

VILNIAUS UNIVERSITETAS
Gyvybės mokslų centras
Neurobiologijos ir biofizikos katedra

Neurobiofizikos bakalauro studijų programos IV kurso studentas

Ervinas KREIVYS

Bakalauro baigiamasis darbas

Elektromagnetinio lauko poveikio *Cordyceps militaris* tyrimas

Darbo vadovas:
Doc. Dr. V. Kisnierienė

Darbo konsultantas:
Dr. Rokas Buišas

Vilnius 2025

TURINYS

Santrumpos	3
ĮVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. Elektromagnetinis laukas	7
1.1.1. Elektromagnetinė jėga	7
1.1.2. Elektromagnetinio lauko įtaka jonams	7
1.2. Elektromagnetinio lauko įtaka biologinėms sistemoms	9
1.3. Magnetotropizmas	12
1.4. Grybų membraninis potencialas	13
1.5. ML poveikis grybams	16
1.6. <i>Cordyceps militaris</i>	17
1.7 Kordicepinas	18
2. METODIKA	19
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	26
3.1 <i>Cordyceps militaris</i> vertikalaus augimo atsakas į magnetinio lauko stimulą.....	26
3.2 <i>Cordyceps militaris</i> grybienos augimo plokštumoje dinamikos ir morfologijos pokyčiai veikiant magnetiniu lauku.....	29
3.2.1 Grybienos augimo plotas.....	29
3.2.2 Grybienos augimo perimetras	30
3.2.3 Grybienos formos koeficientas	32
3.2.4 Grybienos augimo greitis	34
3.3 Kordicepino koncentracijos spektrofotometriniai matavimai	37
IŠVADOS.....	38
SANTRAUKA.....	39
SUMMARY	40
LITERATŪRA	42

Santrumpos

VP – veikimo potencialas (angl. Action potential)

EML – elektromagnetinis laukas (angl. Electromagnetic field)

GML – Žemės geomagnetinis laukas (angl. Earth's geomagnetic field)

ML – Magnetinis laukas (angl. Magnetic field)

MP – membraninis potencialas (angl. Membrane potential)

IVADAS

Biologinėms sistemoms gyventi žemėje reikalingos specifinės sąlygos. Optimalias sąlygas organizmams vystytis, daugintis bei plėstis sukuria įvairūs fizikiniai parametrai tokie kaip: šviesa – pagrindinis energijos šaltinis fotosintetiniams organizmams, fotoperiodas kuris daro įtaką biologiniams ritmams ir organizmų elgesiui, temperatūra – kuri lemia cheminių reakcijų efektyvumą, biomolekulių stabilumą, slėgis – kuris veikia dujų apykaitą visose karalystėse pvz., hidrostatinis slėgis ypač svarbus vandens organizmuose, o sausumos organizmai evoliucijos metu prisitaikė prie atmosferos slėgio. Šie fizikiniai parametrai varijuoja nuo geografinės padėties, altitudės bei klimato.

Žemės geomagnetinis laukas (GML) ne tik apsaugo atmosferą, bet ir gyvybę Žemėje nuo saulės vėjo ir kosminių spindulių, taip sukurdamas stabilias aplinkos sąlygas organizmams vešėti. Yra manoma jog GML galėjo paveikti gyvybės kilmę, būdamas erdvinės informacijos šaltiniu organizmams nuo vienąlėsčių iki augalų ir gyvūnų. GML neturi aiškos formos ir yra netaisyklingo lauko pavidalo kuris gaubia visą planetą. Nors GML yra pastovus, jis gali kisti pvz., žemės polių apsikeitimas vietomis (180°) žymiai susilpnintų lauką ar net sukeltų trumpalaikį jo išnykimą. Tai gali sąlygoti klimato pokyčius, o ląstelių lygmeniu - padidėjusį mutacijų dažnį, kurį sukelia saulės vėjas ir kosminė radiacija (Erdmann et al., 2021).

Mūsų planetos sukuriamas magnetinis laukas nėra stiprus, vidutiniškai apie $50 \mu\text{T}$ paviršiuje ir varijuoja nuo pusiaujo iki polių nuo 20 iki $68 \mu\text{T}$ ("The Earth's Magnetic Field," 2006). Stiprumas skiriasi nuo vietos ir laiko. Tačiau jis yra pakankamai stiprus, kad darytų įtaką gyviems organizmams dėl poveikio įkrautoms dalelėms, įskaitant jonus ir įvairias polines molekules. Be GML žemės paviršiuje veikia magnetiniai laukai sukurti dirbtinių magnetų – ar tai būtų garsiakalbių magnetai skirti garso bangoms generuoti garsiakalbiuose, ar medicininiai magnetai naudojami magnetiniame rezonanse žmogaus kūno vaizdams gauti ar didelio galingumo magnetai naudojami moksliniuose tyrimuose greitininti dalelėms.

Kadangi GML yra kintamo stiprumo – varijuoja nuo altitudės, vietos bei laiko ir yra sąlyginai silpnas lyginant su magnetais kuriuos naudojame kasdieniame gyvenime, kyla problemų tirti GML ir daryti išvadas apie jo poveikį gyviems organizmams. Magnetai sukurti žmonių yra daug kartų stipresni už GML ir turi taisyklingesnes bei simetriškas formas. Pasitelkiant Faradėjaus induktyvumo dėsnį galima kurti magnetinius dipolius, kurių sąveika gali

pasireikšti tiek traukos, tiek stūmos jėgomis, priklausomai nuo jų orientacijos. Kadangi šie magnetai turi ir simetriškus laukus ir yra daug kartų stipresni už GML galima lengviau tirti jų poveikį gyviems organizmams.

Magnetiniai laukai veikia įvairias polines molekules, tame tarpe ir gyvybiškai svarbius jonus tokius kaip: Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Fe^{2+} ir Fe^{3+} . Taip pat daro didelę įtaką fermentų aktyvumui, hormonų išskyrimui, ląstelių augimui ir dalyjimuisi. Yra atlikta pakankamai daug tyrimų vertinant magnetinio lauko poveikį gyvūnų ir augalų karalystėms, tačiau mažai žinoma apie šį poveikį grybų karalystei. Yra atlikta pavienių tyrimų atskiroms rūšims kur dažniausiai tirtas ML poveikis tik vienam faktoriui pvz., sporų daigumui (Wittekindt et al., 1990), radialiniam augimui (Sulaf H. Tiamooz et al., 2020) ar konidiogenezei (Anaya et al., 2021). Mažai yra žinoma apie magnetinio lauko įtaką ir veikimo mechanizmą grybų ląstelių dauginimuisi, dalyjimuisi, metabolizmui ir kitoms fiziologinėms funkcijoms. Populiarėjant vaistinių grybų auginimui, vartojimui ir plečiantis tyrimų laukui apie grybus kaip karalystę, norima atrasti geresnių trąšų, auginimo sąlygų, kad padidinti derlių, sumažinti auginimo proceso sąnaudas, atrasti naujų ne cheminių būdų stimuliuoti grybų augimą, todėl tikslinga išplėsti tyrimų objektų skalę ir ištirti magnetinio lauko poveikį morfologiniams, fiziologiniams ir cheminiams požymiams *Cordyceps militaris* grybienai ją veikiant 0.5T elektromagnetais.

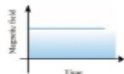
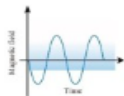
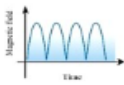
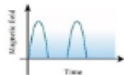
Darbo tikslas – įvertinti magnetinio lauko sukeltus pokyčius *Cordyceps militaris* grybienos morfologijai, fiziologijai ir kordicepino sintezei.

Uždaviniai:

- Sukurti eksperimentinę platformą ML poveikio *C. militaris* grybienai tirti
- Įvertinti organizmo magnetotropizmą veikiant grybo augimą magnetais skirtingomis padėtimis
- Įvertinti grybienos morfolometrinius parametrus kontrolinėmis sąlygomis bei veikiant ML;
- Įvertinti grybo kordicepino koncentraciją kontrolinėmis sąlygomis bei veikiant ML;

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Magnetinis laukas susikuria judant elektros krūviams (pvz., elektros srovė) ir šiuos krūvius veikia jėga, kuri yra statmena tiek krūvių judėjimo kryptimi, tiek paties magnetinio lauko kryptimi (Li et al., 2021). Tačiau magnetinį lauką kontroliuoti yra sunku dėl jo pastovaus magnetinių dipolių kiekio. Dėl šios priežasties galima pasitelkti elektromagnetus, kurių magnetinį lauką galima kontroliuoti keičiant elektros srovės stiprumą. Šie laukai gali būti skirstomi pagal jų stiprumą ir kryptį – Pastovus (angl. Constant) magnetinis/elektromagnetinis laukas, kintantis (angl. Alternating) ML/EML laukas, pulsuojantis (angl. Pulsating) laukas ir impulsinis (angl. Pulsed) laukas. **1.1 pav.** Skirtingomis sąlygomis sukelti ML ir jų grafiniai vaizdavimai.

Magnetic field type	Features	Graphics	Examples
Constant magnetic field	Magnetic field strength and direction are constant		Eternal Magnets
Alternating magnetic field	Magnetic field strength, direction regular change		Industrial frequency magnetic therapy machine
Pulsating magnetic field	The magnetic field strength varies regularly and the direction is constant		Co-polar rotating magnet therapy, magnetic field generated by pulsating DC magnets
Pulsed magnetic field	Intermittent emergence of magnetic fields		Intermittent current flow into the coil of an electromagnet with various shapes of pulsed magnetic fields

1.1 pav. Magnetinių laukų skirstymas pagal jų stiprumą ir kryptį (Li et al., 2021).

1.1. Elektromagnetinis laukas

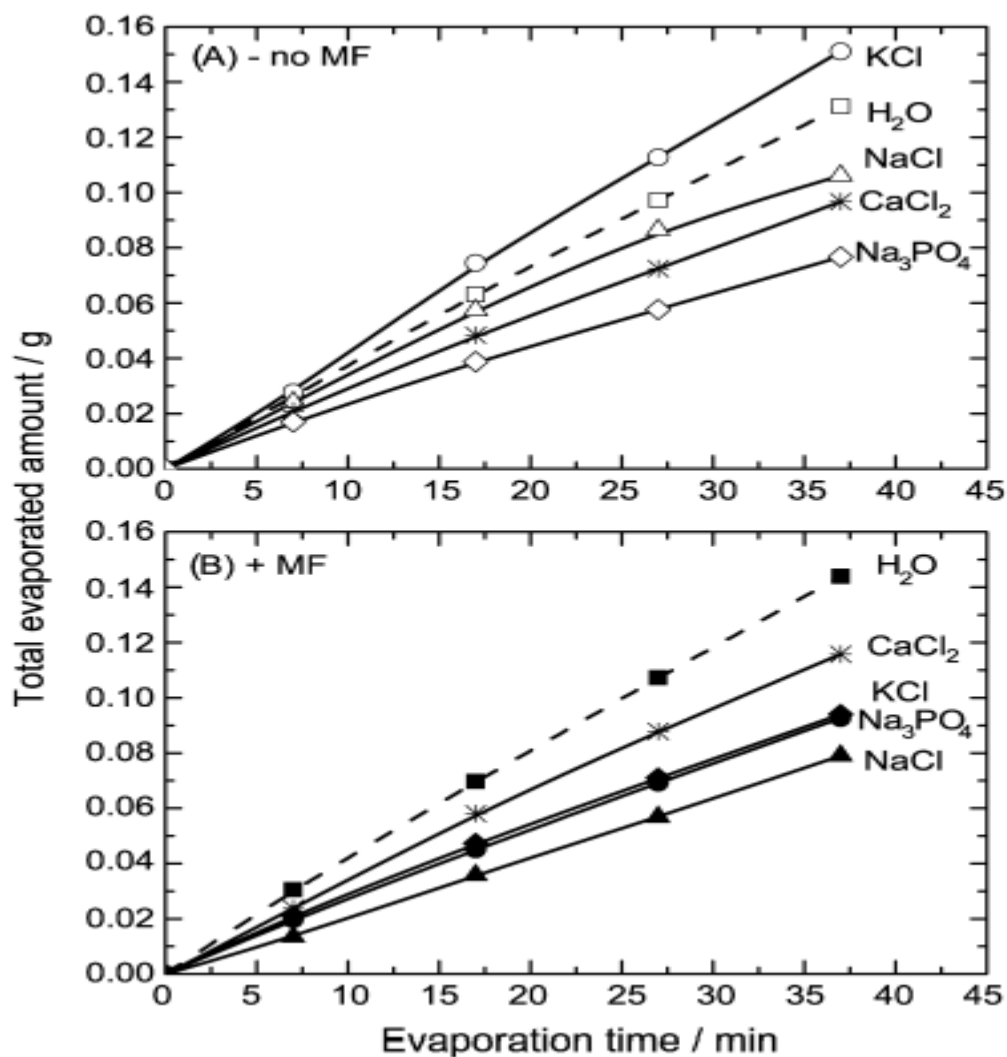
1.1.1. Elektromagnetinė jėga

Elektromagnetinė jėga yra atsakinga už daugelį kasdieniame gyvenime stebimų cheminių ir fizinių reiškinių. Elektrostatinė trauka tarp atomų branduolių ir jų elektronų sulaiko atomus kartu. Elektrinės jėgos taip pat leidžia skirtingiems atomams susijungti į molekules, įskaitant ir makromolekules, tokias kaip baltymai, kurie sudaro gyvybės pagrindą. Tuo tarpu magnetinė sąveika tarp sukimosi momento ir elektronų magnetinių momentų taip pat turi įtakos cheminiam reaktyvumui (Chopdar, 2024). Klasikinė elektrodinamika grindžiama Maksvelo mikroskopinėmis lygtimis ir Lorencio jėgos dėsnio. Maksvelo lygtys sieja elektrinį lauką E ir magnetinę indukciją B su elektros krūvio ρ ir elektros srovės J pasiskirstymu erdvėje ir laike. Esant elektriniams ir magnetiniams laukams E ir B , Lorencio dėsnis nurodo jėgos tankį F , kuri patiria medžiagos, kuriose yra krūviai ρ ir srovės J , tokiu būdu: $F = \rho \times E + J \times B$ (Mansuripur et al., 2013). Tai yra viena iš keturių fundamentaliųjų gamtos jėgų, kuri daro įtaką krūvį turinčioms dalelėms per elektrinius ir magnetinius laukus. Ši jėga yra esminė daugeliui technologijų – elektros varikliai, generatoriai ir kiti elektronikos prietaisai. Taip pat elektromagnetinės bangos tokios kaip radijo, mikro, infraraudonieji spinduliai, matoma šviesa, gama, rentgeno bei ultravioletiniai spinduliai yra plačiai naudojamos komunikacijos, medicinos bei astronomijos sričių technologijose.

1.1.2. Magnetinio lauko įtaka jonams

Pokyčius kuriuos padaro magnetinis laukas tirpalams priklauso nuo daugelio faktorių tokių kaip: lauko stiprumas, lauko kryptis, kaip ilgai magnetiniu lauku buvo veiktas tirpalas, kokia tirpalo sudėtis ir tirpalo takumas (Holysz et al., 2007). Lorencio jėga, judantiems jonams tirpale, yra per silpna, kad darytu kokia nors reikšminga įtaką kristalizacijos procesams įvairioms druskoms (Madsen, 1995). Tačiau atliktas tyrimas, kuriame buvo matuojama ML įtaką vandens laidumui, elektrolitinių tirpalų garavimo greičiams bei jų laidumams rodo, jog ML stiprina arba silpnina (priklausomai nuo tirpalo sudėties) kohezines jėgas tarp vandens molekulių (pvz.,

vandeniliniai ryšiai) (Holysz et al., 2007). Čia silpniausias ML efektas pastebėtas CaCl_2 , o stipriausias NaCl . Tirpaluose Ca^{2+} ir Na^+ katijonai tvarko vandens struktūrą, o Cl^- ją suardo. KCl atveju tiek K^+ , tiek Cl^- jonai suardo vandens struktūrą, o Na_3PO_4 tvarko ją. Iš šių pastebėjimų galima daryti prielaidą kokia bus ML įtaka tirpalam priklausomai nuo to kokie jonai bus tirpale ir kokia jų koncentracija (Holysz et al., 2007) (**1.2. pav.**).



1.2. pav. Laiko funkcija atsižvelgiant į išgaravusio vandens iš ML-paveikto (A) ir ML-nepaveikto (B) gryno vandens bei 10^{-1} M elektrolitinio vandens tirpalų bendrą kiekį (Holysz et al., 2007).

1.2. Magnetinio lauko įtaka biologinėms sistemoms

Magnetinis laukas gali keisti kultūros terpės fizikines ir chemines savybes, darant įtaką terpėje esantiems paramagnetiniams jonams – judėjimui ir sąveikai su vandens molekulėmis. Pavyzdžiui, tyrimai su *Spirulina* (cianobakterija) parodė, kad didėjant ML stiprumui, mažėja kultūros terpės elektrinis laidumas, o nitratų (NO_3^-) kiekis terpėje gali didėti (D. Wang et al., 1998). Sumažėjęs laidumas rodo mažesnę laisvų elektrolitų judėjimą, kas gali lemti didesnę jonų, įskaitant ir nitratų, koncentraciją arčiau ląstelių paviršiaus, taip palengvinant jonų įsisavinimą ir metabolizmą. NO_3^- įsisavinimas yra būtinas procesas ne tik bakterijoms, bet ir augalams, kuriems nitratai yra pagrindinis azoto šaltinis baltymams, nukleorūgštims, chlorofilui ar kitoms gyvybiškai svarbioms molekulėms gaminti. Augaluose nitratai absorbuojami per šaknis, transportuojami ksilema ir kaupiami vakuolėse. Vėliau, citoplazmoje ir chloroplastuose veikianti reduktazės sistema paverčia NO_3^- į amonį. Šios sistemos aktyvumas yra reikalingas veiksnys reguliuojant faktinę nitratų koncentraciją ląstelėse (Bóbics et al., 2016). Būtent čia ML gali turėti netiesioginį poveikį – jeigu magnetinis laukas keičia jonų pasiskirstymą terpėje ar ląstelėje, tai gali veikti substrate esančio NO_3^- prieinamumą reduktazėms. Taip pat nitratų redukcijos procesas yra susijęs su elektronų pernaša ir potencialiai su laisvųjų radikalų dinamika, magnetinio lauko sąveika su šiais procesais galėtų moduluoti fermentų aktyvumą. Nors ML trukdo tam tikrų laisvųjų radikalų susidarymui ir stabilumui, kas yra svarbu redokso fermentinėms reakcijoms, tikslus poveikis nitratų reduktazių sistemai ir bendram azoto metabolizmui reikalauja išsamesnių tyrimų. Grybai, įskaitant ir *Cordyceps militaris*, taip pat naudoja nitratus kaip antrinį azoto šaltinį, pirmenybę teikdami amoniui ar organiniam azotui.

Magnetinis laukas daro reikšmingą įtaką ląstelių mikrostruktūrai ir fiziologijai. Esminis ML poveikis yra membranos lipidų takumo (angl. Fluidity) pokyčiui. Padidėjus membranos takumui ląstelė efektyviau reaguoja į išorinius stresinius dirgiklius ir taip geriau apsaugo savo vidinę terpę. Membranos savybių pokytis tiesiogiai susijęs su padidėjusiu jos pralaidumu, kas ir optimizuoja maistinių medžiagų, būtinų augimui įsisavinimą. Gebėjimas veikti ląstelių membranų pralaidumą ir baltymų receptorių vietas atveria galimybes magnetinius laukus

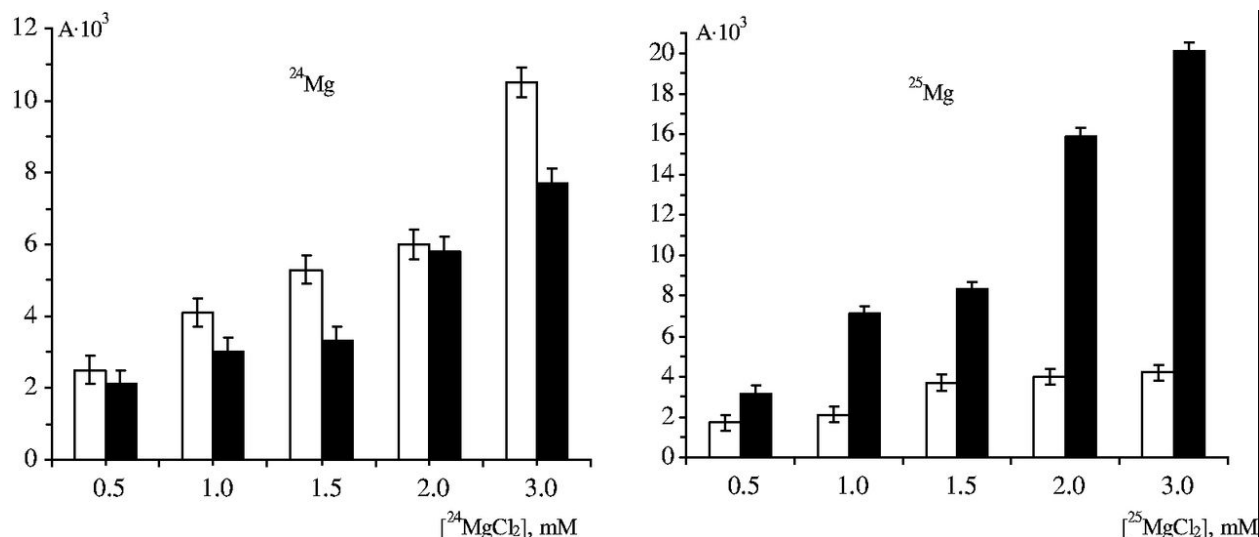
panaudoti tiksliniam molekulių, pvz., antikūnų transportui per ląstelių membranas reguliuoti. Taip pat pastebėta, jog ML indukuoja įkrautų biomolekulių judėjimą ląstelėse, kas tam tikromis sąlygomis lemia didesni ląstelių gyvybingumą. ML poveikis sukelia platų biologinių pokyčių spektrą – moduliuoja biocheminių reakcijų greitį, tarpląstelinę signalizaciją, veikia augimo greitį, molekulių sąveika su membranomis (Barnes, 2005). Šie ML poveikiai ląsteliniam lygmenyje aktualūs tiriant *Cordyceps militaris* grybą. Membranos pralaidumo pokytis galėtų tiesiogiai paveikti gebėjimą įsisavinti maistines medžiagas iš auginimo terpės, o tai rodytu didesni augimo greitį ir didesnę biomasę. Jeigu ML naudojamas kaip stresorius, galima stimuliuoti antrinių metabolitų gamybą, tokių kaip kordicepinas, ergosterolis ar polisacharidai.

Magnetinio lauko poveikis skatina gyvų organizmų augimą ir netiesiogiai veikia mikroorganizmų metabolizmą, keisdamas angliavandenių ir baltymų sintezę bei būtinų amino rūgščių kaupimąsi per elektronų pernašas, kurios sukuria protonų translokaciją (Hsien & Teng, 2005). Kadangi metabolinės reakcijos yra pagrįstos krūvių ir sisteminių jonų skirtumais, elektronų ir jonų judėjimas gali lemti biomolekulių (tokių kaip baltymai, angliavandeniai ir lipidai) koncentracijos pokyčius (Santos et al., 2017). Ląstelių struktūros ir morfologijos pokyčiai, kuriuos sukelia magnetinio lauko poveikis, taip pat gali lemti baltymų skilimą į mažesnius peptidus (Veiga et al., 2020). Magnetinio lauko poveikis gali sustiprinti mikroorganizmų metabolinius kelius, kurie lemia angliavandenių kaupimąsi, taip skatindami augimą (Santos et al., 2017). ML poveikis gali trukdyti fermentų kinetikai ir keisti fermentų aktyvumą, padidindamas biokatalizatorių ir substratų susidūrimo greitį, keisdamas fermentų agregacijos būseną, sukeldamas konformacinius pokyčius fermentuose arba didindamas difuzijos greitį (Lucena et al., 2020).

Magnetiniai laukai sąveikauja su biologinėmis sistemomis, veikdami ląstelių membranių potencialą – tai moduliuoja jonų pernašą per ląstelių membranas. Ypač svarbūs yra kalcio jonai, kurie veikia kaip pagrindiniai signaliniai tarpininkai, pavyzdžiui, T-limfocitų aktyvacijos procesuose. Tyrimai su žmonėmis ir gyvūnais rodo, kad žemo dažnio (50 Hz) ir silpni (0.2-6.6 μ T) kintantys ML gali turėti neigiamą poveikį imuninės sistemos rodikliams – limfocitų, leukocitų ir T-limfocitų paviršinių baltymų kompleksų CD3 ir CD4 sumažėjimą (Bonhomme-Faivre et al., 2003). Žemės geomagnetinis laukas natūraliai svyruoja tokio pat stiprumo diapozone kaip jau minėtieji dirbtiniai ML, kuriuos sukuria transformatorinės ar aukštos įtampos

elektros linijos. Dėl šio nepastovumo GML gali sukelti netikėtus pokyčius ląstelėse. Pavyzdžiui, nustatyta, kad GML svyravimai gali lemti melatonino kiekio sumažėjimą organizme (Weydahl et al., 2000). Melatoninas yra vertinamas dėl galimo teigiamo poveikio asmenims kurie serga išemine širdies liga (Jaruševičius et al., 2018). Įdomu, kad kituose tyrimuose pastebėta koreliacija tarp GML svyravimų ir ūminių miokardo infarkto atvejų padažnėjimo, kas parodo sudėtinga GML sąveiką su biologinėmis sistemomis (Jaruševičius et al., 2018). Nors dauguma tyrimu koncentruojasi į gyvūnų ląsteles, ML poveikis jonų transportui ir membraniniam potencialui yra bendras ląstelinis mechanizmas kuris yra būdingas eukariotinėms grybų ląstelėms. *Cordyceps militaris* augimui ir metabolizmui palaikyti yra svarbi jonų homeostazė, kuria gali sutrikdyti ML svyravimai.

Prieš dešimtmetį padarytas atradimas atskleidė jog magnetinio izotopo efekto įtaka ATP sintezei egzistuoja. Nustatyta, kad ATP sintezės fermentai kurie savo aktyviajame centra turi Mg^{2+} jonus su magnetini branduolį turinčiais ^{25}Mg izotopais, pasižymi 2-3 kartus didesniu aktyvumu nei fermentai turintys nemagnetinius ^{26}Mg ar ^{24}Mg izotopus (Buchachenko et al., 2012). Atsižvelgiant į tai jog ^{25}Mg izotopas turi branduolinį magnetinį momentą ir, kad Mg^{2+} jonai yra pagrindiniai kofaktoriai ATP sintezėje, DNR polimerazių veikloje (taisyme ar replikacijoje), buvo atlikti tyrimai kuriais siekta išsiaiškinti ar Mg branduolinis magnetinis momentas veikia DNR sintezės procesus. Tyrimai atlikti Buchachenko et al., 2013, parodė jog $^{24}Mg^{2+}$ nemagnetinis jonas slopino DNR sintezę, o magnetinis $^{25}Mg^{2+}$ jonas skatino (1.3. pav.).



1.3. pav. Magnetinio lauko poveikis DNR sintezės greičiui kai fermentas pol β turi skirtingus magnio izotopus - $^{24}\text{Mg}^{2+}$ ir $^{25}\text{Mg}^{2+}$. X ašyje magnio chlorido konc. (mM), Y ašyje tričio radioaktyvumas išreikštas count/min/mg DNR. Balti stulpeliai žymi eksperimenta žemės geomagnetinio lauko veikime, juodi stulpeliai esant 160mT magnetiniam laukui (Buchachenko et al., 2012).

1.3. Magnetotropizmas

Tropizmai, arba organizmų kryptingi atsakai į aplinkos dirgiklius, yra fundamentalūs reiškiniai. Pavyzdžiui, fototropizmas apibūdina kryptingą augimą link šviesos šaltinio (teigiamas fototropizmas) arba nuo jo (neigiamas fototropizmas). Šį reiškinį augaluose ir kai kuriuose grybuose, įskaitant vaisiakūnius formuojančius *Cordyceps militaris*, medijuoja specifiniai fotoreceptoriai (pvz., fototropinai, kriptochromai, opsinai), kurie sugeria tam tikro ilgio šviesos bangas ir inicijuoja signalų kaskadas, vedančias prie augimo krypties pokyčių. Kitas gerai žinomas pavyzdys yra gravitotropizmas – augalų gebėjimas orientuoti augimą pagal gravitacijos vektoriu. Augaluose šį procesą reguliuoja struktūros – statolitai, kurių sedimentacija ląstelėse inicijuoja hormonais medijuojamus signalinius kelius, lemiančius diferencijuotą augimą ir organo orientacijos korekciją (Hasenstein, 1999). Tačiau grybai, įskaitant ir *Codyceps militaris*, neturi tokių aiškiai identifikuojamų statolitų ar kiktų tankių, nusėdančių organelių, kaip krakmolo grūdėliai, kurios galėtų veikti kaip gravitacijos jutikliai. Manoma, kad grybų hifai gravitaciją gali jausti per kitokius mechanizmus, pavyzdžiui, protoplastu pagrįstą gravitacinį jutimą. Protoplastas veikia kaip masė, spaudžiančia ar tempiančia su juo susijusias citoskeleto struktūras, ypač aktino mikrofilamentus, kurie gali būti pritvirtinti prie plazminės membranos ar branduolio (Hasenstein, 1999). Šis modelis paaiškina gravitacinį jutimą be sunkiasvorių organelių sedimentacijos. Šis grybų gebėjimas justti fizinius aplinkos signalus naudojant sudėtingus ląstelės mechanizmus kelia klausimą ir apie kitų tropizmų, tokių kaip magnetotropizmas, galimybę. Magnetotropizmas yra organizmo augimo ar judėjimo kryptingas atsakas į magnetinį lauką. Kai kuriuose organizmuose (pvz., magnetotaktinėse bakterijose ar

gyvūnuose) (Blakemore, 1975) yra specializuotų magnetoreceptorių, tokie kaip magnetito kristalai, grybuose, tokios struktūros nėra.

Svarstant magnetotropizmo mechanizmus *Cordyceps militaris* grybuose, reikia atkreipti dėmesį į kitas sąveikas. Radikalų porų mechanizme gali dalyvauti ir fotoreceptoriai kriptochromai – tai baltymai kurie reaguoja į šviesą ir į magnetinius laukus (F. Wang et al., 2017) ir gali paveikti įvairius ląstelinius procesus. Kriptochromų buvimas grybuose atveria galimybę jiems veikti kaip magnetiniams jutikliams. Taip pat ML veikia jonų kanalų aktyvumą ir ląstelės membranos savybes (Barnes, 2005). Lokalizotas ML poveikis galėtų sukurti viduląstelinius gradientus, kurie vestu prie kryptingo augimo.

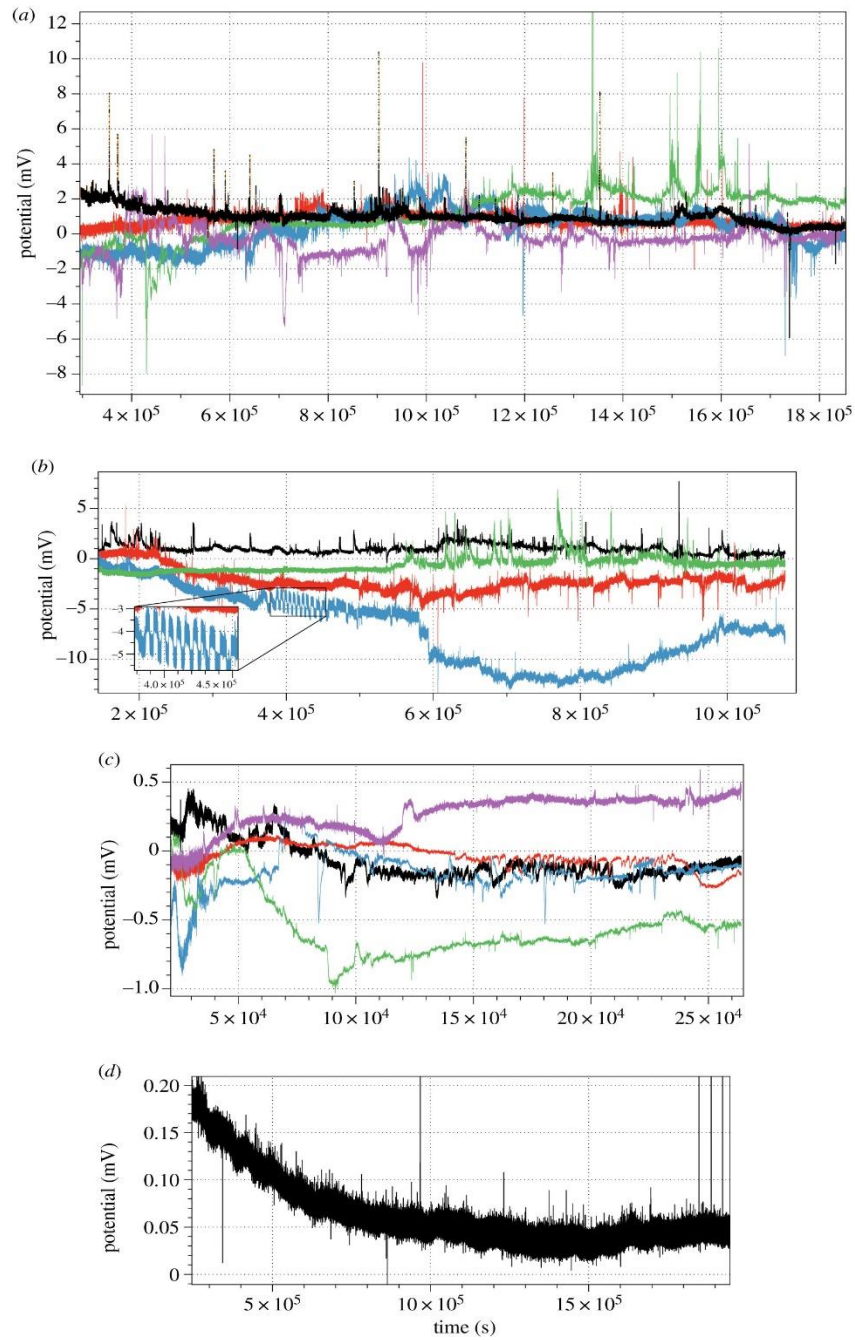
Tyrimai rodo jog magnetinis laukas gali mažinti arba didinti biologinį poveikį daugumai augalų bei grybų ar bakterijų. Magnetotropinis poveikis gali būti ūglių augimui augaluose, vaisiakūnių formavimu grybuose, antiksidaciniam aktyvumui, chlorofilo kiekiui augaluose ir įvairių baltymų kiekiui grybuose. Taip pat gali veikti žydėjimą augaluose ir gyvenimo stadijas tiek augaluose tiek grybuose (Narasimhan & Bindu, 2023). Atlikta nedaug tyrimų bandant suprasti ir paaiškinti pagrindinį magnetinio lauko poveikio mechanizmą ląstelėms. Manoma, kad didžiausia įtaką ML daro laisvųjų radikalų judėjimui kas lemia augimo pokyčius. Kitas mechanizmas gali būti reaktyviojo deguonies ir azoto pokyčiai ląstelėse. Paramagnetiniai jonai tokie kaip Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} dažnai randami grybų ląstelėse ir manoma jog jie atsakingi už magnetotropizmą nes yra išjudinami magnetinio lauko. Įrodyta jog ML veikia tiek ląstelių funkcinius, tiek struktūrinius augalų ir grybų ląstelių procesus keičiant ląstelės membranos takumą bei pralaidumą (Narasimhan & Bindu, 2023).

1.4. Grybų membraninis potencialas

Ląstelių gebėjimas generuoti ir palaikyti elektrinį potencialą per membraną, keičiant tarpmembranines jonų koncentracijas yra būtinas gyvybės procesas. Šie elektriniai signalai yra gyvybiškai svarbūs norint reguliuoti metabolinius, vystimosi ir elgsenos procesus tiek

gyvūnuose, tiek augaluose. Gyvūnų nervinėje sistemoje elektrinis signalizavimas yra informacijos perdavimo, apdorojimo ir atminties pagrindas, tačiau augaluose elektriniai signalai valdo fiziologinius atsakus – reakcija į pažaidas, lapų judėjimus ir ląstelių turgoro pokyčius. Kaikurie moksliniai tyrimai kelia hipotezes apie sudėtingus elektrinio signalizavimo tinklus miškuose, formuojamus per mikorizinius ryšius tarp grybų ir medžių, kas gali priminti primityvią smegenų struktūrą (Blatt et al., 2024).

Grybų karalystėje efektyvi vidinė komunikacija, ypač plačiai išsidėsčiusiuose miceliniuose tinkluose, yra būtina. Pavyzdžiui, *Basidiomycetes* genties grybai, kurie gali sudaryti didžiulius, daug hektarų apimančius ir labai senus organizmus, demonstruoja koordinuotus viso micelio atsakus ieškant maisto medžiagų ir reaguojant į aplinkos stimulus (S. Olsson et al., 1995). Šis atsakas leidžia manyti jog grybai turi greitus signalizavimo mechanizmus tarp nutolusių micelio dalių. Nors informacijos kiekis apie grybų membranos potencialų stiprumą ar trukmę yra ribotas, atlikti tyrimai su tam tikromis rūšimis, pavyzdžiui, *Neurospora crassa*, rodo, kad grybų ląstelės gali generuoti į veikimo potencialą panašius elektrinius signalus. Šie signalai skiriasi nuo gyvūnų veikimo potencialo: trukmė gali būti gerokai ilgesnė, amplitudė keleta kartų viršija ramybės potencialą (**1.4 pav.**) (Slayman et al., 1976). Manoma, kad šie potencialų pokyčiai atsiranda dėl periodiškų membranos pralaidumo pokyčių neorganiniams jonams (H^+ ar Cl^-) arba dėl protonų pompų veiklos pokyčių (Slayman et al., 1976). Tiksliai šių elektrinių signalų funkcija grybuose nėra iki galo aiški, tačiau akivaizdu, kad membranos potencialas ir jo pokyčiai yra neatsiejami nuo pagrindinių ląstelės procesų, tokių kaip jonų transportas, maisto medžiagų įsisavinimas, turgoro palaikymas, augimas ir atsakas į stresorius. Būtent šie procesai yra gryvybiškai svarbūs *C. Militaris* augimui ir bioaktyvių junginių sintezei. Anksčiau minėta, kad ML gali tiesiogiai veikti ląstelių membranas, keičiant jų takumą ir jonų kanalų aktyvumą. Šis poveikis neišvengiamai daro įtaką ir membraniniam potencialui. Net jeigu ML nesukelia „veikimo potencialų“, vietiniai membranos potencialo pasikeitimai, jonų srauto modifikacijos ar porotnų pompos veiklos įtaka gali lemti reikšmingus fiziologinius padarinius pH homeostazei, turgoriniam slėgiui, signalų perdavimui, maisto medžiagų įsisavinimui.



1.4. pav Elektrinio aktyvumo pavyzdžiai (A) *Cordyceps militaris*, (B) *F. Velutipes*, tarpas rodo pliūpsni aukšto dažnio šuolių, (C) *S. Commune* ir (D) *O. Nidiformis*. Spalvos rodo įrašus iš skirtingų kanalų (Adamatzky, 2022).

1.5. Magnetinio lauko poveikis grybams

Susidomėjimas magnetobiologija pastaraisiais dešimtmečiais auga kartu su susidomėjimu grybais kaip karalyste, ieškant būdų moduluoti augimą ir metabolizmą. Tyrimuose naudojami įvairūs ML tipai – pastovūs, kintantys ar pulsuojantys. Vertinami parametrai apima kolonizavimo greitį (Ružič et al., 1997), micelio radialinį augimą (Tiamooz et al., 2020), biomasės kaupimą, konidijų produkciją (Nagy & Fischl, 2004), o kartais ir patogeniškumą (Jaworska et al., 2016) ar ląstelės membranos potencialo svyravimus (Zablotskii et al., 2016). Daugumoje tyrimų naudojami silpni ML, kurių stiprumas yra nuo dešimčių μT iki kelių šimtų mT ir vos keletame tyrimų naudoti stipresni, 0.2T ar 0.5T elektromagnetai. Rezultatų įvairovė varijuoja dėl skirtingų rūšių, ML stiprumo, dažnio ir poveikio trukmės. Pavyzdžiui, *Isaria fumosorosea* linijinis augimas, veikiant stipriu 0.2T magnetiniu lauku, padidėjo net 355%, o *Beauveria bassiana* – 142%, lyginant su kontrolinėmis grupėmis (Jaworska et al., 2016).

Nors tyrimų kurie nagrinėtų ML poveikį *Cordyceps militaris* iki šiol yra nedaug, vertingų išvalgų galima gauti analizuojant rezultatus, gautus darant tyrimus su kitomis grybų rūšimis, ypač tomis, kurios turi panašias biologines savybes ar ekologines nišas. Pavyzdžiui, magnetinio lauko poveikis *Pisolithus tinctorius* lėmė padidėjusį ergosterolio kiekį (Ružič et al., 1997). Ergosterolis yra pagrindinis grybų ląstelių membranų komponentas, kuris reguliuoja membranos laidumą, takumą ir vientisumą. *Cordyceps militaris* ergosterolio pokyčiai galėtų ne tik paveikti ląstelių atsparumą stresui, bet ir būti susiję su kitų steroidinių junginių sinteze bei bendra antrine metabolitų produkcija.

Kitas pavyzdys yra entomopatogeninio grybo *I. fumosorosea* patogeniškumo padidėjimas vabzdžių lervoms (pvz., *Tenebrio molitor*, Didysis milčius) net iki 5 kartų, paveikus grybieną 0.1T ML vieną ir dvi valandas (Jaworska et al., 2016). Kadangi *Cordyceps militaris* yra entomopatogeninis grybas, kurio virulentiškumas yra svarbiausia savybė natūralioje aplinkoje, ML poveikis šiam aspektui galėtų būti itin reikšmingas.

Naujausi tyrimai su kitais vaistiniai grybais taip pat teikia daug žadančių rezultatų dėl ML panaudojimo grybų auginimo procesams optimizuoti. Pavyzdžiui veikiant *Antrodia cinnamomea* grybieną 8mT stiprumo pastoviu ML po 4 valandas kasdien, buvo stebimas ne tik reikšmingas

biomasės prieaugis, bet ir padidėjusi vertingų antrinių metabolitų – triterpenoidų ir polisacharidų. Taip pat ML poveikis sutrumpino bendrą fermentacijos laiką.

Atsižvelgiant į šias analogijas, keliama hipotezė, kad ML veikia ne tik *Cordyceps militaris* augimo greitį ir biomasės išeigą, bet ir svarbių bioaktyvių junginių, tokių kaip kordicepinas, adenzinas, ergosterolis produkciją. Šie junginiai sintetunami kaip atsakas į aplinkos dirgiklius arba yra susiję su grybo vystymosi stadijomis, kurias ML galėtų moduluoti. Išsamūs tyrimai nagrinėjantys ML poveikį *Cordyceps militaris* fiziologijai ir biochemijai yra itin aktualūs bandant atskleisti ML ir grybo sąveikos mechanizmus ir vertinti biotechnologinio pritaikymo galimybes optimizuojant augimą ar skatinant norimų metabolitų gamybą.

1.6. *Cordyceps militaris*

Cordyceps militaris (L.) Fr. Yra entomopatogeninis grybas, priklausantis *Ascomycota* skyriui, *Sordariomycetes* klasei ir *Cordycipitaceae* šeimai. Natūraliomis sąlygomis šis grybas paplitęs įvairiuose pasaulio regionuose, pagrinde Azijoje, kur dažniausiai aptinkamas kalnuotose vietovėse, parazituoiant įvairių drugių ir kitų vabzdžių lervas bei lėliukes (Das et al., 2021). Grybo vaisiakūnis, išaugantis iš parazitauto vabzdžio yra vėzdo formos, ryškiai oranžinės spalvos su šiurkščiu paviršiumi ir išauga iki 8cm aukščio (Davis et al., 2019).

Šis grybas pasižymi gebėjimu sintetinti įvairias biologiškai aktyvias medžiagas tarp kurių ir kordicepinas, adenzinas, ergosterolis, GABA, polisacharidai, cikliniai peptidai (kordiminai) ir daugelis kitų (Yue et al., 2013). Dėl šių junginių *Cordyceps militaris* yra vertinamas vaistinis grybas tradicinėje Rytų medicinoje. Tūkstančius metų naudojami kaip imunitetą stiprinanti, ilgaamžiškumą skatinanti priemonė (Shrestha et al., 2012). Tyrimais įrodyta jog šio grybo ekstraktai turi antibakterinių, antivirusinių, priešgrybinių, antioksidacinių, priešvėžinių ir priešūždegiminių poveikių (Das et al., 2021). Būtent dėl šių savybių grybas ir jo produktai tiriami kaip potencialūs vaistai ar gydymo priemonės.

Istoriškai *Cordyceps* šeimos grybai buvo ypač reti ir brangūs nes randami tik natūraliose augimvietėse aukštai kalnuose. *Cordyceps militaris* pasižymi tuo, kad jį išmokta kultivuoti dirbtinėmis sąlygomis. Iš pat pradžių buvo bandoma užauginti ant lervų, siekiant imituoti natūralias sąlygas (Shrestha et al., 2012). Vėliau atrasta galimybė auginti *C. Militaris* ant įvairių grūdinių substratų ar skystose terpėse. Tai leido standartizuoti ir ženkliai padidinti grybo biomasės ir aktyvių junginių gamybą. Siekiant optimizuoti auginimo sąlygas ir padidinti pageidaujamų junginių koncentraciją ML daromas poveikis potencialiai gali atverti naujas galimybes šio grybo biotechnologijos srityje.

1.7. Kordicepinas

Kordicepinas, chemiškai žinomas kaip 3'-deoksiadenozinas, yra purino nukleozidų analogas, artimas adenzinui, tik skiriasi ribozės žiede hidroksilo grupės neturėjimu ties 3' anglies atomu. Šis unikalus junginys pirmą kart buvo išskirtas ir identifikuotas iš *Cordyceps militaris* grybo kultūros 1950 metais (Cunningham et al., 1950). Dėl struktūrinio panašumo į adenziną, kordicepinas sąveikauja su įvairiais ląsteliniiais procesais. Ankstyvuoju tyrimų etapu kordicepinas buvo plačiai naudojamas kaip biocheminis įrankis tiriant RNR sintezės ir brendimo mechanizmus. Dėl 3'-deoksi grupės stokos, kordicepinas, jungiantis į augančią RNR grandinę veikia kaip terminacijos signalas, stabdant tolimesnę polimerizaciją, ypač uodegos formavimąsi (Fouquet et al., 1975). Vėliau molekulinės biologijos tyrimams vis labiau kryptant į genų klonavimo ir sekoskaitos technologijas, kordicepino kaip RNR tyrimų įrankio naudojimas ir su juo susijusių publikacijų skaičius laikinai sumažėjo.

XX a. pabaigoje susidomėjimas kordicepinu ir jo biologiniu aktyvumu pradėjo vėl augti. Šį atgimimą skatino keletas veiksnių: augo dėmesys tradicinei medicinai ir natūraliems produktams, naujos galimybės biotechnologijoje leido tirti sudėtingus mechanizmus ir vis gausėjo įrodymų apie didelį kordicepino farmakologinį potencialą. Kaip minėta kordicepinas pasižymi biologinio aktyvumo gausa: antivirusinė priemonė, antidiabetiniu ir neuroprotekcinu poveikiu (Radhi et al., 2021). Veikimo mechanizmai yra sudėtingi – apoptozės indukcija

vėžinėse ląstelėse, RNR bei DNR sintezės reguliavimas, signalinių takų moduliacija, poli(A) polimerazės inhibicija. *Cordyceps militaris* išlieka pagrindiniu natūraliu kordicepino šaltiniu, todėl tyrimai stimuliuojant šį grybą ML gali padėti suprasti sąveiką tarp grybo ir magnetinio lauko taip galbūt optimizuojant auginimo sąlygas ar norimų junginių koncentracijos padidėjimą.

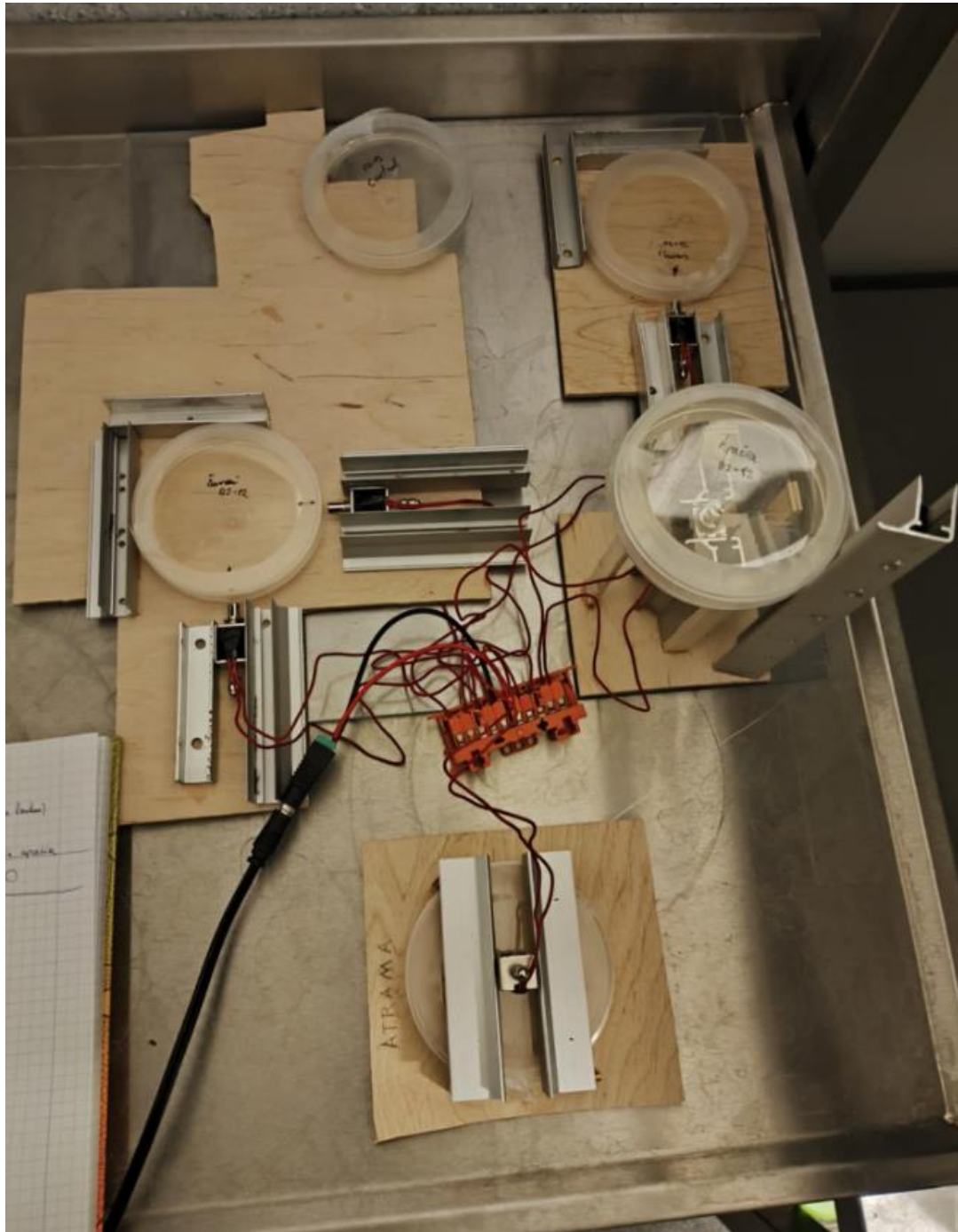
2. METODIKA

Tyrimo objektas: *Cordyceps militaris* (Carl Linnaeus) grybiena. Skysta grybo kultūra auginama LB (Lisogyny broth/ *Luria Bertani*) agaro substrate 9 cm skersmens petri lėkštelėse, kurios laikomos kambario temperatūros ($22.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) sąlygomis 12/12 valandų šviesos/tamsos režimu, kad imituoti natūralias sąlygas. Tyrime naudojami 0.5T elektromagnetai kurie atitraukti nuo lėkštelių 0.5cm atstumu. Grybiena kontrolinėje petri lėkštelėje neveikiama magnetiniu lauku todėl atskiriama nuo elektromagnetų skleidžiamų laukų, kad nepaveiktų augimo proceso.

Tyrimo metodai:

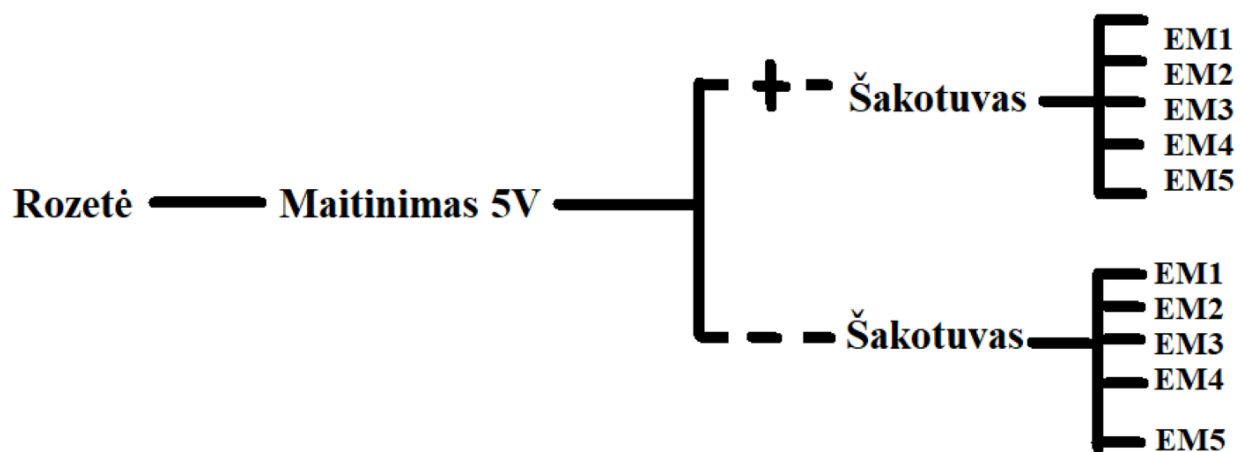
Magnetinio lauko poveikio platformos sukurimas. Prieš tyrimą sukonstruotos keturios skirtingos auginimo platformos, kad būtų galima matuoti iš skirtingų pusių veikiančio magnetinio lauko poveikį augančiai grybieni (2.1 pav.). Platformos kurtos, kad grybą galima būtų veikti ML iš: apačios, viršaus, vieno šono bei dviejų šonų. Taip sukurta sistema leidžia pamatyti grybo radialinio augimo atsaką į magnetinį stimulą ir vektorinį augimą link magneto arba nuo magneto. Kiekvienos platformos pagrindas yra medinis, o rėmai laikantys elektromagnetus pritvirtinti prie aliuminio profilių, kad sugertų ir išsklaidytų elektromagnetų generuojama šilumą. Šalia pastatytas nešiojamas fenas kuris dar labiau vėsina visas lėkšteles bei

aliuminio rėmus.



2.1 pav. Tyrimui naudojama auginimo platforma su keturiomis skirtingomis elektromagnetų pozicijomis: Viršuje kairėje – kontrolė, viršuje dešinėje iš vieno šono veikiama lėkštelė, viduryje iš kairės – dviemimis kryptimis iš šonų veikiama lėkštelė, viduryje iš dešinės lėkštelė veikiama ML iš apačios ir apačioje veikiama ML iš viršaus.

Sistamai sukurti buvo panaudoti penki 0.5T elektromagnetai, prijungti 5V įtampos laidu per šakotuvą, kuris išdalina įtampą į 5 vienodo stiprumo dalis taip silpninant tekančią srovę (**2.2 pav.**). Elektromagnetų jungimas atliktas taip, kad srovė juose tekėtų vienoda kryptimi (pliusas -> minusas). Tai išdėsto magnetinius polius priešingai, todėl yra generuojama traukos jėga. Silpninti srovę yra būtina, nes elektromagnetai gali šilti ir lydyti petri lėkšteles ar daryti šiluminę įtaką augančioms *Cordyceps militaris* grybo kolonijoms. Silpninant srovę silpnėja ir elektromagnetų sukurtas magnetinis laukas, taip pat magnetinis laukas silpnėja eksponentiškai tolstant nuo šaltinio. Todėl buvo išmatuoti realūs ML stipriai tenkantys kiekvienai platformai. Be to, kontrolinėms sąlygoms įvertinti reikalingi magnetinio lauko stiprumo matavimai patalpoje. ML stiprumas patalpoje bei kiekvienos platformos atžvilgiu išmatuotas naudojant PhyPhox programėlę. Telefonuose esantis Holo jutiklis turi nedidelę puslaidininko plokštelę per kurią teka pastovi srovė. Bet koks kitas laukas (elektromagnetų sukurtas ML, žemės geomagnetinis laukas) veikia šią plokštelę sukeldamas įtampą. Ši įtampa yra proporcinga magnetinio lauko stiprumui kuris yra statmenas plokštei. Tokiu būdu išmatuoti magnetiniai laukai skirtingose lėkštelėse padėtyse bei patalpos magnetinis laukas: Kontrolė (patalpos magnetinis laukas) – 180 μT , Iš apačios – 300 μT , iš viršaus – 280 μT , iš dviejų šonų – 300 μT ir iš vieno šono – 230 μT .



Pav., 2.2. Tyrimo platformos elektros jungimo schema

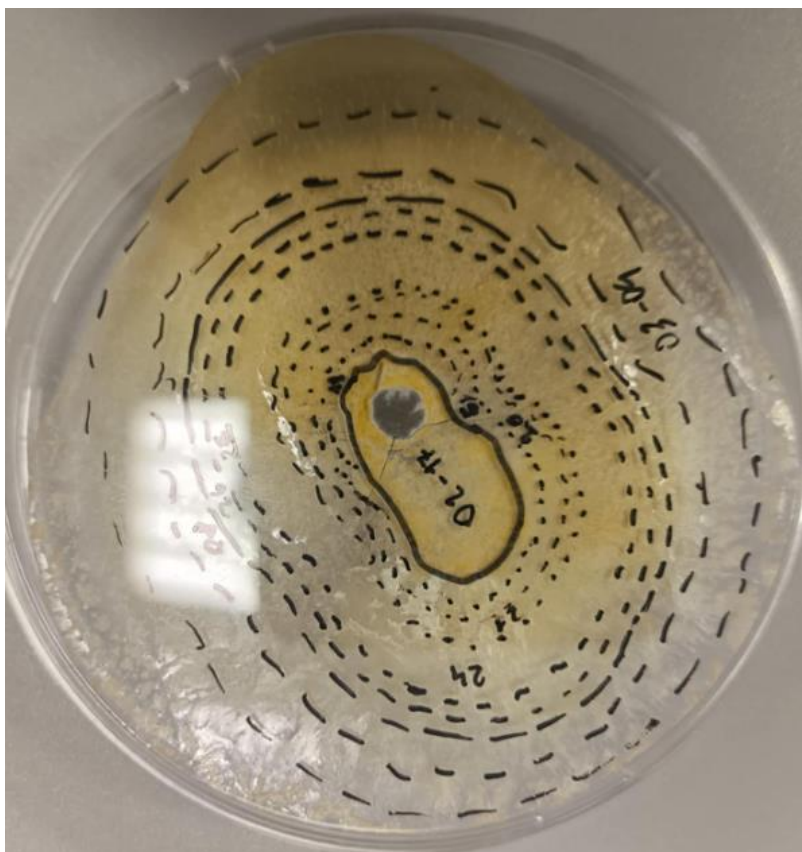
Tyrimo eiga: Grybo sodinimas: Lėkštelės inokuliuojamos 50 µl skysta *Cordyceps militaris* grybiena švaraus oro gaubte (angl. Laminar flow hood). Lėkštelių substrato viduryje dezinfekuotu kintamojo tūrio mechaninės pipetės antgalio galu yra padaroma 0.5cm skersmens apvali skylė kurioje įleidžiama skysta grybiena, kad neišbėgtų į kraštus, o pradėtų augimą iš centro. *Cordyceps militaris* grybiena užkrėstos lėkštelės apvyniojamos „Parafilm“ laboratorine sandarinimo plėvele, kad terpė kurioje auga grybiena, bei pati grybiena nedžiūtų. Lėkštelės pastatomos į penkias pozicijas kurios yra veikiamos skirtingo stiprumo bei skirtingų krypčių magnetiniu lauku ir auginamos 14 – 20 dienų iki pilnos kolonizacijos arba išdžiūvimo.

Pirmasis tyrimo etapas yra nustatyti grybo adaptaciją magnetinio lauko stimului ir ištirti ar *C. militaris* turi magnetotropinių savybių. Penkios skirtingų sąlygų pozicijos yra tam, kad nustatytume magnetotropizmą grybienai (**2.1 pav.**): Kontrolė – neveikiama elektromagnetų sukurtu magnetiniu lauku ir atskirta nuo kitas lėkštelės veikiančių magnetinių laukų. Antroji lėkštelė su grybo kolonija veikiama ML iš apačios, kad galima būtų įvertinti grybo pasipriešinimą ML ir gravitropizmui atkreipiant dėmesį į jo augimo morfologiją – ar grybiena auga į viršų, o ne radialiai. Trečioji lėkštelė veikiama iš viršaus, kad įvertinti ar yra priešinimasis gravitropizmui ar visgi grybas turi magnetotropinių savybių ir auga link magneto (į viršų) ar nuo magnetinio lauko šaltinio. Ketvirtoji lėkštelė veikiama iš vieno šono norint įvertinti vektorinį augimą link arba nuo elektromagneto skleidžiamo magnetinio lauko stimulo. Penktoji lėkštelė veikiama iš dviejų šonų, kad įvertinti grybo vektorinį augimą nuo arba link interferuojančių magnetinių laukų ir ar yra veikiamas radialinis augimas. Lėkštelės aukštis – 15.85mm ir atėmus terpės aukštį esantį lėkštelėje nustatomas maksimalus galimas grybienos augimo į viršų aukštis.

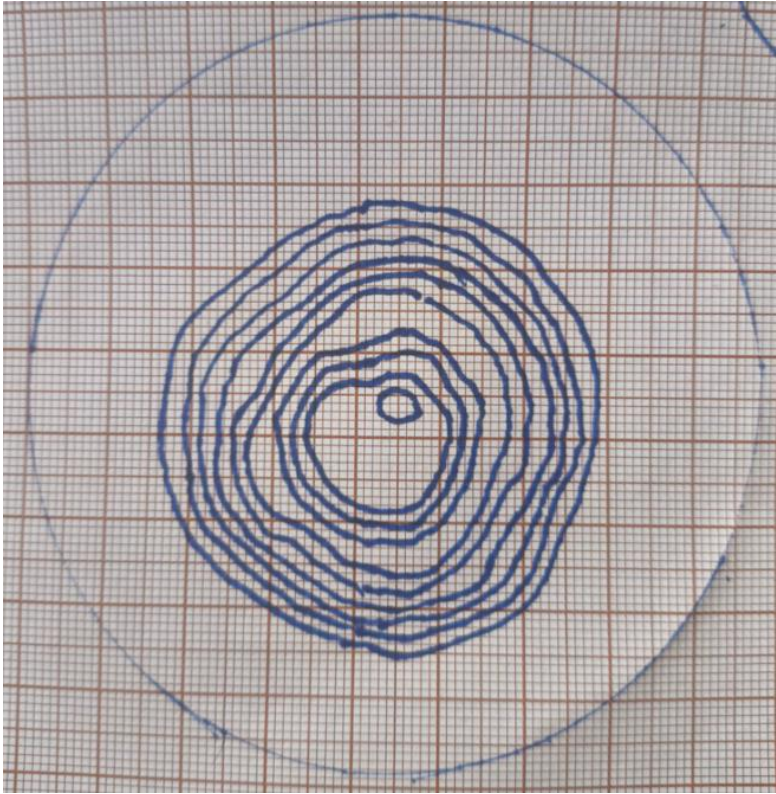
Antrasis tyrimo etapas - ištirti magnetinio lauko daromą įtaką grybienos augimui, augimo greičiui ir augimo morfologijai. Inokuliuojant lėkštelės grybiena pradeda savo „lag“ (angl. Strigimo/stringa) fazę kai skystos kultūros ląstelės dar tik adaptuojasi prie naujos terpės – iš skystos kultūros persodinamos į 2% LB terpę. Tai trunka maždaug vieną ar dvi dienas. Lėtai auginami hifai iš sporų ar ląstelių sancaupų, augantys hifai dar nėra matomi todėl nėra žymimas augimas. Po stringančios fazės ląstelės pradeda daugintis sparčiai ir auga radialiai – nuo inokuliacijos centro į visas puses. Praėjus maždaug penkioms dienoms po inokuliacijos pasimato baltos spalvos *C. militaris* grybiena ir galima pradėti duomenų rinkimą. Vertinamas grybienos išplitimo perimetras. Duomenys surenkami apverčiant lėkštelės trumpam periodui, kol ant

lėkštelės dugno apvedamas grybienos išplitimas. Duomenys renkami kas maždaug 24 valandas. Tokiu būdu lėkštelės dugne gaunami, panašūs į topografinius, grybienos augimo žemėlapiai (2.3. pav.). Vėliau, baigus eksperimentą (pradėjus grybienai džiūti ar pilnai kolonizavus substratą) šis topografinis žemėlapis nuo lėkštelės perkeliamas ant milimetrinio popieriaus lapo (2.4. pav.). Baigus braižyti, žemėlapiai yra nuskenuojami. Skenavimas reikalingas tam, kad gauti tikslią, perbraižytą ranka repliką PDF formatu siekiant išvengti fotografavimo artefaktų ir nelygaus skenavimo kampo tai atliekant telefonu, nes tai gali įvesti netikslumų skaičiuojant plotą bei perimetrą. Nuskenuoti žemėlapiai įkeliami į braižybos programą „AutoCAD 2026“. Šioje programoje naudojant „spline“ funkcija dar kartą apibraižomi augimo perimetrai ir apskaičiuojami plotai bei perimetrai kiekvienos žymos. Visi duomenys perkeliama į „Microsoft Excel“ ir „Origin“ programas tolimesnei analizei ir pateikimui. Eksperimentas buvo kartotas 4 kartus po 5 lėkšteles – iš viso sudaryta 20 grybienos augimo žemėlapių.

Trečioji tyrimo dalis yra kordicepino koncentracijos matavimai lyginant ML veiktas grupes su kontroline grupe. Perbraižius grybienos augimo perimetrus, lėkštelės nešamos į švaraus oro gaubtą, kad galima būtų saugiai jas atidaryti. Iš kiekvienos, skirtingos krypties veiktos lėkštelės išimama po $0.01\text{g} \pm 0.0005\text{g}$ šlapios, dar nespėjusios sudžiūti grybienos. Proceso svarbu nepaimti agaro, nes tai gali kenkti spektrofotometriniam tyrimams dėl didelės gausos įvairių organinių molekulių kurios turi panašų sugerties spektrą į kordicepino. Mėginiai skiedžiami 5ml distiliuoto vandens, vėliau paimama 400μl šio tirpiklio ir dar praskiedžiama 3ml vandens tam, kad gauti tikslesnius sugerties spektro matavimus (praskiesta 8.5 karto). Šis 3.4ml tirpalas pilamas į specialią kvarcinę spektrofotometrinę kiuvetę pralaidžią UV spinduliams. Kordicepino sugeria šviesą ties 259nm bangos ilgiu (Tuli et al., 2013). Kordicepino molinė masė – 251.24.



2.3 pav. Petri lėkštelės dugne pažymėtas grybienos augimo perimetras. Atskiros linijos žymi skirtingas matavimo dienas.



2.4 pav. Perbraižytas augimo žemėlapis ant milimetrinio popieriaus lapo.

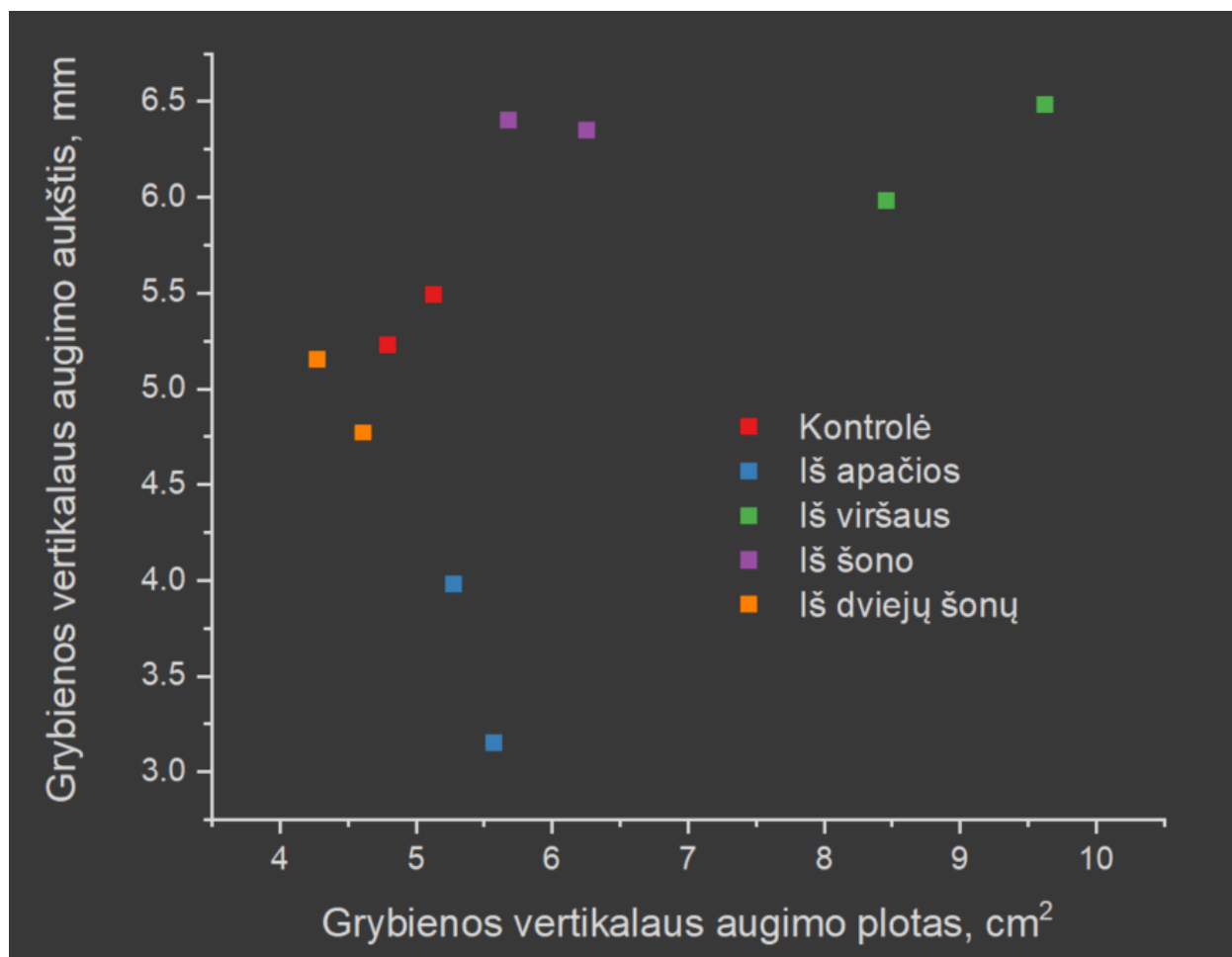
Statistiniai metodai: duomenų analizė atlikta naudojant OriginPro 2018 programinę įrangą. Duomenų pasiskirstymo normalumas tikrintas Shapiro-Wilk kriterijumi; kelių nepriklausomų grupių palyginimui, kai duomenys nebuvo pasiskirstę normaliai, taikytas Kruskal-Wallis testas; nustatius statistiškai reikšmingus skirtumus tarp grupių pagal Kruskal-Wallis testą, atlikti poriniai palyginimai naudojant Dunn testą. Statistinis reikšmingumas vertintas esant $p < 0,05$. Rezultatų skaitinės vertės išreikštos vidurkiu $\pm$ SE. Kai kurių tyrimo dienų duomenys buvo interpoliuojami dėl tos dienos nežymėjimo, todėl tai gali paveikti SE reikšmes.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. *Cordyceps militaris* vertikalaus augimo atsakas į magnetinio lauko stimulą

Paveiksle 3.1 pateikiami *Cordyceps militaris* grybienos vertikalaus augimo aukščio (mm) ir vertikalaus augimo ploto (cm²) priklausomybės duomenys, gauti skirtingomis ML poveikio sąlygomis ir kontrolinėje grupėje. Kiekvienoje grupėje atlikti du pakartojimai (duomenys imti iš 3-iojo ir 4-ojo eksperimento pakartojimų). Dėl mažo pakartojimų skaičiaus statistinė analizė nebuvo atliekama, todėl toliau pateikiami aprašomieji stebėjimai, kurie gali rodyti tam tikras tendencijas:

1. Kontrolinė grupė (raudona spalva) - grybiena, auginta be ML stimulo, rodė vidutinius augimo rezultatus: vertikalus augimo aukštis buvo 5.23-5.49mm, o grybienos augusios virš terpės paviršiaus plotas 4.79-5.12cm².
2. ML poveikis iš apačios (mėlyna spalva) – ši grupė rodė mažiausius augimo rodiklius. Vertikalus augimo aukštis 3.15-3.98mm, o plotas 5.28-5.57cm².
3. ML poveikis iš viršaus (žalia spalva) – šioje grupėje stebėtas ryškiausias grybienos augimas vertikalia ašimi. Vertikalus augimo aukštis siekė 5.98-6.48mm, o plotas buvo didžiausias iš visų grupių – 8.46-9.62cm².
4. ML poveikis iš šono (violetinė spalva) – grybiena veikiamą ML iš šono, pasiekė aukštą vertikalų augimą (6.35-6.4mm), panašų į grupės veiktos ML iš viršaus, tačiau augimo plotas buvo vidutinis – 5.68-6.25cm².
5. ML poveikis iš dviejų šonų (oranžinė spalva) – šios grupės rezultatai buvo artimi kontrolinės grupės rezultatams, tačiau mažesni: aukštis – 4.77-5.15mm, plotas – 4.27-4.61cm².

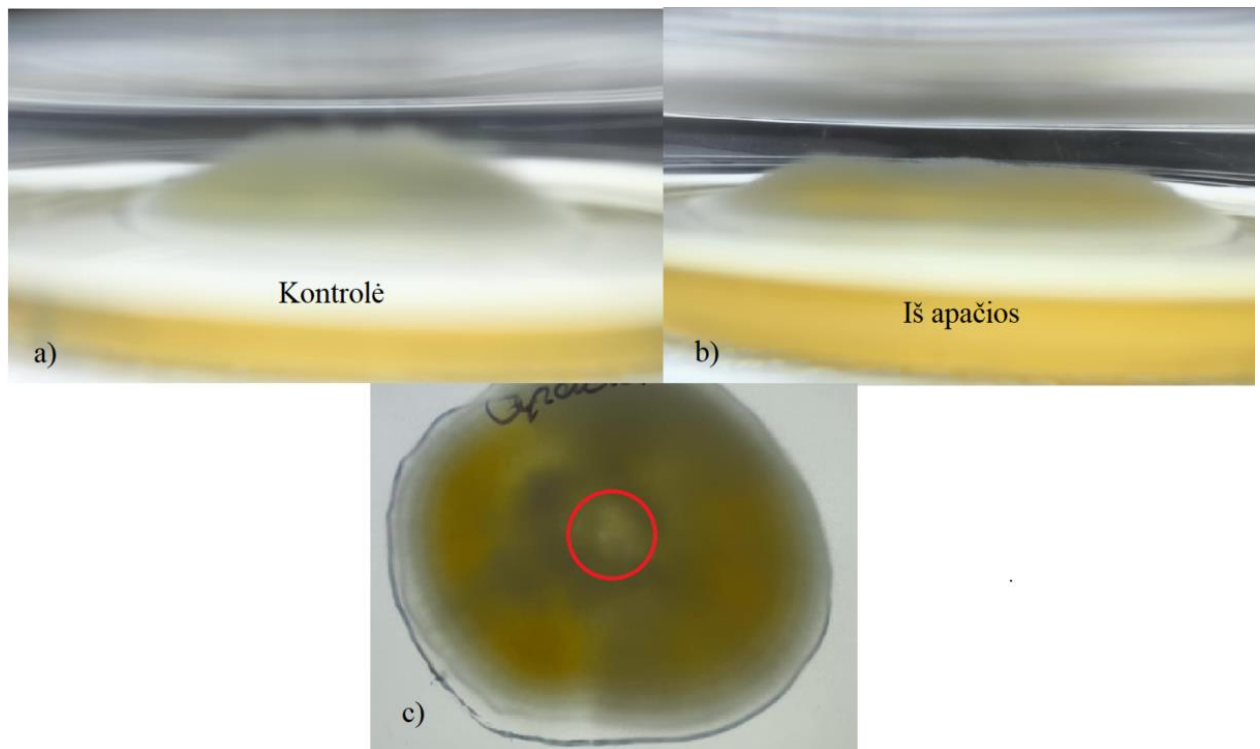


3.1. pav. Vertikalio grybienio augimo plotas ir aukštis nuo terpės paviršiaus.

Apibendrinant šiuos stebėjimus, matoma, kad skirtingų ML stimulo kryptys galimai daro nevienodą įtaką *C. Militaris* grybienio vertikaliam augimui ir augimo plotui. Didžiausią vertikalų augimą skatinantis poveikis stebėtas ML veikiant iš viršaus, o mažiausias – iš apačios. Svarbu paminėti, kad šios išvados yra paremtos ribotu duomenų kiekiu ir turėtų būti tikrinamos tolimesniais tyrimais su didesniu pakartojimų skaičiumi, siekiant gauti statistiškai patikimus rezultatus.

Be kiekybinių vertikalio augimo parametrų skirtumų, tyrimo metu taip pat buvo stebimi ir morfologiniai grybienio augimo ypatumai skirtingose grupėse (**3.2 pav.**). Pavyzdžiui, pastebėta, kad grupėje veiktoje ML iš apačios grybienio vertikalus augimas formavo struktūrą, primenančią tuščiavidurės spurgos formą – tankesnis ir aukštesnis augimas kraštuose ir retesnis

bei žemesnis centre. Kitose grupėse, vertikalus augimas buvo labiau tolygus, formuojant apvalios formos struktūrą.



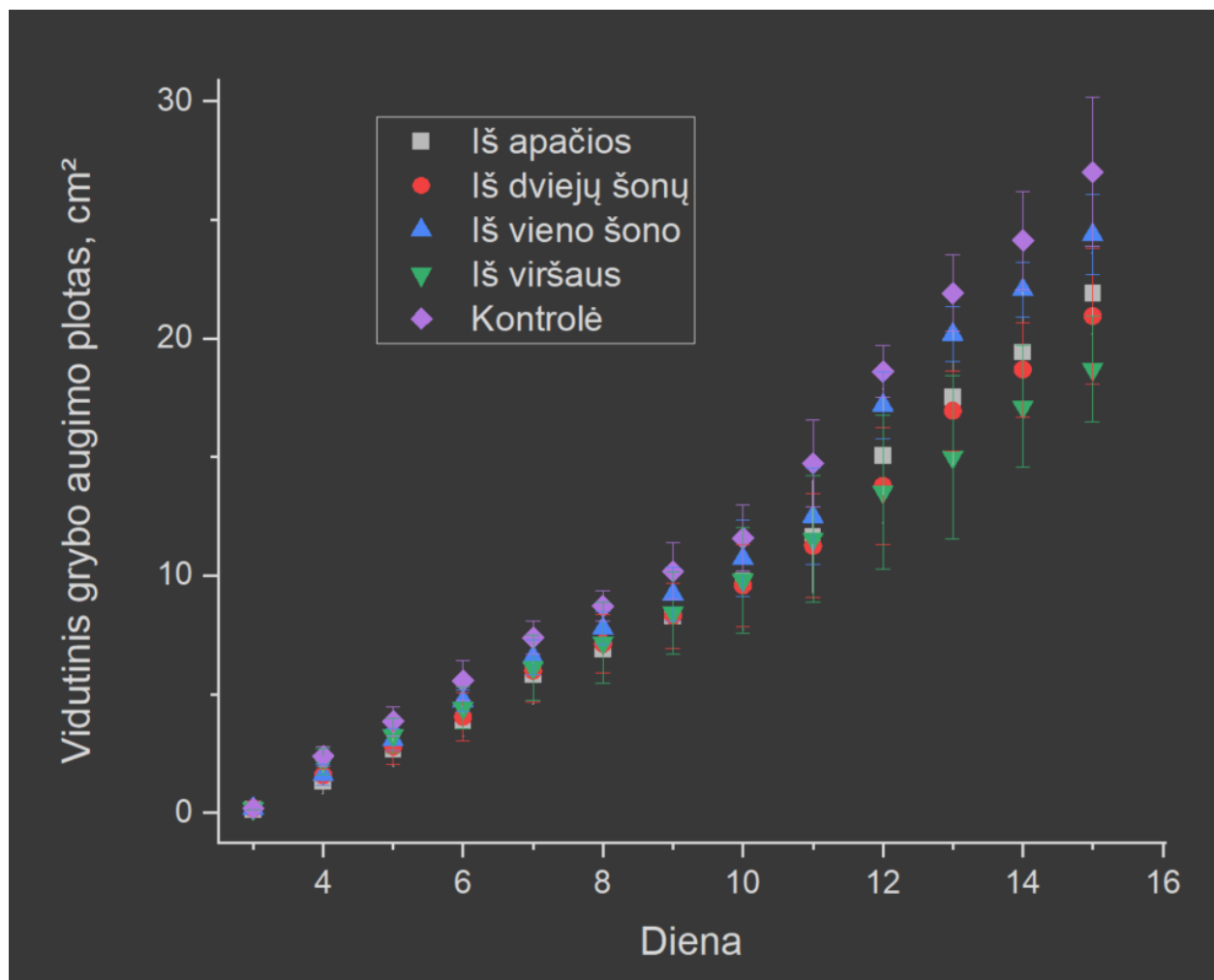
3.2 pav. Morfologiniai augimo ypatumai: a) Kontrolinės grupės vertikalaus augimo stebėjimas iš šono, b) grupės, veiktos ML iš apačios, vertikalaus augimo stebėjimas iš šono, c) grupės, veiktos ML iš apačios, vertikalaus augimo stebėjimas iš viršaus, raudonas apskritimas žymi plotą kuriame vertikalaus augimo aukštis buvo mažesnis negu kolonijos kraštuose.

Šie morfologiniai stebėjimai papildė kiekybinius duomenis, rodydami jog ML poveikis galimai veikia ne tik grybienos augimo intensyvumą, bet ir erdvinę struktūrą. Pavyzdžiui lemia erdvinių struktūrų susidarymą skirtingose eksperimentinėse grupėse. Norint detaliau ištirti šiuos morfologinius pokyčius ir jų sąsajas su ML stimuliu skirtingomis kryptimis, reikalingi tolimesni tyrimai.

3.2. *Cordyceps militaris* grybienos augimo plokštumoje dinamikos ir morfologijos pokyčiai veikiant magnetiniu lauku

3.2.1 Grybienos augimo plotas

Paveiksle 3.3 pateikiama *C. militaris* grybienos vidutinio augimo ploto (cm^2) dinamika per 15 tyrimo dienų, priklausomai nuo ML veikimo krypties. Grafike taip pat vaizduojami standartinės paklaidos intervalai (SE).



3.3 pav. *Cordyceps militaris* vidutinio ($\pm$ SE) grybienos augimo ploto dinamika veikiant skirtingų krypčių ML. $n = 4$

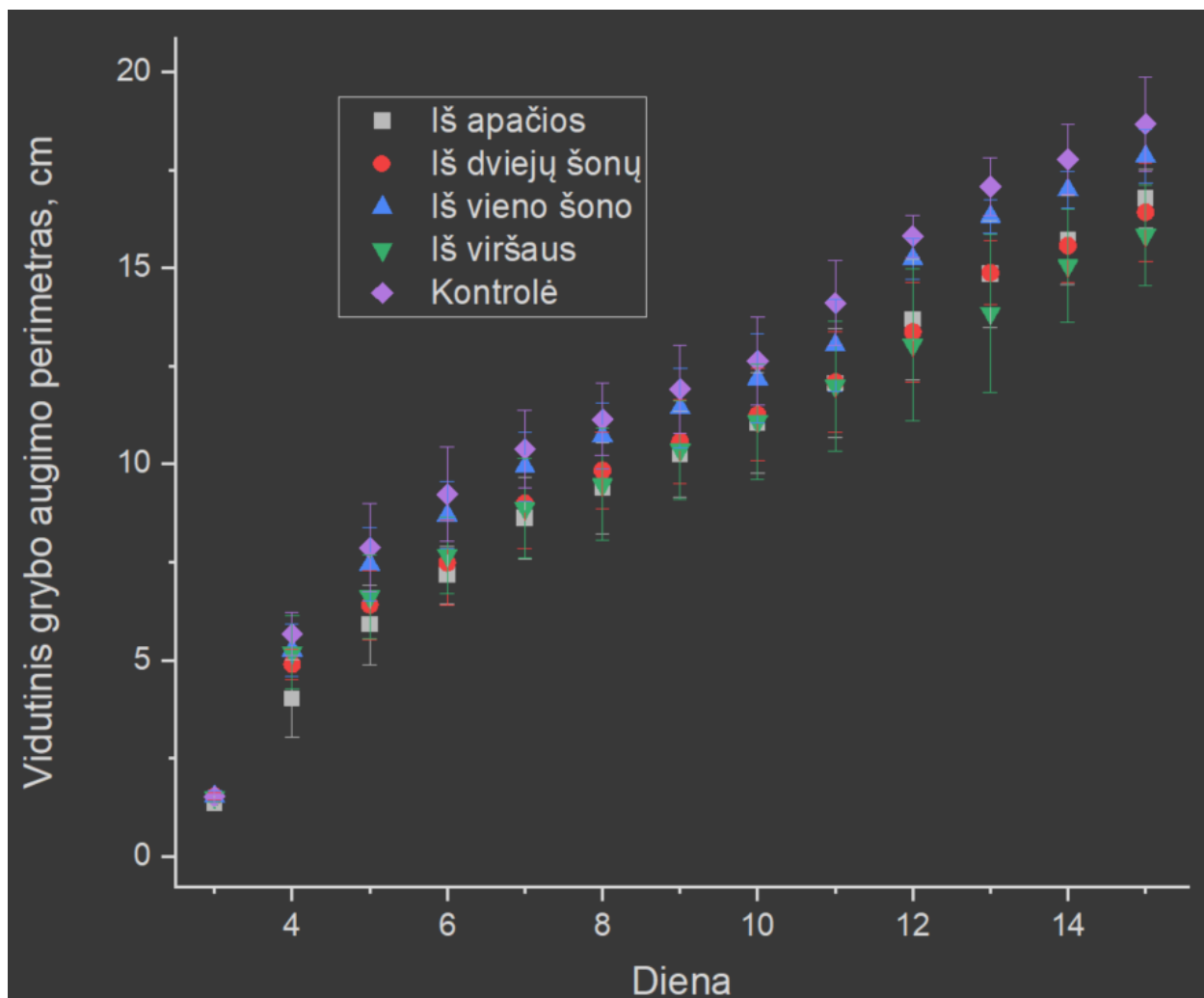
Bendras visų tirtų grupių bruožas yra laipsniškas vidutinio grybienos augimo ploto didėjimas nuo 3 iki 15 tyrimo dienos. Atlikus normalumo patikrinimą (Shapiro-Wilk testą), nustatyta, kad duomenys pasiskirstę nenormaliai. Skirtumams tarp grupių įvertinti buvo taikytas neparametrinis Kruskal-Wallis testas kuris neparode statistiškai reikšmingų skirtumų tarp tirtų grupių vidutinio grybienos augimo ploto nei vieną tyrimo dieną ($p > 0.05$ visais atvejais). Nepaisant skirtumų statistinio nereikšmingumo, stebint grafiką vizualiai galima išskirti tendencijas:

1. Kontrolinė grupė – kiekviena dieną augo geriausiai. 15-ąją dieną pasiekė didžiausia vidutinį grybienos plotą - 27.01cm^2 .
2. ML poveikis iš viršaus – grupė veikiama ML iš viršaus augo blogiausiai per visą stebėjimo laikotarpį. 15-ąją dieną šios grupės vid. plotas buvo 18.7cm^2 .
3. ML poveikis iš dviejų šonų ir apačios – duomenys rodo panašius ploto augimo tempus ir galutines reikšmes.

Dideli SE intervalai ir jų ryškus persidengimas tarp daugumos grupių per visą tyrimo laikotarpį patvirtina statistinės analizės rezultatus, rodančius skirtumų tarp grupių statistinį nereikšmingumą. Dėl šių priežasčių, remiantis atliktu tyrimu, negalima daryti išvados, kad taikytos skirtingos ML kryptys turėjo statistiškai reikšmingos įtakos *Cordyceps militaris* grybienos augimo plotui. Norint gauti statistiškai patikimesnius rezultatus, ateityje būtų tikslinga atlikti tyrimus su didesniu pakartojimų skaičiumi

3.2.2 Grybienos perimetras

Tolesnėje analizėje nagrinėjamas *Cordyceps militaris* grybienos vidutinio augimo perimetro (cm) kitimas per 15 tyrimo dienų, priklausomai nuo taikyto ML krypties. Rezultatai pateikti (3.4 pav.).



3.4 pav. *Cordyceps militaris* vidutinio ($\pm$ SE) grybienos augimo perimetro dinamika veikiant skirtingų krypčių ML. $n = 4$

Panašiai kaip ir grybienos ploto atveju, visų tirtų grupių vidutinis perimetras nuosekliai didėjo tyrimo eigoje. Atlikus duomenų normalumo patikrinimą ir pritaikius neparametrinį Kruskal-Wallis testą, nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp tirtų grupių vidutinio grybienos augimo perimetro nei vieną tyrimo dieną ($p > 0.05$, visais atvejais). Nepaisant statistiškai nereikšmingų skirtumų tarp grupių, vizualiai stebint duomenis galima išvelgti tendencijas:

1. Kontrolinė grupė – ši grupė viso tyrimo metu augo didžiausiu vidutiniu grybienos perimetru. 15-ąją tyrimo dieną vid. perimetras buvo 18.66cm.

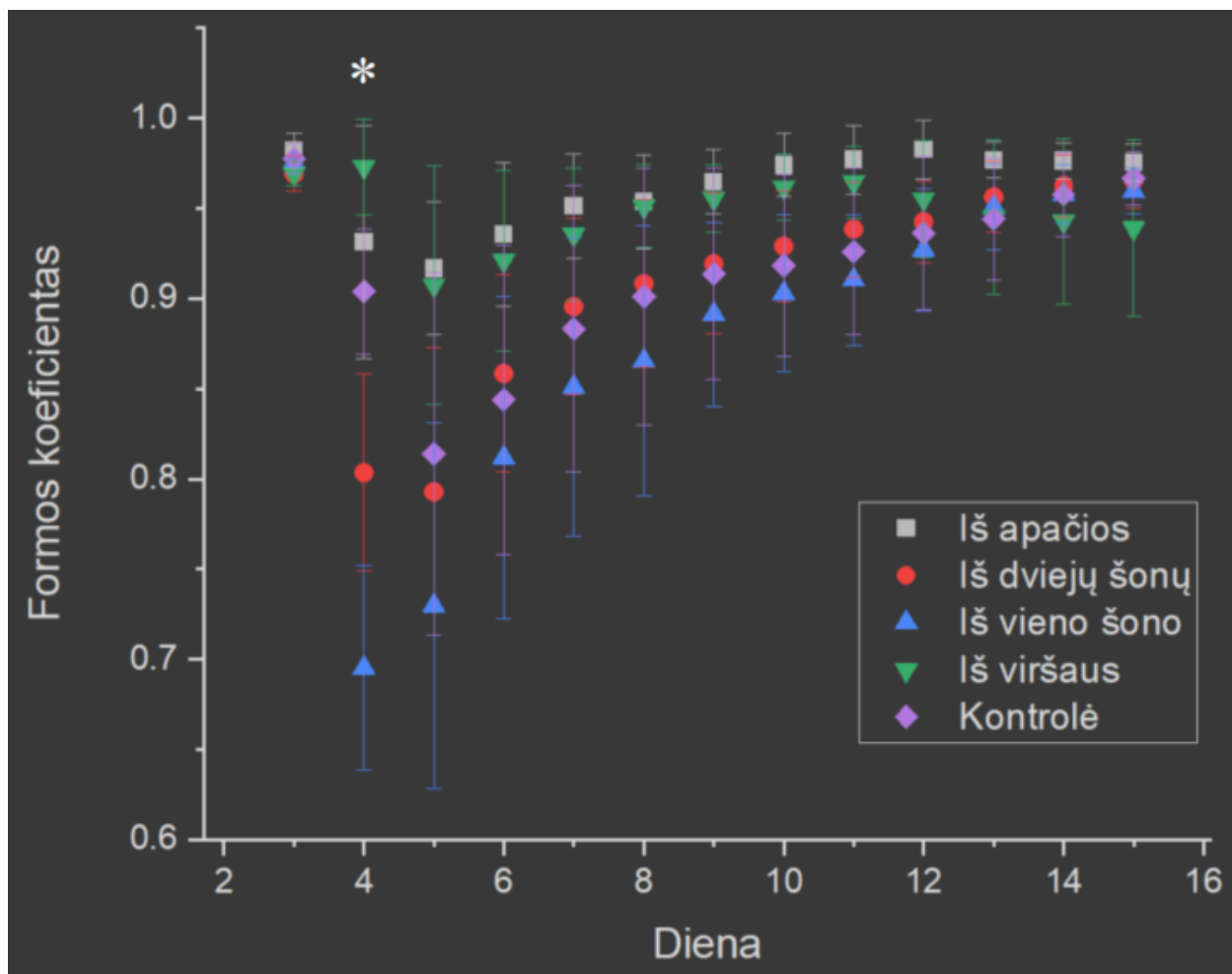
2. ML poveikis iš viršaus – grupė pasižymėjo mažiausiu vid. perimetru per visą stebėjimo laikotarpį.
3. ML iš vieno šono ir iš apačios – perimetro augimo tendencijos buvo artimos kontrolinės grupės rodikliams didžiąją eksperimento dalį.

Standartinės paklaidos intervalai, pavaizduoti grafike, yra palyginti dideli ir dažnai persidengia tarp skirtingų grupių, ypač pirmosiomis tyrimo dienomis. Šis persidengimas vizualiai paremia Kruskal-Wallis testo rezultatus, indikuojančius, kad stebimi vidurkių skirtumai nėra statistiškai reikšmingi. Remiantis atlikto tyrimo duomenimis ir statistine analize, negalima teigti, kad skirtingos ML poveikio kryptys turėjo statistiškai reikšmingos įtakos *Cordyceps militaris* grybienos augimo perimetrai. Tolimesni tyrimai su didesne imtimi galėtų suteikti tikslesnį ML poveikio vertinimą.

3.2.3 Grybienos formos koeficientas

Įprastai petri lėkštelėse grybiena auga radialiai, todėl yra svarbu įvertinti nukrypimą nuo šio parametro. Grybienos formos koeficientas skaičiuojamas pagal formulę $FK = (4 \times \pi \times S) / P^2$ (S – plotas, P – perimetras). Šis rodiklis leidžia įvertinti, kiek analizuojama forma yra artima idealiam apskritimui, kur idealiai apskritos formos objekto koeficientas yra lygus 1. Mažesnės koeficiento reikšmės (artėjančios prie 0) rodo didesnę nukrypimą nuo apskritimo – gali būti labiau ištįsusi, netaisyklinga, kampuota.

Sudarytas augimo profilis parodė, kad nepriklausomai nuo magnetinio lauko veikimo krypties, 4-5 dienomis grybienos plėtimosi forma plokštumoje keičiasi stipriausiai dėl adaptacijos prie naujų augimo sąlygų. Veikiant ML adaptacija prie naujų sąlygų vyksta skirtingai. Paveiksle 3.5 pateikiama *Cordyceps militaris* grybienos vidutinio formos koeficiento kitimas per 15 tyrimo dienų.



3.5 pav. *Cordyceps militaris* grybienos vidutinio ($\pm$ SE) formos koeficiento dinamika veikiant skirtingų krypčių ML. Žvaigždutė žymi statistiškai reikšmingą skirtumą, $n = 4$.

Bendra visų grupių formos kitimo tendencija rodo, kad pradinėmis augimo dienomis (ypač 4-5 dieną) formos koeficientas buvo mažesnis, rodantis netaisyklingesnę kolonijos formą, o vėliau, augimui progresuojant, jis didėjo, artėdamas prie 1, kas reiškia, jog kolonijos tapo labiau apskritos. Duomenų normalumo patikrinimas ir vėliau atliktas neparametrinis Kruskal-Wallis testas (su Dunn post-hoc testu poriniams palyginimams) atskleidė statistiškai reikšmingus skirtumus tarp kai kurių eksperimentinių grupių ketvirtąjį tyrimo dieną. Šią dieną, galima laikyti pradine grybienos augimo arba „lag“ faze, nustatyti statistiškai reikšmingi ($p < 0.05$) skirtumai tarp šių grupių porų:

Iš apačios ir Iš dviejų šonų,

Iš apačios ir Iš vieno šono,

Iš dviejų šonų ir Iš viršaus,

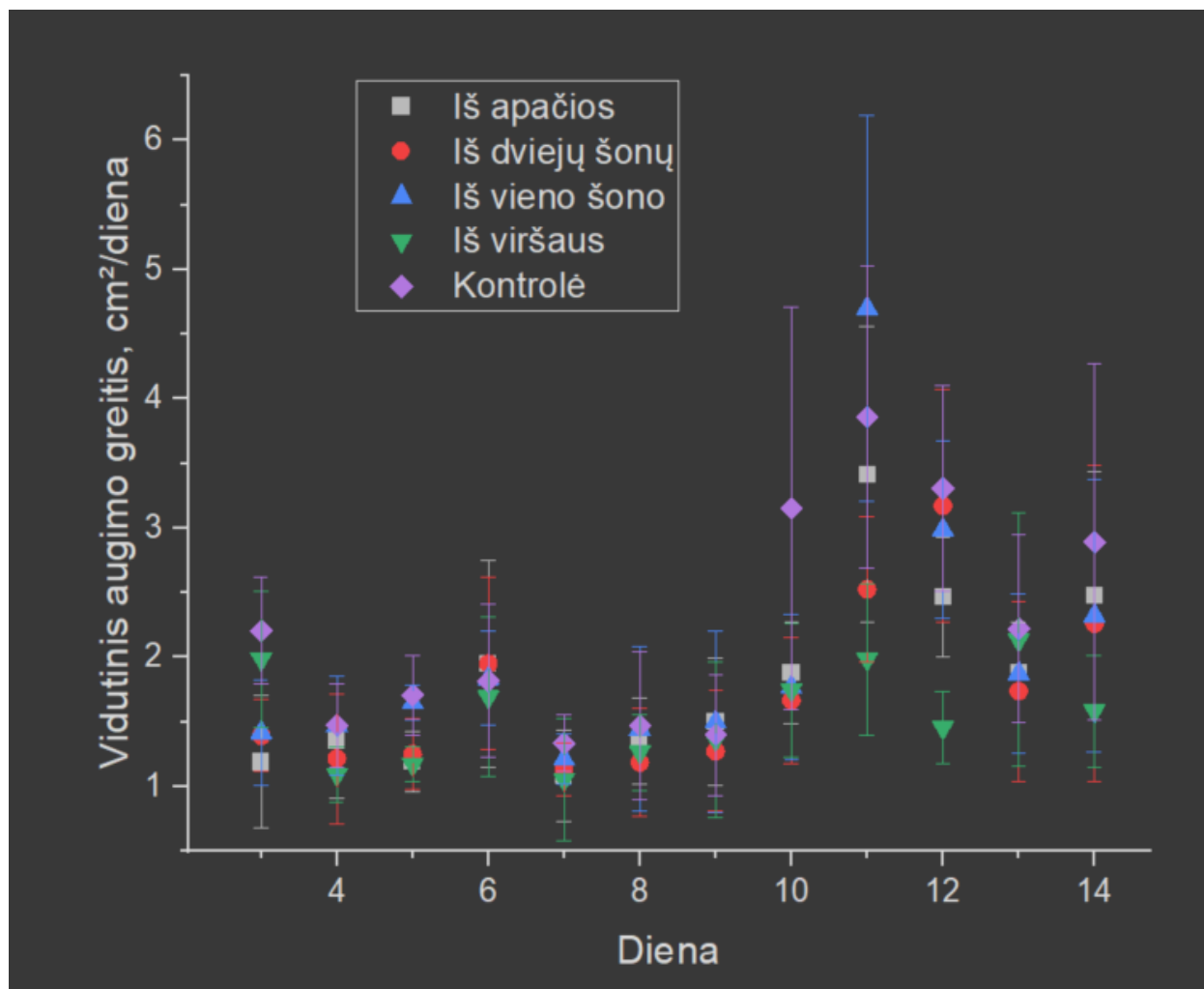
Iš vieno šono ir Iš viršaus.

Kitomis tyrimo dienomis statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių pagal formos koeficiento kitimą nenustatyta ($p > 0.05$). Reiktų pabrėžti jog grybiena buvo persodinama iš skystos terpės į kietą (LB agarą), kas gali sukelti šoką ir versti organizmą adaptuotis prie naujų augimo sąlygų. Analizuojant grafiką detaliau matyti jog ketvirtąją dieną grupė veikiama iš dviejų šonų ir grupė veikiama iš vieno šono rodė mažiausias vidutines formos koeficiento reikšmes, tai rodo netaisyklingą, ištįsusią kolonijos formą šioje ankstyvoje augimo stadijoje. Vėlesnėmis tyrimo dienomis nors statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta, visose grupėse stebėta formos koeficiento didėjimo tendenciją. Nuo 11-os tyrimo dienos visų grupių vidutinės formos koeficientai buvo virš 0.9, o tai rodo jog kolonijos tapo labiau apskritos. Grupėje veiktoje ML iš apačios visą tyrimo laikotarpį stebėta aukščiausia formos koeficiento reikšmė.

Stebėti statistiškai reikšmingi skirtumai formos koeficiente ketvirtąją augimo dieną, sutampantys su adaptaciniu periodu po persodinimo rodo, kad ML kryptis gali būti svarbus veiksnys, moduluojantis *Cordyceps militaris* grybienos pradinį erdvinį kolonijos formavimąsi ir atsaką į aplinkos pasikeitimą. Nors vėlesnėse augimo stadijose šie skirtumai išsilygino, pradinis morfologinis atsakas galėtų turėti įtakos vėlesniems augimo procesams, pavyzdžiui, augimo greičiui.

3.2.4 Grybienos augimo greitis

Grybienos augimo greitis buvo vertinamas kaip vidutinis ploto pokytis per dieną (cm^2/diena). Šio rodiklio analizė pateikta paveiksle (**3.6 pav.**), kuriame pavaizduota augimo greičio dinamika skirtingose eksperimentinėse grupėse per 14 tyrimo dienų.



3.6 pav. *Cordyceps militaris* vidutinio ($\pm$ SE) grybienos augimo greičio (cm^2/diena) dinamika veikiant skirtingų kryptių ML. $n = 4$.

Atlikus duomenų normalumo patikrinimą ir pritaikius neparametrinį Kruskal-Wallis testą, nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp tirtų grupių vidutinio grybienos augimo greičio nei vieną tyrimo dieną ($p > 0.05$, visais atvejais). Nors statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta, grafike matomos tam tikros vizualios tendencijos, apibūdinančios augimo greičio dinamiką:

1. Daugumoje grupių stebimas netolygus augimo greitis per visą tyrimo laikotarpį. Pradinėmis dienomis (3-5) greitis buvo santykinai didesnis, vėliau nuo 7 iki 9 dienos

daugumoje grupių jis sumažėjo, o tyrimo pabaigoje kaikuriose grupėse stebimas greičio padidėjimas.

2. Didžiausias vidutinis augimo greitis stebimas grupėje Iš vieno šono 11-ąją dieną ir kontrolinėje grupėje 10-11 dienomis. Šių pikų SE yra labai didelės, kas rodo didelę duomenų sklaidą.
3. Grupėje veiktoje ML iš viršaus viso tyrimo metu stebėtas mažiausias vidutinis augimo greitis.

Labai dideli SE intervalai, ypač ties stebimais greičio pikais, ir ryškus SE intervalų persidengimas tarp visų grupių per visą tyrimo laikotarpį, vizualiai patvirtina Kruskal-Wallis testo rezultatus apie statistiškai nereikšmingus skirtumus. Dėl didelės duomenų variacijos ir statistiškai nereikšmingų skirtumų, negalima daryti išvados, kad ML kryptis turėjo aiškų ir nuoseklų poveikį *Cordyceps militaris* grybienos augimo greičiui tirtomis sąlygomis.

Atlikus kiekybinę *Cordyceps militaris* grybienos augimo ir morfolometrinių parametrų analizę, siekiant įvertinti skirtingų kryptų ML poveikį, gauti nevienareikšmiški rezultatai. Bendras visų tirtų grupių bruožas buvo laipsniškas ploto ir perimetro didėjimas per 15 tyrimo dienų. Nors vizualiai buvo matomos tam tikros tendencijos, atlikus neparametrinę Kruskal-Wallis statistinę analizę, nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp eksperimentinių grupių pagal šiuos du parametrus nei vieną tyrimo dieną ($p > 0.05$). Dideli standartinių paklaidų intervalai ir jų persidengimas tarp grupių patvirtino šiuos statistinius rezultatus. Analizuojant formos koeficientą, kuris parodo kolonijos artimumą idealiai apskritimo formai, buvo nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai ($p < 0.05$) tarp kai kurių grupių ketvirtąją tyrimo dieną. Būtent šią dieną, kuria galima laikyti pradinę adaptacijos prie naujų augimo sąlygų fazę, grupės, veikiamos ML iš dviejų šonų ir iš vieno šono, demonstravo statistiškai reikšmingai mažesnę formos koeficientą lyginant su grupėmis, veikiamomis ML iš apačios ir viršaus. Tai rodo, kad ML kryptis gali moduluoti pradinę grybienos kolonijos formavimąsi. Kitomis tyrimo dienomis statistiškai reikšmingų skirtumų pagal formos koeficientą tarp grupių nerasta, o visos kolonijos ilgainiui įgavo labiau apskritą formą. Būtų tikslinga padidinti imtį ir grybo augimą veikti stipresniu magnetiniu lauku. Taip pat veikti ir kitas vaistines, plačiai auginamas grybų rūšis.

3.3 Kordicepino koncentracijos spektrofotometriniai matavimai

Siekiant įvertinti ML poveikį kordicepino biosintzei ir kaupimuisi *Cordyceps militaris* grybienoje, buvo atlikta spektrofotometrinė analizė. Išmatuota absorbcija 5 skirtingo ML poveikio grupėms veikiant nuo 220 iki 300nm bangos ilgio šviesa (UV). Pradinė grybienos masė kiekvienam mėginiui buvo 0.01g, kuri buvo ekstrahuojama 5ml distiliuoto vandens. Prieš matavimą, 400μl gauto ekstrakto buvo papildomai praskiesta 3ml distiliuoto vandens (skiedimas 8.5 karto). Kad apskaičiuoti kordicepino koncentraciją pirminiame ekstrakte reikia pirmiausia žinoti kordicepino molinį ekstinkcijos koeficientą ϵ kuris yra $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (t.y. $14000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Kredich & Guarino, 1961). Toliau paimama absorbcijos reikšmė 259nm ir dauginama iš 8.5 (kiek kartų skiesta), kad apskaičiuoti pirminę, neskiesto ekstrakto absorbcijos reikšmę. Pavyzdžiui $0.1285 \times 8.5 = 1.092 A_{259}$. Tada daliname šią reikšmę iš ϵ , kad sužinoti koncentraciją pirminiame ekstrakte: $1.092 / 14000 = 0.000078\text{mol/L}$. Kad apskaičiuoti masės koncentraciją, pirmame ekstrakte gautą reikšmę dauginame iš molinės masės ir daliname iš 1000, kad paversti į mililitrus: $0.000078 \times 251.24 / 1000 = 0.0196\text{mg/ml}$. Dauginame iš 5 nes ekstraktas darytas 5ml distiliuoto vandens tirpale: $0.0196 \times 5 = 0.098\text{mg}$. Kad sužinoti kordicepino kiekį mg/g grybienoje daliname gautą reikšmę iš mėginio svorio: $0.098 / 0.01 = 9.8\text{mg/g}$. Visų grupių duomenys pateikti 3.1 lentelėje.

Lentelė 3.1. Kordicepino kiekio apskaičiuotos vertės mg/g nuo išmatuotos absorpcijos ties 259nm.

Grupė	Išmatuota A_{259}	Kordicepino kiekis (mg/g grybienos)
Kontrolė	0.1285	9.801
2 Šonai	0.129	9.838
Viršus	0.1296	9.884
1 Šonas	0.1442	11
Apačia	0.1516	11.5645

Spektrofotometrinės analizės metu apskaičiuoti kordicepino kiekiai (mg/g šlapios masės) *Cordyceps militaris* grybienoje skirtingose eksperimentinėse grupėse. Nors buvo stebimi tam tikri vidutinio kordicepino kiekio skirtumai, dėl riboto spektrofotometrinių matavimų pakartojimų skaičiaus (n=3) kiekvienoje grupėje, formali statistinė analizė skirtumams įvertinti nebuvo atlikta. Gauti rezultatai panašūs į kitų autorių atliktus tyrimus (Hur, 2008), todėl tikslinga šiuo metodu nustatyti kordicepino koncentraciją pakartotiniuose bandymuose. Nepaisant statistinės analizės trūkumo galima matyti jog grupės veiktos ML iš apačios ir šono sintetino ir kaupė didesnes kordicepino koncentracijas lyginant su kontroline grupe todėl prasminga daryti tęsti tyrimus varijuojant magnetinio lauko stiprumu norint optimizuoti veikliųjų medžiagų sintezę ir kaupimą.

IŠVADOS

1. Atlikus *Cordyceps militaris* grybienos augimo ploto, perimetro ir greičio matavimus per 15 dienų statistiškai reikšmingo magnetinio lauko poveikio nei vienam iš šių augimo parametrų nenustatyta.
2. Ketvirtąją augimo dieną, ankstyvojoje adaptacijos fazėje po persodinimo, magnetinio lauko kryptis turėjo statistiškai reikšmingą poveikį ($p < 0,05$) grybienos formos koeficientui. Veikiant ML iš dviejų šonų ir iš vieno šono, stebėta netaisyklingesnė kolonijos formą lyginant su grupėmis, veikiamomis ML iš apačios ir iš viršaus.
3. Spektrofotometrinės analizės metu apskaičiuoti kordicepino kiekiai (mg/g šlapios masės) *Cordyceps militaris* grybienoje atitinka įprastus kiekius.
4. Remiantis šiuo tyrimu, negalima daryti statistiškai pagrįstų išvadų apie ML poveikį kordicepino koncentracijai *Cordyceps militaris* grybienoje.

Autoriaus asmeninis indėlis

Pagrindinis šio baigiamojo darbo autoriaus indėlis apima tyrimo idėjos generavimą, eksperimentų vykdymą ir rezultatų analizę. Darbo vadovė Vilma Kisnierienė teikė metodologines konsultacijas ir padėjo formuluojant darbo kryptis, analizuojant rezultatus ir formuluojant išvadas.

VILNIAUS UNIVERSITETAS GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS NEUROBIOLOGIJOS IR BIOFIZIKOS KATEDRA

Ervinas Kreivys

Bakalauro baigiamasis darbas

Elektromagnetinio lauko poveikio *Cordyceps militaris* tyrimas

SANTRAUKA

Magnetiniai laukai (ML) yra nuolat mus supantis aplinkos veiksnys, kurio poveikis biologinėms sistemoms, įskaitant grybus, kelia vis didesnę mokslinę susidomėjimą. *Cordyceps militaris* yra medicininio požiūriu vertingas grybas, žinomas dėl kordicepino ir kitų biologiškai aktyvių junginių sintezės. Šio baigiamojo darbo tikslas yra ištirti skirtingų kryptių ML poveikį *Cordyceps militaris* grybienos augimui, morfologijai ir kordicepino kiekiui. Tyrimo metu *Cordyceps militaris* grybiena buvo auginama kietoje terpėje (LB agar) penkiose eksperimentinėse grupėse: kontrolinėje (be kryptingo ML poveikio) ir keturiose grupėse, veikiamose ML iš skirtingų kryptių (iš apačios, iš dviejų šonų, iš vieno šono, iš viršaus). Buvo

stebimi ir matuojami grybienos augimo parametrai (plotas, perimetras, augimo greitis, formos koeficientas) per 15 dienų. Spektrofotometrinės analizės metodu nustatytas kordicepino kiekis grybienos ekstraktuose. Duomenys buvo analizuojami naudojant aprašomąją ir, kur įmanoma, neparametrinę statistinę analizę (Kruskal-Wallis testą). Tyrimo rezultatai parodė, kad nors buvo stebimos tam tikros vizualios tendencijos, statistiškai reikšmingo ML poveikio *Cordyceps militaris* grybienos augimo plotui, perimetrui ir greičiui tirtomis sąlygomis nenustatyta ($p > 0,05$). Dėl riboto spektrofotometrinių matavimų pakartojimų skaičiaus, tvirtų išvadų apie ML įtaką kordicepino koncentracijai taip pat nebuvo galima padaryti. Tačiau nustatyta, kad ketvirtąją augimo dieną, ankstyvojoje adaptacijos fazėje, ML kryptis turėjo statistiškai reikšmingą poveikį ($p < 0,05$) grybienos formos koeficientui, kas rodo galimą ML įtaką pradiniam augimo procesams ir magnetotropinio atsako požymius. Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad nors bendras ML poveikis augimo intensyvumui ir kordicepino kaupimuisi šiame tyrime nebuvo statistiškai pagrįstas, grybiena gali jautriai reaguoti į ML kryptį ankstyvosiose augimo stadijose. Tolimesni tyrimai su didesnėmis imtimis ir skirtingo stiprio ML poveikiu yra reikalingi šiems stebėjimams patvirtinti.

VILNIUS UNIVERSITY

LIFE SCIENCES CENTER

DEPARTMENT OF NEUROBIOLOGY AND BIOPHYSICS

Ervinas Kreivys

Bachelor thesis

RESEARCH ON THE EFFECTS OF ELECTROMAGNETIC FIELDS ON *CORDYCEPS MILITARIS*

SUMMARY

Magnetic fields (MF) are ever-present environmental factors, and their impact on biological systems, including fungi, is a growing area of scientific interest. *Cordyceps militaris* is a medically valuable fungus known for synthesizing cordycepin and other bioactive compounds. This final thesis aimed to investigate the effect of MF applied from different directions on *Cordyceps militaris* mycelial growth, morphology, and cordycepin content. During the study, *Cordyceps militaris* mycelium was cultured on a solid medium (LB agar) in five experimental groups: a control (without directed MF exposure) and four groups exposed to MF from different directions (from below, from two sides, from one side, from above). Mycelial growth parameters (area, perimeter, growth rate, shape factor) were monitored and measured over 15 days. Cordycepin content in mycelial extracts was determined using spectrophotometric analysis. Data were analyzed using descriptive statistics and, where possible, non-parametric statistical analysis (Kruskal-Wallis test). The study results indicated that despite certain visual trends observed, no statistically significant effect of MF on *Cordyceps militaris* mycelial growth area, perimeter, or rate was found under the studied conditions ($p > 0.05$). Due to the limited number of repetitions for the spectrophotometric measurements, robust conclusions regarding the influence of MF on cordycepin concentration could not be drawn either. However, a statistically significant effect ($p < 0.05$) of MF direction on the mycelial shape factor was observed on the fourth day of growth, during the early adaptation phase. This suggests a potential MF influence on initial growth processes and possible signs of a magnetotropic response. The obtained results suggest that while the overall MF effect on growth intensity and cordycepin accumulation in this study lacked statistical significance, the mycelium might react sensitively to MF direction during early growth stages. Further studies with larger sample sizes and MF exposure of varying strengths are necessary to confirm these observations.

LITERATŪRA

1. 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>
2. Anaya, M., Gámez-Espinosa, E., Valdés, O., Guzmán, T., & Borrego, S. (2021). Effect of the oscillating magnetic field on airborne fungal. *Archives of Microbiology*, 203(5), 2139–2145. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02193-x>
3. Barnes, F. S. (2005). Mechanisms for electric and magnetic fields effects on biological cells. *IEEE Transactions on Magnetics*, 41(11), 4219–4224. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2005.855480>
4. Blakemore, R. (1975). Magnetotactic Bacteria. *Science*, 190(4212), 377–379. <https://doi.org/10.1126/science.170679>
5. Blatt, M. R., Pullum, G. K., Draguhn, A., Bowman, B., Robinson, D. G., & Taiz, L. (2024). Does electrical activity in fungi function as a language? *Fungal Ecology*, 68, 101326. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2023.101326>
6. Bóbics, R., Krüzselyi, D., & Vetter, J. (2016). Nitrate content in a collection of higher mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 430–436. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7108>
7. Bonhomme-Faivre, L., Marion, S., Forestier, F., Santini, R., & Auclair, H. (2003). Effects of Electromagnetic Fields on the Immune Systems of Occupationally Exposed Humans and Mice. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 58(11), 712–717. <https://doi.org/10.3200/AEOH.58.11.712-717>

8. Buchachenko, A. L., Kuznetsov, D. A., & Breslavskaya, N. N. (2012). Chemistry of Enzymatic ATP Synthesis: An Insight through the Isotope Window. *Chemical Reviews*, 112(4), 2042–2058. <https://doi.org/10.1021/cr200142a>
9. Chopdar, R. K. (2024). ELECTROMAGNETISM: CONCEPTS AND APPLICATIONS. *JOURNAL OF THEORY, MATHEMATICS AND PHYSICS*, 3(5), Article 5.
10. Cunningham, K. G., Manson, W., Spring, F. S., & Hutchinson, S. A. (1950). Cordycepin, a Metabolic Product isolated from Cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. *Nature*, 166(4231), 949–949. <https://doi.org/10.1038/166949a0>
11. Das, G., Shin, H.-S., Leyva-Gómez, G., Prado-Audelo, M. L. D., Cortes, H., Singh, Y. D., Panda, M. K., Mishra, A. P., Nigam, M., Saklani, S., Chaturi, P. K., Martorell, M., Cruz-Martins, N., Sharma, V., Garg, N., Sharma, R., & Patra, J. K. (2021). Cordyceps spp.: A Review on Its Immune-Stimulatory and Other Biological Potentials. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.602364>
12. Davis, M., Sommer, R., & Menge, J. (2019). *Field Guide to Mushrooms of Western North America*. University of California Press. <https://doi.org/10.1525/9780520953604>
13. Erdmann, W., Kmita, H., Kosicki, J., & Kaczmarek, Ł. (2021). How the Geomagnetic Field Influences Life on Earth – An Integrated Approach to Geomagnetobiology. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 51, 1–27. <https://doi.org/10.1007/s11084-021-09612-5>
14. Fouquet, H., Wick, R., Böhme, R., Sauer, H. W., & Scheller, K. (1975). Effects of cordycepin on RNA synthesis in *Physarum polycephalum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 168(1), 273–280. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(75\)90251-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(75)90251-9)

15. Hasenstein, K. H. (1999). Gravisensing in plants and fungi. *Advances in Space Research*, 24(6), 677–685. [https://doi.org/10.1016/S0273-1177\(99\)00399-3](https://doi.org/10.1016/S0273-1177(99)00399-3)
16. Holysz, L., Szczes, A., & Chibowski, E. (2007). Effects of a static magnetic field on water and electrolyte solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 316(2), 996–1002. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.08.026>
17. Hsien, I., & Teng, C. (2005). A Puzzle of the Effect of Magnetic Field on Biological Cells. *Life Science Journal*, 2.
18. Hur, H. (2008). Chemical Ingredients of Cordyceps militaris. *Mycobiology*, 36(4), 233–235. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2008.36.4.233>
19. Jaruševičius, G., Rugelis, T., McCraty, R., Landauskas, M., Berškienė, K., & Vainoras, A. (2018). Correlation between Changes in Local Earth's Magnetic Field and Cases of Acute Myocardial Infarction. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/ijerph15030399>
20. Jaworska, M., Domanski, J., Tomasik, P., & Znoj, K. (2016). Stimulation of pathogenicity and growth of entomopathogenic fungi with static magnetic field. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123(6), 295–300. <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0035-y>
21. Kredich, N. M., & Guarino, A. J. (1961). Studies on the biosynthesis of cordycepin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 47(3), 529–534. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(61\)90546-7](https://doi.org/10.1016/0006-3002(61)90546-7)
22. Li, W., Ma, H., He, R., Ren, X., & Zhou, C. (2021). Prospects and application of ultrasound and magnetic fields in the fermentation of rare edible fungi. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105613. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105613>

23. Lucena, G. N., Santos, C. C. dos, Pinto, G. C., Piazza, R. D., Guedes, W. N., Jafelicci Júnior, M., de Paula, A. V., & Marques, R. F. C. (2020). Synthesis and characterization of magnetic cross-linked enzyme aggregate and its evaluation of the alternating magnetic field (AMF) effects in the catalytic activity. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 516, 167326. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2020.167326>
24. Mansuripur, M., Zakharian, A. R., & Wright, E. M. (2013). Electromagnetic-force distribution inside matter. *Physical Review A*, 88(2), 023826. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.88.023826>
25. Nagy, P., & Fischl, G. (2004). Effect of static magnetic field on growth and sporulation of some plant pathogenic fungi. *Bioelectromagnetics*, 25(4), 316–318. <https://doi.org/10.1002/bem.20015>
26. Narasimhan, S., & Bindu, S. (2023). An assessment of the application of magnetic fields in the study of in vitro plant cell and tissue cultivation. *Research Journal of Biotechnology*, 18(12), 147–150. <https://doi.org/10.25303/1812rjbt1470150>
27. Radhi, M., Ashraf, S., Lawrence, S., Tranholm, A. A., Wellham, P. A. D., Hafeez, A., Khamis, A. S., Thomas, R., McWilliams, D., & de Moor, C. H. (2021). A Systematic Review of the Biological Effects of Cordycepin. *Molecules*, 26(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/molecules26195886>
28. Ružič, R., Gogala, N., & Jerman, I. (1997). Sinusoidal Magnetic Fields: Effects on the Growth and Ergosterol Content in Mycorrhizal Fungi. *Electro- and Magnetobiology*, 16(2), 129–142. <https://doi.org/10.3109/15368379709009838>
29. Santos, L. O., Deamici, K. M., Menestrino, B. C., Garda-Buffon, J., & Costa, J. A. V. (2017). Magnetic treatment of microalgae for enhanced product formation. *World Journal*

of Microbiology and Biotechnology, 33(9), 169. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2332-4>

30. Shrestha, B., Zhang, W., Zhang, Y., & Liu, X. (2012). The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: Research and development. *Mycological Progress*, 11(3), 599–614.
<https://doi.org/10.1007/s11557-012-0825-y>
31. 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)
32. The Earth’s Magnetic Field. (2006). In *The Earth’s Magnetism* (pp. 1–66). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-27980-8_1
33. Tiamooz, S., Al-Juthery, H., & Ali, M. (2020). The Study Effect of field Magnetic on some of average fungi of the soil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 553, 012036. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/553/1/012036>
34. Tuli, H. S., Sharma, A. K., Sandhu, S. S., & Kashyap, D. (2013). Cordycepin: A bioactive metabolite with therapeutic potential. *Life Sciences*, 93(23), 863–869.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.09.030>
35. Veiga, M. C., Fontoura, M. M., de Oliveira, M. G., Costa, J. A. V., & Santos, L. O. (2020). Magnetic fields: Biomass potential of *Spirulina* sp. for food supplement. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(7), 1231–1240.
<https://doi.org/10.1007/s00449-020-02318-4>
36. Wang, D., Gao, D., Peng, Z., & Yu, S. (1998, January 1). *Primary study of zarrouk-media treated by special magnetic field on production of polysaccharide of Spirulina platensi*. *Wei sheng wu xue tong bao*.

37. Wang, F., Song, X., Dong, X., Zhang, J., & Dong, C. (2017). DASH-type cryptochromes regulate fruiting body development and secondary metabolism differently than CmWC-1 in the fungus *Cordyceps militaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(11), 4645–4657. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8276-7>
38. Weydahl, A., Sothorn, R. B., Cornélissen, G., & Wetterberg, L. (2000). Geomagnetic activity influences the melatonin secretion at latitude 70° N. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 55, s57–s62. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(01\)90006-X](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(01)90006-X)
39. Wittekindt, E., Broers, D., Kraepelin, G., & Lamprecht, I. (1990). Influence of non-thermic AC magnetic fields on spore germination in a dimorphic fungus. *Radiation and Environmental Biophysics*, 29(2), 143–152. <https://doi.org/10.1007/BF01210559>
40. Yue, K., Ye, M., Zhou, Z., Sun, W., & Lin, X. (2013). The genus *Cordyceps*: A chemical and pharmacological review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(4), 474–493. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01601.x>
41. Zablotskii, V., Polyakova, T., Lunov, O., & Dejneka, A. (2016). How a High-Gradient Magnetic Field Could Affect Cell Life. *Scientific Reports*, 6(1), 37407. <https://doi.org/10.1038/srep37407>

PADĖKA

Noriu padėkoti Rokui Buišui, Indrei Lapeikaitei, Vilmai Kisnierienei, Vilmantui Pupkiui, Aušrinei Navickaitei, Ramutei Pagalytei, Gintautui Bagždžiunui, Anitai Elizabeth Clarke už pagalbą ir idėjas ruošiant baigiamąjį bakalauro darbą.