmised võimaldavad kahe elektroodi abil mitmekülgset infot koguda maa-aluse muul viisil raskesti ligipääsetava hüüfvõrgustiku kohta. Võimekus mütseeli potentsiaali muutuseid tõlgendada võimaldab teadlikult elektrilisi signaale saates mütseeli elutegevust mõjutada. Lisaks uutele võimalustele looduskooslustega suhestumiseks ja seente kasutamiseks nii materjali-, tekstiili- kui ka sensoritehnoloogias avavad seente elektrilised omadused kombineerituna hüdraulilise süsteemiga uued vaated näiteks pehmerbootikas.

# Prototype for Non-invasive Mycelial Electrophysiological Measurements

Hana Geara

## SUMMARY

Fungi are considered to be the linking networks of ecosystems. Understanding the processes in fungi is essential for the comprehension of whole ecological systems. The most remarkable about fungi are the signalling mechanisms for coordinating mycelial growth. Three main types of fungal communication mechanisms are chemical, mechanical, and electrical. A prototype for non-invasive extracellular fungal electrical measurements was proposed, considering the anatomical and physiological peculiarities that enable electrical communication within mycelium, and previously used electrical measuring methods.

3D-printed prototypes enabled to measure extracellular potential changes in *Pleurotus ostreatus* mycelium grown on agar medium. In previously used extracellular methods, electrodes have been inserted into mycelium resulting in damaged tissue. The non-invasive approach introduced in this thesis lies in letting the mycelium colonize the electrodes.

As a result of the measurements, cyclic behaviour of potential changes with an average period of 20 hours was observed. To the best knowledge, electrically measured circadian rhythms have not been reported previously in fungi. Although circadian rhythm is well characterized by molecular methods in *Neurospora crassa* little information is available on *Pleurotus ostreatus*. Further evaluation of the results requires additional verification of fungal species *Pleurotus ostreatus* circadian rhythms with conventional methods.

The thesis can be considered part of the bigger aim to gain a better understanding of fungal electrophysiology. Making contact with mycelium allows to gain information from the mycelium as well as to send information to the hyphal network. Fungal electrical activity measurements enable to make contact with mycelial networks through a simple electrode setup.

In addition to the perspective to gain insight into ecosystems, fungal electrical activity has applications in material, textile and sensor technology. Fungal electrical features combined with microfluidics inside hyphae open new opportunities in soft robotics.

## TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajaid Kadri-Ann Valdurit ja Leho Tedersood, kes võimaldasid selle uurimuse seente elektrofüsioloogia teemal läbi viia. Täna Kadri-Anni alati olemas olemast, motiveerimast ja korrapära loomast. Täna Leho Tedersood kiirete ja konkreetsete vastuste ja eluskultuuridega varustamise eest.

Avaldan siirast tänu Indrek Mustale ulmeliste ideede, filosoofiliste mõtiskluste ning igakülgse abi eest.

Olen tänulik Hanna Hõrakule, kes lubas kasutada laborit seente kasvatamiseks ja jagas näpunäiteid. Täna Mikk Välbet toredate vestluste ja laboris juhendamise eest.

Avaldan tänu Irma Zetturile aja ja õpetuse eest eluskultuuridega tegeledes.

Olen tänulik kõigile labori kaaslastele meeldiva seltskonna, sisukate vestluste ja õpetussõnade eest.

Täna oma perekonda igakülgse toetuse eest.

Lõpetuseks täna Jurit kõige eest.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Adamatzky, A. (2018a). On spiking behaviour of oyster fungi *Pleurotus djamor*. *Scientific Reports*, 8(1), 7873. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26007-1>
- Adamatzky, A. (2018b). Towards fungal computer. *Interface Focus*, 8(6), 20180029. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2018.0029>
- Adamatzky, A. (2022). Language of fungi derived from their electrical spiking activity. *Royal Society Open Science*, 9(4), 211926. <https://doi.org/10.1098/rsos.211926>
- Adamatzky, A., & Gandia, A. (2022). Fungi anaesthesia. *Scientific Reports*, 12(1), 340. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04172-0>
- Adamatzky, A., Gandia, A., & Chiolerio, A. (2021). Towards fungal sensing skin. *Fungal Biology and Biotechnology*, 8(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40694-021-00113-8>
- Adamatzky, A., Nikolaidou, A., Gandia, A., Chiolerio, A., & Dehshibi, M. M. (2021). Reactive fungal wearable. *Biosystems*, 199, 104304. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2020.104304>
- Attias, N., Danai, O., Abitbol, T., Tarazi, E., Ezov, N., Pereman, I., & Grobman, Y. J. (2020). Mycelium bio-composites in industrial design and architecture: Comparative review and experimental analysis. *Journal of Cleaner Production*, 246, 119037. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119037>
- Attri, R. K. (2015). *Various Noise Sources & Noise Reduction Techniques in Instrumentation*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2592.9046>
- Bahn, Y.-S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (2007). Sensing the environment: Lessons from fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 5(1), 57–69. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1578>
- Baker, C. L., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2012). The circadian clock of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 95–110. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00288.x>
- Bonneville, S., Delpomdor, F., Pr eat, A., Chevalier, C., Araki, T., Kazemian, M., Steele, A., Schreiber, A., Wirth, R., & Benning, L. G. (2020). Molecular identification of fungi microfossils in a Neoproterozoic shale rock. *Science Advances*, 6(4), eaax7599. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax7599>

- Bueno, D. J., & Silva, J. O. (2014). FUNGI | The Fungal Hypha. *Encyclopedia of Food Microbiology* (1k 11–19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00132-4>
- Chaurasia, P. K., & Bharati, S. L. (2021). Applicability of fungi in agriculture and environmental sustainability. *Microbes in Land Use Change Management* (1k 155–172). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824448-7.00010-3>
- Chronobiology: Biological timekeeping. (2004). *Choice Reviews Online*, 41(05), 41-2795-41–2795. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.41-2795>
- Crilly, A. J., Earnshaw, R. A., & Jones, H. (1993). *Applications of fractals and chaos: The shape of things*. Springer-Verlag. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-78097-4>
- Darrah, P. R., Tlalka, M., Ashford, A., Watkinson, S. C., & Fricker, M. D. (2006). The Vacuole System Is a Significant Intracellular Pathway for Longitudinal Solute Transport in Basidiomycete Fungi. *Eukaryotic Cell*, 5(7), 1111–1125. <https://doi.org/10.1128/EC.00026-06>
- Dehshibi, M. M., Chiolerio, A., Nikolaidou, A., Mayne, R., Gandia, A., Ashtari-Majlan, M., & Adamatzky, A. (2021). Stimulating Fungi *Pleurotus ostreatus* with Hydrocortisone. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(8), 3718–3726. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00752>
- Dunlap, J. C., & Loros, J. J. (2017). Making Time: Conservation of Biological Clocks from Fungi to Animals. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 5.3.05. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0039-2016>
- Eamus, D., & Jennings, D. H. (1986). Turgor and fungal growth: Studies on water relations of mycelia of *Serpula lacrimans* and *Phallus impudicus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 86(4), 527–535. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80053-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80053-5)
- Enderle, J., & Bronzino, J. (2012). *Introduction to Biomedical Engineering (Third Edition)*. Academic Press.
- Fensom, D. S. (1963). THE BIOELECTRIC POTENTIALS OF PLANTS AND THEIR FUNCTIONAL SIGNIFICANCE: V. SOME DAILY AND SEASONAL CHANGES IN THE ELECTRICAL POTENTIAL AND RESISTANCE OF LIVING TREES. *Canadian Journal of Botany*, 41(6), 831–851. <https://doi.org/10.1139/b63-068>

- Giovannetti, M., Azzolini, D., & Citernesi, A. S. (1999). Anastomosis Formation and Nuclear and Protoplasmic Exchange in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5571–5575. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.12.5571-5575.1999>
- Gontis, V., Kaulakys, B., Alaburda, M., & Ruseckas, J. (2004). Evolution of Complex Systems and 1/f Noise: From Physics to Financial Markets. *Solid State Phenomena*, 97–98, 65–70. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.97-98.65>
- Gow, N. A. R., & Morris, B. M. (1995). The electric fungus. *Botanical Journal of Scotland*, 47(2), 263–277. <https://doi.org/10.1080/03746609508684833>
- Harris, S. D. (2008). Branching of fungal hyphae: Regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, 100(6), 823–832. <https://doi.org/10.3852/08-177>
- Heaton, L. L. M., López, E., Maini, P. K., Fricker, M. D., & Jones, N. S. (2010). Growth-induced mass flows in fungal networks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1698), 3265–3274. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0735>
- Herman, K. C., & Bleichrodt, R. (2021). Go with the flow: Mechanisms driving water transport during vegetative growth and fruiting. *Fungal Biology Reviews*, S1749461321000464. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.10.002>
- Hoeksma, J., Misset, T., Wever, C., Kemmink, J., Kruijtzter, J., Versluis, K., Liskamp, R. M. J., Boons, G. J., Heck, A. J. R., Boekhout, T., & den Hertog, J. (2019). A new perspective on fungal metabolites: Identification of bioactive compounds from fungi using zebrafish embryogenesis as read-out. *Scientific Reports*, 9(1), 17546. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54127-9>
- Kalberer, P. P. (1985). Influence of the depth of the casing layer on the water extraction from casing soil and substrate by the sporophores, on the yield and on the dry matter content of the fruit bodies of the first three flushes of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Scientia Horticulturae*, 27(1–2), 33–43. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(85\)90052-4](https://doi.org/10.1016/0304-4238(85)90052-4)
- Kang, X., Kirui, A., Muszyński, A., Widanage, M. C. D., Chen, A., Azadi, P., Wang, P., Mentink-Vigier, F., & Wang, T. (2018). Molecular architecture of fungal cell walls

- revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*, 9(1), 2747. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05199-0>
- Kobayashi, M., & Musha, T. (1982). 1/f Fluctuation of Heartbeat Period. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, BME-29(6), 456–457. <https://doi.org/10.1109/TBME.1982.324972>
- Lew, R. R. (2005). Mass flow and pressure-driven hyphal extension in *Neurospora crassa*. *Microbiology*, 151(8), 2685–2692. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27947-0>
- Lew, R. R. (2007). Ionic currents and ion fluxes in *Neurospora crassa* hyphae. *Journal of Experimental Botany*, 58(12), 3475–3481. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm204>
- Lew, R. R. (2011). How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 9(7), 509–518. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2591>
- Lin, E. C., & Cantiello, H. F. (1993). A novel method to study the electrodynamic behavior of actin filaments. Evidence for cable-like properties of actin. *Biophysical Journal*, 65(4), 1371–1378. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81188-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81188-3)
- Luo, Y. (2020). *Thermogel for surface contact plant electrophysiology* [Nanyang Technological University]. <https://doi.org/10.32657/10356/146265>
- Mafla-Endara, P. M., Arellano-Cacedo, C., Aleklett, K., Pucetaite, M., Ohlsson, P., & Hammer, E. C. (2021). Microfluidic chips provide visual access to in situ soil ecology. *Communications Biology*, 4(1), 889. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02379-5>
- Money, N. P. (1990). Measurement of hyphal turgor. *Experimental Mycology*, 14(4), 416–425. [https://doi.org/10.1016/0147-5975\(90\)90064-Z](https://doi.org/10.1016/0147-5975(90)90064-Z)
- Moore, D. (1997). The Growing Fungus. *Mycologist*, 11(3), 140. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(97\)80029-8](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(97)80029-8)
- Moore, R. T. (1978). Taxonomic Significance of Septal Ultrastructure with Particular Reference to the Jelly Fungi. *Mycologia*, 70(5), 1007. <https://doi.org/10.2307/3759134>
- Moore, R. T., & McAlear, J. H. (1962). *Observations on Septa of Ascomycetes and Basidiomycetes*. 49(1), 86–94. <https://doi.org/10.2307/2439393>
- Mousavi, S. A. R., Nguyen, C. T., Farmer, E. E., & Kellenberger, S. (2014). Measuring surface potential changes on leaves. *Nature Protocols*, 9(8), 1997–2004. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.136>

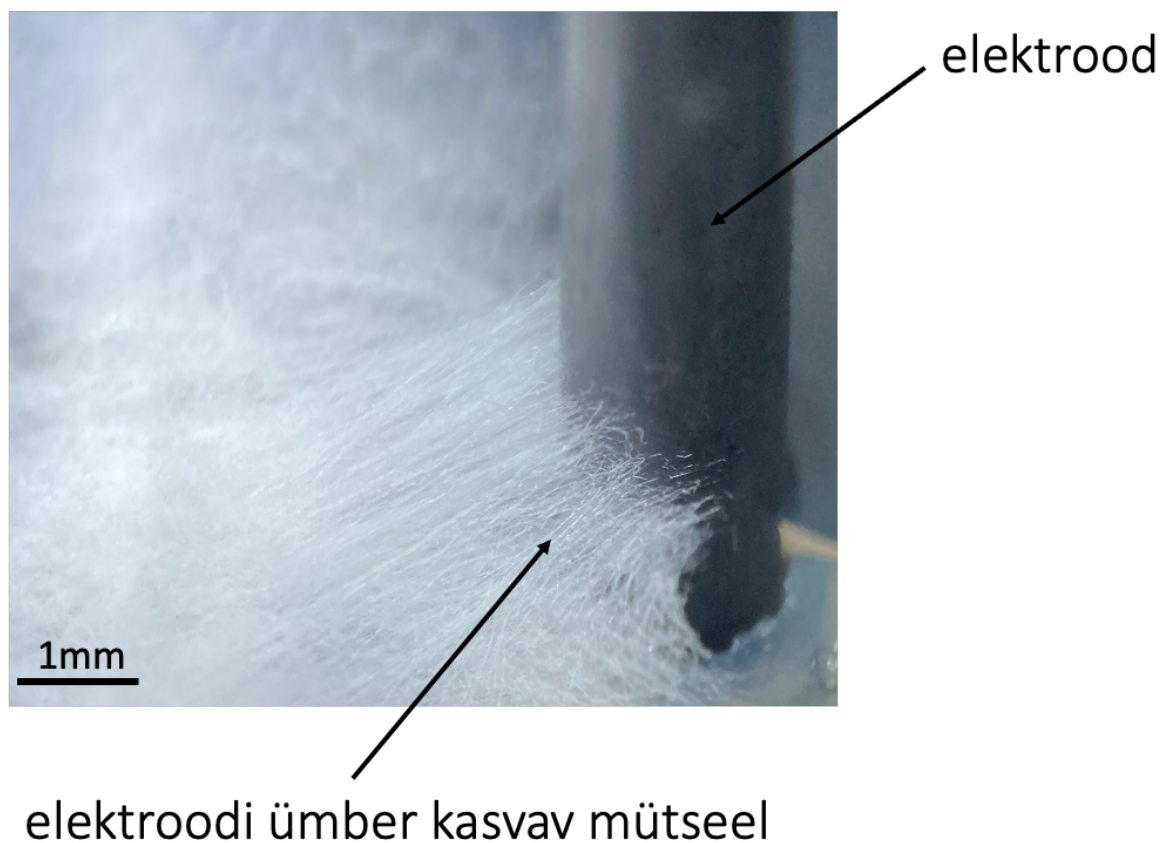
- Nagy, L. G., Varga, T., Csernetics, Á., & Virágh, M. (2020). Fungi took a unique evolutionary route to multicellularity: Seven key challenges for fungal multicellular life. *Fungal Biology Reviews*, *34*(4), 151–169. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.07.002>
- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: Diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, *94*(6), 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- Olsson, S. (1999). Nutrient translocation and electrical signalling in mycelia. N. A. R. Gow, G. D. Robson, & G. M. Gadd (Toim), *The Fungal Colony* (1. tr, lk 25–48). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511549694.003>
- Olsson, S., & Hansson, B. S. (1995). Action potential-like activity found in fungal mycelia is sensitive to stimulation. *Naturwissenschaften*, *82*(1), 30–31. <https://doi.org/10.1007/BF01167867>
- Patrignani, G., & Pellegrini, S. (1986). Fine Structures of the Fungal Septa on Varieties of Basidiomycetes. *Caryologia*, *39*(3–4), 239–250. <https://doi.org/10.1080/00087114.1986.10797786>
- Pennisi, E. (2018). Land plants arose earlier than thought—And may have had a bigger impact on the evolution of animals. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aat3642>
- Pirozynski, K. A., & Malloch, D. W. (1975). The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems*, *6*(3), 153–164. [https://doi.org/10.1016/0303-2647\(75\)90023-4](https://doi.org/10.1016/0303-2647(75)90023-4)
- Rettinger, J., Schwarz, S., & Schwarz, W. (2022). *Electrophysiology: Basics, Modern Approaches and Applications* (2nd tr). Springer.
- Schmieder, S. S., Stanley, C. E., Rzeplia, A., van Swaay, D., Sabotič, J., Nørrelykke, S. F., deMello, A. J., Aebi, M., & Künzler, M. (2019). Bidirectional Propagation of Signals and Nutrients in Fungal Networks via Specialized Hyphae. *Current Biology*, *29*(2), 217–228.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.058>
- Schofield, Z., Meloni, G. N., Tran, P., Zeffass, C., Sena, G., Hayashi, Y., Grant, M., Contera, S. A., Minter, S. D., Kim, M., Prindle, A., Rocha, P., Djamgoz, M. B. A., Pilizota, T., Unwin, P. R., Asally, M., & Soyer, O. S. (2020). Bioelectrical understanding and engineering of cell biology. *Journal of The Royal Society Interface*, *17*(166), 20200013. <https://doi.org/10.1098/rsif.2020.0013>

- Seiler, S., & Plamann, M. (2003). *The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus Neurospora crassa*. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-07-0433>
- Semmlow, J. (2018). The big picture: Bioengineering signals and systems. *Circuits, Signals and Systems for Bioengineers (3 Edition, pp. 1–50)*.
- Slayman, C. L., Scott Long, W., & Gradmann, D. (1976). “Action potentials” in NEUROSPORA CRASSA, a mycelial fungus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 426(4), 732–744. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90138-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90138-3)
- Smith, M. L., Bruhn, J. N., & Anderson, J. B. (1992). The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature*, 356(6368), 428–431. <https://doi.org/10.1038/356428a0>
- Tabak, H. H. & Wm. Bridge Cooke. (1968). The Effects of Gaseous Environments on the Growth and Metabolism of Fungi. *Botanical Review*, 34(2), 126–252. JSTOR.
- Vandamme, L. K. J. (s.a.). *Noise in Materials and Components. Low frequency noise as a diagnostic tool for reliability and quality assessment of electronic devices*. Eindhoven University of Technology, 5600MB Eindhoven, The Netherlands.
- Vandelook, S., Elsacker, E., Van Wylick, A., De Laet, L., & Peeters, E. (2021). Current state and future prospects of pure mycelium materials. *Fungal Biology and Biotechnology*, 8(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40694-021-00128-1>
- Volkov, A. G. (2006). *Plant Electrophysiology: Theory and Methods*. Springer.
- Voss, R. F. (1992). 1/f Noise and Fractals in Economic Time Series. J. L. Encarnação, G. Sakas, H.-O. Peitgen, & G. Englert (Toim), *Fractal Geometry and Computer Graphics* (1k 45–52). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-95678-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-95678-2_3)
- Watkinson, S. C., Boddy, L., & Money, N. P. (2015). *The Fungi (Third Edition)* (Third Edition). Academic Press.
- Wilson, R. A., & Talbot, N. J. (2009). Fungal physiology – a future perspective. *Microbiology*, 155(12), 3810–3815. <https://doi.org/10.1099/mic.0.035436-0>
- Xie, J., Wu, Y., Xing, D., Li, Z., Chen, T., Duan, R., & Zhu, X. (2021). A comparative study on the circadian rhythm of the electrical signals of *Broussonetia papyrifera* and *Morus alba*. *Plant Signaling & Behavior*, 16(11), 1950899. <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1950899>

Yu, Z., & Fischer, R. (2019). Light sensing and responses in fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), 25–36. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0109-x>

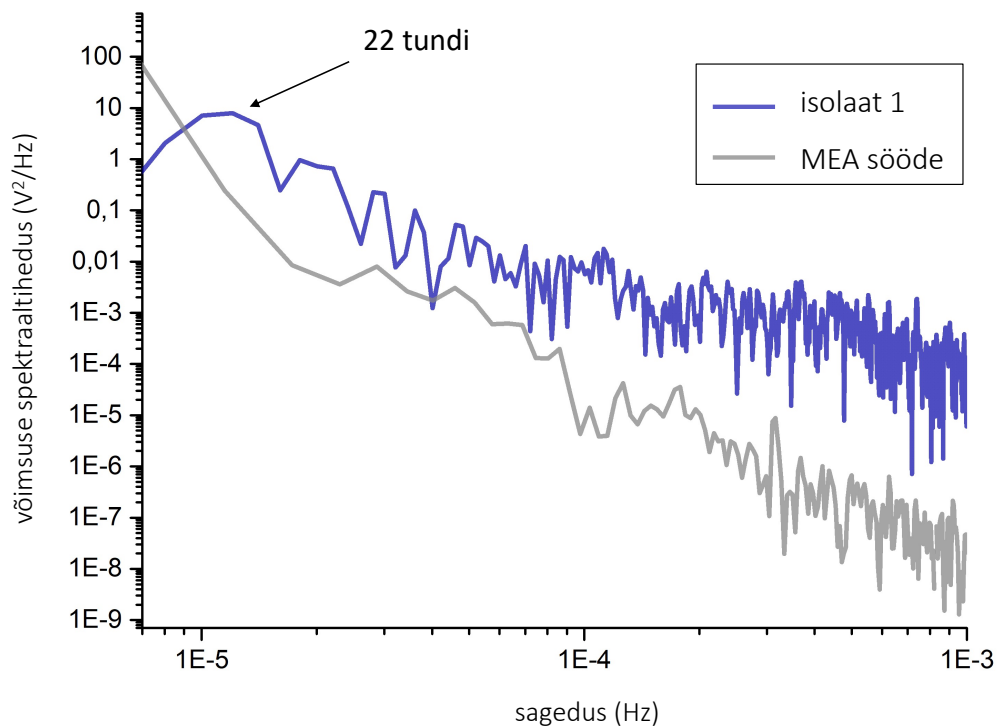
## LISAD

### Lisa 1. Grafiitelektroodi ümber kasvav austerserviku, *Pleurotus ostreatus* mütseel



Joonis 12 Grafiitelektroodi ümber kasvav seeneliigi *Pleurotus ostreatus* mütseel. Elektroodi läbimõõt on 2 mm.

## Lisa 2. Mõõteraku ja MEA söötme võimsuse spektraaltiheduse võrdlus



Joonis 13 Isolaat 1 ja puhta MEA söötme võimsuse spektraaltiheduse võrdlus. Isolaat 1 mõõtmised kestsid 7 päeva, MEA söödelt mõõdeti 2 päeva, mistõttu on MEA söötme graafikul andmepunkte vähem. Puhtal MEA söötme graafikul ei tule välja kasvava mütseeliga mõõterakkudele iseloomulikku madalsageduslikku piiki keskmiselt 20-tunnise perioodiga.

## LIHTLITSENTS

Mina, Hana Geara,

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„Mütseeli elektofüsioloogia mitteinvasiivse mõõtesüsteemi prototüüp”, mille juhendajad on Kadri-Ann Valdur ja Leho Tedersoo,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 26.05.2025 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Hana Geara

26.05.2022