



Die Sprache der Pilze

SIA Arbeit Q1 Schuljahr 22/23

Autoren Paul Maier, Lea Maier, Simon Geisler
Betreuung Frau Dr. Stefanie Hardung

in Kooperation mit der Fakultät für
Umwelt und Natürliche Ressourcen
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

gefördert durch mikro makro mint

abgegeben am 21. Mai 2023

Zusammenfassung

In dieser Arbeit untersuchen wir die elektrische Signalaktivität von Pilzen vor dem Hintergrund einer möglichen Anwendung als „biologische Sensoren“. Obwohl bereits stimulierbare intra- und extrazelluläre elektrische Spiking-Aktivität, nachgewiesen werden konnte (Olsson and Hansson, 1995), fehlt ein umfassendes Verständnis der verschiedenen Einflüsse und ihrer entsprechenden Reaktionen. Wir entwickeln daher eine Methode, um diesbezüglich Untersuchungen durchzuführen. Konkret analysieren wir den Einfluss eines steigenden pH-Werts auf Pleurotus ostreatus und Pleurotus pulmonarius. Unsere Methode erzielt eine möglichst gleichmäßigen Lösung der zu untersuchenden Substanz in Wasser, während Elektroden in mit Pilzsubstrat gefüllten Plastikkörben die elektrische Aktivität aufzeichnen. Unsere Ergebnisse konnten keinen statistisch signifikanten Nachweis erbringen, dass die ausgewählten Pilze auf den steigenden pH-Wert reagieren. Die entwickelte Methode bietet aber einen Ausgangspunkt für weitere Forschung, Verbesserungsmöglichkeiten, sowie Vor- und Nachteile behandeln wir in der Diskussion. In ihr entwickeln wir auch weiterführende Fragestellungen aus unseren Ergebnissen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	3
1 Einleitung	1
2 Material	3
3 Vorversuche	5
3.1 Methode	5
3.1.1 Trockene Testmessungen (11. Januar)	5
3.1.2 Testmessungen im Wasser (11. Januar)	5
3.1.3 Mehrere Bechergläser (18. Januar)	5
3.1.4 Einzelnes Becherglas (25. Januar)	6
3.2 Ergebnisse	6
3.2.1 Zu kleiner Messbereich	6
3.2.2 Korrelation zwischen Reiz und Spannungsausschlag	7
3.2.3 Durchmischung vs. Tauschen der Bechergläser	7
4 Hauptversuchsreihe	10
4.1 Methode	10
4.1.1 Abweichung der Methode der Messung am 7. März	11
4.1.2 Statistische Methoden zur Auswertung	11
4.2 Ergebnisse	12
4.2.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Spannungsverläufe .	12
4.2.2 Einfluss der NaOH-Zugabe	13
4.2.3 Vergleich Pulmonarius Leere Körbe	13
4.2.4 Vergleich Ostreatus Leere Körbe	13
4.2.5 Durchmischung im Becherglas	14
5 Diskussion	20
6 Fazit	22
Literatur	24

Abbildungsverzeichnis

1 Pilzkulturen	3
2 Versuchsaufbau Vorversuche	6

3	Messergebnisse vom 11. Januar	8
4	Messergebnisse vom 18. Januar	8
5	Messergebnisse vom 25. Januar (I)	9
6	Versuchsaufbau Hauptversuchsreihe	10
7	Messergebnisse vom 25. Januar (II)	15
8	Messergebnisse vom 14. Februar	15
9	Einfluss der Zugabe von NaOH-Lösung in den Messergebnissen vom 14. Februar (Ausschnitt, z-Werte)	16
10	Messergebnisse vom 1. März	16
11	Abweichung von \bar{V}_{Wasser} in den Messergebnissen vom 1. März (z- Werte)	17
12	Abweichung von \bar{V}_{Wasser} in den Messergebnissen (minütlicher Durch- schnitt) vom 1. März (z-Werte)	17
13	Messergebnisse vom 7. März	18
14	Abweichung von \bar{V}_{Wasser} in den Messergebnissen vom 7. März (z- Werte)	18
15	Abweichung von \bar{V}_{Wasser} in den Messergebnissen (minütlicher Durch- schnitt) vom 7. März (z-Werte)	19
16	Verteilung Becherglas	19

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht Hauptversuchsreihen	11
---	-----------------------------------------	----

1 Einleitung

Pilze gehören zu den größten, ältesten (Smith et al., 1992) und am weitesten verbreiteten (Watkinson et al., 2001) Lebewesen der Erde. Ihre riesigen Netzwerke aus Myzelium können sich über mehrere Hektar erstrecken (Smith et al., 1992). Pilze sind wie Tiere heterotroph (Watkinson et al., 2001, S. 4), ihre Zellen besitzen allerdings Zellwände (Watkinson et al., 2001, S. 99 f.) und Vakuolen (Watkinson et al., 2001, S. 97). Darüber hinaus weisen Pilze keine Nervenzellen, also „auf Erregungsleitung und Erregungsübertragung spezialisierte Zelle[n]“ (Wikipedia), auf (Watkinson et al., 2001, S. 1-3, S. 85-106). Nichtsdestotrotz, konnte bei ihnen intra- und extrazelluläre elektrische Spiking-Aktivität nachgewiesen werden, die auf Stimulation reagiert (Olsson and Hansson, 1995) (Adamatzky, 2018, S. 2 f.). Ursache und Zweck dieses Verhaltens sind noch nicht abschließend geklärt, man vermutet aber eine zweckmäßige, systematische Kommunikation innerhalb des Pilzes in einer Art „Pilzsprache“ (Adamatzky, 2022, S. 4 ff.). Es gibt bereits Untersuchungen zu den Reaktionen der Pilze auf verschiedene äußere Einflüsse wie etwa mechanische Belastungen (Adamatzky et al., 2020), Licht (Adamatzky et al., 2020) und Chemikalien (Dehshibi et al., 2021). Einige Wissenschaftler haben darüber hinaus die Komplexität der potenziellen „Pilzsprache“ bereits mit der, der europäischen Sprachen verglichen und diese als komplexer identifiziert (Adamatzky, 2022, S. 4-12).

Die oben beschriebene Kombination aus Eigenschaften – ihre weite Verbreitung, Anpassungsfähigkeit und die Möglichkeit einer entschlüsselbaren „Pilzsprache“ – machen Pilze für die Biotechnik sehr interessant. Denkbar ist beispielsweise der Einsatz von Pilzen als „biologische Prozessoren“. Eine erste Studie zu dem Thema versuchte in von Myzel durchsetztem Substrat, einfache boolesche Operatoren umzusetzen (Roberts and Adamatzky, 2022). In dieser wurde der Pilz einer elektrischen Spannung ausgesetzt, welche einen 4 Bit binären String codierte (Roberts and Adamatzky, 2022). Beim Messen der resultierenden Ausgangsspannung fanden die Forscher heraus, dass die Pilze eine Vielzahl an logischen Operationen durchführen können (Roberts and Adamatzky, 2022), woraus sie folgern, dass man mit Pilzen Turing-vollständige Prozessoren konstruieren könnte (Roberts and Adamatzky, 2022). Neben der Verwendung in Bereich des „unconventional computing“, bietet sich aber auch der Einsatz als „biologische Sensoren“ an. Eine entsprechende Studie konnte belegen, dass Pilze elektrisch auf mechanische Reize, sowie auf Stimulation durch Licht reagieren (Adamatzky et al., 2020, S. 6). Darüber hinaus gelang es auf Grundlage der elektrischen Signale Rückschlüsse auf den verursachenden Reiz zu ziehen (Adamatzky et al., 2020, S. 6). Langfristig könnte also eine Entschlüsselung der elektrischen Signale von Pilzen gelingen, die diese dann als Sensoren nutzbar macht. In Ökosystemen, wie dem Wald, könnte man von den Signalen der Pilze auf Umweltbedingungen, wie die Wasserversorgung, die

Bodenzusammensetzung und vieles mehr schließen, ohne die Notwendigkeit viele verschiedene Sensoren installieren und warten zu müssen.

Um diesem Ziel näherzukommen, müssen aber zunächst eine Vielzahl an Einflüssen und die entsprechenden Reaktionen verschiedener Pilze untersucht werden. In dieser Arbeit versuchen wir daher die Methoden für eine solche Untersuchung am Beispiel des Einflusses eines steigenden pH-Werts bei *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus pulmonarius* – zu erarbeiten. Unsere gewählte Methode, die auf dem Lösen der zu untersuchenden Substanz in Wasser beruht, kann dann entsprechend auf andere Einflüsse, wie einen steigenden pH-Wert oder die Kontamination des Wassers durch verschiedene Chemikalien, übertragen werden. Durch die resultierende Vergleichbarkeit wird ermöglicht, Reizen bestimmte „Muster“ an elektrischen Signalen zuzuordnen. Gelingt dies zuverlässig, so kann in einem nächsten Schritt umgekehrt versucht werden, von den elektrischen Signalen auf den Einfluss zu schließen.

Unsere Untersuchungen gliedern sich in eine Vorversuchsreihe und eine Hauptversuchsreihe. In ersterer testen wir verschiedene Ansätze und Arbeitsweisen, deren Auswertung die Grundlage für die eigentliche Hauptversuchsreihe bildet. Unsere Forschung soll, wie bereits beschrieben, die Grundlage für weitere Untersuchungen schaffen, um die „Sprache der Pilze“ zu entschlüsseln und diese dadurch technisch nutzbar zu machen.

2 Material

Für unsere Forschung verwenden wir zwei Pilzarten der Gattung Pleurotus: Pleurotus ostreatus und Pleurotus pulmonarius (siehe Abbildung 1). Die beiden Pilzarten sind sich sehr ähnlich (Stamets, 1993, S. 321). Sie wachsen beide als Parasiten an Laubhölzern und bewohnen boden- und luftfeuchte Wälder [S. 315, 321](Stamets, 1993). Hauptgrund diese Pilze im Speziellen zu verwenden, war neben der schnellen Verfügbarkeit, dass vor allem der Pleurotus ostreatus in vergleichbaren Studien sehr häufig verwendet wurde (Dehshibi et al., 2021) und die Ähnlichkeit zum ebenfalls vielfach untersuchten Pleurotus djamor (Adamatzky, 2018) sehr groß ist (Stamets, 1993, S. 321). Unsere Exemplare entstammen der Stammsammlung der Universität Freiburg und wurden über zwei Monate lang in Erlenmeyerkolben gefüllt mit Malzextrakt in Rüttlern herangezüchtet.

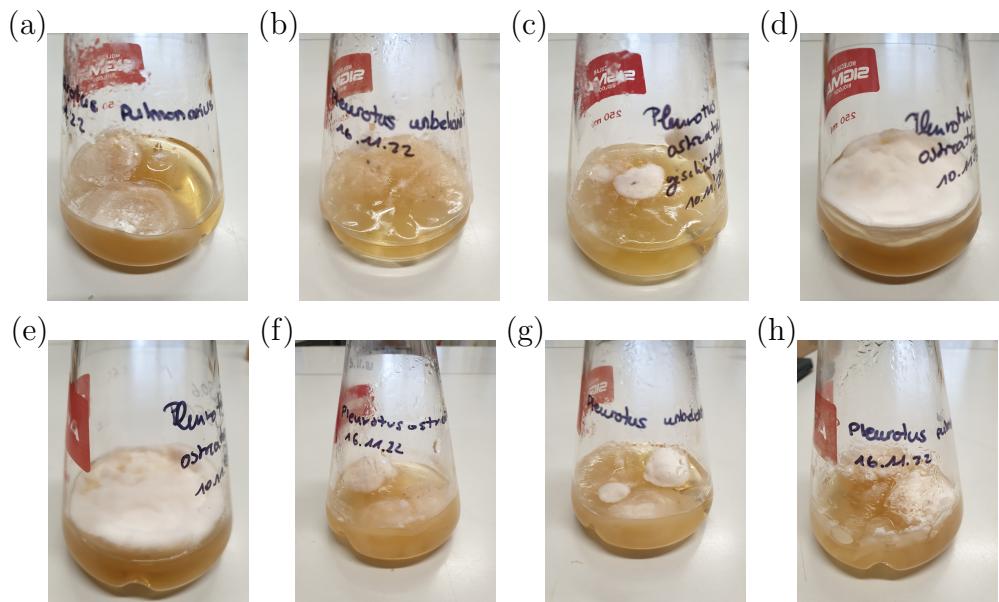


Abbildung 1: Pilzkulturen: a), h) Pleurotus pulmonarius, gerüttelt gewachsen; b), c), f), g) Pleurotus ostreatus, gerüttelt gewachsen; d), e) Pleurotus ostreatus, stehend gewachsen; Quelle: Eigene Darstellung

Für die Messung der Spannung verwenden wir den PicoLog ADC-24, einen 24 Bit USB-Datenlogger mit 8 echt-differenzielle bzw. 16 single-ended Eingängen (Pico Technology), in Kombination mit dem ADC-2x Terminal-Board. Zum Auslesen des Datenloggers verwenden wir die dazugehörige Software PicoLog 6.2.6. Als Elektroden verwenden wir 72 Subdermal Nadelelektroden (13 mm Durchmesser) mit 100-250 cm Kabel, welche über einen etwa 2 cm langen Kupferdraht mit dem Terminal-Board verbunden sind. Weitere relevante Materialien sind im Folgenden

aufgelistet:

- Verschiedene Bechergläser, eines mit einem Fassungsvermögen von 5 l
- Kleine Plastikkäfige für die Handhabung der Pilze
- Metall-Gestänge, Faden, Wasserfestes Klebeband und weiteres zur Befestigung der Pilze

Für die eigentliche Auswertung und Darstellung der Daten in Diagrammen entschieden wir uns R in Kombination mit R Studio zu verwenden. R ist eine Programmiersprache, die für statistische Berechnungen, Datenanalyse und Grafikdesign verwendet wird (R-Project), R-Studio die dazugehörige integrierte Entwicklungsumgebung (Kent State University). Den Code für unsere Auswertung und alle folgenden Diagramme schrieben wir selbst, er findet sich auf GitHub unter folgendem Link: <https://github.com/c0mput3r5c13nt15t/language-of-fungi>.

3 Vorversuche

3.1 Methode

Für die Vorversuche verwendeten wir eine Messrate von einer Messung pro Sekunde und einen Messbereich von ± 39 mV. Ab den ersten Messungen im Wasser mussten wir den Messbereich aber auf ± 313 mV erhöhen, da die gemessenen Spannungen zu groß wurden. Die konkrete Durchführung der einzelnen Versuchsreihen ist im Folgenden kurz beschrieben.

3.1.1 Trockene Testmessungen (11. Januar)

Die ersten sechs Testmessungen erfolgten an einem stehend gewachsenen *Pleurotus ostreatus*. Das Pilzsubstrat entnahmen wir dem Reagenzglas in Form einer Pilzdecke, platzierten es auf einer Petrischale, steckten die Nadelelektroden in verschiedenen Positionen ein und verbanden sie mit den unterschiedlichen Eingängen (siehe Abbildungen 2a). Zunächst stimulierten wir den Pilz mit einem mechanischen Reiz, indem wir mit einem Holzstab jeweils für wenige Sekunden in den Pilz einstachen. Diese ersten Messungen dienten lediglich dazu, die Funktionsweise des Messgerätes sicherzustellen und einen ersten Eindruck für die Reaktion des Pilzes zu bekommen.

3.1.2 Testmessungen im Wasser (11. Januar)

Die ersten Messungen in wässrigem Medium erfolgten an einem im Rüttler gewachsenen *Pleurotus ostreatus*. Diesen legten wir zunächst auf eine Petrischale und füllten einen Teil des Pilzsubstrates in einen Käfig und legten diesen in eine mit Wasser gefüllte Petrischale (siehe Abbildungen 2b). Als Reizquelle verwendeten wir eine 4%-ige NaOH Lösung. Das Myzel des Pilzes war über zwei single-ended Eingängen und GND mit dem Messgerät verbunden.

3.1.3 Mehrere Bechergläser (18. Januar)

Für die weiteren Messungen im Wasser füllten wir 3 Käfige mit wenigen Gramm Pilzsubstrat aus zwei Kolonien und befestigten diese an einer Stange über drei Bechergläsern (siehe Abbildungen 2c). Wir tauchten die Käfige zunächst für einige Minuten in Leitungswasser, anschließend in basische Lösung ($\text{pH}=12,3$), wieder in Leitungswasser, dann in saure Lösung ($\text{pH}=2,4$) und zuletzt wieder in Leitungswasser. Ganz zum Schluss hoben wir die Pilze zum Vergleich noch ein letztes Mal an und senkten sie wieder ab, ohne aber die Bechergläser dazwischen auszutauschen. Die Lösungen waren jeweils gut durchmischt und wiesen einen konstanten pH-Wert auf, den wir im Voraus bestimmten. Zwischen dem ersten und zweiten

und dem zweiten und dritten Tausch des Mediums schalteten wir das Messgerät aus, weshalb die Messergebnisse hier nicht durchgängig sind. Wir maßen jeweils nach dem Eintauchen bei einem der Pilze den pH-Wert.

3.1.4 Einzelnes Becherglas (25. Januar)

Für den letzten Vorversuch hängten wir vier Käfige gefüllt mit Pilzsubstrat zusammen in ein großes, mit Leitungswasser gefülltes, Becherglas (siehe Abbildung 2d). Hierdurch wollen wir vermeiden, die Pilze herausheben zu müssen und stattdessen die Lösung mithilfe eines Magnetrührers durchmischen. Zur pH-Messung führen wir zu Beginn ein pH-Meter ein, welches wir über den Messzeitraum in der Lösung beließen. Wir testen jeweils zwei Käfige, *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus pulmonarius*. Wir tropften zweimal 0,5 ml 4%-ige NaOH-Lösung zu und schalteten während der Messung den Rührer kurzzeitig aus und wieder ein.

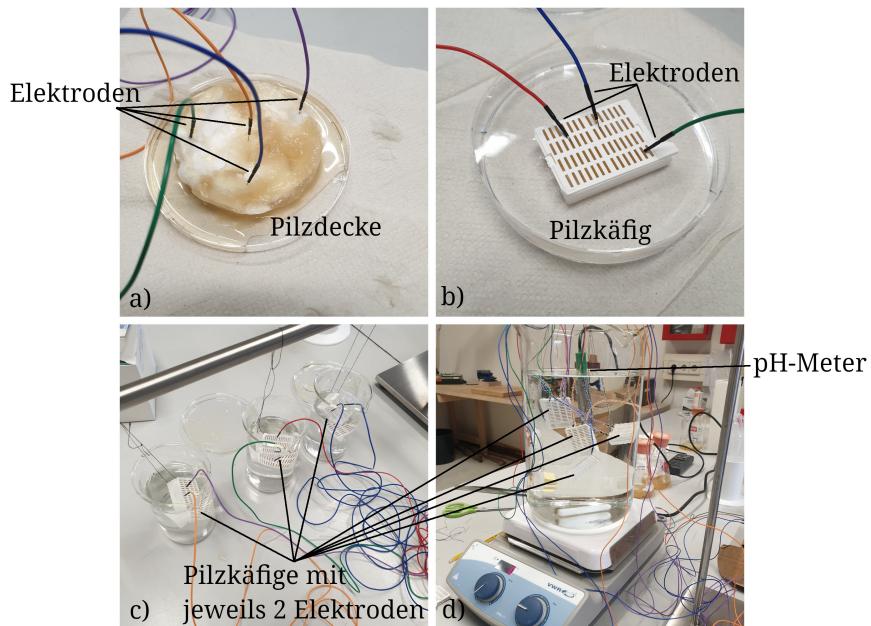


Abbildung 2: Versuchsaufbau Vorversuche: a) Messungen an Pilzdecke, b) Messungen in Käfig im Wasser, c) Messungen über mehrere Bechergläser, d) Messungen in einzelnen Becherglas; Quelle: Eigene Darstellung

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Zu kleiner Messbereich

Der zunächst gewählte Messbereich von ± 39 mV wurde während einigen Messungen zeitweise überschritten, dies führte dazu, dass das Messgerät in dieser Zeit

keine Werte aufzeichnete. Die Messkurve weist daher nach a) keine y-Werte, sondern eine kleine Lücke auf (siehe Abbildung 3). Der nächstgrößere Messbereich von ± 156 mV scheint aber groß genug, wie die Messungen im Spannungsbereich von ± 313 mV (siehe Abbildung 4) zeigen.

3.2.2 Korrelation zwischen Reiz und Spannungsausschlag

Die Ergebnisse (siehe Abbildungen 4 und 5) zeigen eine Korrelation zwischen dem jeweiligen Reiz und einem Spannungsausschlag. Nach dem jeweiligen Reiz ist ein kurzzeitiger starker Abfall bzw. Anstieg der gemessenen Spannung zu beobachten. Im Anschluss kehrt die Spannung in etwa wieder auf ihren Ausgangswert zurück, wobei sie in einigen Fällen danach etwas höher bzw. niedriger liegt (siehe Abbildung 5 Ostreatus 4). Auffällig ist, dass sich die Ausschläge aus Abbildung 5 bei b), e) deutlich von denen bei c) und d) unterscheiden. Während die ersten beiden steile Spikes nach oben darstellen, ist bei c) ein leichter Anstieg und d) eine kleine Spike nach unten erkennbar.

3.2.3 Durchmischung vs. Tauschen der Bechergläser

Vergleicht man die Messergebnisse aus dem Versuch mit mehreren kleinen Bechergläsern (siehe Abbildung 4), mit dem Versuch mit einem einzigen Becherglas und einem Magnetrührer (siehe Abbildung 5) fällt auf, dass die Ausschläge in ersterem viel größer und unregelmäßiger sind. Hier ist zudem wichtig anzumerken, dass sich die Elektroden während des Anhebens und Absenkens teilweise lösten und wieder befestigt werden mussten. Im Versuch mit dem einzelnen Becherglas und dem Magnetrührer traten diese Probleme nicht auf. Hier kann man allerdings beobachten, dass der Magnetrührer ein gewisses „Grundrauschen“ in der Spannungsmessung verursacht. Die pH-Messung wiederum, bzw. das Einführen der pH-Elektrode, zeigt nur in den kleinen Bechergläsern einen Einfluss auf den Spannungsverlauf. Insgesamt sind die externen Einflüsse in der zweiten Methode kleiner und gleichmäßiger.

11. Januar 2023

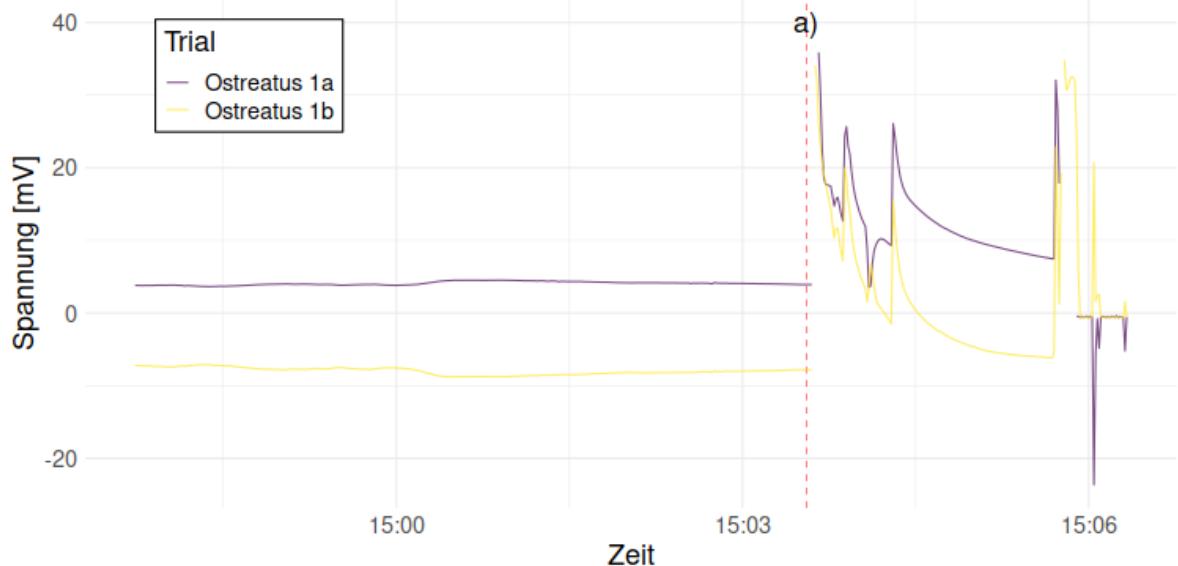


Abbildung 3: Messergebnisse vom 11. Januar; erste Testmessung im Wasser; a) Zugabe 0,5 ml 4 %ige NaOH-Lösung; Quelle: Eigene Darstellung

18. Januar 2023

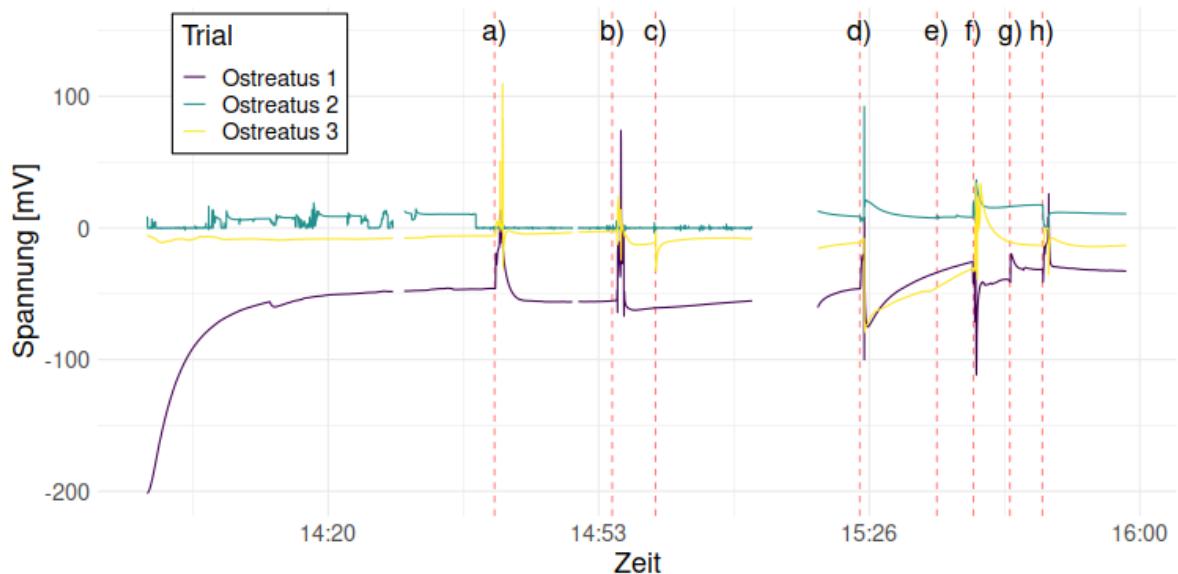


Abbildung 4: Messergebnisse vom 18. Januar; a),b),f) Anheben der Pilze und Absenken in neues Medium; h) Anheben der Pilze und Absenken in selbes Medium; c) pH-Messung Ostreatus 3; e) pH-Messung Ostreatus 2; g) pH-Messung Ostreatus 1; Quelle: Eigene Darstellung

25. Januar 2023

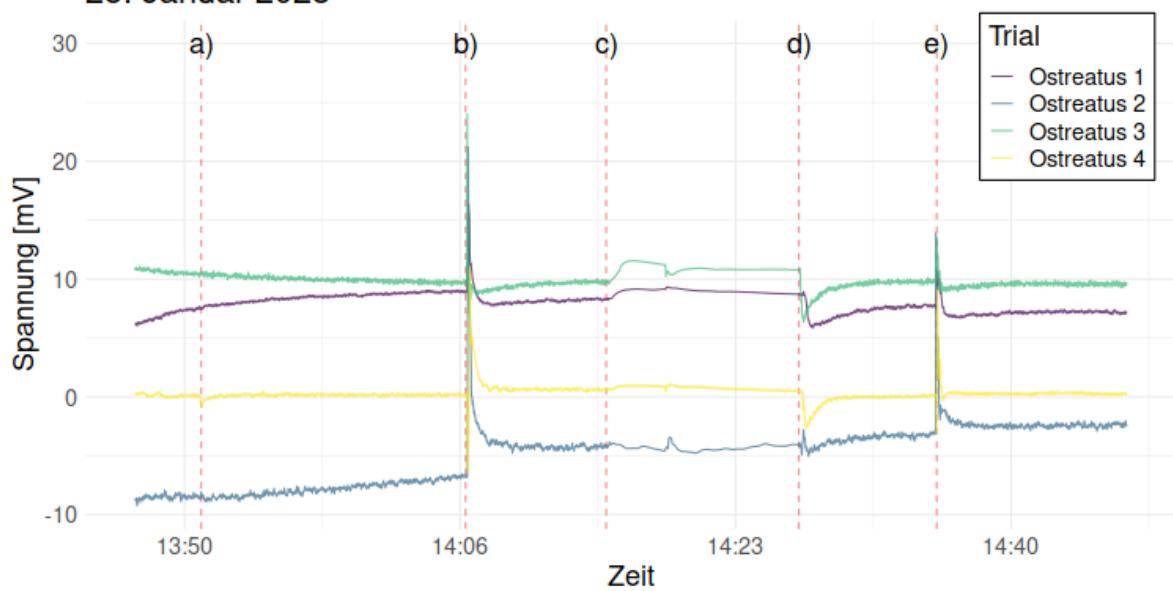


Abbildung 5: Messergebnisse vom 25. Januar (I); a) Einführen pH-Meter; b),e) Zugabe 0,5 ml 4 %ige NaOH-Lösung; c),d) An- bzw. Ausschalten Rührer; Quelle: Eigene Darstellung

4 Hauptversuchsreihe

4.1 Methode

Die Methode der Hauptversuchsreihe orientiert sich an der Methode der letzten Messung der Vorversuche (vgl. 3.14 „Einzelnes Becherglas“, siehe Abbildung 6 a-c). Wir verringerten aber die Zeit zwischen den Messpunkten auf 60 Millisekunden und schränkten den Messbereich auf ± 156 mV ein, um so die Messgenauigkeit zu erhöhen. Zudem verwendeten wir ab sofort ausschließlich die echt-differenziellen Eingänge, da dies ebenfalls die Genauigkeit steigert (Meilhaus Electronic GmbH) und die Limitierung auf 8 gleichzeitige Messungen keine Einschränkung darstellt. Einen Überblick über den jeweiligen Käfiginhalt und die zugegebene Flüssigkeit der verschiedenen Messreihen gibt die Tabelle 1.

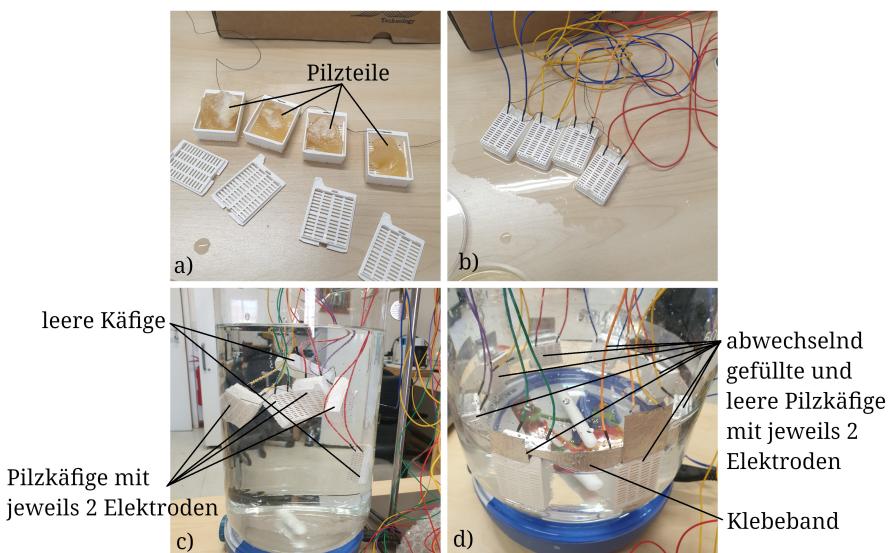


Abbildung 6: Versuchsaufbau Hauptversuchsreihe; a) Abfüllen des Pilzsubstrats in die Käfige, b) Befestigung der Elektroden, c) Messung in 5l-Gefäß, d) Befestigung der Pilze am unteren Gefäßrand; Quelle: Eigene Darstellung

Datum	Käfiginhalt	Zugabe
25.1.23	2 Ostreatus, 2 Pulmonarius	4 x 0,5 ml NaOH
14.2.23	2 Ostreatus, 2 Pulmonarius	paarweise abwechselnd 4 x 0,5 ml, NaOH 4 x 0,5 ml Leitungswasser
1.3.23	4 Pulmonarius, 2 leer	3 x 0,5 ml NaOH
7.3.23	4 Ostreatus, 4 leer	5 x 0,5 ml NaOH

Tabelle 1: Übersicht Hauptversuchsreihen; Quelle: Eigene Darstellung

4.1.1 Abweichung der Methode der Messung am 7. März

Die Methode der Messung am 7. März wichen insofern von den vorherigen Versuchsreihen ab, als dass wir die Käfige am unteren Rand des Gefäßes festklebten (siehe Abbildung 6d). Hierbei wechselten sich vier leere Körbe und vier Körbe mit Pleurotus Ostreatus ab. Das Ziel dieses Aufbaus war, der schlechten Durchmischung und der resultierenden Ungleichverteilung der zugetropften Base entgegenzuwirken. Leider waren die Elektroden von zwei der vier leeren Käfige nicht richtig verbunden, weshalb diese Messfehler aufwiesen und entfernt werden mussten. Im Anschluss an die Messung gaben wir ein paar Tropfen ein prozentiges Methylenblau in das Gefäß, dieses sollte zeigen, wie sich Flüssigkeiten nach der Zugabe in dem Gefäß verteilen.

4.1.2 Statistische Methoden zur Auswertung

Um den Einfluss der NaOH-Zugabe in Gegensatz zur Zugabe von Wasser zu ermitteln, untersuchten wir die Messergebnisse des 14. Februar. Wir beschränkten uns dabei auf Ostreatus und Pulmonarius 1, ab ca. 14:40, weil die Messkurven in den beiden Fällen parallel zur x-Achse verlaufen. Dies ist nötig, da wir den z-Wert über die gesamte Messreihe bilden und andernfalls aufgrund der generellen Entwicklung der Spannungsverläufe die Spikes nicht eindeutig identifizieren könnten. Für deren Erkennung legten wir einen z-Wert von $\pm 1,65$ fest, was einem Konfidenzniveau von 90 % entspricht. Ein Messpunkt, der außerhalb dieses Grenzwertes liegt, ist mit 90-prozentiger Sicherheit kein zufälliger Ausreißer, sondern auf den vorhergegangenen Reiz zurückzuführen.

Des Weiteren untersuchten wir auf Grundlage der Messungen des 1. und 7.

März, inwiefern das in den Messergebnissen zu beobachtete Verhalten tatsächlich auf eine Reaktion des Pilzes zurückzuführen ist. Wir stellten hierfür die Nullhypothese auf, dass der Pilz nicht auf die Basenzugabe reagiert und sich seine Spannung dementsprechend proportional zu der Spannung in den leeren Körben verhält: $H_0 : V_{Pilz} \propto \bar{V}_{Wasser}$. Für die Berechnung, bildete wir den z-Wert über der Differenz zwischen den einzelnen Pilzspannungen und der durchschnittlichen Spannung in den leeren Körben. Als signifikant legte wir wieder einen z-Wert von $\pm 1,65$ fest. Liegt also die Pilzspannung abseits dieses Grenzwertes, haben wir eine 90-prozentige Chance, dass es sich um eine Reaktion des Pilzes handelt. Außerdem verwendeten wir Binning, um die Messungen von spontanen Extremwerten zu bereinigen. Hierbei arbeiten wir mit dem minütlichen Spannungsdurchschnitt der Messungen, statt den einzelnen Datenpunkten.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Spannungsverläufe

Die verschiedenen Messungen der Pilze zeigen selbst bei gleichen Bedingungen und gleichen Einflüssen stark unterschiedliche Ausgangsspannungen und auch Spannungsverläufe. In Abbildung 7 ist beispielsweise zu erkennen, dass die Spannung in Ostreatus 1 und Pulmonarius 2 zu Beginn sinkt. Im gleichen Zeitraum schwankt die gemessene Spannung bei Pulmonarius 1, kehrt aber in etwa wieder auf ihren Ausgangswert zurück. Die Spannung von Ostreatus 2 hingegen steigt sogar. Im weiteren Verlauf sind Ausschläge zu erkennen, die jeweils kurz nach der Zugabe der Base auftreten, sich aber in der Ausrichtung (negative oder positive Abweichung) und Intensität stark unterscheiden. Es lässt sich außerdem feststellen, dass der Ausschlag bei Ostreatus 1 und 2 und Pulmonarius 2 entgegen der Anfangsentwicklung geschieht, wobei der Ausschlag von Pulmonarius 2 bei a) zunächst stark negativ und anschließend stark positiv ist. Abbildung 8 zeigt hingegen deutlich ähnlichere Verläufe, wobei eine starke Differenz zwischen der Ausgangsspannung und der später annähernd konstanten Spannung zu sehen ist. Zudem zeigen Ostreatus 2 und Pulmonarius 2 kaum Reaktion auf die Zugabe der Base bzw. des Wassers. Eine Tendenz, die pilzübergreifend in mehreren Messreihen zu beobachten ist, ist, dass diejenigen Pilze mit der größten Abweichung in ihrer Ausgangsspannung, eine starke Ab- bzw. Zunahme der Spannung aufweisen (siehe Abbildung 8 Ostreatus 2, 10 Pulmonarius 2 und 3, 13 Ostreatus 1 und 2). Ein Einpendeln der Spannung um den Nullpunkt ist allerdings bei keinem der Pilze zu beobachten, stattdessen nähern sich die Verläufe asymptotisch einer Parallelen zu x-Achse an. Zusammenfassend verlaufen die verschiedenen Messkurven sehr unterschiedlich, insbesondere lässt sich kein Rückschluss auf die Pilzart ziehen.

4.2.2 Einfluss der NaOH-Zugabe

Für den Spannungsverlauf des Ostreatus 1 der Messung vom 14. Februar lässt sich erkennen, dass dieser nach a), b) c), e) und f) signifikante Spikes aufweist (siehe Abbildung 9 Ostreatus 1). Auffällig ist, dass die Spikes bei a) und b) um ein Vielfaches ausgeprägter sind, als die folgenden Spikes. Bei Pulmonarius 1 des gleichen Versuchsdurchlaufes hingegen können wir signifikante Spikes unter anderem nach a), c), d), e) und f) finden, wobei hier keine große Diskrepanz in ihrer Ausprägung zu beobachten ist (siehe Abbildung 9 Pulmonarius 1). Für beide Pilze gilt, dass die Spikes ausgeprägter und häufiger, allerdings nicht ausschließlich nach der NaOH-Zugabe auftreten (siehe Abbildung 9). Im Vergleich zu anderen Messungen, beispielsweise der von 1. März (siehe Abbildung 10), sind die Spikes mit einem Unterschied von weniger als 2,5 mV sehr klein, weshalb die Messung insgesamt wenig aussagekräftig ist und keine Bewertung des Einflusses der NaOH-Zugabe gegenüber der Zugabe von Wasser zulässt.

4.2.3 Vergleich Pulmonarius Leere Körbe

Die Messung vom 1. März (siehe Abbildung 10) beinhaltet neben den vier Messungen im Pulmonarius auch zwei leere Körbe, deren gemessene Spannungen relativ nahe beieinander liegen und weitestgehend parallel verlaufen. Lediglich in der Ausrichtung und Intensität der Ausschläge unterscheiden sie sich deutlich. Die vier Spannungskurven der Pilze hingegen verlaufen sehr unterschiedlich zueinander, insgesamt aber auch stark abweichend von der Kurve der leeren Körbe.

Um eine Reaktion des Pilzes auf die Basenzugabe nachzuweisen, werteten wir die Messergebnisse entsprechend der in 4.1.2 beschriebenen Methode aus: Abbildung 11 zeigt hierzu die z-Werte der Spannungsdifferenz zwischen den Pilzen und dem Wasser. Sowohl bei a), b) und c) ist die Abweichung der Pilzspannung von der durchschnittlichen Spannung im Wasser signifikant, die Abweichung der Spannung in den leeren Käfigen ist es aber ebenfalls. Diese Problematik kann auch nicht durch das Binning der Werte gelöst werden (siehe Abbildung 12). Eine Widerlegung der Nullhypothese ist auf dieser Basis nicht möglich.

4.2.4 Vergleich Ostreatus Leere Körbe

Die Messung vom 7. März (siehe Abbildung 13) zeigt im Vergleich zur Messung vom 1.3.23 kleinere Ausschläge, für die leeren Körbe, die in der Intensität zudem abnehmen. Der Ausgangs-Unterschied zwischen den beiden ist im Mittel höher. Eine Abweichung zu den vorherigen Messungen stellen die Schwankungen am Anfang und die zwei Ausschläge von einem leeren Korb und Ostreatus 3 zum Ende hin dar. Nichtsdestotrotz lassen sich in allen Messreihen wieder Ausschläge, jeweils kurz nach der Zugabe der Base, feststellen. Mit Ausnahme der Messreihen

des Ostreatus 3 lässt sich zudem in allen Messreihen eine fallende Intensität der Ausschläge beobachten.

Für diese Messreihe untersuchten wir ebenfalls die Signifikanz der Spannungsabweichungen nach der in 4.1.2 beschriebenen Methode. Es lässt sich auch hier feststellen, dass die diese zwischen den leeren Käfigen und $\overline{V_{Wasser}}$ am größten sind. Die Abweichungen liegen insgesamt in einem kleineren Bereich. Die Abweichung von Ostreatus 4 in a) übersteigt die der leeren Körbe sogar. Das Binning der Werte führt aber auch hier nicht zu einem aussagekräftigerem Ergebnis, da die Ausschläge der leeren Körbe weiterhin zu groß sind (siehe Abbildung 15). Die Nullhypothese kann nicht widerlegt werden.

4.2.5 Durchmischung im Becherglas

Direkt nach der Zugabe ist eine tiefblaue „Wolke“ im oberen Drittel des Becherglases erkennbar (siehe Abbildung 16a). Diese wird durch das Rühren in die Mitte des Becherglases und von dort aus Richtung Becherglasboden gesogen (siehe Abbildung 16b). Dort verteilt der Rührfisch das Methylenblau dann gleichmäßig (siehe Abbildung 16b). Das Wasser färbt sich von unten her gleichmäßig blau bis nach oben hin. In der Mitte ist unterdessen noch ein dünner werdender, dunkelblauer Strudel erkennbar (siehe Abbildung 16c). Gegen Ende ist dieser Strudel dünn und beginnt zu flackern, bevor er sich schließlich auflöst (siehe Abbildung 16d). Der gesamte Verteilungsvorgang benötigt weniger als 50 Sekunden.

25. Januar 2023

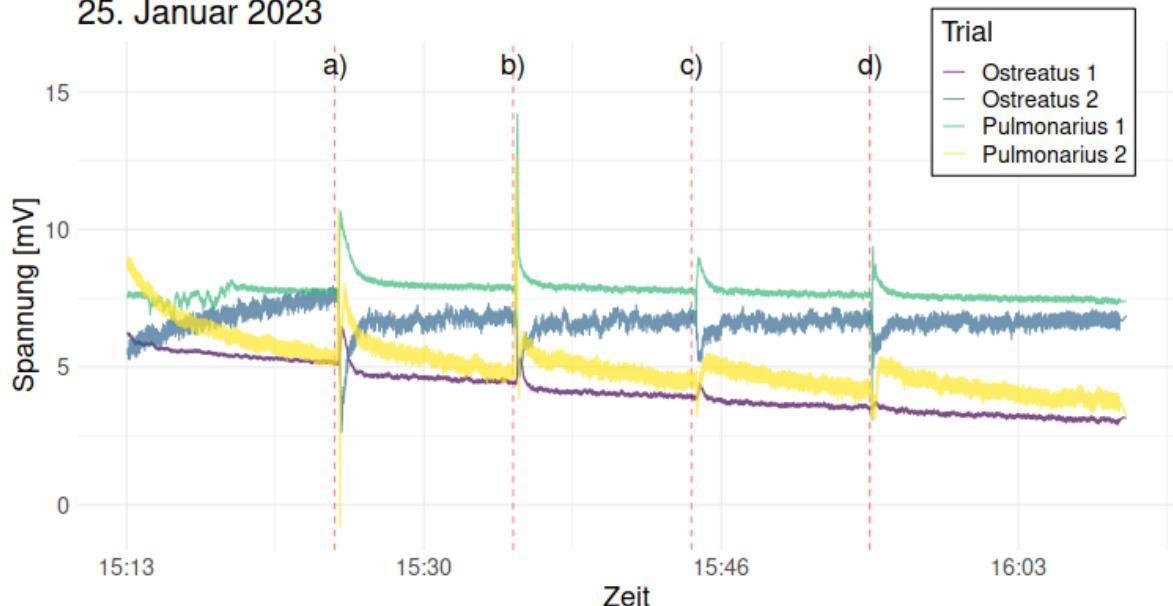


Abbildung 7: Messergebnisse vom 25. Januar (II); a)-d): Zugabe 0,5 ml 4 %ige NaOH-Lösung; Quelle: Eigene Darstellung

14. Februar 2023

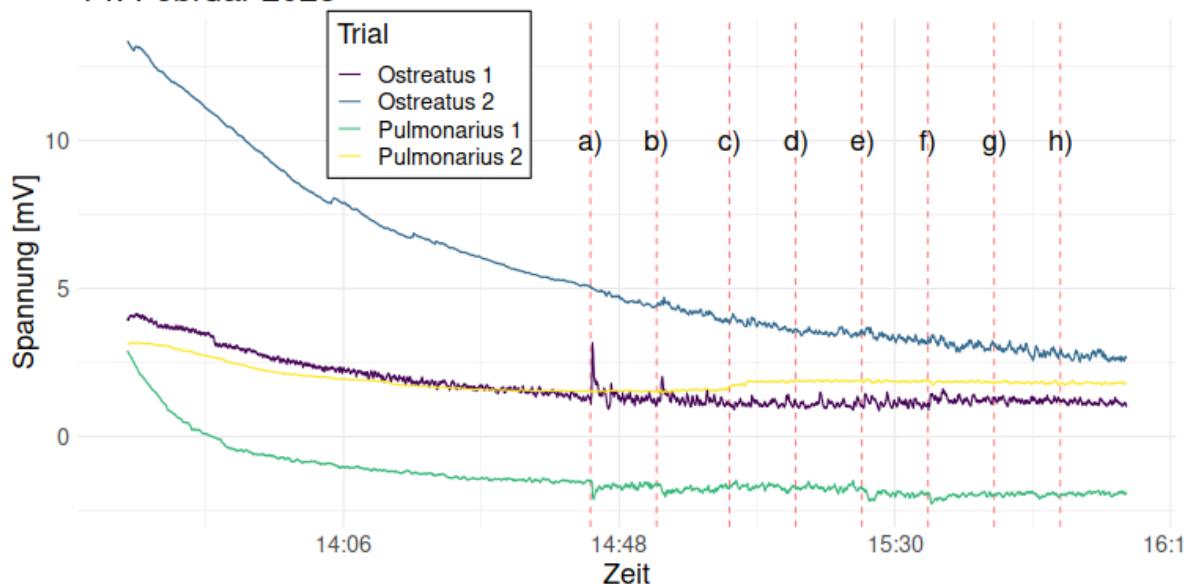


Abbildung 8: Messergebnisse vom 14. Februar; a),b),e),f): Zugabe 0,5 ml 4 %ige NaOH-Lösung; c),d),g),h): Zugabe 0,5 ml Leitungswasser; Quelle: Eigene Darstellung

14. Februar 2023

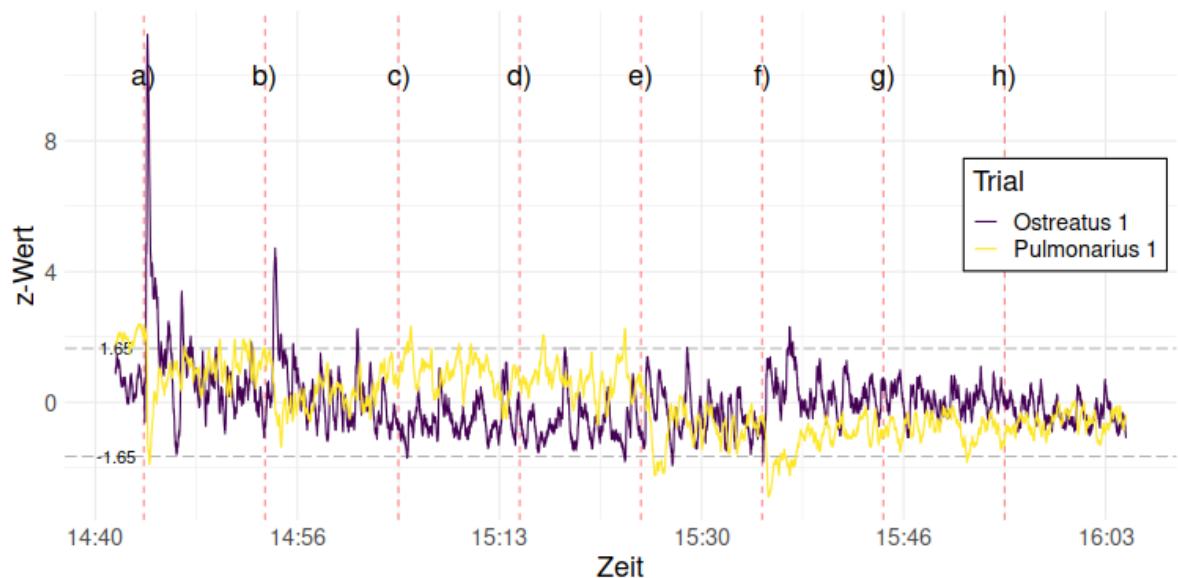


Abbildung 9: Einfluss der Zugabe von NaOH-Lösung in den Messergebnissen vom 14. Februar (Ausschnitt, z-Werte); a),b),e),f): Zugabe 0,5 ml 4 %ige NaOH-Lösung; c),d),g),h): Zugabe 0,5 ml Leitungswasser; Quelle: Eigene Darstellung

1. März 2023

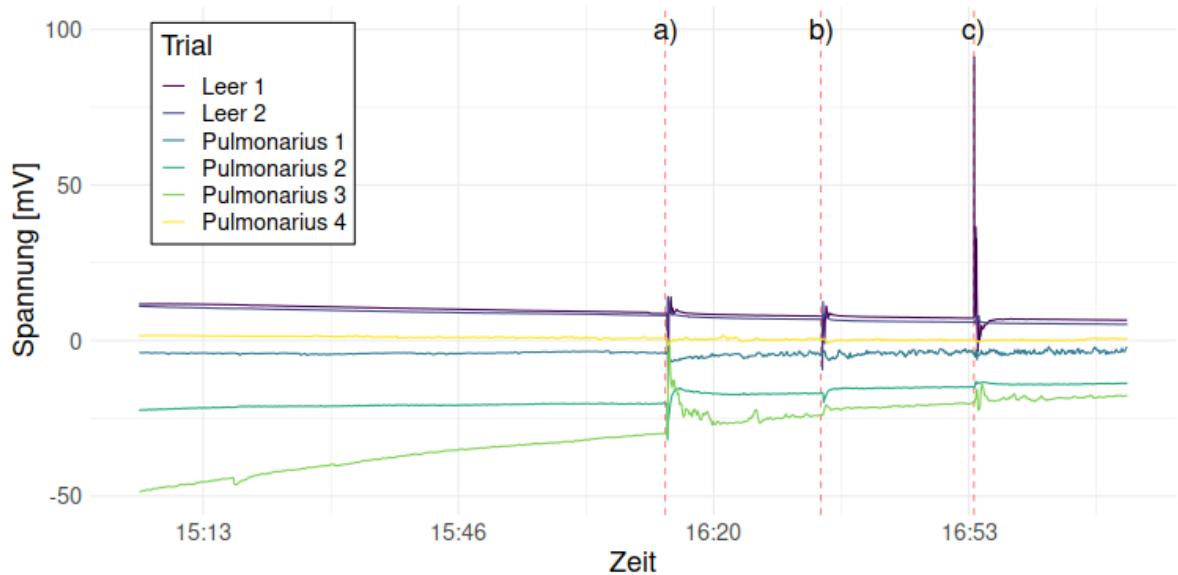


Abbildung 10: Messergebnisse vom 1. März; a)-c): Zugabe 0,5 ml 4 %ige NaOH-Lösung; Quelle: Eigene Darstellung

1. März 2023

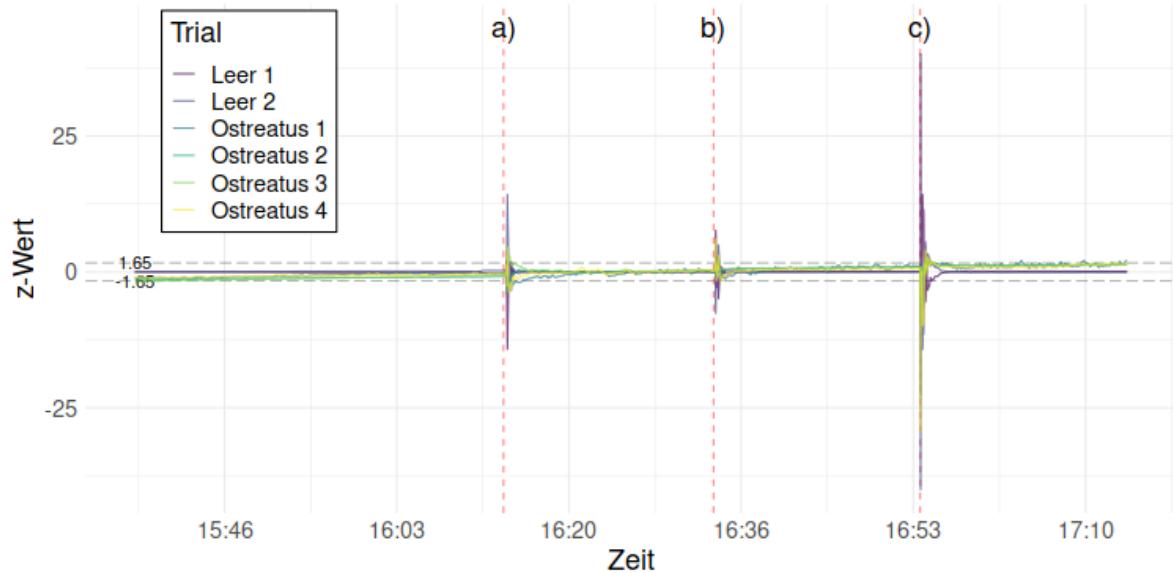


Abbildung 11: Abweichung von $\overline{V_{Wasser}}$ in den Messergebnissen vom 1. März (z-Werte); a)-c): Zugabe 0,5 ml 4 %ige NaOH-Lösung; Quelle: Eigene Darstellung

1. März 2023

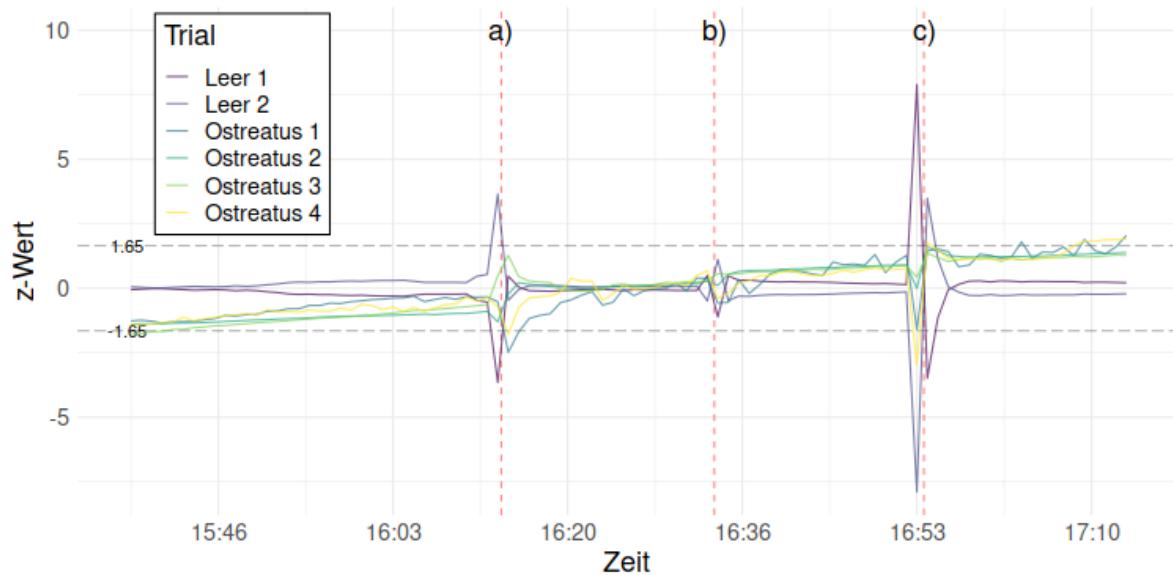


Abbildung 12: Abweichung von $\overline{V_{Wasser}}$ in den Messergebnissen (minütlicher Durchschnitt) vom 1. März (z-Werte); a)-c): Zugabe 0,5 ml 4 %ige NaOH-Lösung; Quelle: Eigene Darstellung

7. März 2023

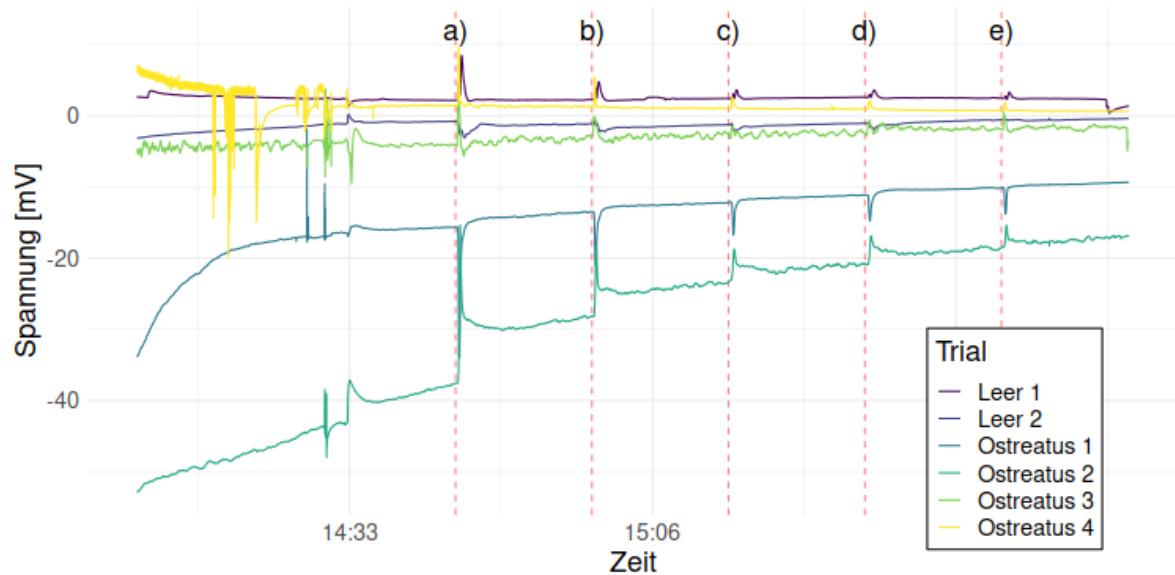


Abbildung 13: Messergebnisse vom 7. März; a)-e): Zugabe 0,5 ml 4 %ige NaOH-Lösung; Quelle: Eigene Darstellung

7. März 2023

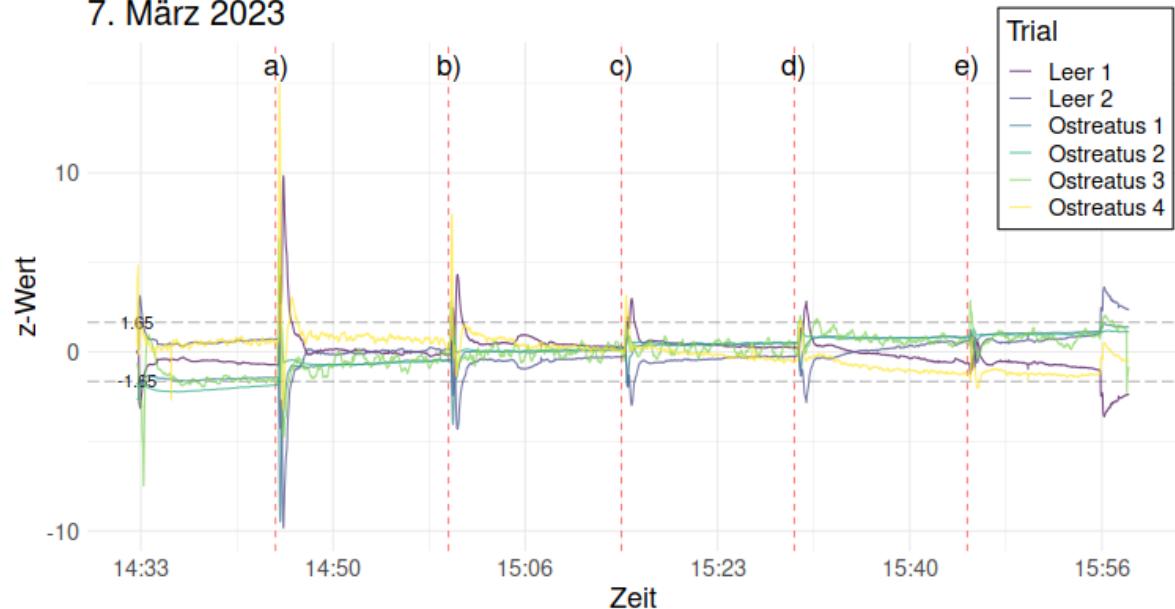


Abbildung 14: Abweichung von $\overline{V_{Wasser}}$ in den Messergebnissen vom 7. März (z-Werte); a)-e): Zugabe 0,5 ml 4 %ige NaOH-Lösung; Quelle: Eigene Darstellung

7. März 2023

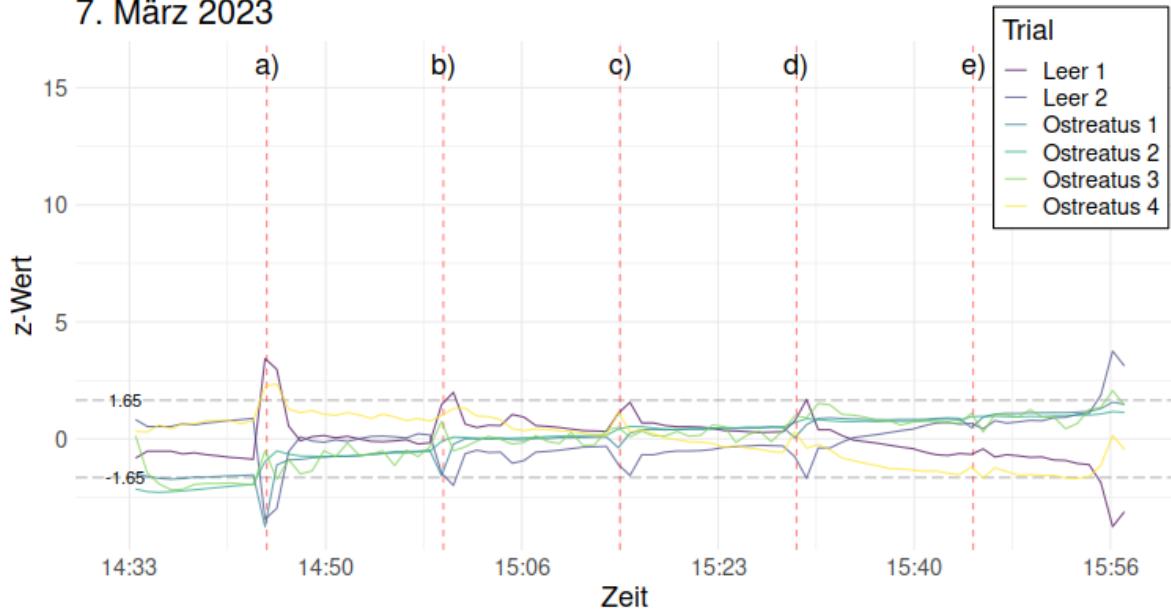


Abbildung 15: Abweichung von $\overline{V_{Wasser}}$ in den Messergebnissen (minütlicher Durchschnitt) vom 7. März (z-Werte); a)-e): Zugabe 0,5 ml 4 %ige NaOH-Lösung; Quelle: Eigene Darstellung

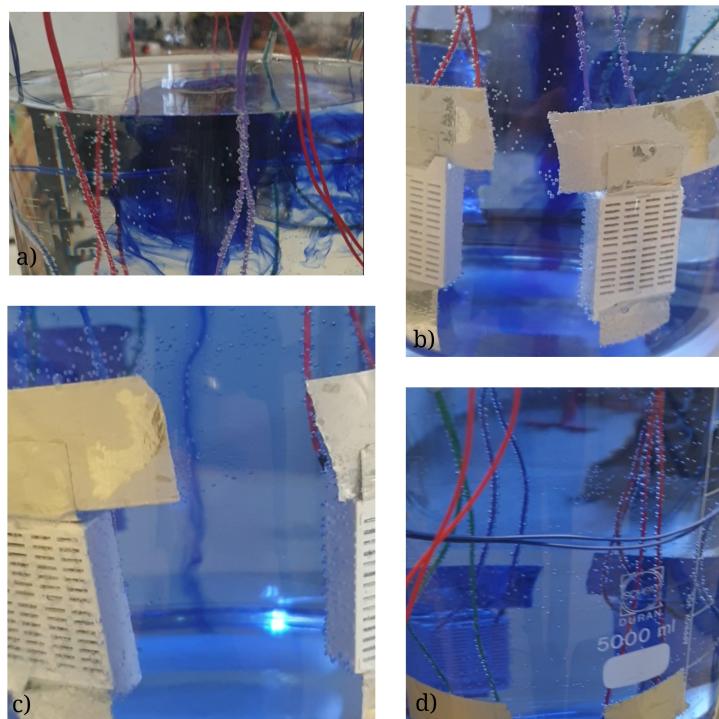


Abbildung 16: Verteilung von 1-prozentigem Methylenblau im Becherglas nach der Messung vom 7. März; Quelle: Eigene Darstellung

5 Diskussion

Ausgehend von den Ergebnissen der beiden Versuchsreihen wollen wir nun in die Diskussion übergehen. Das Ziel dieser Arbeit ist, wie einleitend beschrieben, eine Herangehensweise für die Untersuchung der Reaktionen von Pilzen auf unterschiedliche Reizquellen zu erarbeiten und diese in Bezug auf die Reaktion auf einen steigenden pH-Wert bei *Pleurotus ostreatus* und *pulmonarius* zu testen. Unsere Methode sollte dabei äußere Reize minimieren und gleichzeitig den zu untersuchenden Reiz gleichmäßig auf mehrere Pilze verteilen und so vergleichbare Messergebnisse zu schaffen. Für die konkrete Untersuchung des Einflusses des pH-Werts auf die elektrische Aktivität prüften wir zwei Hypothesen statistisch: Zum einen verglichen wir die Auswirkung der Zugabe von NaOH mit der Zugabe von Wasser, zum anderen stellten wir eine Nullhypothese dazu auf, inwiefern die Messergebnisse auf eine Reaktion des Pilzes zurückzuführen sind. Es gelang uns im Verlauf der Arbeit weder erstere Hypothese eindeutig zu belegen, noch die Nullhypothese zu widerlegen. Die erhobenen Daten und der Prozess der Methodenerarbeitung waren dennoch erkenntnisreich.

Unter anderem stellte sich das Testen im Medium Wasser insofern als zielführend heraus, da es, vor allem in der Versuchsanordnung mit den am Boden des Becher-glasses festgeklebten Pilzen, eine gleichmäßige Verteilung der zugegebenen Substanz gewährleistete, wie die Analyse der Verteilung des Methylenblaus zeigte. Das Rühren mittels eines Rührfisches hatte insofern einen Effekt auf die Messungen, als dass diese dadurch weniger stetig waren. Unklar ist, inwiefern dieser Einfluss auf das tatsächliche Rühren zurückzuführen ist, da bereits das Magnetfeld des Rührers die empfindliche elektrische Messung verfälschen könnte. Insgesamt blieben die äußeren Einflüsse aber, zumindest im Vergleich zum Herausheben und Absenken der Pilze, vernachlässigbar klein.

Eine Herausforderung, die sich aus den gesammelten Messdaten ergab, war eine mangelnde Vergleichbarkeit. Die Messkurven unterschieden sich unter anderem in den Ausgangsspannungen, den Stärken ihrer Ausschläge und dem Bereich in dem sie sich einpegelten. Gleichzeitig weisen die Kurven der jeweiligen auch keine eindeutigen Merkmale auf, durch die man etwa von der Messkurve auf die Pilzart schließen könnte. Grund für letzteres könnte sein, dass die beiden Pilze derselben Gattung angehören und sind sich auch in ihrer Lebensweise nur wenig unterscheiden (Stamets, 1993, S. 321). Auch für erstere Beobachtungen lassen sich begründete Hypothesen aufstellen. Die unterschiedlichen Ausgangsspannungen und die verschiedenen Parallelen zu x-Achse, um die sich die Pilzspannungen einpendeln, könnten darauf hindeuten, dass jeder Pilz ein individuelles Basispotenzial aufweist, welches nicht zwangsläufig bei einem Wert von 0 Volt liegt. Auch menschliche Neuronen weisen ein sogenanntes Ruhepotenzial auf, welches bei ca. -70 mV liegt BiologyOnline (2022). Zudem gibt es natürlich die Möglichkeit, dass

neben den gezielt provozierten Reizen auch andere Reize bestehen. Unter anderem könnten das initiale Ändern der Umgebung, welches der Messung vorausging, oder das ständige Wachstum die Messung verfälschen.

Die angestellten Überlegungen zeigen, dass die Vergleichbarkeit zwischen den Messungen noch verbessert werden muss. Ein entscheidender Faktor in diesem Zusammenhang ist Länge der Messung. Aufgrund äußerer Umstände waren wir gezwungen, unsere Messreihen in Sitzungen von maximal fünf Stunden durchzuführen. Eine kontinuierliche Messung über mehrere Tage, wie sie auch in anderen Arbeiten durchgeführt wurde, (Adamatzky, 2018, S. 2) würde den Pilzen erlauben, sich besser an ihre neue Umgebung zu gewöhnen und dadurch höchstwahrscheinlich auch in gleichmäßigeren Messungen resultieren. Eine weitere Maßnahme zur Steigerung der Vergleichbarkeit könnte sein, die Zeit zwischen den Messungen zu reduzieren. Wir waren, wieder aufgrund äußerer Einflüsse, auf maximal einen Messtag pro Woche limitiert und konnten in den Ferien überhaupt keine Messungen anstellen. Die Pilze haben sich in dieser Zeit verändert, sind gewachsen und haben gegen Ende sogar Fruchtkörper ausgebildet. Für eine einzelne Messung sind die Änderungen wenig ausschlaggebend, da sich die zu untersuchenden Pilze untereinander immer noch ähnlich verhalten, Vergleich zwischen verschiedenen Messungen werden aber erheblich erschwert.

Trotz der schweren Vergleichbarkeit zwischen den Messkurven lassen sich einige Beobachtungen auch in anderen Arbeiten wiederfinden. So ähnelt vor allem die grundlegende Form der Spikes der aus vergleichbaren Studien. Auf einen rapiden Anstieg folgt ein häufig langsameres Absinken der Spannung, oftmals auch unter den Ausgangszustand. Dieses Verhalten wurde ebenfalls bei der Reaktion auf Cortisol (Dehshibi et al., 2021, S. 4) und auch in den Fruchtkörpern des *Pleurotus djamor* beobachtet (Adamatzky, 2018, S. 3). Die Art der Reaktion ist zudem vergleichbar mit der Reaktion auf mechanische Belastung. Diese ist nämlich nicht durchgehend, ab dem Zeitpunkt des Reizes, sondern nur punktuell (Adamatzky et al., 2020, S. 6) bei ihrem Beginn und Ende. Zweiterte Beobachtung ist allerdings insofern noch nicht abschließend zu machen, da wir in unseren Versuchen keine Säure zu tropften, um den pH-Wert wieder auf sein Ausgangsniveau zu bringen, es also in dem Sinne kein Ende des Reizes gab.

Obwohl *Pleurotus ostreatus* und *pulmonarius* aufgrund ihrer schnellen Verfügbarkeit und einfachen Handhabung für unsere Zwecke eine gute Wahl waren, ist es unabdingbar, dass zukünftige Forschungsarbeiten auch andere Pilze untersuchen, um abschätzen zu können, inwiefern die bisherigen Erkenntnisse in dem Bereich übertragbar sind. Dariüber hinaus ist es für die Anwendung als biologische Sensoren notwendig, vor allem diejenigen Pilze zu untersuchen, die über ausgeprägte unterirdische Myzel-Netzwerke eng mit ihrer Umwelt vernetzt sind. Denkbar wären beispielsweise Pilze der Gattung Hallimasch. Diese parasitäre Art bildet riesige

Netzwerke aus Myzel, die sich über mehrere Quadratkilometer erstrecken können (Smith et al., 1992). In diesem Zusammenhang sollte auch die Vergleichbarkeit verschiedener Medien geprüft werden, da weder die von uns gewählten, noch die meisten anderen wissenschaftlich interessanten Pilze natürlicherweise in Wasser vorkommen (Stamets, 1993, S. 315, 321). Derzeit ist es nämlich noch schwer abzuschätzen, inwiefern das gewählte Medium die gemessenen Reaktionen beeinflusst haben könnte.

Neben den bisherigen Überlegungen in Bezug auf die Forscherfrage dieser Arbeit wurden durch einige Ergebnisse auch gänzlich neue Fragestellungen aufgeworfen. Eine Beobachtung war beispielsweise, dass die Intensität der elektrischen Spikes mit zunehmenden Wiederholungen tendenziell abnimmt. Man könnte im diesem Zusammenhang untersuchen, wie lange eine Pause zwischen Reizen sein muss, damit die Reaktion wieder ihre ursprüngliche Stärke erreicht oder ob es durch vermehrtes Reizen sogar zu einer Art „Gewöhnung“ kommen kann, die keine messbare Reaktion mehr verursacht. Neben den Stärken der Ausschläge ist auch deren „Richtung“ interessant. Bei den Pilzen kam es vermehrt dazu, dass derselbe Reiz einen Ausschlag in eine bestimmte, aber zwischen den Pilzen unterschiedliche Richtung provozierte. Denkbar wäre, dass nicht nur die Intensität, Länge und charakteristische „Form“ der Spikes wichtig sind für die Kommunikation, sondern ebenfalls ihre Richtung.

Sobald eine ausreichende Datenlage zu den Reaktionen verschiedener Pilze auf verschiedene Reize vorliegt und abschätzbar ist, welche Parameter eines Ausschlags Informationen codieren, kann man erste Versuche wagen, diese zu entschlüsseln. Künstliche Intelligenz wird hierbei eine wichtige Rolle spielen, da sie große Datenmengen zu den elektrischen Signalen und den auslösenden Reizen schnell und effizient analysieren kann. Durch das Lernen von Mustern und Zusammenhängen in diesen Daten könnte eine KI neue Erkenntnisse über die Kommunikation der Pilze gewinnen und vielleicht sogar eine Übersetzung ermöglichen. Sofern die Qualität und Quantität der Daten ausreichen, könnte eine KI durch Supervised Learning trainiert und anschließend mit Blindproben getestet werden. Hierfür müsste man lediglich die Vorhersagen der KI mit den tatsächlichen Reizen abgleichen. Durch eine erfolgreiche Entschlüsselung ließe sich auch die Hypothese bestätigen, dass es sich um einen zweckmäßigen Informationsaustausch handelt.

6 Fazit

Insgesamt stellt unsere wissenschaftliche Arbeit einen wichtigen ersten Schritt zur Entwicklung einer Methode dar, um die elektrischen Reaktionen der Pilze auf verschiedene Umwelteinflüsse systematisch analysieren zu können. Für unseren gewählten Einfluss, den steigenden pH-Wert, gelang es uns nicht statistisch rele-

vant zu belegen, dass dieser eine Reaktion bei den gewählten Pilzen hervorruft. Nichtsdestotrotz konnten wir neue Beobachtungen im Zusammenhang mit den elektrischen Signalen der Pilze machen und hierdurch weiterführende Fragestellungen entwickeln. Auch unser methodisches Vorgehen bzw. dessen Erarbeitung ist für zukünftige Arbeiten interessant, da es einen Anhaltspunkt bietet, wie an die Problemstellung herangegangen werden kann. Unsere Methode weist zwar Schwächen auf, wir konnten diese aber teilweise schon während der praktischen Arbeit identifizieren und Verbesserungen vornehmen. Außerdem gelang es uns weitere Verbesserungsmöglichkeiten, sowie die Vor- und Nachteile unserer Herangehensweise zu erarbeiten, sodass weitere Arbeiten von diesen Erkenntnissen profitieren können. Zusammenfassend bildet diese Arbeit, mit ihrem Fokus auf Methodik, einen guten Ausgangspunkt für weiterführende Forschung in diesem Bereich.

Literatur

- Andrew Adamatzky. On spiking behaviour of oyster fungi pleurotus djamor. *Scientific Reports*, 8(1):7873, May 2018. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-018-26007-1. URL <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26007-1>.
- Andrew Adamatzky. Language of fungi derived from their electrical spiking activity. *Royal Society Open Science*, 9(4), 2022. doi: 10.1098/rsos.211926.
- Andrew Adamatzky, Antoni Gandia, and Alessandro Chiolerio. Fungal sensing skin. 08 2020. doi: 10.21203/rs.3.rs-113217/v1.
- BiologyOnline, Jun 2022. URL <https://www.biologyonline.com/dictionary/resting-potential>.
- Mohammad Mahdi Dehshibi, Alessandro Chiolerio, Anna Nikolaidou, Richard Mayne, Antoni Gandia, Mona Ashtari-Majlan, and Andrew Adamatzky. Stimulating fungi pleurotus ostreatus with hydrocortisone. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(8):3718–3726, Aug 2021. doi: 10.1021/acsbiomaterials.1c00752. URL <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00752>.
- Kent State University. Statistical & qualitative data analysis software: About r and rstudio. URL <https://libguides.library.kent.edu/statconsulting/r>. (01.03.2023).
- Meilhaus Electronic GmbH. Wie funktioniert eigentlich differenzielle signal-Übertragung? URL <https://www.meilhaus.de/news-aktionen/blog/blog-differenziell/>. (16.01.2023).
- Stefan Olsson and B. Hansson. Action potential-like activity found in fungal mycelia is sensitive to stimulation. *Naturwissenschaften*, 82:30–31, 08 1995. doi: 10.1007/BF01167867.
- Pico Technology. Picolog adc-20/24 hochauflösende usb-datenlogger, bis 16-kanal, 24bit. URL <https://www.meilhaus.de/picolog-adc/9639>. (19.01.2023).
- R-Project. What is r? URL <https://www.r-project.org/about.html>. (01.03.2023).
- Nic Roberts and Andrew Adamatzky. Mining logical circuits in fungi. *Scientific Reports*, 12(1):15930, Sep 2022. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-022-20080-3. URL <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20080-3>.

Myron L. Smith, Johann N. Bruhn, and James B. Anderson. The fungus *armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature*, 356(6368): 428–431, Apr 1992. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/356428a0. URL <https://doi.org/10.1038/356428a0>.

Paul Stamets. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*, page 313–326. Ten Speed Press, 1993.

Sarah C. Watkinson, Michael J. Carlile, and Graham W. Gooday. *The Fungi*. Elsevier, Academic Press, 2001.

Wikipedia. Nervenzelle. URL <https://de.wikipedia.org/wiki/Nervenzelle>. (14.05.2023).