

Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen Academiejaar 2010-2011

## Modelleren van mycelium netwerken in complexe substraten

#### Denis De Wilde

Promotoren: Prof. Dr. B. De Baets en Pof. Dr. Ir. Joris Van Acker Begeleiders: Ir. Jan M. Baetens en Dr. Ir. Jan Van den Bulcke

> Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van Master in de bio-ingenieurswetenschappen: milieutechnologie



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen Academiejaar 2010-2011

## Modelleren van mycelium netwerken in complexe substraten

#### Denis De Wilde

Promotoren: Prof. Dr. B. De Baets en Pof. Dr. Ir. Joris Van Acker Begeleiders: Ir. Jan M. Baetens en Dr. Ir. Jan Van den Bulcke

> Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van Master in de bio-ingenieurswetenschappen: milieutechnologie

The author and supervisor give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using results from this thesis.

De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.

Gent, juni 2011

De promotoren,

Prof. Dr. Bernard De Baets Prof. Dr. Ir. Joris Van Acker De begeleiders,

Ir. Jan Baetens en Dr. Ir. Jan Van den Bulcke De auteur,

Denis De Wilde

### Voorwoord

Een voorwoord voor een werk dat een nabeschouwing is van de afgelopen vijf jaar, het is de conclusie hiervan die de aanzet is geweest tot deze thesis. Bio-ingenieur als uitloper van het humaniora geeft het beschouwende aspect in de menswording sterkte. De beschouwing van de werkelijkheid en het vatten ervan is dan ook de grond van deze thesis.

Het was een interessante reis, de zoektocht naar oplossingen geeft me een intrinsiek gevoel van vrijheid. Gebonden door de probleemstelling is er immers de onbeperkte pool aan oplossingen. Het was dan ook moeilijk een einde te maken aan deze scriptie gezien de voorgestelde oplossingen telkens een waaier van nieuwe uitbreidingen gaven.

Prof. Dr. De Baets en Prof. Dr. Ir. Joris Vanacker wil ik danken om deze thesis mogelijk te maken. De beschikbaarheid en de input van de begeleiders Ir. Jan Baetens en Dr. Ir. Jan Van den Bulcke was tijdens deze scriptie van onschatbare waarde. Het enthousiasme waarmee mijn begeleiders aan wetenschappelijk onderzoek doen gaf kleur aan deze scriptie en bij deze wil ik hen hiervoor danken. Mijn vrienden van het thesislokaal, Lien Eyerman en Wouter Naessens, wil ik danken voor hun boeiende en veelzijdige persoonlijkheden die een bron waren van veel plezier. Tot slot wil ik mijn vriendin en ouders danken voor het warme kader die zij vormden om deze scriptie te schrijven.

## Inhoudsopgave

Vo	Voorwoord ii				
1	Inle	iding		1	
2	Fila	menteu	ze schimmels	3	
	2.1	Defini	tie en toelichting	3	
	2.2	Belang	g	4	
	2.3	Ecolog	gie	6	
	2.4	Morfo	logie	7	
	2.5	Mecha	nismen achter gepolariseerde groei en hyfe-oriëntatie	9	
	2.6	Vertak	kingsmechanismen	10	
		2.6.1	Modelleren van het vertakken	10	
		2.6.2	Beschrijving van vertakkingspatronen	11	
		2.6.3	Analyse van het mycelium	12	
3	Spee	ctrum a	an wiskundige modellen	15	
	3.1	Inleidi	ng	15	
	3.2	Cellula	aire Automaten	18	
	3.3 Modelleren van filamenteuze schimmels		20		
		3.3.1	Continu model ter beschrijving van filamenteuze schimmelgroei door Boswell	22	
		3.3.2	Discreet model ter beschrijving van filamenteuze schimmelgroei	26	
4	Imp	lementa	atie 2D discreet model	32	
	4.1	Aanpa	ssingen aan het bestaande model	32	
	4.2	Soft- e	n hardware	33	

#### INHOUDSOPGAVE

	4.3	Overzicht	33
	4.4	Aanpassing $\Delta x$	35
	4.5	Bijsturing van de tijdstap	37
	4.6	Groei	39
	4.7	Vertakken	42
	4.8	Translocatie	42
	4.9	Opname nutriënten en onderhoud	44
	4.10	Rekentijd	48
5	Resu	lltaten	49
	5.1	Validatie van het ontwikkelde model	49
	5.2	Benchmark situaties	56
		5.2.1 Overzicht	56
		5.2.2 Situatie 1	59
		5.2.3 Situatie 2	60
		5.2.4 Situatie 3	61
		5.2.5 Situaties 4 en 5	62
		5.2.6 Situatie 6	63
6	Alge	mene conclusie en verder werk	67

#### iv

## Lijst van figuren

2.1	Sporedragend mycelium van de witrotter Sporotrichum sp. [1]	5
2.2	Digitaal beeld van groeiend mycelium [2]	7
2.3	Experimentele gegevens die de groei beschrijven voor <i>Geotrichum candidum</i> op vast DM medium bij 25 °C [3]. Er wordt gebruik gemaakt van logarimische assen om de totale hyfelengt, het aantal tippen en HGU in functie van de tijd weer te geven.	13
2.4	Beeldvorming van de hyfetip van N. crassa[4].	14
2.5	Een model dat de tipgroei beschrijft conform de recente bevindingen [5]	14
3.1	Patronen uit 1D CA die worden teruggevonden op de schelp van de <i>Oliva porp-</i> <i>hyria</i> [6].	17
3.2	Tesselatie van een 2D vlak	18
3.3	Evolutie van regel 22 in tijd en ruimte	19
3.4	De Moore en von Neumann omgeving bij cellulaire automaten	19
3.5	De evolutie van een 1D CA met regel 22 met willekeurige initiële condities	20
3.6	Twee parallel groeiende hyfen waarbij de cel met nummer 1 twee actieve buren heeft en de cel met nummer 2 er drie heeft.	27
3.7	Tesselatie van een 2D vlak	29
3.8	Twee hexagonale cellen uit de tesselatie waardoor een hyfe loopt. De hyfe met hyfetip wordt aangeduid door een pijl.	31
4.1	Constructie van een hexagonale tesselatie.	34
4.2	Gesimuleerd myceliumnetwerk na 1000 tijdstappen gebruik makend van het aangepaste CA-gebaseerde model overeenkomstig de parameterwaarden en initiële condities uit Tabel 4.1 waarin $b$ gelijk aan $10^8$ gekozen wordt. De zwarte pijlen stellen de hyfen met hun groeirichting voor en de rood ingekleurde cellen de hyfetippen waar in een volgende tijdstap groei mogelijk is.	35
4.3	Tesselatie van een 2D vlak	37

#### LIJST VAN FIGUREN

4.4	(a) Visualisatie van een hyfe die twee vertakkingen heeft in $c_k$ , de zwarte pijlen stellen de hyfen met hun groeirichting voor. (b) Abstractie van drie hyfen voor- gestels als rechthoeken, die door $c_k$ groeien wanneer deze eenzelfde diameter hebben als $c_k$ . Hyfe 1 heeft twee vertakkingen die Hyfe 2 en Hyfe 3 genoemd worden. De gele kleur geeft weer waar een hyfe aanwezig is, de groene kleur geeft weer waar er twee hyfen op elkaar liggen, de blauwe kleur waar er drie hyfen op elkaar liggen.	38
4.5	Implementatie anastomosis	40
4.6	Illustratie van diffusie in de richting van een centraal gelegen cel indien er twee actieve buren zijn met een hogere interne substraatconcentratie hebben.	43
4.7	De opname [mol glucose/ $\Delta t$ ] overeenkomstig de Michaëlis-Menten vergelijking in functie van $s_e$ voor een hyfe met $s_i$ =4 10 <sup>-5</sup> .	47
4.8	De rekentijd in functie van de gesimuleerde periode met $s_i(c_k, 0) = 10^{-6}$	48
5.3	$v_{max}$ [mol glucose (0.01vmm hyfe) <sup>-2</sup> $\Delta t^{-1}$ ] voor de centrale cel van het inoculum gedurende een simulatie van 4 uren	52
5.5	De gesimuleerde totale hyfelengte (a) en het aantal hyfetippen (b) volgens [7].	54
5.6	De gemiddelde hoeveelheid intern beschikbare energie $E_i$ , uitgedrukt in mol glucose, gedurende 10 simulaties van vijf uren. Het gekleurde gebied stelt de standaardafwijking voor op de simulaties.	54
5.7	De gesimuleerde groeisnelheid van het myceliumnetwerk in een heterogene om- geving die wordt uitgemiddeld over een tijdsinterval gelijk aan 400 $\Delta t$ indien er (a) $s_i(c_k, 0) = 10^{-6}$ [mol glucose mm <sup>-2</sup> ] of (b) $s_i(c_k, 0) = 3 \ 10^{-5}$ [mol glu- cose mm <sup>-2</sup> ].	55
5.8	Het initiële myceliumnetwerk voor de verschillende benchmark situaties. De rode cellen bevatten hyfetippen, de grijze cellen bevatten enkel mycelium. Dit wordt voorgesteld door pijlen waarbij de tip een hyfetip voorstelt.	56
5.9	Kleurenlegende overeenkomstig $s_i(c_k, t)$ gedeeld door 3/8 $s_i(c_k, 0)$ , als dit quotiënt naar nul gaat zullen de cellen $c_k$ blauw ingekleud worden, anders rood	57
5.10	Overzicht benchmark situaties aangaande $s_e(c_k, 0)$	58
5.11	Visualisatie van het gesimuleerde myceliumnetwerk in Situatie 1	59
5.12	De gesimuleerde groeisnelheid van het myceliumnetwerk in een heterogene om- geving die wordt uitgemiddeld over een tijdsinterval gelijk aan 400 $\Delta t$ indien er (a) in een homogene omgeving of (b) in een heterogene omgeving gegroeid wordt.	60
5.13	Visualisatie van het gesimuleerde myceliumnetwerk in Situatie 3	61
5.15	Visualisatie van het gesimuleerde myceliumnetwerk in Situatie 4	63
5.16	Visualisatie van het gesimuleerde myceliumnetwerk in Situatie 5	64

#### LIJST VAN FIGUREN

5.17	Het myceliumnetwerk van Physarum polycephalum(geel) dat de voedingsbron-		
	nen (wit) op zijn pad optimaal verbindt [8].	65	
5.19	Visualisatie van het gesimuleerde myceliumnetwerk in Situatie 6	66	

## Lijst van tabellen

2.1	Enkele producten die gewonnen worden bij het cultiveren van filamenteuze fungi	4
3.1	Classificatie van ruimtelijk expliciete modellen volgens het al dan niet continu (C) of discreet (D) zijn van ruimte (R), tijd (T) en toestand (S)	15
3.2	Betekenis en dimensies van de modelparameters die gebruikt worden in de stel- sels PDV 3.14-3.19 en 3.4-3.8.	24
4.1	De waarde van de modelparameters die gebruikt worden in het 2D discreet mo- del [9]	36
4.2	Overzicht van de gebruikte lijsten die horen bij het gesimuleerde myceliumnet- werk op tijdstap $t_n$ en $t_n + \Delta t$ dat afgebeeld staat op Figuur 4.3.	36
5.1	Overzicht benchmark situaties met betrekking tot de initiële verdeling van het externe substraat.	56

## Lijst van symbolen

Symbool	Betekenis
L	Lengte
Т	Tijd
Μ	Massa
b	Vertakkingsgraad
$c_i$	Cellen in de tesselatie die inactief mycelium bevatten
$c_k$	Cellen in de tesselatie die actief mycelium bevatten
Cl	Cellen in de tesselatie waarnaar gegroeid wordt gedurende $\Delta t$
$c_r$	Cellen in de tesselatie die het deel van de hyfe net voor de hyfetippen
$c_t$	Cellen in de tesselatie die hyfetippen bevatten
$c_w$	Cellen in de tesselatie waarnaar vertakt wordt gedurende $\Delta t$
$c_z$	Alle cellen waaruit de tesselatie opgebouwd is
$d_a$	Hyfale vacuolatiegraad (inactivatie)
$d_i$	Hyfale autolysegraad (afbraak)
v	Groeisnelheid van de hyfale tippen per eenheid intern substraat
f	Anastomosisgraad
$D_i$	Diffusiecoëfficiënt van het intern substraat
$D_a$	Actief transport van intern substraat
$D_e$	Diffusiecoëfficiënt van het extern substraat
$c_1$	Effectieve opname van substraat
$c_2$	Kost voor groei aan de hyfale tippen
$c_3$	Totale opname substraat
$c_4$	Kost voor actieve substraat translocatie
m	Lengte aan actieve hyfen per oppervlakte
m'	Lengte aan inactieve hyfen per oppervlakte
n	Aantal hyfetippen
p	Densiteit aan hyfetippen
$s_i$	Interne substraatconcentratie
$s_e$	Externe substraatconcentratie
$D_p$	Diffusiecoëfficiënt
ρ	Dichtheid
X	Biomassa

#### LIJST VAN TABELLEN

$h_d$	Gemiddelde diameter van een hyfe
$h_l$	Gemiddelde lengte van het mycelium
$\delta(p)$ Snelheid waarmee de hyfen afsterven	$[T^{-1}]$
$\sigma(n,p)$	Snelheid waarmee er nieuwe hyfetippen gevormd worden
E	Groeisnelheid van de hyfen

### Samenvatting

Het modelleren van myceliumnetwerken wordt typisch aan de hand van partiële differentiaalvergelijkingen (PDV) gedaan. Het gebruik van cellulaire automaten (CA) is recent interessant geworden doordat de rekenkracht van de computers sterk is toegenomen en laat toe om groei in een heterogene omgeving te simuleren, wat niet mogelijk is met PDV. De modelstructuur voor het CA-gebaseerde model gaat uit van een discretisatie van de PDV die klassiek gebruikt worden voor het modelleren van myceliumnetwerken en dit voor *R. solani* in 2D.

Het ontwikkelde CA-gebaseerde model is gebaseerd op werk van Boswell et al. [9]. Hierbij kwamen enkele inconsistenties aan het licht bij de dimensieanalyse van de onderliggende partiële differentiaalvergelijkingen (PDV). Verder wordt bewezen dat de voorgestelde tijdstap  $\Delta t$  in [9] bijna 100 keer te groot is om een stabiele discretisatie van het diffusieproces te verzekeren. De parameterwaarden en initiële condities in [9] komen niet overeen met deze uit [10] dat de basis vormt van eerder genoemd artikel. Ten slotte is de diameter van de hexagonale cellen  $(\Delta x)$  waaruit de tesselatie is opgebouwd in [9] is zo klein dat er problemen kunnen ontstaan bij de virtuele opname van glucose. Als oplossingen werden respectievelijk een opnamekinetiek volgens Michaëlis-Menten, parameterwaarden en initiële condities uit [10], een beperking van  $\Delta t$  door de CFL voorwaarde [14] en een grotere  $\Delta x$  voorgesteld. De implementatie van het CA-gebaseerde model in [9] met de zonet opgesomde aanpassingen vormen dan ook de kern van het ontwikkelde CA-gebaseerde model.

Het ontwikkelde CA-gebaseerde model werd vervolgens gevalideerd met experimentele gegevens aangaande de macroscopische karakteristieken van de filamenteuze schimmels R. solani en A. niger. De macroscopische karakteristieken van het gesimuleerde myceliumnetwerk komen overeen met de experimenteel bepaalde gegevens. Er kan besloten worden dat de basisprocessen, verantwoordelijk voor de groei van myceliumnetwerken, in het ontwikkelde CA-gebaseerde model vervat zijn. Vervolgens wordt het ontwikkelde model toegepast om myceliumgroei in een heterogene omgeving te simuleren. Op macroscopische schaal werd hierbij waargenomen dat het gesimuleerde myceliumnetwerk gebieden met relatief meer substraat ook meer exploreert. Er vormt zich immers een dens myceliumnetwerk op deze plaatsen. Verder is een belangrijke karakteristiek van de filamenteuze schimmel het transloceren van voeding naar zones in het netwerk waar schaarste is, ook dit komt tot uiting in het gesimuleerde myceliumnetwerk. Verder wordt er aangetoond dat indien  $\Delta t$  door de CFL-voorwaarde begrensd wordt er meer translocatie is naar zones van schaarste dan in het geval  $\Delta t$  niet begrensd wordt door de CFL-voorwaarde. Door de verhoogde translocatie is er immers meer voeding in deze zones van het gesimuleerde netwerk en wordt er meer groei waargenomen. De uiteindelijke morfologie van het gesimuleerde myceliumnetwerk wordt dus sterk beïnvloed door de grootte van  $\Delta t$ . Indien meerdere

#### LIJST VAN TABELLEN

voedingsbronnen in een substraatloze omgeving verspreid worden heeft de werkelijke filamenteuze schimmel de eigenschap deze voedingsbronnen optimaal te verbinden, in zulke mate zelfs dat het uiteindelijke myceliumnetwerk sterke overeenkomsten heeft met het sporennetwerk [8]. Als finale validatie van het ontwikkelde CA-gebaseerde model werden voedingsbronnen overeenkomstig de plaats van de belangrijkste steden van België geplaast in een substraatloze omgeving. Het gesimuleerde myceliumnetwerk was in staat om na 12 uren gesimuleerde tijd de steden te vinden, echter de suboptimale hyfen (verbindingen) bleven bestaan. Indien enkel de hyfen gevisualiseerd worden, zodra deze een grenswaarde van intern aanwezig substraat overschrijden komt ruwweg een optimaal verbindingsnet naar boven. Een parametrisatie van de paramter w die zorgt voor de inactivatie en het uiteindelijk afsterven van hyfen is daarom in de toekomst aan de orde om het ontwikkelde CA-gebaseerde model als optimalisatiealgoritme in te zetten. Desalniettemin vormt het ontwikkelde CA-gebaseerde model een biologisch relevant model zodat het de basis kan vormen voor verdere uitbreidingen.

De ruimte waarin het myceliumnetwerk gesimuleerd wordt zou in verder werk kunnen uitgebreid worden tot drie dimensies. De richtingen waarin hyfen kunnen vertakken en groeien nemen hierbij sterk toe zodat het efficiënt programmeren van het algoritme een essentiële rol zal spelen om de nodige rekentijd te beperken. Indien een extra toestand van de cellen ingevoerd wordt aangaande aanwezigheid van hout, zou er bij het inladen van een 3D scan van hout, een simulatie kunnen gebeuren in deze houtstructuur. Aan de hand van CT-scans kunnen reeds beelden gevormd worden van het myceliumnetwerk in houtstructuren [11], die een validatie van de bekomen simulaties mogelijk maken. Op deze manier zou een CA-gebaseerd model ontwikkeld kunnen worden dat de afbraak van hout na schimmelinfectie kan modelleren, wat vele toepassingen kan hebben.

# Inleiding

In deze scriptie wordt de groei van het myceliumnetwerk van filamenteuze schimmels in 2D onder beschouwing genomen. Er wordt een biologisch relevant model ontwikkeld dat vervolgens gevalideerd wordt met experimentele gegevens over schimmelgroei in een vlak (petriplaat). Hierbij wordt een letterlijke invulling gegeven aan de titel bio-ingenieur, namelijk 'het bouwen van levende materie', al is bouwen in dit geval op een artificiële wijze. Indien blijkt dat het ontwikkelde model de werkelijke groei van filamenteuze schimmels in 2D kan benaderen wordt bewezen dat de belangrijkste biologische processen die de morfologie van het myceliumnetwerk bepalen erin vervat zitten. Het kunnen voorspellen van schimmelgroei heeft vele toepassingen. In het geval hout verbrandt wordt om energie te produceren is het voorspellen van mogelijke verliezen door schimmelinfectie belangrijk. Vervolgens hebben filamenteuze schimmels de eigenschap voedingsbronnen optimaal te verbinden, de gevormde myceliumnetwerken hebben dan ook sterke gelijkenissen met het sporennet dat steden optimaal verbindt [8]. Het ontwikkelde model zou dan ook gebruikt kunnen worden om het huidige sporennet te optimaliseren. Ten slotte heeft de filamenteuze schimmel een uiterst belangrijke rol in de productie van antibiotica en citroenzuur waardoor het vatten van de biologische processen in filamenteuze schimmels een essentiële factor is in het optimaliseren van het productieproces.

Het gedrag van filamenteuze schimmels kan op verschillende schalen bestudeerd worden. Op microscopische schaal kunnen we het gedrag van individuele hyfen met een breedte van enkele  $\mu$ m bekijken en op macroscopische schaal de mycelianetwerken die tot enkele vierkante kilometers groot worden. In 2003 werd in de Amerikaanse staat Oregon een sombere honingzwam (*Armillaria ostoyae*) ontdekt met een ondergronds myceliumnetwerk dat zich uitstrekt over 8,9 km<sup>2</sup> wat deze sombere honingzwam het grootste organisme ter wereld maakt. De leeftijd van deze sombere honingzwam wordt tussen de 2000 en 8500 jaar geschat [12]. Gezien de grootte van een myceliumnetwerk is het van belang de gedragingen op de verschillende schalen

#### HOOFDSTUK 1. INLEIDING

met elkaar te linken om een dieper inzicht te krijgen hoe een filamenteuze schimmel zijn netwerk vormt. Microscopische technieken kunnen uitzonderlijk gedetailleerde informatie leveren over processen op hyfeniveau maar deze processen linken over verschillende ruimtelijke schalen is pas mogelijk wanneer er gewerkt wordt met wiskundige modellen die groei op hyfe niveau linken met de respons en functie op het niveau van het myceliumnetwerk.

MacArthur schreef [13]: To do science is to search for general patterns. Not all naturalists want to do science; many take refuge in nature's complexity in a justification to oppose any search for patterns. This book is addressed to those who do wish to do science'. Het boek van Wolfram [6] 'A new kind of science' ligt in lijn met deze gedachte gezien hij hierin aantoont dat er met cellulaire automaten (CA) bestaande uit eenvoudige regels complexe patronen verkregen kunnen worden. Om de complexiteit in morfologie van filamenteuze schimmels op microscopische en macroscopische schaal te verklaren zal er in deze scriptie een CA-gebaseerd model ontwikkeld worden.

Het model is gebaseerd op het CA-gebaseerde model dat voorgesteld werd door Boswell et al. [9]. Hierbij kwamen enkele inconsistenties aan het licht bij de dimensieanalyse van de onderliggende partiële differentiaalvergelijkingen (PDV). Verder wordt bewezen dat de voorgestelde tijdstap  $\Delta t$  in [9] bijna 100 keer te groot is om een stabiele discretisatie van het diffusieproces te verzekeren. De parameterwaarden en initiële condities in [9] komen niet overen met deze uit [10] dat de basis vormt van eerder genoemd artikel. Ten slotte is de diameter van de hexagonale cellen ( $\Delta x$ ) waaruit de tesselatie bestaat in [9] is zo klein dat er problemen kunnen ontstaan bij de virtuele opname van glucose. Als oplossingen werden respectievelijk een opnamekinetiek volgens Michaëlis-Menten, parameterwaarden en initiële conditie uit [10], een beperking van  $\Delta t$  door de CFL voorwaarde [14] en een grotere  $\Delta x$  voorgesteld. De implementatie van het CA-gebaseerde model in [9] met de zonet opgesomde aanpassingen vormen dan ook de kern van het ontwikkelde CA-gebaseerde model. Het ontwikkelde CA-gebaseerde model wordt vervolgens gevalideerd met experimentele gegevens aangaande de macroscopische karakteristieken van de filamenteuze schimmels R. solani en A. niger. Vervolgens wordt het ontwikkelde model met heterogene initiële condities toegepast en het gesimuleerde mycliumnetwerk geanalyseerd. Eigenschappen zoals translocatie van substraat door het myceliumnetwerk van gebieden met overvloed aan substraat naar gebieden van schaarste wordt waargenomen. Een aanzet tot het gebruik als optimalisatiealgortime wordt tevens gemaakt waarbij het luik naar verder werk geopend wordt.

## Filamenteuze schimmels

#### 2.1 Definitie en toelichting

Schimmels vertegenwoordigen een eigen rijk in de taxonomie. Het zijn eukaryote organismen met een celkern, mitochondriën en een cytoskelet. Draadvormige fungi zijn meercellige schimmels die bestaan uit een netwerk van schimmeldraden genaamd hyfen. De hyfen zijn tubulaire cellen die zich apicaal uitbreiden en vertakken. Een hyfe bestaat uit 1 of meerdere cellen die omgeven zijn door een tubulaire celwand. Bij de meeste fungi worden de hyfen opgedeeld in cellen door een septum. De poriën van het septum zijn groot genoeg om mitochondriën, ribosomen of zelfs nuclei door te laten. Het netwerk van hyfen wordt het mycelium genoemd en vormt het vegetatieve deel van de schimmel. De microscopische morfologie bestaat uit een populatie van hyfen terwijl de macroscopische morfologie deze is van het mycelium. De totale hyfelengte van het mycelium is de som van de lengtes van alle individuele hyfen.

Hyfale groei kan gebeuren aan de hyfetippen of door intercalaire groei. Intercalaire groei komt enkel voor in de bovengrondse stucturen zoals de conidioforen en sporangioforen. De vegetatieve hyfen groeien enkel als gevolg van elongatie van de hyfetippen. Hierbij worden de bouwstoffen om groei mogelijk te maken in ouder weefsel gemaakt en vervolgens aangevoerd om geïncorporeerd te worden in de wand van de hyfetip. Deze rolt als het ware over het medium. Intercalaire groei daarentegen is het gevolg van de groei van intercalair gelegen compartimenten en duwt de hyfetip vooruit waardoor er wrijvingskrachten optreden die de groei inefficiënt maken en het moeilijker wordt om de rigiditeit van de hyfewand te behouden. In bovengrondse structuren zoals de vruchtlichamen van Basidiomyceten is er geen wrijving en wordt er intercalaire groei waargenomen [15].

Doorheen de hyfen worden nutriënten getransporteerd wat translocatie genoemd wordt.

Translocatie beslaat enerzijds passieve diffusie aangestuurd door een concentratiegradiënt en anderzijds actief transport naar de hyfetippen toe.

De belangrijkste macroscopische parameter voor de karakterisatie van schimmelgroei is de totale biomassa. Wanneer we de dichtheid  $\rho [M L^{-3}]$  van de hyfe constant beschouwen kan de biomassa X [M] geschat worden aan de hand van de totale lengte aan hyfen  $h_l [L]$  en de gemiddelde diameter van een hyfe  $h_d [L]$  (2.1).

$$X = \rho h_d h_l \tag{2.1}$$

Het schatten van de biomassa over een serie tijdsintervallen geeft de groeisnelheid van de hyfen  $E [L T^{-1}]$  en de snelheid waarmee biomassa aangemaakt wordt. Real-time analyse van de microscopische parameter  $h_l [L]$  gebeurt tegenwoordig met geautomatiseerde beeldverwerking. In sommige analyses wordt er gesuggereerd dat de hyfetippen in pulsen groeien [16], alhoewel dit in andere artikels tegengesproken wordt [17]. Hierbij is het argument de grootte van de pixels bij het verkrijgen van beelden met analoge en digitale camera's kan leiden tot een gepulseerde groei [18].

#### 2.2 Belang

In elk ecosysteem hebben filamenteuze schimmels een belangrijk aandeel in de redistributie en hergebruik van nutriënten en mineralen door hun sterke afbraakeigenschappen. Deze eigenschappen worden door de mens geëxploiteerd na isolatie van afbraakenzymen uit deze filamenteuze fungi [19], biodegradatie van afvalproducten [20, 21, 22] en fermentatieprocessen op ruwe grondstoffen [23]. Bijkomend worden deze organismen op grote schaal gekweekt om antibiotica en citroenzuur te produceren. Tabel 1 geeft een overzicht van enkele belangrijke producten die door filamenteuze fungi geproduceerd worden.

Product	Organisme	Referentie
Citroenzuur	Aspergillus niger	[24]
Peniciline	Penicillium chrysogenum	[25]
Cephalosporine	Acremonium chrysogenum	[25]
Glucoamylase	Aspergillus niger	[26]
Immunoglobuline IgG 1	Aspergillus niger	[27]
Menselijk interleukine 6	Aspergillus niger	[28]

Tabel 2.1: Enkele producten die gewonnen worden bij het cultiveren van filamenteuze fungi

De prijzen van petroleum afgeleide koolstofketens voor het gebruik in de chemische synthese worden verwacht te stijgen, waardoor het belang van de citroenzuurproductie door filamenteuze schimmels zou toenemen [29]. Een belangrijke basidiomyceet die op hout groeit is

de witrot schimmel (Figuur 2.1) door zijn efficiënte secretie van laccasen. Dit zijn fenol oxiderende enzymen die inwerken op het moeilijk afbreekbare lignine. Deze enzymen hebben zowel lignolytische als polymeriserende (cross-linking) eigenschappen. Door het 'Laccase Mediator Systeem' (LMS) kunnen laccasen ook niet-fenolische verbindingen afbreken. Deze van schimmels afkomstige enzymen hebben een breed toepassingsgebied in de papier- en pulpindustrie. Ze worden gebruikt voor bioleaching van pulp om energie te besparen, gevaarlijke chemicaliën te vervangen, verwijdering van inkt om de recycleerbaarheid van papier te verhogen, verwijdering van fenolische vervuilende componenten uit hout of water en behandeling van het effluent van de papierindustrie. De voordelen van deze enzymen zijn hun natuurlijke oorsprong, lage toxiciteit en milde operationele vereisten wat de energiekost verlaagt aangezien er normaal bij extreme druk of temperatuur gewerkt moet worden [30]. Schimmels leven daarnaast ook in symbiose met planten en bomen. Een symbiose tussen schimmels en het wortelstelsel van de bomen, biedt aan beide voordelen. De schimmel zorgt voor een efficiëntere opname van schaarse voedingsstoffen, zoals fosfaten en stikstof en beschermt tegelijkertijd de wortels tegen bodemparasieten. Zelf kunnen ze putten uit de suikers in de wortels. 85% van alle planten en bomen zijn afhankelijk van dergelijke symbiose voor hun groei [31]. Specifieke schimmelsoorten zoals Arthrobotrys superba worden in de bodem geïntroduceerd als nematociden. Het is een alternatief voor de chemische methoden die hiervoor in de landbouw gebruikt worden [32]. Op macroscopische schaal produceren filamenteuze schimmels patronen die ook terug te vinden zijn in zenuw en vasculaire systemen [33].



Figuur 2.1: Sporedragend mycelium van de witrotter Sporotrichum sp. [1].

Mycotoxines, secundaire metabolieten van schimmels die in lage concentratie negatieve effecten hebben op mens en dier resulteren in ziekte en economische verliezen. De term mycotoxine werd geïntroduceerd in 1962 in nasleep van een veterinaire crisis nabij Londen waarbij honderdduizend kalkoenen stierven. Toen het mysterieuze 'Turkey X disease' gelinkt werd aan gecontamineerde pindanoten met secundaire metabolieten van *Aspergillus flavus* werden wetenschappers zich bewust dat secundaire metabolieten van schimmels dodelijk konden zijn. Tegenwoordig zijn er meer dan 300 mycotoxines bekend en de aandacht van de wetenschappers gaat vooral uit naar deze die toxisch en/of carcinogeen zijn. De wereldwijde contaminatie van voedsel en dierenvoeder met mycotoxines is een significant probleem. Bepaalde schimmels kunnen meerdere mycotoxines produceren en bepaalde mycotoxines kunnen door verschillende schimmelsoorten geproduceerd worden. De ziekte die veroorzaakt wordt door deze mycotoxines is mycotoxicose. Het wordt echter vaak niet herkend door dokters, behalve wanneer een grote groep mensen getroffen wordt. Herkauwers zijn in het algemeen resistenter omdat de rumenbacteriën in staat zijn om de mycotoxines af te breken. De economische impact van de mycotoxines ligt in het verlies van mensen- en dierenlevens, de kosten voor gezondheidszorg en dierenarts, minder vleesproductie, vernietigen van geïnfecteerd voedsel en investeringen in onderzoek [34].

#### 2.3 Ecologie

Filamenteuze schimmels zijn typische saprofyten die leven van dood plantaardig materiaal of leven in symbiose met de mycorhiza van planten [35]. Het mycelium kan nutriënten in de bodem opzoeken en afzonderen, nutriënten afkomstig van rottend organisch materiaal concentreren, nutriënten verplaatsen tussen verschillende organische bronnen en uiteindelijk deze nutriënten ter beschikking stellen voor planten om hun primaire productie te behouden. De hyfen van zowel de saprofytische als symbiotische filamenteuze schimmels die zich door de bodem vertakken vormen vaak aggregaten die koorden genoemd worden. Het zijn snel groeiende, persistente kanalen met een hoge geleidbaarheid [36]. Deze koorden vormen complexe netwerken die zich over kilometers kunnen uitbereiden.

De distributie van nutriënten in de natuur is extreem heterogeen en onvoorspelbaar in tijd en ruimte waardoor de schimmels afhankelijk van hun soort verscheidene strategiën uitwerkten om op zoek te gaan naar nieuwe voedingsbronnen en om voedingsbronnen die mogelijks op hun mycelia netwerk terecht komen in te kapselen [37]. De schimmelarchitectuur die we als dusdanig kunnen waarnemen in de natuur is niet statisch maar een respons op lokale veranderingen, beschadiging of predatie. De respons gebeurt door een combinatie van groei, vertakkingen, fusie of regressie [37]. Het is nog niet duidelijk of er specifieke globale mechanismen bestaan die lokale prikkels en responsen koppelen over verschillende ruimtelijke schalen om het lange termijn succes te garanderen van de gehele kolonie of dat dit collectieve gedrag slechts het gevolg is van lokale interacties van individuele hyfen [37, 38].

Achter de fysische structuur van de filamenteuze schimmels zit een fysiologisch systeem bestaande uit opname, opslag en redistributie van nutriënten doorheen het netwerk [37]. Wanneer de kolonie zich vormt vanuit een bepaald punt (het inoculum) wordt er verwacht dat translocatie plaatsgrijpt vanuit het startpunt naar de groeizone. Wanneer er later in het groeiproces voedingsbronnen gevonden worden, kan er redistributie naar de basis voorkomen maar niet noodzakelijk langs hetzelfde transportsysteem. Echter, er is weinig geweten over de celullaire anatomie van de weg, het transportmechanisme en zijn drijvende kracht alsook over de manier waarop er informatie doorgegeven wordt doorheen het myceliumnetwerk dat bij zou kunnen dragen tot de coördinatie van responsen op het kolonieniveau die lokale stimuli uitsturen [37]. Een beter inzicht in de translocatie van nutriënten vereist analyse op de verschillende ruimtelijke schalen gaande van de opname door 'transporters' in individuele hyfen tot translocatie door het hyfenetwerk over enkele meters. Er wordt gedacht dat translocatie een samenspel is van massastroming, diffusie, stroming van cytoplasma en een specifieke vesikel transport [36]. Om de nutriëntenstroom door het netwerk te volgen zijn er enkele directe en indirecte technieken voorhanden, zoals confocale beeldvorming en 'Fluorescence recovery after photobleaching' (FRAP) waarbij het herstel van fluorescentie na het fotochemisch vernietigen van moleculen, met een fluorescente stof gelabeld, bewijst dat er transportprocessen plaatsvinden waarbij er op micrometeren millimeter schaal een beeld gevormd wordt of ´photon-counting scintillation' waarbij radioactieve stoffen over enkele centimeters gevolgd worden [37].

#### 2.4 Morfologie

De morfolgie van filamenteuze schimmels bestaat uit een dens netwerk van hyfen dat bestaat uit vertakkende hyfecellen die uitbreiden aan hun apex. De diameter van deze hyfen is typisch van de grootteorde 10  $\mu$ m. De eerste theoretische benaderingen ter beschrijving van fungale morfologie verschenen in de jaren zeventig en waren gebaseerd op microscopische beelden [39]. Deze beelden werden toen gedigitaliseerd, echter de analyse ervan kon nog niet geautomatiseerd gebeuren waardoor de analyse hiervan veel tijd vergde. Dit probleem werd in de jaren tachtig grotendeels teruggedrongen door geautomatiseerde beeldanalyse [40]. Figuur 2.2 geeft een voorbeeld van een digitaal beeld van een groeiend mycelium waarbij de verschillende onderdelen oongeduid worden.

Door deze geautomatiseerde beeldanalyse werd de statistische evaluatie van experimentele data mogelijk omdat een veel groter aantal mycelianetwerken geanalyseerd kon worden. In de jaren negentig bestond de trend erin de interne structuren te kwantificeren [41] en de morfogenese van een enkel mycelia in groeikamers te documenteren [42].

De fungale morfologie werd in het begin door twee eenvoudige parameters gekarakteriseerd, de totale hyfelengte H [L] en het aantal hyfetippen n die door analyse van digitale beelden gevonden werden [43].



Figuur 2.2: Digitaal beeld van groeiend mycelium [2].

De groei van mycelium gebeurt in de eerste fase na inoculeren exponentieel. Deze exponentiële groei wordt beschreven door een specifieke groeisnelheid  $\mu$ [h-1] en is evenredig met de totale hyfelengte, zodat

$$\frac{\mathrm{d}H}{\mathrm{d}t} = \mu \ H \tag{2.2}$$

en de oplossing wordt gegeven door:

$$H(t) = e^{\mu(t-t_0)} H_0; \ t > t_0.$$
(2.3)

Op lange termijn is de groei van het mycelium enerzijds een gevolg van de groeiende hyfetippen en anderzijds van het vertakken van bestaande hyfen. De totale groei van de hyfelengte Hwordt beschreven door een snelheidsconstante  $q \ [\mu \ m \ h^{-1}]$  van n hyfetippen (Vgl. (2.4)), terwijl het vertakkingsproces zelf afhankelijk is van H en een vertakkingsconstante  $k \ [\mu \ m \ h^{-1}]$ (Vgl. (3.3)). De oplossing van dit stelsel DV wordt gegeven in Vgl. (2.4)

$$\begin{cases} \frac{\mathrm{d}H}{\mathrm{d}t} = q \ n(t), \\ \frac{\mathrm{d}n}{\mathrm{d}t} = k \ H(t). \end{cases}$$
$$H(t) = e^{q \ k \ (t-t_0)} \ H_0; \ t > t_0. \tag{2.4}$$

Een belangrijk verband tussen de groeisnelheid van de hyfetippen en het vertakken is uit te drukken a.h.v. 'Hyphal Growth Unit' (HGU), wat niet meer is dan de gemiddelde lengte van elke hyfetip in het mycelium [3], die gegeven wordt door

$$HGU = \frac{H(t)}{n(t)} \tag{2.5}$$

Indien myceliumgroei het verdubbelen van een groeieenheid inhoudt, volgt dat de totale hyfelengte en het aantal tippen van een myceliumnetwerk exponentieel stijgt met ongeveerd dezelfde specifieke groeisnelheid. Vandaar dat de ratio tussen de totale hyfelente en het aantal hyfetippen verwacht wordt slechts binnen bepaalde grenzen te variëren [3]. Wanneer het mycelium begint te groeien stijgt de HGU in de tijd, maar bereikt vervolgens een constante waarde die als karakteristiek dient. Dit is omdat er initieel nog geen tippen gevormd worden en het mycelium enkel aan de hyfetippen groeien. De lengte stijgt maar het aantal hyfen blijft constant zodat de waarde van HGU toeneemt. Vanaf een bepaalde grootte van het mycelium begint de fase van continue hyfetip productie. Deze typische fenomenen werden besproken in [3] en worden in Figuur 2.3 weergegeven. Hierop is duidelijk dat de toename van het aantal tippen proportioneel is met de specifieke groeisnelheid (helling curve met holle bolletjes evenwijdig met holle vierkanten).

Wanneer het mycelium in een fase van constante HGU verkeert is er een wiskundig verband tussen de specifieke groeisnelheid  $\mu$ , de groeisnelheid van de hyfetippen en de vertakkingsconstante [2].

$$\mu = \sqrt{qk} \tag{2.6}$$

Wanneer de HGU een steady state bereikt, begint n exponentieel te stijgen terwijl de lengte van elke hyfe slechts lineair toeneemt. Dit gedrag wordt verklaard door een model waarin vesikels nodig zijn om celwandsynthese te bewerkstelligen [44]. Volgens dit model worden er vesikels over het volledige mycelium geproduceerd en met een constante snelheid getransporteerd

#### HOOFDSTUK 2. FILAMENTEUZE SCHIMMELS

naar de dichtstbijzijnde hyfetip om hyfale groei mogelijk te maken. In de eerste uren dat de spore uitgroeit tot mycelium wordt er aangenomen dat de celwandbiosynthese de limiterende stap is. Met stijgende totale hyfelengte, stijgt ook het aantal vesikels wat het verband tussen groeisnelheid en hyfelengte verklaart. Wanneer het mycelium nog verder groeit, verlengt de afstand tot de hyfetippen en wordt het transport van vesikels de snelheidslimiterende stap. Omdat het transport van vesikels met een constante snelheid gebeurt, kan de hyfale lengte enkel lineair toenemen over de tijd. Dit betekent ook dat vesikels accumuleren in het mycelium. De overbodige vesikels worden vervolgens gebruikt voor de vorming van vertakkingen van de hyfen wat de exponentiële toename van het aantal hyfetippen verklaart bij een constante HGU [2]. De groeisnelheid blijft dus constant maar door het vertakken zal H exponentiëel toenemen.

De karakteristieke tubulaire vorm van filamenteuze schimmels wordt verkregen als gevolg van de hoge celwandsynthese activiteit aan de hyfale apex[45].In de hyfetippen worden er vele chitine synthasen en  $\beta$ -1,3-glucaan synthase complexen gevonden, dit zijn de enzymen die de synthese van de hoofdcomponenten van de celwand katalyseren. Deze componenten komen voor in vesikels die vervolgens samensmelten met het apicale plasmamembraan waar zij hun overeenkomstige polysacchariden vormen. Het aggregaat van membraangebonden, van het Golgiapparaat afkomstige vesikels aan de hyfetippen wordt het apicaal lichaam genoemd. Dit apicaal lichaam is beter bekend als de Spitzenkörper(Spk) en wordt weergegeven in Figuur 2.4. Het is een intracellulair organel dat geassocieerd wordt met de groei. Het verband tussen de beweging van de Spk met de groeirichting van de hyfe als ook een computersimulatie van de hyfale morfogenese, leidde tot de visie dat de Spk zich gedroeg als een vesikel aanvoer centrum. Dit centrum gelegen in de hyfetippen, recruteert vesikels die vanuit de hyfen aangevoerd worden en brengt de vesikels in de apicale koepel aan waardoor de typische tubulaire vorm van de hyfen gevormd wordt.

#### 2.5 Mechanismen achter gepolariseerde groei en hyfe-oriëntatie

Eén van de meest gepolariseerde cellen in de natuur zijn deze van de filamenteuze schimmels. Bij celpolarisatie is er slechts groei op een bepaald deel van het celoppervlak, hier de apex. De apex is de plaats waar secretorische vesikels, geproduceerd in het hyfale netwerk toekomen en is ook de plaats van endocytose. Deze vesikels leveren de membranen voor tipgroei, glycoproteïne voor de celwand en enzymen voor de biosynthese van chitine en glucaan(skelet). De microtubuli zouden de banen kunnen leveren voor lange afstandtransport van deze vesikels waarbij kinesine als motoreiwit voor het transport van de vesikels fungeert [46, 47]. Bij de eencellige gisten is gepolariseerde groei slechts beperkt tot enkele periodes in de celcyclus terwijl dit bij filamenteuze schimmels zoals *Aspergillus nidulans* of *Neurospora crassa* een continu gebeuren is [48]. Er wordt aangenomen dat de heterolytische enzymen door hetzelfde mechanisme afgescheiden worden als de enzymen die nodig zijn voor gepolariseerde groei [49]. De mechanismen die van belang zijn bij de groei van hyfetippen zijn nog niet uitgeklaard.

Sterolrijke gebieden in de membraan aan de hyfetippen worden 'lipid rafts' genoemd. Ze werden voor het eerst gelocaliseerd in dierlijke cellen waar ze van belang zijn in gepolariseerde

#### HOOFDSTUK 2. FILAMENTEUZE SCHIMMELS

cellen zoals axonen en epitheelcellen. Deze 'lipid' rafts bestaan voornamelijk uit sfingolipiden, wat het hoofdbestanddeel is van het plasmamembraan bij eukaryote cellen. Wanneer de biosynthese van de sphingolipiden uitgeschakeld wordt remt de tipgroei af en stijgt het vertakken bij *Aspergillus nidulans* [50]. Verder blijkt dat de sterolrijke lipid rafts het cytoskelet polariseren en dat het Golgi-apparaat zich concentreert in de hyfetip door middel van het actine cytoskelet. Dus het cytoskelet polariseert het secretieorgaan. Als drijvende kracht werd vroeger de turgordruk aangeduid, echter zijn rol is in vraag te stellen aangezien het cytoplasma op zich de capaciteit heeft om de hyfetip voorwaarts te duwen [5].

In Figuur 2.5 wordt een model weergegeven voor tipgroei aan de hyfen. Het is een overzicht van de tot nu toe bekende componenten die het mechanisme van tipgroei uitmaken. Aan de hyfale apex is een sterolrijke zone te zien, dit zijn de 'lipid rafts' die mogelijks de endocytose vergemakkelijken en als steiger dienen voor apicale proteïnen die een microdomein creëren waar componenten van het polarisoom gerekruteerd kunnen worden. Het polarisoom zelf speelt een rol in de vorming van de nucleus en de polarisatie van het actine cytoskelet. Vervolgens wordt het mogelijk om vesikels aan te voeren voor exocytose. Microtubuli worden aan de hyfetip verankerd waardoor er transport mogelijk is van vesikels op lange afstand, die vervolgens worden opgeslagen in het Spk. De cytoplasmatische druk verkregen door de turgordruk en dynamica van het cytoskelet duwt de apex voorwaarts. Het model voorgesteld in Figuur 2.5 is gebaseerd op gegevens van verschillende modelsystemen afgeleid van *Fusarium acuminatum, S. cerevisiae, Ashbya gossypii, A. nidulans, C. albicans*, and *U. maydis*.

Hyfeoriëntatie is een essentieel aspect van de gepolariseerde groei, de morfologie, spatiale ecologie en de pathogenese van schimmels. De mogelijkheid om tipgroei te heroriënteren als reactie op omgevingsveranderingen is essentieel voor de vertakking van de kolonie, de penetratie in gastweefsel en de vorming van paringstructuren [47]. Calcium signalisatie, de polarisoom Bud1-GTPase module en de Tea-cell-end marker eiwitten samen met specifieke kinesines (motoreiwitten die instaan voor het transport) en sterolrijke apicale microdomeinen zijn betrokken bij hyfeoriëntatie. Deze informatie werd verkregen door mutaties door te voeren die een van deze processen verstoorden met als gevolg dat er hyfen gevormd werden die abnormaal meanderden of een vertraagde trofische respons vertoonden. Hier komt ook tot uiting dat de oriëntatie en groei van de hyfetippen aparte mechanismen zijn die parallel werken tijdens filamenteuze groei. Dit laat de schimmel toe om hun reproductie zelf te bepalen al naar gelang de omgevingsfactoren [47].

#### 2.6 Vertakkingsmechanismen

#### 2.6.1 Modelleren van het vertakken

De schimmelbiomassa neemt exponentieel toe terwijl de lengte van een individuele hyfe slechts lineair toeneemt. Trinci [43] stelde dat dit het gevolg was van het exponentieel toenemen van het aantal hyfetippen als gevolg van het vertakken. Katz et al. [51] bestudeerden de groeikinetiek van *Aspergillus nidulans* op drie verschillende groeimedia met elk een andere groeisnelheid voor de schimmel. Uit deze observaties leiden ze af dat:

$$\overline{E} = \mu_{max} G, \qquad (2.7)$$

waarbij  $\overline{E}$  de gemiddelde snelheid is waarmee de hyfetippen zich uitbreiden [ $L T^{-1}$ ],  $\mu_{max}$  de maximale groeisnelheid is en G de gemiddelde lengte van de hyfe achter een hyfetip

Ì

$$G = \frac{L_t}{N_t},\tag{2.8}$$

waarbij  $L_t$  de totale lengte van het mycelium en  $N_t$  het aantal hyfetippen is. De hyfale groeieenheid is een indicator voor de vertakkingsdensiteit. Katz et al. [51] veronderstellen dat een nieuwe vertakking gevormd wordt wanneer voor een hyfe de waarde  $\overline{E}$  overschreden wordt.

Prosser & Trinci [52] werkten een model uit dat succesvol de exponentiële groei en het vertakken van de hyfen beschreef in de veronderstelling dat hyfetippen uitbreiden door het incorporeren van nieuwe bouwstoffen in vesikels aangeleverd [53]. Dit mechanisme werd in twee stappen gemodelleerd: (i) vesikels worden geproduceerd in een stuk hyfe ver gelegen achter de hyfetip; (ii) vesikels worden vervolgens getransporteerd naar de hyfetip van segment naar segment om dan geabsorbeerd te worden in het segment van de hyfetip. Wanneer de concentratie aan bouwstoffen in het segment van de hyfetip hoger werd dan de maximale absorptiesnelheid van deze bouwstoffen werd een vertakking aan de hyfetip geïnititieerd (apicale vertakking). Door het variëren van de parameters in dit model werden er verschillende vertakkingspatronen verkregen.

Het model van Prosser & Trinci [52] bevat ook het concept van de 'verdubbelings cyclus' door het aantal nuclei in het gemodelleerd mycelium in eenzelfde proportie te vermeerderen als aangroei van biomasa. In een groeiende hyfe vormt zich aan de hyfetip een septum wanneer het apicaal compartiment een bepaald volume bereikt. Bij microscopie van de hyfen wordt waargenomen dat er zich aan deze septa vesikels accumuleren en het is ook op deze plaats waar een hyfe zich vertakt. In het model worden vertakkingen dan ook aan deze septa geïnitieerd zodra de concentratie aan bouwstoffen groter wordt dan een bepaalde waarde conform het apicaal vertakken. Dit model vertoonde goede overeenkomsten met experimentele data voor totale lengte aan mycelium, hyfale groeieenheid en aantal hyfetippen bij *Geotrichum candidum* [52]. In een aanpassing van dit model door Yang et al. [54] waarbij een stochastisch element gebruikt werd om het vertakkingsproces te modelleren gaf dit meer realistische myceliumvormen.

#### 2.6.2 Beschrijving van vertakkingspatronen

Leopold [55] onderzocht in het algemeen systemen die vertakken in de natuur, zoals bomen en waterstromen. Gebaseerd op de classificatie van Horton [56], gaf ze een label aan elke tak van een boom of rivier overeenkomstig het aantal vertakkingen deze droegen. Een eerste orde vertakkingen, een tweede orde vertakking droeg enkel eerste orde vertakkingen, een derde orde droeg enkel eerste en tweede orde vertakkingen, enz. Ze meette daarbij ook de lengte van elke vertakking om zo tot een gemiddelde waarde te komen voor elk orde vertakking. Hierbij was de lengte van de  $n^e$  orde vertakking ook deze van de  $(n - 1)^{ste}$  orde erbij opgeteld. Leopold ontdekte dat er een lineair verband was tussen de orde van vertakking en (i) het

logaritme van het aantal vertakkingen bij een gegeven orde en (ii) de gemiddelde lengte van een vertakking van een gegeven orde. De rico van dit lineair verband werd voor (i) geïnterpreteerd als de vertakkingsratio (VR) en voor (ii) als de lengte ratio (LR). Observaties toonden aan dat er weinig variatie is in de waarde van deze ratio over verschillende boomsoorten (VR=4.7-6.5; LR=2.5-3.6) en verschillende netwerken van rivieren (BR=3.5; LR=2.3).

#### 2.6.3 Analyse van het mycelium

Gull [57] gebruikte de analyse van Leopold [55] haar analyse om de vertakkingskarakteristieken van het mycelium van de filamenteuze schimmel *Thamnidium elegans* te bepalen. Er werd een vertakkingsratio van 3.8 en een lengteratio van 4.0 bekomen voor een derde-orde systeem en een vertakkingsratio van 2.6 en lengteratio van 2.7 voor een vierde orde systeem. Alhoewel deze waarden geen inzicht geven in de biologische mechanismen achter schimmelgroei geeft het toch weer dat schimmels vertakkingen gebruiken als strategie om een oppervlak zo maximaal mogelijk te koloniseren met een minimum aan mycelium. De verkregen waarden kunnen geïnterpreteerd worden als de frequentie waarmee de schimmel vertakt. De vertakkingsfrequentie kan ook op een tweede manier verkregen worden steunende op de fractale geometrie. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de 'box-counting' methode waarbij een grid bestaande uit vierkante cellen met breedte  $\epsilon$  over het patroon gelegd wordt. Vervolgens worden het aantal 'boxes'  $N_{box}$ dat opgevuld wordt door het patroon geteld. Wanneer een patroon fractaal is zal het gelijkvormig zijn op elke schaal. Een echt fractaal patroon heeft dus een oneindige lengte. In het andere geval limiteert de geometrie van het patroon de mate waarin dit het oppervlak kan vullen. De mate waarin dit mogelijk is wordt weergegeven in de fractale dimensie *D*, volgens

$$N_{box}(\epsilon) = C\epsilon^{-D}; \tag{2.9}$$

waarbij C een constante is. In het geval van een rechte lijn is D = 1, en bij een compleet gevuld vlak is D=2. Wanneer er bij hogere resolutie gekeken wordt ( $\epsilon \rightarrow 0$ ) komt tot uiting dat het patroon slechts een beperkt deel van het oppervlak bedekt. Wanneer het logaritme van  $N_{box}$  geplot wordt t.o.v het logaritme van  $(1/\epsilon)$  wordt er een rechte verkregen met helling D. Toegepast op het mycelium van schimmels is  $\epsilon$  gelimiteerd door de diameter van de hyfe op microscopisch vlak en de diameter van het volledige myceliumnetwerk op macroscopisch vlak. Mycelia zijn dus geen echte fractalen maar binnen dit bereik kan er toch een accurate regressieanalyse uitgevoerd worden waarbij de capaciteit tot het opvullen van de ruimte kan gekwantificeerd worden en de vertakkingsfrequentie bepaald. Obert et al. [58] pasten deze methode toe op het mycelium van Ashbya gossypii. Zij ontdekten dat het mycelium zich daadwerkelijk gedraagt als fractalen en vonden D=1.94. Deze hoge waarde duidt op een volwassen mycelium wiens centrum bijna volledig homogeen gevuld is met vertakte hyfen. Aan de randen van het volwassen mycelium vonden zij D=1.45. Er werd geconcludeerd dat wanneer een mycelium zich ontwikkeld, de fractale dimensie van het volledige mycelium convergeert naar twee terwijl D naar 1.5 convergeert als enkel de randen beschouwd worden. Ritz and Crawford [59] and Jones et al. [60] bevestigden deze bevinding.



Fig. 2. Growth of a mycelium of Aspergillus nidulans on solid DM medium at 25 °C. □, No. of tips; ○, total hyphal length; ●, hyphal growth unit.

**Figuur 2.3:** Experimentele gegevens die de groei beschrijven voor *Geotrichum candidum* op vast DM medium bij 25 °C [3]. Er wordt gebruik gemaakt van logarimische assen om de totale hyfelengt, het aantal tippen en HGU in functie van de tijd weer te geven.



Figuur 2.4: Beeldvorming van de hyfetip van N. crassa[4].



Figuur 2.5: Een model dat de tipgroei beschrijft conform de recente bevindingen [5].

## 3

## Spectrum aan wiskundige modellen

#### 3.1 Inleiding

Wiskundige modellen worden geclassificeerd volgens het al dan niet discreet of continu karakteriseren van de tijd, de ruimte en het toestandsdomein. In Tabel 2 wordt een overzicht gegeven van de verschillende mogelijkheden.

De analyse van temporele processen aan de hand van modellen werd in het verleden met gewone differentiaalvergelijkingen (DV) en differentievergelijkingen uitgevoerd. Later werden veelvuldig partiële differentiaalvergelijkingen (PDV) gebruikt omdat ze als voordeel hadden zowel temporele als spatiale processen in hun vergelijking te corporeren. Het nadeel is dat ze

S	R	Т	Naamgeving	Beschrijving
C	D	D	Coupled map lattices	Systeem van DV
C	D	C	Reactie-dispersie netwerken	Systeem van gewone DV
C	C	D	Reactie-dispersie modellen	IntegroDV
C	C	C	Reactie-dispersie modellen	Partiële DV
D	D	D	Op het individu gebaseerde modellen	Aantal regels
D	D	C	Interagerende partikel systemen	Aantal regels
D	C	D	Neighborhood models	Aantal regels
D	C	C	Spatial point processes	Aantal regels

**Tabel 3.1:** Classificatie van ruimtelijk expliciete modellen volgens het al dan niet continu (C) of discreet(D) zijn van ruimte (R), tijd (T) en toestand (S)

moeilijker op te lossen zijn dan gewone DV [61]. In tegenstelling tot  $n^{de}$  orde lineaire, homogene DV waarbij men slechts n lineair onafhankelijke oplossingen nodig zijn om een algemene oplossing te vinden, heeft de algemene oplossing van een lineaire homogene PDV oneindig veel oplossingen nodig om een algemene oplossing te kunnen constueren. De algemene oplossing is dan een oneindige reeks van lineaire combinaties waardoor er vragen kunnen zijn omtrent hun convergentie [62].

Vele processen in de fysische wereld zoals warmtestroming, vibraties van een bal, de propagatie van geluidsgolven, de diffusie van inkt in een glas water, elektrische en magnetische velden, de verspreiding van algen langs het oppervlak van de oceaan, de fluctuatie van een aandeel op de markt kunnen met succes gemodelleerd worden door PDV [62]. De drie belangrijkste PDV in de geschiedenis zijn de warmtevergelijking, de golfvergelijking en de Laplace vergelijking. De warmetevergelijking werd voor het eerst opgelost door Joseph Fourier (1768-1830) toen deze met Napoleon in Eqypte verbleef en het probleem omtrent de afkoeling van kanonnen bestudeerde. Hij loste deze vergelijking op met behulp van trigonometrische reeksen die later Fourier reeksen genoemd werden aangezien Fourier als eerste claimde dat elke functie als een som van cosinus- en sinustermen geschreven kan worden en aantoonde hoe dit kon. De golfvergelijking verscheen voor het eerst in de werken van Euler en d'Alembert in 1760, terwijl de Laplace vergelijking voor het eerst wordt vermeld in een artikel van Euler in 1752 waarin hij de beweging van water beschreef. Laplace (1749-1827) verbond zijn naam aan deze vergelijking door deze opnieuw af te leiden en te gebruiken bij het gravitatieprobleem [62]. Niettemin is gebleken dat een vergelijking van een continu systeem vaak veel analyse nodig heeft om slechts tot een benadering te komen van de manier waarop het systeem zich gedraagt. Enkele belangrijke numerieke benaderingsmethoden zijn de eindige differentiemethode, die gebruik maakt van differentiequotiënten om de afgeleide te benaderen, de eindige element methode die het domein opdeelt in discrete delen en een benadering maakt met een eindige som van functies en de spectrale methode die gebruik maken van Fourier reeksen [62]. Het is niet altijd duidelijk of de karakteristieken van de verkregen oplossingen een gevolg zijn van het systeem of van een slechte benadering van het systeem en dus als artefacten beschouwd mogen worden. Toen de eerste reviews verschenen over het gebruik van PDV in de ecologie gaf men als voordeel het achterhalen van patronen die louter afkomstig konden zijn van de PDV aangezien men vertrok van een homogene omgeving [61]. Toen werd nog niet in acht genomen dat de benaderingsfouten ook een invloed hadden op de verkregen patronen. Bij het gebruik van een CA waarbij tijd, ruimte en toestandsdomein als discreet beschouwd worden heeft men dit probleem niet, aangezien de verkregen patronen enkel van het vooropgestelde model afkomstig zijn en geen benadering behoeft [6].

Vanaf 1950 werden onafhankelijk verschillende soorten modellen geïntroduceerd die tegenwoordig gekend zijn als CA. De inspiratie kwam in nasleep van de ontwikkeling van de elektronische computer. Een aantal voorlopers kunnen worden geïdentificeerd [6]: een reeks wiskundige bewerkingen werden sinds de oudheid gebruikt, eindige differentie benaderingen ter benadering van DV kwam begin de jaren 1900 op, de Turing machine werd uitgevonden in 1936 en was gebaseerd op arbitraire bewerkingen op sequenties discrete elementen. Echter de best gekende voorloper van CA was het werk van John von Neumann in 1952 waarin hij een abstract model trachtte te ontwikkelen voor zelf-reproductie in de biologie. Per cel waren er 29 mogelijke toestanden en hij werkte met 200 000 cellen die zichzelf uiteindelijk zouden reproduceren. Gedurende de jaren '60 werden er alsmaar eenvoudiger CA opgesteld die zichtzelf konden reproduceren. Een belangrijke vondst aangezien eenvoudige transitieregels van de toestand van de cellen in een CA kunnen leiden tot complex gedrag. Aan het einde van de jaren '60 werden pogingen gedaan om CA te verbinden met dynamische systemen maar halfweg de jaren '70 werd het werk rond CA eerder gezien als esoterisch en nam de interesse over het algemeen af (behalve in Japan en Rusland). Ondanks het ontbreken van verder wetenschappelijk onderzoek was er in 1970 een CA van John Conway dat in de recreatieve computerwereld als belangrijk beschouwd werd. Het was een 2D CA met eenvoudige regels die Conway 'The Game Of Life' noemde en die complex gedrag vertoonden. Het werd populair na vermelding in de column Mathematical Games van Martin Gardner in Scientific American [6]. Tussen 1983 en 2002 bestudeerde Stephen Wolfram 1D CA met twee toestanden, de zogenoemde elementaire CA die elk een eigen nummer kregen aan de hand van de transitieregels die het CA gebruikte. Deze CA vertoonden bepaalde eigenschappen zoals het genereren van willekeurige patronen (bv. Regel 30) [6].



Figuur 3.1: Patronen uit 1D CA die worden teruggevonden op de schelp van de Oliva porphyria [6].

Het vinden van de modelstructuur bij CA kan ofwel ad hoc gebeuren ofwel door discretisatie van PDV. Bij de eerste methode wordt er gestuurd vanuit eenvoudige transitieregels die bijvoorbeeld de combinaties zwart-witte cellen (twee toestanden) veranderen in de tijd waarna er op zoek wordt gegaan naar deze patronen in de natuur zoals weergegeven in Figuur 3.1. De modelstructuur wordt ook gevonden door te vertrekken van een fysisch gebaseerde PDV die gediscretiseerd worden en waarna een parameteroptimalisatie gebeurt conform de overeenstemming tussen het model en het te beschrijven proces.

#### 3.2 Cellulaire Automaten

Zoals eerder vermeld wanneer tijd, ruimte en toestandsdomein als discreet beschouwd worden spreekt men van een CA. Door de ruimte discreet te beschouwen is er een tesselatie van de ruimte nodig, hierbij wordt de ruimte volledig opgvuld met cellen die zowel regelmatig (Figuren 3.2(a) en 3.2(b)) als onregelmatig (Figurer 3.2(c)) kunnen zijn. De toestand *s* waarin deze cellen  $c_i$  zich op tijdstip *t* bevinden hangt af van voorgeschreven transitieregels en kan worden aangeduid als  $s(c_i, t)$ .



**Figuur 3.2:** Tesselatie van  $\mathbb{R}^2$  in regelmatige cellen (a) vierkanten of (b) hexagons; Tesselatie in (c) onregelmatige cellen met bijhorende indices

Indien de transitieregels enkel bepaald worden door de toestand van de meest naburige cellen spreken we over elementaire CA. Een voorbeeld hiervan in 1D met transitieregel 22 wordt gegeven in Figuur 3.3(a). Hier bepalen de linker- en rechterbuur van elke cel  $c_i$  wat zijn toestand in een volgende tijdstap zal zijn. Figuur 3.3(b) toont hoe zo een CA in de tijd evolueert (over 20 en 100 tijdstappen). Hier stelt de horizontale as de tijdsas voor waarbij het initiële 1D CA bovenaan staat.

Het is duidelijk dat het belangrijk is het aantal buren te bepalen die invloed hebben op  $s(c_i, t + 1)$ . Wanneer de toestand van alle naburige cellen die raken aan een cel en  $c_i$  zelf invloed hebben op  $s(c_i, t + 1)$  spreken we over de Moore omgeving (Figuur 3.4(a)); indien het enkel de cellen zijn die een zijde gemeenschappelijk hebben spreken we over de von Neumann omgeving (Figuur 3.4(b)) waarbij r staat voor de invloedstraal.



**Figuur 3.3:** (a) Transitieregel 22 voor 1D CA en (b) de evolutie van het 1D bij een eenvoudige initiële conditie waarbij slechts een cel de toestand 1 (zwart) heeft en de overige 0 (wit).



Figuur 3.4: (a) Moore en (b) von Neumann omgeving voor verschillende invloedstralen r.

Aan de hand van deze eenvoudige regels zoals weergeven voor regel 22 in Figuur 3.3(b) kunnen complexe patronen ontstaan indien de begincondities willekeurig gekozen werden (Figuur 3.5). Een op het eerste zicht complex verschijnsel kan dus het gevolg zijn van zeer eenvoudige regels, wat de uitgangspositie is van deze thesis.

Het gedrag van CA is erg gevoelig aan de keuze van de transitieregels en de bijhorende parameters. De moeilijkheid om een betekenisvol CA te ontwikkelen ligt dan ook in de selectie van de transitieregels en de bijhorende modelkalibratie, gekoppeld aan de keuze van de toestandsruimte van de cellen [9]. Een alternatief is het discretiseren van een bestaand en betekenisvol continu model. Dit kan bijvoorbeeld aan de hand van de Anderson discretisatie [63, 64] die ook



Figuur 3.5: De evolutie van een 1D CA met regel 22 met willekeurige initiële condities.

door Boswell gebruikt wordt.

#### **3.3** Modelleren van filamenteuze schimmels

Een wiskundig model ter beschrijving van filamenteuze schimmelgroei kan uitgedrukt worden aan de hand van twee verschillende mechanismen. Een eerste is het gestructureerde model dat enkele basisaspecten aangaande celfunctie en celsamenstelling bevat. Een tweede is het ongestructureerde model, dat enkel rekening houdt met de biomassa om het biologische systeem te beschrijven. Bij ongestructureerde modellen is er veel werk nodig om de modelparameters te identificeren terwijl de fysiologische betekenis van deze parameters niet altijd volledig duidelijk is. Ten tweede kan een ongestructureerd model niet omgaan met veranderingen in omgevingsfactoren zodat de voorspellingsmogelijkheden ervan beperkt zijn [65].

Historisch kan men onderscheid maken tussen twee modeltypes voor de beschrijving van schimmelgroei. Ofwel wordt er gefocust op de macroscopische morfologie waarbij men werkt met biomassaopbrengst [66], ofwel spitst men zich toe op de microscopische morfologie door tipgroei, vertakkingsgraad en anastomosis in rekening te brengen [67]. Vervolgens werd er in een serie artikels van Edelstein [68] een model ontwikkeld dat het verband legt tussen het microscopisch gedrag van individuele hyfen en het macroscopische gedrag van het mycelium. Deze modellen zijn gebaseerd op stelsels DV waarbij de variabelen hyfedensiteit, tippendenstiteit en concentratie van het groeilimiterend substraat voorstellen. Het substraat komt in twee vormen voor, ofwel in het mycelium, ofwel vrij in de omgeving. Er wordt onderscheid gemaakt tussen intern en extern substraat waardoor translocatie van substraat door het mycelium expliciet gemodelleerd kan worden. Edelstein [68] beschouwde de interacties tussen de hyfen door de biologische mechanismen in het mycelium eerder te beschouwen in zijn geheel dan in discrete hyfen. Edelstein neemt aan dat groei aan een constante snelheid gelijk aan  $\mu_{max}$  door gaat. Haar model bechrijft net zoals Cohen's model de densiteit van mycelium overeenkomstig de ruimte of oppervlak dat het bezet. Twee densiteitsparameters worden door Edelstein gedefinieerd, namelijk de hyfedensiteit per eenheid oppervlakte p(x, t) en de tipdensiteit per eenheid oppervlakte n(x,t).

Het model is bestaat uit twee PDV:

$$\begin{cases} \frac{\partial p}{\partial t} = n\overline{E} - \delta \\ \frac{\partial n}{\partial t} = \frac{\partial n\overline{E}}{\partial x} + \sigma \end{cases}$$

waarbij  $\delta(p)$  de snelheid is waarmee de hyfen afsterven,  $\sigma(n, p)$  de snelheid is waarmee er nieuwe hyfetippen gevormd worden en  $n\overline{E}$  de flux van de hyfetippen is waarbij de gemiddelde groeisnelheid  $\overline{E}$  gegeven wordt door Vgl. (2.7).

Edelstein [68] nam in haar wiskundige beschrijving van myceliumgroei ook de interacties tussen de hyfen die de parameter n beïnvloeden en die vervat zitten in de functie  $\sigma$  mee in beschouwing. De interacties tussen de hyfen bestaan uit de vertakkingsmechanismen (verhogen parameter n), afsterven van hyfetippen en anastomosis tip-tip en tip-hyfe. Edelstein toonde aan dat bij  $\delta$ =0 enkel de kolonies die dichotoom vertakken en anastomosis tussen tip en hyfe vormen propagerende kolonies waren. Echter bij een  $\delta > 0$  gaf elke combinatie hyfe interacties propagerende kolonies. De sterfte van hyfen werd hierbij aangetoond een belangrijke eigenschap te zijn bij myceliumgroei naast de densiteit afhankelijke distributie wat een initieel criterium van het model was.

Ferret et al. [69] gebruiken in hun model een gelijkaardige benadering als Edelstein [70] waarbij twee PDV gebruikt worden en de parameterwaarden als densiteiten uitgedrukt worden. In het model, toegepast op bulkculturen, werd de gemiddelde groeisnelheid van de hyfetippen  $(\overline{E})$  aangepast aan de hoeveelheid aanwezige biomassa (X) aan de hand van gegevens verzameld omtrent de groeisnelheid van hyfen in een dens myceliumnetwerk. De invloed naburige hyfen op de oplossing van het stelsel PDV zal hoger zijn in regio's met een hoge tipdensiteit bijgevolg neemt  $\overline{E}$  af wanneer het mycelium groeit en biomassa toeneemt. Deze benadering is een alternatief om hyfesterfte in het model te corporeren.

De vegetatieve groeivorm van de schimmelcellen, is op biologisch vlak de minst interessante aangezien veranderingen in hun morfologie enkel door externe factoren beïnvloed wordt. Van veel groter biologisch belang is de manier waarop deze groeivorm door interne actoren veranderd wordt om zo te resulteren in de verschillende gedifferentieerde cellen die ontstaan aan de hyfen en de interacties tussen de hyfen die leiden tot een gecoördineerd groeien om schimmelweefsel te vormen [71].

Davidson et al. [33, 72, 73, 74, 75] stelden in de jaren negentig in een serie artikels een alternatieve beschrijving van schimmelgroei voor door zich enkel toe te spitsen op macroscopische ontwikkeling van schimmels. Het model, gegeven door het stelsel PDV 3.3, omvat interne en externe concentraties overeenkomstig  $s_i$  en  $s_e$  en de activator a die de opname van  $s_e$  door de wand vergemakkelijkt en  $s_e$  omzet naar energie die kan gebruikt worden om biomassa aan te maken. De beweging van a en  $s_e$  in de ruimte wordt bepaald door diffusie. Het interne substraat wordt als mobiel beschouwd en kan aan een snelheid die overeenkomt met de diffusiesnelheid beschreven worden zoals het ook experimenteel bepaald werd door Olsson [76].

In 2000 werd er een actief translocatiesysteem vooropgesteld door Davidson en Olsson [32] waarbij de flux van intern substraat beschreven werd door een convectieve term, afhankelijk van de substraatconcentratie, die gericht was naar de hyfetippen van het mycelium. De resultaten van
dit model kwomen zowel kwalitatief als kwantitatief overeen met de experimentele gegevens van *Arthrobotrys superba* die werden verzameld in een nutriëntloze omgeving [77].

$$rcl\frac{\partial a}{\partial t} = D_a\frac{\partial a}{\partial t} + a^2s_i - \mu a, \qquad (3.1)$$

$$\frac{\partial s_i}{\partial t} = D_{s_i} \frac{\partial s_i}{\partial x} - a^2 s_i + f(a, s_i, s_e), \qquad (3.2)$$

$$\frac{\partial s_e}{\partial t} = D_{s_e} \frac{\partial s_e}{\partial x} - f(a, s_i, s_e)$$
(3.3)

In 2003 formuleerde Boswell [10] een nieuw model, verkregen door elementen uit de modellen van Edelstein-Keshet [78] en Davidson [33, 72, 73, 74, 75] te combineren en door actieve en passieve translocatie in tegengestelde richting te beschouwen. Een numerieke oplossing hiervan wordt beschreven in [10]. De modelparameteres werden gekalibreerd voor de schimmel *R. solani* aan de hand van een serie groeiexperimenten die zowel kwalitatief als kwantitatief gelijkenissen vertoonden met de resultaten van het model.

#### 3.3.1 Continu model ter beschrijving van filamenteuze schimmelgroei door Boswell

#### **Eén-dimensionaal model**

Boswell [10] ontwikkelde een wiskundig model voor de groei van filamenteuze schimmels en kalibreerde het model voor *Rhizoctonia solani*. Het model bestaat uit vijf niet lineaire PDV, die de belangrijkste processen betrokken bij schimmelgroei, omvatten. Schimmelgroei wordt in het model vereenvoudigd tot de opname van een extern substraat  $s_e$  door bestaande biomassa. Dit opgenomen externe substraat wordt vervolgens omgezet in intern substraat  $s_i$  dat door translocatie herverdeeld wordt om vervolgens gebruikt te worden om biomassa te produceren. Het stelsel PDV wordt gegeven door:

$$\frac{\partial m}{\partial t} = v s_i p - dm, \tag{3.4}$$

$$\frac{\partial m'}{\partial t} = dm, \tag{3.5}$$

$$\frac{\partial p}{\partial t} = -\frac{\partial (vs_i p)}{\partial x} + bs_i m - fmp, \qquad (3.6)$$

$$\frac{\partial s_i}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left( D_i m \frac{\partial s_i}{\partial x} - D_a m s_i \frac{\partial p}{\partial x} \right) + c_1 s_i m s_e - c_2 v s_i p - c_4 D_a m s_i \left| \frac{\partial p}{\partial x} \right|, \quad (3.7)$$

$$\frac{\partial s_e}{\partial t} = D_e \frac{\partial^2 s_e}{\partial x^2} - c_3 s_i m s_e \tag{3.8}$$

waarbij m(x,t) de dichtheid van actieve fungale biomassa, m'(x,t) de dichtheid van inactieve fungale biomassa, p(x,t) de dichtheid van de hyfetippen,  $s_i(x,t)$  de interne substraatconcentratie en  $s_e(x,t)$  de externe substraatconcentratie voorstelt (Tabel (3.2)). De actieve biomassa hangt af van de groeisnelheid en de hoeveelheid actieve biomassa die inactief wordt door vacuolatie Vgl. (3.4) terwijl het aantal actieve hyfetippen per oppervlak vermindert wanneer deze groeien of wanneer een hyfetip versmelt met een andere hyfe (anastomosis f) en neemt toe wanneer de hyfen vertakken (Vgl. (3.6)). De substraatconcentratie die aanwezig is in de hyfen verandert als gevolg van passieve diffusie  $D_i$ , actieve diffusie  $D_a$ , investering in groei  $c_2$ , opname van extern substraat c1 en de investering in actief transport van  $s_i$  (Vgl. (3.7)). De verandering van de extern substraatconcentratie hangt af van passieve diffusie  $D_e$  en de opname door de hyfen  $c_3$ , indien deze aanwezig zijn (Vgl. (3.8)) [10].

Een dimensieanalyse is een eerste controle na het opstellen van PDV om na te gaan of de dimensies in het linkerlid van een gegeven PDV overeen komen met de dimensies van het rechterlid. De dimensies van de parameters uit het stelsel PDV (3.8) worden weergeven in Tabel 3.2 [10]. Hierbij moet opgemerkt worden dat de waarde en de eenheid waarin de groeisnelheid v uitgedrukt staat in de tabel uit artikel 'Fungal growth and function'[79] niet overeenkomt met de artikels [10](Tabel 3) en [80](pg. 466). Het is dan ook de waarde en eenheid voor v uit deze laatst vernoemde artikels die gebruikt zullen worden voor de hieronder volgende dimensieanalyse omdat het de meest logische dimensies voor snelheid [ $L T^{-1}$ ] draagt. In 1D wordt de dimensieanalyse van Vgl. (3.4) na invullen van de overeenkomstige dimensies zoals weergegeven in Tabel 3.2 gegeven door:

$$L^{-1} T^{-1} = L T^{-1} L^{-2} L^{-2} - T^{-1} L^{-1}$$
  
=  $L^{-3} T^{-1} - L^{-1} T^{-1}$  (3.9)

Het is duidelijk dat de dimensies van de eerste term in het rechterlid van deze vergelijking niet overeen komen met deze van het linkerlid, dit is de term waarin de parameter v in voorkomt (Vgl. (3.4)). Echter met de verschillende dimensies van v uit de artikels [10, 80, 10] blijven linker en rechterlid niet overeen komen. Een verdere analyse van de dimensies is bijgevolg aan de orde.

De dimensieanalyse van Vgl. (3.5) na invullen van de overeenkomstige dimensies zoals weergegeven in Tabel 3.2 wordt gegeven door:

$$L^{-1} T^{-1} = T^{-1} L^{-1} (3.10)$$

en komen overeen, terwijl er voor Vgl. (3.6) gevonden wordt dat

$$L^{-2} T^{-1} = -L^{-1} (L T^{-1} L^{-2} L^{-2}) + L^{-1} T^{-1} L^{-2} L^{-1} - L T^{-1} L^{-1} L^{-2}$$
  
=  $-L^{-4} T^{-1} + L^{-4} T^{-1} - L^{-2} T^{-1}$  (3.11)

waarbij de eerste en tweede term in het rechterlid niet overeen komen met deze van het linkerlid. Een mogelijke oorzaak hiervan ligt in foute dimensies van de parameters v en b en variabele p

**Tabel 3.2:** Betekenis en dimensies van de modelparameters die gebruikt worden in de stelsels PDV3.14-3.19 en 3.4-3.8.

Parameter	Fysische betekenis	Dimensies
v	Groeisnelheid van de hyfetippen per eenheid intern substraat	$[L^{-1} T^{-1}]$
$d_a$	Hyfale vacuolatiegraad (inactivatie)	$[T^{-1}]$
$d_i$	Hyfale autolysegraad (afbraak)	$[T^{-1}]$
b	Vertakkingsgraad	$[T^{-1}]$
f	Anastomosisgraad	$[L T^{-1}]$
$D_i$	Diffusiecoëfficiënt van het intern substraat	$[L^3 T^{-1}]$
$D_a$	Actief transport van intern substraat	$[L^3 T^{-1}]$
$D_e$	Diffusiecoëfficiënt van het extern substraat	$[L^2 T^{-1}]$
$c_1$	Effectieve opname van substraat	$[L T^{-1}]$
$c_2$	Kost voor groei aan de hyfetippen	$[L^{-1}]$
$c_3$	Totale opname substraat	$[L T^{-1}]$
$c_4$	Kost voor actieve substraat translocatie	$[L^{-1}]$
m	Lengte aan actieve hyfen per oppervlakte	$[L^{-1}]$
m'	Lengte aan inactieve hyfen per oppervlakte	$[L^{-1}]$
p	Densiteit aan hyfetippen	$[L^{-2}]$
$s_i$	Interne substraatconcentratie	$[L^{-2}]$
$s_e$	Externe substraatconcentratie	$[L^{-2}]$
$D_p$	Diffusiecoëfficiënt	$[L^4 T^{-1}]$

die echter logische dimensies dragen voor groeisnelheid [ $L T^{-1}$ ], vertakkingsgraad [ $T^{-1}$ ] en dichtheid aan de hyfetippen [ $L^{-2}$ ]. Een tweede mogelijke oorzaak van de gevonden inconsistentie ligt in de correctheid van deze PDV. De dimensieanalyse van Vgl. (3.7) wordt gegeven door:

$$L^{-2} T^{-1} = L^{-1} (L^{3} T^{-1} L^{-1} L^{-2} L^{-1} - L^{3} T^{-1} L^{-1} L^{-2} L^{-2} L^{-2} L^{-1}) + L T^{-1} L^{-2} L^{-1} L^{-2} L^{-2} - L^{-1} L^{3} T^{-1} L^{-1} L^{-2} L^{-3} = L^{-2} T^{-1} - L^{-4} T^{-1} + L^{-4} T^{-1} - L^{-2} T^{-1} - L^{-4} T^{-1}$$
(3.12)

waarbij ook hier de dimensies van de verschillende termen in rechterlid en linkerlid niet overeen komen. Nu komen de termen met parameter v echter wel overeen met de dimensies in het linkerlid. De dimensieanalyse van Vgl. (3.8) worden gegeven door:

$$L^{-2} T^{-1} = L^{2} T^{-1} L^{-2} L^{-2} - L T^{-1} L^{-2} L^{-1} L^{-2}$$
  
=  $L^{-2} T^{-1} - L^{-4} T^{-1}$  (3.13)

waarbij de dimensie van de tweede term in het rechterlid niet overeen komt met deze van het linkerlid. Deze tweede term bevat het product van  $s_i$  en  $s_e$ , indien een van deze variabelen er niet zou staan zouden de dimensies wel kunnen overeen komen of wanneer de constante  $c_3$ dimensie  $[L^3T^{-1}]$  zou hebben of indien er een tweede constante bijkomt met dimensie  $[L^2]$ . Er moet echter wel opgemerkt worden dat bij het schrappen van  $s_i$  of  $s_e$  de dimensie [mol glucose] volledig wegvalt in het rechterlid waardoor ook hier de dimensies in linker- en rechterlid niet overeen komen.

#### **Twee-dimensionaal model**

Het stelsel PDV in de twee-dimensionale ruimte zoals afgeleid door Boswell [79] wordt gegeven door:

$$\frac{\partial m}{\partial t} = |vs_i p \bigtriangledown m + D_p s_i \bigtriangledown p| - d_a m, \qquad (3.14)$$

$$\frac{\partial m'}{\partial t} = d_a m - d_i m', \qquad (3.15)$$

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \nabla (vs_i p \bigtriangledown m + D_p s_i \bigtriangledown p) + bs_i m - fmp, \qquad (3.16)$$

$$\frac{\partial s_i}{\partial t} = \nabla (D_i m \bigtriangledown s_i - D_a m s_i \bigtriangledown p) + c 1 s_i m s_e - \tag{3.17}$$

$$c2|vs_ip \bigtriangledown m + D_p s_i \bigtriangledown pc4|D_a m s_i \bigtriangledown p|, \tag{3.18}$$

$$\frac{\partial s_e}{\partial t} = D_e \bigtriangledown^2 s_e - c_3 s_i m s_e, \qquad (3.19)$$

(3.20)

waarbij  $\bigtriangledown$  de afgeleide naar x voorstelt en de betekenis van de modelparameters gegeven wordt in Tabel 3.2. De dimensieanalyse van het stelsel PDV wordt aan de hand van de dimensies uit Tabel 3.2 uitgevoerd, deze zijn conform 'Growth and Function of Fungal Mycelia in Heterogeneous Environments' [79] en wordt gegeven door:

$$L^{-1} T^{-1} = L^{-5} T^{-1} + L^{-1} T^{-1} - L^{-1} T^{-1}, (3.21)$$

$$L^{-1} T^{-1} = T^{-1} L^{-1} - T^{-1} L^{-1}, (3.22)$$

$$L^{-2} T^{-1} = L^{-6} T^{-1} + L^{-2} T^{-1} + L^{-4} T^{-1} - L^{-2} T^{-1}, (3.23)$$

$$L^{-2} T^{-1} = L^{-2} T^{-1} - L^{-4} T^{-1} + L^{-4} T^{-1} - L^{-6} T^{-1} - L^{-2} T^{-1} - L^{-4} T^{-4}$$

$$L^{-2} T^{-1} = L^{-2} T^{-1} - L^{-4} T^{-1}, (3.25)$$

waarbij de inconsistenties in de dimensies terug naar voor komen. De termen die het onderhoud modelleren en die terugkomen in Vgl. (3.25) en (3.24) hebben net zoals in het 1D model dimensies die in linker- en rechterlid niet overeenkomen. Ook hier zal het schrappen van  $s_e$  of  $s_i$ de dimensie [mol glucose] volledig doen wegvallen in het rechterlid waardoor ook hier de dimensies in linker- en rechterlid niet overeen komen. De gediscretiseerde vergelijkingen afgeleid van Vgl. (3.25) en (3.24) zullen in het hoofdstuk 3.3.2 kritisch beschouwd worden aangaande de biologische relevantie en mogelijke alternatieven komen hierbij aan bod.

#### 3.3.2 Discreet model ter beschrijving van filamenteuze schimmelgroei

Het modelleren van filamenteuze schimmelgroei aan de hand van PDV is ideaal om de schimmelgroei in een petriplaat te beschrijven aangezien dit een homogene omgeving is. Echter, in een heterogene omgeving of in een omgeving met weinig nutriënten zal groei leiden tot een onregelmatig patroon waarbij het gedrag van de individuele hyfen bepalend wordt. Een discrete benadering van filamenteuze schimmelgroei is meer geschikt aangezien hierbij de individuele hyfen wel in beschouwing genomen worden. Discrete modellen ter beschrijving van myceliumgroei zijn voorheen reeds opgesteld door Cohen [81], Lindenmayer [82], Hutchinson [83], Bell [84], Kotov en Reshetnikov [85], Ermentrout en Edelstein-Keshet [86], Soddell et al. [87], Regalado [88] en Meskauskas [89]. Het discrete model voorgesteld door Boswell bestaat uit transitieregels die afgeleid zijn uit zijn gekalibreerd en getest continu model [10] zoals gegeven in Vgl. (3.14) - (3.19). Het is belangrijk op te merken dat het discrete model van Boswell in de limiet niet convergeert naar het continue model, maar dient als basisstructuur om een meer gedetailleerd CA te ontwikkelen. De discretisatietechniek verschaft echter wel een betekenisvolle link met het continu model zoals besproken door Anderson [63]. De discretisatie van het 2D stelsel PDV geeft een 'biased random walk' model waarbij de individuele migratiewegen gevolgd kunnen worden [63]. Deze techniek is een eenvoudige maar effectieve manier om macroen microschaal met elkaar te linken [63]. De discretisatie wordt uitgevoerd overeenkomstig artikels van Anderson [90, 64] waarbij er in weze van 'biased random walks' wordt uitgegaan waarbij er een ''master''vergelijking bekomen wordt waarin de verandering van een variabele op een gegeven plaats en tijdstip stochastisch bepaald wordt aan de hand van de toestand van de buren.

#### **Constructie van het CA** [9]

Het CA gebaseerde model maakt gebruik van hexagonale cellen om de ruimte te bedekken zoals weergegeven in Figuur 3.2(b) waarbij de indices zoals in deze figuur gekozen worden. De hyfen groeien dan van het ene centrum van een hexagonale cel naar de andere waarbij een afwijking in groeirichting slechts over hoeken van 60 graden kan gebeuren. Een hyfetip van een hyfe bevindt zich in het centrum van een hexagonale cel. De interne en externe substraatconcentraties worden geacht homogeen verdeeld te zijn in elke cel. Een louter cellulaire benadering waarbij een Moore of von Neumann omgeving gekozen wordt rond elke cel zou niet werken aangezien er tussen parallel lopende hyfen diffusie mogelijk zou zijn omdat ze in elkaars omgeving liggen (Figuur 3.6). Enkel in geval van anastomosis, waarbij de ene hyfe vertakt en vervolgens vergroeit met de parallel gelegen hyfe, wordt ook de cel van de andere hyfe als buur gerekend. De diameter van elke cel langs de x- en y-as bedraagt 0.01 mm aangezien dit de gemiddelde



Figuur 3.6: Twee parallel groeiende hyfen waarbij de cel met nummer 1 twee actieve buren heeft en de cel met nummer 2 er drie heeft.

diameter is van de hyfen van *R. solani*. De diameter van een cel kan bijgevolg niet kleiner gekozen worden dan de diameter van een hyfe. Het model bestaat uit vijf variabelen : m(k,t) en m'(k,t) stellen de cellen k voor die respectievelijk actief en inactief zijn op tijdstip t, p(k,t) houdt de cellen k bij die op tijdstip t een hyfetip zijn,  $s_i(k,t)$  en  $s_e(k,t)$  geven de interne en externe substraatconcentratie weer per cel k.

#### Groeimechanisme

Onder groeimechanisme wordt enerzijds het bepalen van de groeirichting en anderzijds het crëeren van biomassa verstaan. De groeirichting van filamenteuze schimmels wordt in het algemeen niet beïnvloed door gradiënten in  $s_e$  [91], hoewel er wel sprake is van negatieve chemotropisme bij gradiënten van toxische moleculen [92]. De hyfetippen groeien in het algemeen rechtdoor met slechts op willekeurige tijdstippen een kleine afwijking van het rechte pad, zoals ook vastgesteld voor R. solani. Dit is een gevolg van de opbouw van de hyfen, een holle buis, en de wijze waarop bouwstoffen voor hyfewanden aan de hyfetippen geïncorporeerd wordt [9]. Er wordt door Boswell [9] aangenomen dat er twee processen spelen in het bepalen van de groeirichting. Een convectieve term die eenzelfde beweging in stand houdt en een diffusie term die incidenteel afwijkingen van het pad introduceert. De richting waarin groeiende hyfetippen zich begeven is dus te beschouwen als een biased random walk over de centra van de hexagonale cellen en is afhankelijk van de toestand van de cellen. Wanneer een hyfetip in een cel aanwezig is het de actieve buur van de hyfetip vanwaar de hyfetip komt. Aan de hand van de cel  $c_r$  vanwaaruit er in een voorgaande tijdstap gegroeid is worden de mogelijke groeirichtingen bepaald. Het is niet mogelijk voor de virtuele schimmel om een hoek te maken die groter is dan 60 graden (Figuur 3.7(a)). De kans  $\lambda$  om tijdens een tijdstap  $\Delta t$  rechtdoor te groeien wordt gegeven door vergelijking:

$$\lambda(k,t) = D_p \ s_i(k,t) \ \frac{\Delta t}{\Delta x^2} \ + \ v \ s_i(k,t) \ \frac{\Delta t}{\Delta x}$$
(3.26)

waarbij  $D_p$  de diffusiecoëfficiënt voorstelt die het incidenteel afwijken van het rechte pad stuurt. De kans op 60 graden naar links  $\mu$  of rechts  $\eta$  te groeien is gelijk en wordt gegeven door:

$$\mu(k,t) = D_p \ s_i(k,t) \ \frac{\Delta t}{\Delta x^2} \tag{3.27}$$

De kans om als hyfetip niet te groeien gedurende de tijdstap  $\Delta t$  is gelijk aan  $1-(\lambda + \eta + \mu)$ . De verhouding tussen de kans op het nemen van een bocht en rechtdoor groeien wordt niet beïnvloed door  $s_i$ . Wanneer de kans op groei groter wordt dan 1, is de tijdstap te groot om het groeiproces nog te kunnen vatten en is de kans om niet te groeien gedurende  $\Delta t$  kleiner dan nul. Omwille hiervan dient de tijdstap verkleind te worden. Boswell [9] stelt hierbij voor om de simulatie te beëindigen en opnieuw te beginnen met een kleinere tijdstap.

#### Vertakken en anastomosis

Er wordt verondersteld dat het al dan niet vertakken van een hyfe afhangt van  $s_i$  en zolang er geen tegenbewijs is wordt er aangenomen dat hiertussen een lineair verband bestaat [9]. De vergelijking die de kans op vertakken in elke cel gedurende  $\Delta t$  voorstelt wordt dan :

$$b s_i(k,t) \bigtriangleup t,$$
 (3.28)

waarin b een constante is die de vertakkingsgraad voorstelt, het aantal vertakkingen per mm hyfe per tijdseenheid  $\Delta t$ . Een vertakking kan dus onstaan in cel  $c_k$  gedurende het tijdsinterval  $(t,t + \Delta t)$ . De mogelijke vertakkingsplaatsen worden vervolgens bepaald aan de hand van de richting waarin de hyfe groeit. Er kan nooit vertakt worden in een richting tegengesteld aan de groeirichting dus resten er slechts 2 vertakkingsmogelijkheden (Figuur 3.7(b)).

Anastomosis komt in het discrete model voor wanneer een hyfetip groeit naar een cel waar al mycelium aanwezig is, waarbij de hyfetip versmelt met de hyfe en niet langer een hyfetip is. De hyfe wordt hierbij afgesloten.



**Figuur 3.7:** (a) De mogelijke groeirichtingen van een hyfetip overeenkomstig de kansen  $\lambda$ ,  $\mu$  en  $\eta$  en (b) de even waarschijnlijke mogelijke groeirichtingen wanneer een hyfecel vertakt.

#### Onderhoud en inactivatie van actief mycelium

Per lengte aan hyfe gelijk aan de diameter van een hexagonale cel waaruit de tesselatie bestaat  $(\Delta x)$  verbruikt per tijdstap een bepaalde hoeveelheid intern substraat voor zijn onderhoud die een verlaging in  $s_i$  geeft die gelijk is aan:

$$c_5 \ \bigtriangleup x \ \bigtriangleup t$$
 (3.29)

Wanneer  $s_i$  van de cellen  $c_i$  die actief mycelium bevatten op tijdstip t (aangeduid door  $s_i(c_i, t)$ ) onder een kritische waarde w komt zullen cellen i inactief worden en niet meer groeien, noch bijdragen aan translocatie. Deze waarde w bedraagt  $10^{-13}$ [mol/mm<sup>2</sup>]. Inactieve cellen sterven af met een constante snelheid  $d_i$ .

#### **Opname extern substraat**

Voor de opname van extern substraat wordt een deel van het intern substraat verbruikt voor het bekostigen van het actief transport over het membraan. Dit is de reden waarom zowel  $s_i$  als  $s_e$  worden opgenomen in de vergelijking voor opname van  $s_e$ . Aangezien een fractie van  $s_i$  geïnvesteerd wordt voor de opname zal er dus minder  $s_i$  binnen komen dan dat er  $s_e$  uit de omgeving verwijderd wordt, vandaar dat  $c_1 < c_3$  in Vgl. (3.31).

$$\triangle_{opname} s_i(c_k) = c_1 s_i(k,t) m(k,t) s_e(k,t) \bigtriangleup t, \qquad (3.30)$$

$$\triangle_{opname} s_e(c_k) = -c_3 s_i(k,t) m(k,t) s_e(k,t) \bigtriangleup t, \qquad (3.31)$$

waarbij m(k,t) de hyfelengte in een cel die actief mycelium bevat  $(c_k)$  op tijdstip t weergeeft. Deze is gelijk aan het aantal buren waarmee deze cel via hyfen verbonden is maal  $\frac{\Delta x}{2}$ .

#### Translocatie

Er is actieve translocatie van intern substraat naar de hyfetippen toe en passieve translocatie tussen alle cellen die verbonden zijn met actieve hyfen. Actieve translocatie komt enkel voor in de buurt van de hyfetippen en is naar de hyfetippen toe gericht zoals experimenteel bevestigd in de observaties door Fisher-Parton et al.[93] en Jacobs et al. [94]. In het discrete model is er enkel actieve translocatie vanuit de cel waarin het deel van de hyfe net voor de hyfetip gelegen is  $(c_w)$  naar de cel die de hyfetip bevat  $(c_t)$  toe(Figuur 3.8) en wordt voorgesteld door M<sup>act</sup><sub>cwv</sub>.

De translocatie in elke cel wordt geven door:

$$\Delta_{trans} s_i(c_k) = M_{c_k, c_{k1}} + M_{c_k, c_{k2}} + M_{c_k, c_{k3}} + M_{c_k, c_{k4}} + M_{c_k, c_{k5}} + M_{c_k, c_{k6}}, \qquad (3.32)$$

waarbij  $M_{c_k,c_{k_i}}$  staat voor de stijging of daling van  $s_i$  als gevolg van de actieve en passieve translocatie dat in een tijdstap naar  $c_k$  vanuit zijn zes buren  $c_{k_i}$  mogelijk is. Indien er enkel met twee buren een hyfeverbinding is zal er bij gevolg geen translocatie meer zijn vanuit de andere vier buren. Het is belangrijk om de tijdstap  $(\Delta t)$  niet te groot te kiezen zodat het diffusieproces volledig gevat wordt door de diffusievergelijking, een fenomeen waar Boswell geen rekening mee heeft gehouden.  $M_{c_k,c_{k_j}}$  bestaat uit actieve translocatie  $M_{c_w,c_t}^{act}$  en passieve translocatie  $M_{c_k,c_{k_i}}^{pas}$ . De passieve translocatie van  $s_i$  voor cellen waar er mycelium aanwezig is wordt gegeven door:

$$M_{c_k,c_{k_i}}^{pas} = D_i \ \triangle t \ \frac{s_i(c_{k_i},t) - s_i(c_k,t)}{\triangle x^2},\tag{3.33}$$

waarbij  $D_i$  de diffusiecoëfficiënt van het intern substraat voorstelt. De actieve translocatie vanuit de cel voor een hyfetip wordt gegeven door vergelijking:

$$M_{c_w,c_t}^{act} = D_a \ s_i(q,t) \ \frac{\Delta t}{\Delta x}$$
(3.34)



Figuur 3.8: Twee hexagonale cellen uit de tesselatie waardoor een hyfe loopt. De hyfe met hyfetip wordt aangeduid door een pijl.

waarbij  $s_i(q, t)$  staat voor de interne substraatconcentratie van de cel q voor de hyfetip k. De concentratie intern substraat wordt van  $s_i$  van cel q afgetrokken en opgeteld bij  $s_i$  van de hyfetip k. Het is belangrijk dat na anastomosis de hyfetip die vergroeit met een hyfe niet meer als hyfetip gezien wordt zoniet is er nog steeds actieve translocatie naar deze vergroeide hyfetip toe.

# 4

# Implementatie 2D discreet model

# 4.1 Aanpassingen aan het bestaande model

De parameterwaarden en initiële condities die gebruikt worden in het in [9] ontwikkelde CAgebaseerde model komen niet overeen met de experimenteel bepaalde waarden noch met de afgeleide waarden uit [79] dat volgens de auteurs van [9] de basis vormt van het model voorgesteld in [9]. Er werd voor gekozen om de parameterwaarden en intiële condities uit [79] te gebruiken vermits deze experimenteel bepaald werden en hun dimensies gegeven zijn. Bovendien levert Vgl. (3.29) een kost voor onderhoud die per  $\Delta t$  een factor 10<sup>9</sup> groter is dan wat er volgens Vgl. (3.31) gedurende  $\Delta t$  kan opgenomen worden bij gebruik van de parameterwaarden uit [9]. De initiële condities voor  $s_i$  en  $s_e$  bedragen respectievelijk 4 10<sup>-5</sup> en 3 10<sup>-5</sup> [mol glucose mm<sup>-2</sup>] in plaats van de 10<sup>-11</sup> [mol glucose mm<sup>-2</sup>] die vermeld staat in [9] waardoor de toename van  $s_i$  per tijdstap als gevolg van opname groter is dan het verbruik voor onderhoud. De dimensieanalyse van de PDV (3.14)-(3.19) op basis van dewelke Vgl. (3.30) en (3.31) afgeleid werden, bevatten echter nog altijd inconsistenties. Ten einde de dimensies van linker-en rechterlid te doen overeen komen wordt voorgesteld om een Michaëlis-Menten kinetiek voor opname te gebruiken, zoals deze experimenteel bepaald werd voor *A. niger* [95].

In het aldus aangepaste CA-gebaseerde model werd bovendien een dynamische bijsturing van het fysisch tijdsinterval dat overeenkomt met  $\Delta t$  gebruikt. Ten einde een stabiele discretisatie te bekomen dient hiervoor een begrenzing opgelegd te worden.

Verder werd er veronderseld dat het extern substraat niet diffundeert, zodat het model zich enkel toespitst op cellen waar mycelium aanwezig is, wat de rekentijd sterk vermindert.

# 4.2 Soft- en hardware

Het CA-gebaseerd model ter beschrijving van myceliumgroei werd in Mathematica 7.0 (Wolfram Research, Inc., Champaign, USA) geïmplementeerd. Er werd gebruik gemaakt van een Dell Optiplex Dual core computer met 4 GB RAM-geheugen en een rekencluster waarvan de rekenkracht geleverd werd door een Intel blade server chassis die 14 blades en in totaal 80 cores bevat met elk 4 GB aan algemeen geheugen. De software die door deze rekencluster gebruikt wordt is GNU/Linux SuSE, waarbij Sun Grid Engine 6.2 als gridmanager werkt.

# 4.3 Overzicht

Het geïmplementeerd algoritme omvat het maken en aanpassen van lijsten en het oproepen van functies die  $m, m', p, s_i$  en  $s_e$  overeenkomstig Vgln. (3.28) - (3.34) traceren doorheen de tijd en ruimte. Deze variabelen worden bewaard in lijsten die respectievelijk ActiefMycelium, InactiefMycelium, Tiplijst en Concentratie genoemd worden. Laatstgenoemde bevat voor elke cel van de tesselatie waarin mycelium aanwezig is zijn corresponderende  $s_i$  en  $s_e$ . Daarnaast wordt een Hyfelijst aangemaakt die de indices van de opeenvolgende cellen van elke hyfe bevat.

Na aanmaak van de hiervoor vermelde lijsten worden functies ter bepaling van de kansen  $\lambda$ ,  $\mu$  en  $\eta$  (cfr. Vgln. (3.26) en (3.27)) ingeladen die respectievelijk worden aangeduid als Lambdafuntie, Mufunctie en Etafunctie. Deze functies hebben als input de TipLijst en voor elke daarin opgenomen tip halen zij  $s_i$  uit Concentratie waarna deze ingevuld wordt in Vgln. (3.26) of Vgl. (3.27) voor het bepalen van de kans om rechtdoor ( $\lambda$ ), afwijkend naar links ( $\mu$ ) of afwijkend naar rechts ( $\eta$ ) te groeien. Verder wordt een functie Vertakken ingeladen die voor elke hexagonale cel  $c_k$  waar er een actieve hyfe aanwezig is bepaalt of deze gedurende  $\Delta t$  vertakt. Hiervoor wordt uit de lijst Concentratie  $s_i$  ( $c_k$ ) gehaald en ingevuld in Vgl. (3.28) die de kans op vertakken geeft. Als output wordt een lijst bekomen van de cellen die vertakken. Tenslotte wordt een functie MyceliumBuren ingeladen die voor elke cel het aantal naburige cellen bepaalt waarmee er een verbinding bestaat via een hyfe. Verbindingen met cellen die inactief mycelium bevatten worden niet als buur beschouwd. Een functie Coordinaten wordt tot slot ingeladen die voor elke cel binnen de tesselatie de coördinaten van zijn zes hoekpunten geeft indien het celnummer, het aantal rijen en het aantal kolommen waaruit de tesselatie bestaat meegegeven wordt. Aangezien de nummering systematisch gebeurt zoals weergegeven in Figuur 3.2(b), namelijk van onder naar boven en van links naar rechts, is het eenvoudig met de gegeven input de coördinaten te vinden. Cellen met opeenvolgende indices liggen telkens  $\Delta x$  boven elkaar, tenzij de index van de volgende cel deelbaar is door het aantal rijen waaruit de tesselatie bestaat. In dit geval wordt een nieuwe kolom begonnen. Is dit een even kolomnummer dan wordt de y-coördinaat van de zwaartepunten  $\frac{\Delta x}{2}$ verschoven zoals weergegeven op Figuur 4.1 en omdat een nieuwe kolom telkens rechts van de voorgaande begonnen wordt zal de de x-coördinaat  $\Delta x$  groter zijn. De tesselatie van de 2D ruimte aan de hand van hexagonale cellen wordt gevisualiseerd met behulp van de functie Hexagon. Deze functie heeft als input de coördinaten van de zwaartepunten van de hexagons

waaruit de tesselatie is opgebouwd samen met hun diameter  $\triangle x$  en geeft de coördinaten van de zes hoekpunten van het hexagon. Door deze coördinaten voor elk hexagon te verbinden met een lijn, wordt de tesselatie gevisualiseerd.



Figuur 4.1: Constructie van een hexagonale tesselatie.

De modelstructuur is opgebouwd uit vijf delen die tijdens elke tijdstap dienen uitgevoerd te worden (Algoritme 1). Initiëel worden de noodzakelijke lijsten en functies geïnitialiseerd en worden de parameterwaarden en initiële condities gedeclareerd. De gebruikte parameterwaarden en initiële condities worden met hun bijhorende dimensies gegeven in Tabel 4.1. Na afloop van de eigenlijke simulatie wordt een visualisatie gemaakt van de hexagonale cellen waarin mycelium aanwezig is en van de hyfen die deze cellen verbinden. Een visualisatie van het gesimuleerde myceliumnetwerk na 3 uur gebruik makend van de parameterwaarden en initiële condities gegeven in Tabel 4.1 waarbij  $b = 10^8$  wordt gekozen, wordt gegeven in Figuur 4.2. De zwaartepunten van de hexagonale cellen waarin hyfen aanwezig zijn worden verbonden met een zwarte lijn en stellen bijgevolg de individuele hyfen voor, terwijl de groeirichting is aangeduid door een pijl. De hexagonale cellen die een hyfetip bevatten worden met een rode kleur aangeduid. Op deze figuur is duidelijk te zien dat vertakkingen van een hyfe leiden tot nieuwe tippen.

Algoritme 1: Modelstructuur		
Inlezen van de gebruikte functies;		
Declareren van de parameterwaarden en initiële condities overeenkomstig Tabel 4.1;		
for $t \leftarrow 1$ to aantal tijdstappen do		
Limiteren van de tijdstap a.h.v. de groeikans en diffusiesnelheid;		
Groei;		
Vertakken;		
Translocatie;		
Opname nutriënten en onderhoud;		
end		
Visualisatie van het gesimuleerde myceliumnetwerk;		



**Figuur 4.2:** Gesimuleerd myceliumnetwerk na 1000 tijdstappen gebruik makend van het aangepaste CA-gebaseerde model overeenkomstig de parameterwaarden en initiële condities uit Tabel 4.1 waarin *b* gelijk aan 10<sup>8</sup> gekozen wordt. De zwarte pijlen stellen de hyfen met hun groeirichting voor en de rood ingekleurde cellen de hyfetippen waar in een volgende tijdstap groei mogelijk is.

De gesimuleerde structuur van het myceliumnetwerk op twee opeenvolgende tijdstippen  $t_n$ en  $t_n + \Delta t$  wordt gevisualiseerd in Figuur 2 en een overzicht van de lijsten overeenkomstig deze simulatie wordt gegeven in Tabel 4.1. De indices van de cellen waarin tijdens  $\Delta t$  nieuwe hyfen gevormd worden, zijn zowel in Tabel 4.1 als in Figuur 4.3 onderlijnd. Dit voorbeeld zal verder gebruikt worden om de implementatie van het 2D discrete model te verduidelijken.

# **4.4** Aanpassing $\Delta x$

De diameter van de hexagonale cellen  $\Delta x$  wordt in [9] gelijk gesteld aan 0.01 mm omdat de hyfebreedte eveneens 0.01 mm bedraagt. De opname van glucose zoals voogesteld door Vgl. (3.31) wordt uitgedrukt aan de hand van de lengte aan hyfen die zich binnenin een hexagonale cel bevinden. Hierdoor zal een hexagonale cel die een hyfe bevat en hierin twee vertakkingen heeft dubbel zoveel hyfen bevatten en bijgevolg dubbel zo veel kunnen opnemen. Zoals weergegeven in Figuur 4.4 kan er echter maximaal een hyfe met lengte  $\Delta x$  in een hexagonale cel liggen indien de diameter van deze laatste even groot is als deze van een hyfe. Wanneer de diameter van de hexagonale cellen gelijk is aan 0.01 mm, kan er maximaal 0.01 mm hyfe in een cel aanwezig zijn. De opname per hexagonale cel kan daarom niet groter zijn dan wat 0.01 mm hyfe kan opnemen. Echter, volgens Vgl. (3.31) kan er 0.02 mm aan hyfe substraat opnemen, aangezien deze veronderstelt dat een cel die met vier cellen via een hyfe verbonden is vier  $\frac{\Delta x}{2}$  aan hyfen bevat. \_

Parameter	Waarde	Dimensie
$\overline{v}$	106	$[mm mol^{-1} d^{-1}]$
b	$10^{6}$	[vertakkingen mm <sup>-1</sup> dag <sup>-1</sup> ]
$D_i$	34.65	$[mm^2 dag^{-1}]$
$D_a$	$10^{-2}$	$[\text{mm}^2 \text{ dag}^{-1}]$
$D_e$	34.65	$[\text{mm}^2 \text{ dag}^{-1}]$
$c_1$	$9 \ 10^2$	$[mm mol^{-1} d^{-1}]$
$c_2$	$10^{-8}$	$[\text{mol }\text{mm}^{-1}]$
$c_3$	$10^{4}$	$[mm mol^{-1} d^{-1}]$
$c_4$	$10^{-8}$	[-]
$c_5$	$10^{-10}$	$[mol mm^{-3} d^{-1}]$
$s_i$	$4 \ 10^{-5}$	$[\text{mol mm}^{-2}]$
$s_e$	$3 \ 10^{-5}$	$[\text{mol mm}^{-2}]$
$D_p$	$10^{-1}$	$[\mathrm{mm}^4 \mathrm{mol}^{-1} \mathrm{dag}^{-1}]$

Tabel 4.1: De waarde van de modelparameters die gebruikt worden in het 2D discreet model [9].

Tabel 4.2: Overzicht van de gebruikte lijsten die horen bij het gesimuleerde myceliumnetwerk op tijdstap  $t_n$  en  $t_n + \Delta t$  dat afgebeeld staat op Figuur 4.3.

Lijst	$t_n$	$t_n + \Delta t$
Actief Mycelium	$\{c_{4847}, c_{4944}, c_{4946}, c_{5045},$	$\{c_{4847}, c_{4944}, c_{4946}, c_{5045},$
	$c_{5046}, c_{5142}, c_{5143}, c_{5144},$	$c_{5046}, c_{5142}, c_{5143}, c_{5144},$
	$c_{5145}, c_{5146}, c_{5147}, c_{5148},$	$c_{5145}, c_{5146}, c_{5147}, c_{5148},$
	$c_{5245}, c_{5246}, c_{5344},$	$c_{5245}, c_{5246}, c_{5344},$
	$c_{5346}, c_{5447}, c_{5547}\}$	$c_{5346}, c_{5447}, c_{5547}, c_{\underline{4747}}, c_{\underline{5345}} \big\}$
Hyfelijst	$ \{ \{c_{5145}, c_{5245}, c_{5344} \}, \\ \{c_{5145}, c_{5246}, c_{5346}, c_{5447}, c_{5547} \}, \\ \{c_{5145}, c_{5146}, c_{5147}, c_{5148} \}, \\ \{c_{5145}, c_{5046}, c_{4946}, c_{4847} \}, \\ \{c_{5145}, c_{5045}, c_{4944} \}, \\ \{c_{5145}, c_{5144}, c_{5143}, c_{5142} \} \} $	$ \{ \{c_{5145}, c_{5245}, c_{5344} \}, \\ \{c_{5145}, c_{5246}, c_{5346}, c_{5447}, c_{5547} \}, \\ \{c_{5145}, c_{5146}, c_{5147}, c_{5148} \}, \\ \{c_{5145}, c_{5046}, c_{4946}, c_{4847}, c_{4747} \}, \\ \{c_{5145}, c_{5045}, c_{4944} \}, \\ \{c_{5145}, c_{5144}, c_{5143}, c_{5142} \}, \\ \{c_{5046}, c_{7047} \} \} $
Concentratie	$\{c_{myc}, \{s_i(c_{myc}, t_n), s_e(c_{myc}, t_n)\}\}$	$\{c_{myc}, \{s_i(c_{myc}, t_{n+1}), s_e(c_{myc}, t_{n+1})\}\}$



**Figuur 4.3:** Gesimuleerd myceliumnetwerk op  $t_n$  ((a) en (b)) en  $t_n + \Delta t$  ((c) en (d)) overeenkomstig de parameterwaarden en initiële condities opgelijst in Tabel 3.2. Cellen waarin mycelium aanwezig is worden grijs gekleurd, terwijl in (a) en (c) de hyfen en hun groeirichting worden aangeduid. De cellen naar dewelke het myceliumnetwerk tijdens  $\Delta t$  uitgebreid is, zijn onderlijnd.

Hierdoor zal de opname van glucose dubbel zo groot zijn, wat in twee dimensies niet mogelijk is wegens de ruimtelijke beperking. Echter, hoe groter de diameter van de hexagonale cellen gekozen wordt hoe correcter Vgl. (3.31) vermits de hyfen dan minder overlap vertonen. In het aangepaste CA-gebaseerde model zal er omwille van deze reden met  $\Delta x = 0.03$  mm gewerkt worden.

# 4.5 Bijsturing van de tijdstap

Het bijsturen van het fysische tijdsinterval dat overeenkomt met  $\Delta t$  wordt door Boswell [9] enkel aan de hand van de groeikansen ( $\lambda$ ,  $\mu$  of  $\eta$ ) gedaan, waarbij het algoritme gestopt wordt wanneer een van deze groeikansen groter wordt dan één om vervolgens een nieuwe simulatie te starten waarbij een kleinere  $\Delta t$  wordt gekozen. In het geïmplementeerde model wordt  $\Delta t$ dynamisch aangepast, indien  $\lambda$  groter wordt dan 0.9. Dit is omdat de groeikans  $\lambda$  stelselmatig



**Figuur 4.4:** (a) Visualisatie van een hyfe die twee vertakkingen heeft in  $c_k$ , de zwarte pijlen stellen de hyfen met hun groeirichting voor. (b) Abstractie van drie hyfen voorgestels als rechthoeken, die door  $c_k$  groeien wanneer deze eenzelfde diameter hebben als  $c_k$ . Hyfe 1 heeft twee vertakkingen die Hyfe 2 en Hyfe 3 genoemd worden. De gele kleur geeft weer waar een hyfe aanwezig is, de groene kleur geeft weer waar er twee hyfen op elkaar liggen, de blauwe kleur waar er drie hyfen op elkaar liggen.

groter is dan  $\mu$  of  $\eta$ .

Een tweede uitbreiding betreft de beperking van  $\Delta t$  in functie van de diffusiecoëfficiënt. Immers,  $\Delta t$  moet kleiner zijn dan de tijd die het intern substraat nodig heeft om over afstand  $\Delta x$  te diffunderen. Indien  $\Delta t$  bijvoorbeeld dubbel zo groot is zal het substraat in realiteit gedurende de tijdstap twee cellen ver diffunderen terwijl dit in het CA-gebaseerde model onmogelijk kan aangezien er gewerkt wordt met de Moore omgeving en er dus enkel een verbinding bestaat met de aangrenzende buren die op afstand  $\Delta x$  liggen. Hierdoor zou het diffusieproces afgeremd worden en bijgevolg de stabiliteit van de discretisatie in het gedrang komen. De Courant-Friedrichs-Levy (CFL) [14] voorwaarde relateert de grootte van de tijdstap aan de diffusiecoëfficiënt en wordt gegeven door:

$$\frac{\Delta t}{\Delta x^2} D_i > 1/2 \tag{4.1}$$

Wanneer aan deze voorwaarde is voldaan zal er genoeg tijd zijn voor het intern substraat om door een gediscretiseerde ruimte te propageren. Indien de tijdstap waarover diffusie gebeurt zo groot wordt dat de hoeveelheid intern substraat dat diffundeert groter wordt dan het aanwezige interne substraat worden er negatieve concentraties bekomen en wordt er substraat getransloceerd dat er niet is. Bij een negatieve  $s_i$  zal ook de groei-en vertakkingskans negatief worden. Dit zal zich onmogelijk voordoen indien aan de CFL voorwaarden voldaan is. De  $\Delta t$  als gevolg van deze beperking 4.1 kan nooit groter worden dan 0.25 s indien  $\Delta x$  nog gelijk zou zijn aan 0.01 mm. Dit zou als consequentie hebben dat het model 115200 tijdstappen nodig heeft om 8 uur groei te simuleren. Echter indien  $\Delta x = 0.03$  mm kan er gewerkt worden met een  $\Delta t = 2.25$  s wat het aantal tijdstappen en bij gevolg de rekentijd reduceert. Het is belangrijk in te zien dat  $\Delta t$ , indien deze enkel gelimiteerd wort door de kans op groei, voor  $s_i(c_k, 0) = 4 \ 10^{-5}$  niet groter mag worden dan : De procedure voor de beperking van de tijdstap wordt weergegeven in Algoritme 2.

Algoritme 2: Bijsturing van de tijdstap

for  $t \leftarrow 1$  to tijdstappen do if max  $\lambda(c_k) > 0.9$  then  $| \Delta t = \Delta t * 0.5;$ else  $| \Delta t = \Delta t$ end if  $\Delta t > \frac{\Delta x^2}{D_i}$  then  $| \Delta t = \frac{\Delta x^2}{D_i};$ else  $| \Delta t = \Delta t$ end end

De impact van de CFL voorwaarde op het limiteren van  $\Delta t$  kan eenvoudig nagegaan worden. Stel dat de maximale  $s_i(c_k, t) = 10^{-5}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>], dan is de  $\Delta t$  die deze kans  $\lambda$  gelijk aan 1 maakt overeenkomstig Vgl. 3.26 in functie van  $\Delta t$ :

$$\Delta t = \frac{1}{D_p \ s_i \ \frac{D_p \ s_i}{\Delta x^2} + \frac{v \ s_i}{\Delta x}},$$

gelijk aan 0.003 dagen of 259 seconden. De tijdstap die hierbij toegelaten is zal dus 100 keer groter zijn dan de toegelaten  $\Delta t$  volgens de CFL voorwaarde.

## 4.6 Groei

In een eerste stap wordt een lijst PotGroei met de potentiële groeirichtingen voor de cellen  $c_t$  waarin volgens de Tiplijst hyfetippen aanwezig zijn aangemaakt. Er wordt hierbij een keuze gemaakt tussen links, rechts of rechtdoor groeien, respectievelijk een kans  $\mu, \eta$  en  $\lambda$  hebben (Figuur 3.7(a)). De kans om niet te groeien tijdens  $\Delta t$  dan gegeven door  $(1 - \lambda - \mu - \eta)$ . Wanneer een hyfetip in  $c_t$  groeit naar een naburige cel  $c_l$  wordt de hoeveelheid intern substraat in  $c_t$  gedeeld met  $c_l$ . Indien  $c_l$  een element is van Actief Mycelium treedt er anastomosis op waarbij de hyfetip in  $c_k$  vesmelt met de hyfe in  $c_l$ . Zulke cellen hun indices zullen verwijderd worden uit Tiplijst en het interne substraat dat afkomstig is van  $c_t$  wordt opgeteld bij het reeds aanwezige interne substraat in  $c_l$  zodat de massabalans klopt (Figuur 4.5).



**Figuur 4.5:** Gesimuleerd myceliumnetwerk overeenkomstig de parameterwaarden en initiële condities opgelijst in Tabel 3.2, na 6 uren gesimuleerde groei waarin de cellen met mycelium grijs gekleurd zijn en de hyfetippen rood. De pijl duidt een plaats aan waar twee hyfen met elkaar versmolten zijn. (a) geeft de cellen weer die hyfetip zijn of het ooit geweest zijn maar verwijderd werden wegens anastomosis en (b) enkel de cellen met actieve hyfetippen.

Algoritme 3: Groei		
for $t \leftarrow 1$ tot tijdstappen <b>do</b>		
for $j \leftarrow Tiplijst$ do PotGroei=Gewogen keuze overeenkomstig $\lambda, \mu, \eta$ en $(1 - \lambda - \mu - \eta)$ voor elke cel $c_j$ ;		
end		
Tiplijst=PotGroei;		
Update Hyfelijst;		
<pre>if PotGroei ∈ Mycelium then</pre>		
tip verwijderd uit Tiplijst;		
hyfe afgesloten;		
end		
end		

De indices van de cellen naar dewelke hyfen gegroeid zijn tijdens  $\Delta t$  worden toegevoegd aan Hyfelijst, ActiefMycelium en Concentratie zoals weergegeven in Tabel 4.2 voor

 $c_{4747}$ . De indices van cellen waar anastomosis is opgetreden worden enkel aan Hyfelijst toegevoegd omdat deze reeds in ActiefMycelium en Concentratie aanwezig zijn. Door deze indices toe te voegen aan Hyfelijst worden bij de visualisatie van het myceliumnetwerk de plaatsen waar anastomosis optrad duidelijk als een verbinding. In Figuur 4.5 wordt een voorbeeld van anastomosis aangeduid door een pijl.

Tot slot dient vermeld te worden dat hyfen waarvan de hyfetippen met elkaar versmelten afgesloten worden en de twee tippen, die bijgevolg in één cel aanwezig zijn, niet meer tot de hyfetippen behoren. De procedure voor groei wordt weergegeven in Algoritme 3.

# 4.7 Vertakken

De functie Vertakken bepaalt voor elke cel  $c_k$  die actief mycelium bevat of er gedurende  $\Delta t$ een vertakking zal plaatsvinden en geeft de cellen die vertakken  $c_v$  weer in een lijst VertakkendeCellen. Vervolgens wordt er voor elke  $c_v$  gekeken welke groeirichtingen mogelijk zijn waarvan er een willekeurige keuze gekozen wordt. Indien in alle mogelijke groeirichtingen reeds mycelium aanwezig is komt er een lege sublijst in de lijst met vertakkingsmogelijkheden. Bijvoorbeeld, als de cellen  $c_{5050}$ ,  $c_{5061}$  en  $c_{5068}$  vertakken en  $c_{5050}$  geen vertakkingsmogelijkheden heeft,  $c_{5061}$ naar  $c_{5062}$  kan groeien en  $c_{5068}$  naar  $c_{5167}$  of  $c_{4968}$  kan groeien wordt de lijst met de vertakkingsmogelijkheden gegeven door:

 $\{\{\}, \{5062\}, \{5167, 4968\}\}.$ 

Vervolgens wordt er in de sublijsten die niet leeg zijn een willekeurige keuze gemaakt tussen de indices. Indien er slechts één mogelijkheid is zal het uiteraard deze zijn die gekozen wordt. De aldus bekomen lijst bevat de cellen  $c_w$  naar dewelke er tijdens  $\Delta t$  vertakkingen zullen ontstaan, dit zijn dan ook de nieuwe hyfetippen. Voor het bovenstaand voorbeeld kan volgende lijst met vertakkingen bekomen worden:

$$\{\{5062\},\{5167\}\}$$
 .

Op voorwaarde dat deze vertakkingen niet direct aanleiding geven tot anastomosis, worden  $c_w$  vervolgens opgenomen in de Tiplijst. Aangezien vertakkingen telkens nieuwe hyfen voorbrengen wordt aan de Hyfelijst voor elke vertakkende cel  $c_v$  een nieuwe sublijst toegevoegd met op de eerste plaats  $c_v$  en op de tweede  $c_w$ . In dit voorbeeld zouden dus de indices op positie twee en drie uit de lijst VertakkendeCellen gevolgd worden door  $c_{5062}$  en  $c_{5167}$  respectievelijk. Een ander voorbeeld wordt gegeven in Tabel 4.2 voor de hyfe in  $c_{5246}$  die kan vertakken naar  $c_{5345}$  of  $c_{5247}$  en finaal vertakt naar  $c_{5345}$  zoals dit weergeven wordt in de Hyfelijst op  $t_n + \Delta t$  waarvan de sublijst

```
\{5246, 5345\}.
```

wordt en achteraan Hyfelijst wordt toegevoegd. De procedure voor vertakken wordt weergegeven in Algoritme 4.

# 4.8 Translocatie

Het algoritme ter bepaling van de passieve translocatie start met het bepalen van de gradiënten in  $s_i$  tussen de cellen  $c_k$  die actief mycelium bevatten. De lijst met deze gradiënten wordt bewaard als Gradient. De lijst Diffusieterm bevat het verschil in  $s_i$  als gevolg van de diffusie overeenkomstig Vgl. (3.34). Dit verschil in  $s_i$  kan zowel positief als negatief zijn naar gelang het teken van de gradiënt die gedurende  $\Delta t$  aanwezig is tussen twee naburige cellen  $c_k$ . De bijdragen van de naburige cellen worden gesommeerd en opgeteld bij  $s_i(c_k, t)$ . In Figuur 4.6

Algoritme 4: Vertakken		
for $t \leftarrow 1$ tot tijdstappen <b>do</b>		
Met de functie Vertakken wordt een lijst met alle cellen uit de lijst		
ActiefMycelium gegenereert die vertakken;		
Voor de cellen die vertakken worden hun mogelijke groeirichtingen bepaald;		
Een willekeurige keuze wordt gemaakt tussen de mogelijke groeirichtingen;		
Hyfelijst wordt aangepast met nieuwe lijsten die elk staan voor een nieuwe hyfe;		
Tiplijst wordt aangepast met de cellen naar dewelke vertakt wordt;		
In het geval anastomosis optreedt worden deze tippen verwijderd uit Tiplijst;		
end		

wordt de richting van de passieve translocatie aangeduid door een pijl. De donkere cellen hebben een hogere  $s_i$  dan de centraal gelegen cel waarmee ze verbonden zijn door een hyfe, waardoor er diffusie vanuit deze cellen naar de centraal gelegen cel zal zijn.



**Figuur 4.6:** Illustratie van diffusie in de richting van een centraal gelegen cel indien er twee actieve buren zijn met een hogere interne substraatconcentratie hebben.

Voor de actieve translocatie wordt verondersteld dat deze wordt verwezenlijkt door de cellen  $c_r$  die het deel van de hyfe bevatten dat voor een hyfetip  $c_t$  gelegen is. Deze cellen  $c_r$  doen een investering om een hoeveelheid intern substraat naar de hyfetip te transporteren waardoor hun  $s_i$  daalt. Deze hoeveelheid geïnvesteerd intern substraat wordt gegeven door Vgl. (3.33). De concentratie intern substraat van  $c_t$  wordt vervolgens vermeerderd met het interne substraat dat vanuit de voorgaande cel getransloceerd wordt naar  $c_t$ . De procedure voor translocatie wordt weergegeven Algoritme 5.

Algoritme 5: Translocatie		
for $i \leftarrow l$ to $tijdstappen$ do		
Passieve translocatie:		
Een lijst Gradient wordt gemaakt die het verschil in $s_i$ tussen de cellen $c_k$ geeft;		
Een lijst Diffusieterm wordt overeenkomstig Vgl. (3.33) aangemaakt;		
De verschillende diffusietermen worden opgeteld bij $s_i$ van $c_k$ overeenkomstig		
Vgl. (3.32).		
Actieve translocatie :		
$c_t$ en $c_w$ hun $s_i$ wordt overeenkomstig Vgl. (3.34) aangepast;		
end		

#### 4.9 Opname nutriënten en onderhoud

De opname van  $s_e$  is volgens Vgl. (3.30) afhankelijk van  $s_i$  en  $s_e$  [9]. Echter, omdat  $s_i(c_k, 0)$  en  $s_e(c_k, 0)$  in [9] gelijk zijn aan  $10^{-11}$  (eenheden zijn niet gegeven) geeft de opname van extern substraat gedurende  $\Delta t$  een toename in  $s_i$  van grootteorde  $10^{-24}$  terwijl het onderhoud per  $\Delta t$  overeenkomstig Vgl. (3.29) een daling van  $s_i$  geeft die gelijk is aan  $10^{-15}$  aangezien  $c_5 = 10^{-9}$  [9]. Het is duidelijk dat er veel meer substraat verbruikt wordt dan dat er substraat in de cel opgenomen wordt zodat deze virtuele schimmel niet levensvatbaar is.

Davidson [96] die het CA-gebaseerde model van Boswell [9] implementeerde werkt eveneens met een  $s_e(c_k, 0) = 10^{-11}$  wat conform bovenstaande uitleg onrealistisch is aangezien de opname een factor  $10^9$  keer kleiner is dan het verbruik. De verklaring voor deze initiële  $s_e$  en  $s_i$ ligt mogelijks in de omrekening van mol per mm<sup>2</sup> naar mol per oppervlakte van een cel ( $10^{-4}$  mm<sup>2</sup>), hetgeen een  $s_e(c_k, 0)$  levert die gelijk is aan  $10^{-7}$ [mol glucose mm<sup>-2</sup>]. Dit zou niet kloppen aangezien  $s_e(c_k, 0)$  waarmee de parameterwaarden bepaald werden gelijk is aan  $3 \ 10^{-5}$ [mol glucose mm<sup>-2</sup>] [10]. Verder lost dit het dimensieprobleem niet op aangezien in Vgl. (3.13) de dimensies van  $s_i$  en  $s_e$  niet meer mol glucose per oppervlakte eenheid [ $L^{-2}$ ] zijn maar in mol glucose per cel [-] zodat de dimensies in linker en rechterlid nu gegeven door

$$\begin{array}{rcl} L^{-2} \ T^{-1} & = & L^2 \ T^{-1} \ L^{-2} \ L^{-2} - L \ T^{-1} \ L^{-1}, \\ & = & L^{-2} \ T^{-1} - T^{-1}, \end{array}$$

nog steeds verschillend zijn. Indien de experimenteel bepaalde parameterwaarden en initiële condities overeenkomstig [10] gebruikt worden zijn de initiële  $s_i$  en  $s_e$  respectievelijk gelijk aan 4  $10^{-5}$  en 3  $10^{-5}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] waardoor de opname overeenkomstig Vgl. (3.31) een factor  $10^4$  groter wordt dan het verbruik voor onderhoud, wat wel tot realistische waarden leidt.

De dimensieanalyse van de PDV (3.18)-(3.19) waarvan Vgl. (3.30) en (3.31) afgeleid werden bevat echter nog altijd inconsistenties. Teneinde de dimensies in linker-en rechterlid te doen overeen komen zou  $s_i$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] of  $s_e$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] in Vgl. (3.31) en 3.30 geschrapt kunnen worden. Een andere oplossing zou kunnen zijn om de opname te modelleren met een Michaelis-Menten kinetiek in functie van  $s_e$  zoals dit door Jorgensen et al. [95] experimenteel bepaald werd voor de filamenteuze schimmel Aspergillus niger, waarbij een maximale opname  $v_{max}$  bereikt wordt vanaf een bepaalde  $s_e$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] en de opname sterk afneemt vanaf dat  $s_e$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] onder een bepaalde kritische waarde  $K_m$  komt.

Het schrappen van  $s_i$  in Vgl. (3.31) en (3.30) levert:

$$\triangle_{opname} s_i(c_k) = c_1 m(c_k, t) s_e(c_k, t) \bigtriangleup t, \qquad (4.2)$$

$$\triangle_{opname} s_e(c_k) = -c_3 m(c_k, t) s_e(c_k, t) \triangle t.$$
(4.3)

Dit geeft een opname die  $s_i \, 10^6$  keer meer doet stijgen gedurende  $\Delta t$ . Zoals in Sectie 3.3.1 reeds werd aangekaart zijn de dimensies in linker- en rechterlid in bovenstaande vergelijkingen nog steeds niet gelijk aangezien de dimensie mol glucose in het rechterlid weggedeeld wordt maar het linkerlid nog steeds mol glucose als dimensie heeft.

De gegevens die beschikbaar zijn over de Michaëlis-Menten kinetiek van de filamenteuze schimmel Aspergillus niger zijn gegeven in molair  $(K_m)$  en in mol per gram droog gewicht van een hyfe per seconde  $(v_{max})$  [95]. Aangezien in het 2D discrete model gewerkt wordt met mm hyfe i.p.v. g hyfe en mol glucose per mm<sup>-2</sup> i.p.v mol glucose per liter zullen de eenheden omgevormd worden. Immers de initiële condities  $s_e(c_k, 0=3\ 10^{-5}$  die gegeven wordt in Tabel 4.1 komt overeen met een 2 % glucose (massa/volume verhouding) oplossing. Dit komt overeen met 20 gram glucose per liter of 0.111 M glucose waardoor een link gelegd kan worden met de gegevens in [95] aangezien dit overeen stemt met  $s_e = 3\ 10^{-5}$ . In [95] wordt gemeld dat  $K_m = 9\ 10^{-6}$ [M] hetgeen overeen stemt met  $3\ 10^{-9}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>]. Indien men veronderstelt dat het droog gewicht van een hyfe  $(g_{dw})$  overeen komt met de massa intern aanwezige glucose kan de experimenteel bepaalde  $v_{max}$  die gelijk is aan 0.5  $10^{-6}$  [mol glucose  $g_{dw}^{-1}s^{-1}$ ] omgerekend worden naar [mol glucose  $\Delta x^{-1}\ dag^{-1}$ ] zoals hieronder beschreven. De hoeveelheid intern substraat [mol glucose] die initieel per cel met  $\Delta x = 0.01\$ mm aanwezig is bedraagt

$$4 \ 10^{-5} [\frac{\text{mol glucose}}{\text{mm hyfe}^2}] \ 0.01^2 [\text{mm}] = 4 \ 10^{-9} [\text{mol}],$$

aangezien in 2D het oppervlak van een hyfe als een rechthoek kan gezien worden met lengte 0.01 mm en breedte 0.01 mm zodat de oppervlakte gelijk is aan 0.01 mm<sup>2</sup>. Indien vermenigvuldigd met de molaire massa van glucose (180  $\left[\frac{g}{mol}\right]$ ) levert dit het aantal gram glucose per 0.01 mm hyfe:

$$4 \ 10^{-9} \left[\frac{\text{mol glucose}}{0.01 \text{ mm hyfe}}\right] \ 180 \left[\frac{\text{g}}{\text{mol glucose}}\right] = 7.2 \ 10^{-7} \ \frac{\text{g}_{\text{glucose}}}{\text{mm hyfe}}$$
(4.4)

Indien aangenomen wordt dat de massa glucose in een hyfe gelijk is aan  $g_d w$  van een hyfe wordt

 $v_{max}$ 

$$7.2 \ 10^{-7} \left[\frac{\text{g}}{\text{mm hyfe}}\right] \ 0.5 \ 10^{-6} \left[\frac{\text{mol glucose}}{\text{g}_{\text{dw}}\text{s}}\right] = 3.6 \ 10^{-13} \left[\frac{\text{mol glucose}}{\text{mm hyfe s}}\right] \ \Delta t[s] \quad (4.5)$$

$$= 8.1 \ 10^{-13} \ [\frac{\text{mol glucose}}{0.01 \text{ mm hyfe } \Delta t}].$$
(4.6)

Een hyfe met lengte 0.01 mm heeft bijgevolg per dag een opname van  $3.11 \ 10^{-8}$  [mol glucose dag<sup>-1</sup> (mm hyfe)<sup>-1</sup>]. Dit geeft een verschil in  $s_i$  dat gelijk is aan  $3.11 \ 10^{-4}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup> dag<sup>-1</sup>] indien  $s_e$  hoog genoeg is zodat de maximale opnamesnelheid  $v_{max}$  bereikt wordt. De initiële hoeveelheid intern substraat wordt dus elke dag tien keer volledig vervangen en kan dus telkens geïnvesteerd worden in groei of kan door het myceliumnetwerk getransloceerd worden. Er dient opgemerkt te worden dat de  $v_m ax$  die hier bekomen werd, deze is voor een hyfe met  $s_i$  gelijk aan de initiële  $s_i$ . Echter, gedurende de simulatie zal deze veranderen en hierbij ook de  $v_{max}$ . Gezien het experimenteel bepaalde verband  $0.5 \ 10^{-6} [\frac{\text{mol glucose}}{g_{dw}s}]$  [95], zal er minder (meer) opname zijn als  $s_i$  hoger (lager) is. Een lineair verband wordt verondersteld tussen  $g_dw$  of massa glucose  $M_{glucose}$  en  $v_{max}$ . Een algemeen verband tussen  $s_i$  en  $v_{max}$  wordt dan overeenkomstig de experimenteel bepaalde maximale opnamesnelheid  $v_{max,exp}$ 

$$s_{i}\left[\frac{\text{mol glucose}}{(\text{mm hyfe})^{2}}\right] \frac{\text{Oppervlak hyfe}}{cel}[\text{mm}^{2}] 180\left[\frac{\text{g}}{\text{mol glucose}}\right] = M_{glucose}\left[\frac{\text{mol glucose}}{cel}\right] (4.7)$$

$$v_{max,exp}\left[\frac{\text{mol}}{g_{dw}s}\right] M_{glucose}\left[\frac{\text{mol glucose}}{cel}\right] \Delta t[s] = v_{max}\left[\frac{\text{mol glucose}}{cel\Delta t}\right] \quad (4.8)$$

De vergelijking die de Michaëlis-Menten kinetiek beschrijft wordt gegeven door

$$v = v_{max} \frac{s_e}{s_e + K_m}.$$
(4.9)

De vergelijking die het aantal mol glucose opgenomen door een cel  $c_k$  tijdens  $\Delta t$  bepaalt wordt gegeven door

$$v = v_{max} \Delta t \; \frac{\text{lengte hyfen per cel}}{0.01 \text{ mm}} \; \frac{s_e}{s_e + K_m},\tag{4.10}$$

en is weergegeven in Figuur 4.7.

Het is belangrijk de totale lengte van de hyfen die zich in een cel bevinden in rekening te brengen aangezien de parameters voor de Michaëlis-Menten kinetiek per 0.01 mm hyfe uitgedrukt staan. Aan de hand van Vgl. (4.7) wordt de hoeveelheid [mol glucose] die opgenomen wordt per  $\Delta t$  gegeven. De  $s_i$  in cellen  $c_k$  als gevolg van deze opname is de opgenomen hoeveelheid glucose plus de hoeveelheid glucose die reeds aanwezig was gedeeld door het oppervlak aan hyfen in de cel onder beschouwing. Aangezien  $s_e$  veel hoger is dan  $K_m$  in een omgeving met  $s_e = 3 \ 10^{-5}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] is het verschil in  $s_i$  als gevolg van de opname per  $\Delta t$  gelijk aan de maximale opnamesnelheid 8.1  $10^{-9}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup> $\Delta t^{-1}$ ] indien  $s_i = 4 \ 10^{-5}$ [mol glucose mm<sup>-2</sup>]. De opname van glucose gaat zoals beschreven door Jorgensens et al. [95]



**Figuur 4.7:** De opname [mol glucose/ $\Delta t$ ] overeenkomstig de Michaëlis-Menten vergelijking in functie van  $s_e$  voor een hyfe met  $s_i$ =4 10<sup>-5</sup>.

over de afname aan  $s_e$ , de netto opname zal slechts een deel van het opgenomen substraat zijn omwille van een imperfecte conversie van extern naar intern substraat die 90 % bedraagt [9]. De maximale opname wordt dan 7.29  $10^{-9}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup> $\Delta t^{-1}$ ].

De oorspronkelijk voorgestelde vergelijking voor opname in [9] (Vgl. (3.31)) brengt per  $\Delta t$  een stijging van  $s_i$  teweeg

$$= \Delta t \ s_i(c_k, 0) \ s_e(c_k, 0) \ c1$$
  
= 2.25 4 10<sup>-5</sup> 3 10<sup>-5</sup> 9 10<sup>2</sup>  
= 2.8 10<sup>-13</sup> [mol glucose (mm hyfe)<sup>-2</sup> \Delta t<sup>-1</sup>]

Het in Vgl. (3.31) schrappen van  $s_i$  geeft bijgevolg een opname van  $s_i$  per  $\Delta t$  die gelijk is aan 7 10<sup>-9</sup> [mol glucose (mm hyfe)<sup>-2</sup>  $\Delta t^{-1}$ ]. Dit levert een opname die van dezelfde grootteorde is als de Michaëlis-Menten vergelijking. De Michaëlis-Menten kinetiek als het schrappen van  $s_i$  in Vgl. (3.31) werden toegepast ten einde de dimensies in linker- en rechterlid te doen overeen komen. Het is opmerkelijk dat deze twee vergelijkingen eenzelfde opname teweeg brengen die tevens veel groter is dan de opname die volgt uit Vgl. (3.31).

Als de opname door Vgl. (3.31) beschreven wordt met de initiële  $s_i$  en  $s_e$  in [9] is er echter een te groot verschil met de experimenteel bepaalde gegevens voor opname. De opname is dan van grootteorde  $10^{-26}$ [mol glucose mm<sup>-2</sup>  $\Delta t^{-1}$ ], zoals eerder aangehaald geeft dit te weinig input aan substraat om het verbruik aan onderhoud te compenseren. Het ontwikkelde CA-gebaseerde model zal gebruik maken van de Michaëlis-Menten kinetiek om de opname te beschrijven, in Vgl. (3.25) zit immers nog een fout in de dimensies aangaande [mol glucose] zoals reeds in Sectie 3.3.1 werd aangehaald.

Algoritme 6: Opname nutriënten en onderhoud		
for $t \leftarrow 1$ tot tijdstappen <b>do</b>		
LengteHyfe= $\frac{\Delta x}{2}$ keer het aantal buren waarmee de cellen $c_k$ uit		
ActiefMycelium met een hyfe verbonden zijn;		
$s_e$ uit de lijst Concentratie wordt overeenkomstig Vgl. (4.10) aangepast voor elk		
celnummer uit de lijst ActiefMycelium afhankelijk van de lengte aan hyfen,		
LengteHyfe, die in de cel aanwezig is; $s_i$ uit de lijst Concentratie wordt		
overeenkomstig Vgl. (4.10) aangepast (rekening houdend met imperfecte conversie)		
voor elk celnummer uit de lijst ActiefMycelium afhankelijk van de lengte aan		
hyfen, LengteHyfe, die in de cel aanwezig is ;		
end		

# 4.10 Rekentijd

De rekentijd in functie van de gesimuleerde periode word in Figuur 4.8 voorgesteld. Hieruit blijkt dat de rekentijd sterk toeneemt naarmate de gesimuleerde periode langer wordt. Dit is het gevolg van het alsmaar groter worden van de lijsten. De grootte van  $s_i(c_k, 0)$  bepaalt sterk de benodigde rekentijd aangezien een grote  $s_i(c_k, 0)$  initieel zorgt voor meer groei zodat de lijsten reeds groter zijn bij het begin van de simulatie.



**Figuur 4.8:** De rekentijd in functie van de gesimuleerde periode met  $s_i(c_k, 0) = 10^{-6}$ .

# **5** Resultaten

# 5.1 Validatie van het ontwikkelde model

Het CA-gebaseerde model met parameterwaarden en initiële conditie zoals gegeven in Tabel 4.1 simuleert een groeiperiode van 40 uren in een omgeving met 1 % (massa/volume) glucose als C-bron aangezien de experimenteel bepaalde gegevens ter validatie in een omgeving met 1 % (massa/volume) glucose bepaald werden [3]. De initiële  $s_e$  in cellen  $c_z$  is bijgevolg gelijk aan  $1.5 \ 10^{-5}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] in plaats van  $3 \ 10^{-5}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] zoals weergegeven in Tabel 4.1. De opname wordt overeenkomstig Vgl. (4.9) bepaald waardoor het verschil in opnamesnelheid als gevolg van een halvering van de externe substraatconcentratie weinig verschil maakt. In beide gevallen is  $s_e(c_z, 0)$  veel groter dan  $K_m$  zodat de opnamesnelheid in beide gevallen  $v_{max}$  benadert. Een belangrijk gegeven in het experiment is de oplossing waarin de sporen bewaard worden aangezien deze bepalend is voor de initiële interne substraatconcentratie. De sporeoplossing bestaat uit een 0.1 (V/V) Tween 80 oplossing (gele kleur). Vandaar dat er wordt aangenomen dat  $s_i(c_k, 0)$  veel lager is dan deze uit Tabel 4.1 namelijk  $10^{-6}$  [mol glucose mm<sup>-1</sup>]. Indien  $s_i(c_k, 0)$  veel hoger is (cfr. Tabel 4.1) zal de kans om te groeien initieel ook veel hoger zijn. Als gevolg zal er in de beginfase sneller mycelium gevormd worden zonder dat er nog vertakkingen opgetreden zijn. Als gevolg zal de HGU zoals weergegeven op Figuur 5.1(c) initieel een veel sterker stijgende exponentiële toename waargenomen worden dan te zien is op Figuur 5.2(c) waarbij  $s_i(c_k, 0)$  lager is. De totale hyfelengte en aantal hyfetippen waarvan Figuren 5.1(c) en 5.2(c) afgeleid werden wordt gegeven in respectievelijk Figuren 5.1(a) 5.1(b) en Figuren 5.2(a) 5.2(b). Op Figure 5.1(a) is duidelijk te zien dat er in het begin een sterke toename is van de totale hyfelengte wat het gevolg is van de hogere  $s_i(c_k, 0)$ .

Het aantal hyfetippen, de totale lengte van het myceliumnetwerk en de HGU in functie van de tijd werd experimenteel bepaald voor de filamenteuze schimmels *Mucor hiemalis*, *Ge*-



**Figuur 5.1:** De macroscopische karakteristieken voor het gesimuleerde myceliumnetwerk met parameterwaarden en initiële conditie uit Tabel 4.1 na 4 uren groei met **??** de totale hyfelengte i.f.v. de tijd, **??** het aantal hyfetippen i.f.v. de tijd en **??** HGU i.f.v. de tijd.

otrichum candidum, Aspergillus nidulans, Neurospora crassa en Penicillium chrysogenum in [3]. Ter validatie van het ontwikkelde model worden de macroscopische karakteristieken zoals totale lengte van het myceliumnetwerk, aantal hyfetippen en HGU (Vgl. (2.5)) vergeleken met experimenteel bepaalde gegevens die hierover beschikbaar zijn. De grootte-orde van deze experimenteel bepaalde karakteristieken is hetzelfde, er wordt gekozen om A. nidulans weer te geven om een vergelijking te maken. Het aantal hyfetippen dat zich in de tijd vormt bij Aspergillus nidulans wordt weergegeven in Figuur 5.4(a) door vierkanten, de totale lengte van het myceliumnetwerk door holle bolletjes en de HGU door volle bolletjes. Figuur 5.4(b) geeft de lengte weer van het gesimuleerde myceliumnetwerk dat bekomen wordt met het ontwikkelde CA-gebaseerde model. Na 16 uren groei bedraagt de lengte van het myceliumnetwerk zowel voor Aspergillus nidulans als voor de gesimuleerder R. solani 2.5 mm. In Figuur 5.4(c) wordt het aantal hyfetippen van de gesimuleerde *R. solani* in functie van de tijd weergegeven. Hieruit blijkt dat het aantal hyfetippen dat zich tijdens een gesimuleerde groei van 16 uren vormt iets lager is dan de experimenteel bepaalde voor Aspergillus nidulans. Dit is te verklaren doordat de experimenteel bepaalde HGU in [97] 0.2 mm is in plaats van de 0.15 - 0.16 mm bij Aspergillus nidulans wat een lager aantal vertakkingen per lengte hyfe impliceert. In Figuur 5.4(d) wordt de HGU in functie van de tijd gegeven voor de gesimuleerde R. solani. Hieruit blijkt dat deze convergeert naar 0.17 mm, een lagere waarde dan 0.2 mm zoals dit werd waargenomen



**Figuur 5.2:** De macroscopische karakteristieken voor het gesimuleerde myceliumnetwerk met parameterwaarden en initiële conditie uit Tabel 4.1 met  $s_i(c_k, 0) = 10^{-6}$  na 4 uren groei met ?? de totale hyfelengte i.f.v. de tijd, ?? het aantal hyfetippen i.f.v. de tijd en ?? HGU i.f.v. de tijd.

in [97]. Echter in vergelijking met [7] komt dit overeen. Dit is logisch aangezien de groei-en vertakkingskansen in [7] dezelfde zijn als in het ontwikkelde model. Er zijn in Figuur 5.4(d) twee fasen te onderscheiden: initieel een fase van exponentiële groei en vervolgens een fase van convergentie. De aanwezigheid van twee zulke fasen wordt bevestigd door experimentele observaties[3]. Dit is, zoals besproken in Sectie 2.4, het gevolg van initiële fase van schimmelgroei zonder vertakkingen waardoor n constant blijft en H exponentieel toeneemt, cfr. Vgl. 2.5 stijgt HGU in deze eerste fase exponentieel. In Figuur 5.4(d) duurt deze fase tot t=1.8h, vanaf dan stijgt het aantal tippen zoals te zien is op Figuur 5.4(c) waardoor HGU niet meer exponentieel toeneemt. Echter vanaf de fase van tipproductie begint stijgt n mee met de totale hyfelengte waardoor HGU naar een constante waarde convergeert.

In [7] wordt de lengte die een myceliumnetwerk groeit en het aantal hyfetippen die gedurende een dag ontstaan weergegeven (Figuur 5.5), hieruit blijkt dat het gesimuleerde myceliumnetwerk  $10^4$  cm of 100m per dag kan groeien en hierbij  $10^4$  hyfetippen vormt. Het enige verschil is dat de simulatie in [7] in 3D gebeurt terwijl de experimenteel bepaalde gegevens in [3] en het in deze thesis ontwikkelde CA-gebasserde model uitgaan van groei in een 2D vlak (petriplaat). Er is wel op te merken dat er in 2D meer kans is op anastomosis omdat er minder groeimogelijkheden zijn, waardoor er meer mogelijheden zijn om een andere hyfe te ontwijken. Hierdoor zullen er uiteindelijk minder tippen zijn dan in 3D, dit is echter geen sluitende verklaring voor het grote verschil in aantal tippen. Het inoculum in de 3D simulatie in [7] bestaat uit 12 hyfen in plaats van 6, wat slechts overeen komt met enkele minuten voorsprong aangaande groei. Een verschil in initiële conditie van  $s_i(c_k, t)$  (deze is immers niet te meten dus moet er hieromtrend een aanname gebeuren) heeft ook een impact op het verloop van hyfelengte en aantal tippen zoals te zien is in Figuur 5.1 waarbij  $s_i(c_k, t) = 4 \ 10^{-5}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>]. Hierbij zal door de 40 maal grotere  $s_i(c_k, 0)$  een 40 maal hogere  $v_{max}$  geven, door deze veel hogere input zal de groei ook meer gestimuleerd worden, die een hogere opname met zich meebrengt, simpelweg omdat er meer myclium aanwezig is om op te nemen. Door de groei zal het aanwezige interne substraat sterk verdund zijn over het mycelium waardoor de groeikansen terug dalen zoals weergegeven op Figuur refvmaxIII.De initiële conditie  $s_i(c_k, 0)$  heeft dus op lange termijn geen invloed op de opnamekinetiek.



**Figuur 5.3:**  $v_{max}$  [mol glucose (0.01vmm hyfe)<sup>-2</sup> $\Delta t^{-1}$ ] voor de centrale cel van het inoculum gedurende een simulatie van 4 uren.

De HGU daarentegen (Figuur 5.4(d)), kent eenzelfde verloop aangezien deze voornamelijk afhangt van de groei- en vertakkingskansen. Aangezien er met dezelfde paramterwaarden gewerkt wordt is dit gelijklopend. Het zijn namelijk de groei-en vertakkingskansen die de helling van de totale hyfelengte en aantal tippen in functie van de tijd (uitgezet op logaritmische assen) bepalen. De hellingsgraden zijn hierbij ongeveer gelijk wat een constante HGU impliceert zoals uitgelegd in Sectie 2.4 en voorgesteld in Figuur 5.4(a). Echter, een hogere kans op groei bij eenzelfde kans op vertakken zou een hogere HGU geven omdat de internodes tussen de vertakkingen gemiddeld groter zullen zijn.

Een cruciale stap in de validatie van het voorgestelde model behelst de controle van de massabalans. Dit wordt gedaan door de schimmelgroei te simuleren in een substraatloze omgeving  $(s_e(c_k, 0)=0$ [mol glucose mm<sup>-2</sup>]). In Figuur 5.6 wordt de hoeveelheid intern beschikbare energie  $E_i$ , uitgedrukt in mol glucose, weergegeven in functie van de tijd. Hieruit blijkt dat  $E_i$ stelselmatig afneemt als gevolg van investeringen in groei, actieve translocatie en onderhoud. Tijdens de eerste twee uur is er meer afname van  $E_i$  als gevolg van de investeringen die nodig waren in groei. Deze investeringen en het delen van de hoeveelheid intern substraat over een hyfe die groeit of vertakt naar het nieuw stuk hyfe of vertakking, leiden tot een sterke daling van  $s_i$ . Hierbij is de kans op groei en vertakken van cellen  $c_k$  ook sterk afgenomen zodat de investeringen voor groei en vertakken uit blijven. Enkel nog de kleine investeringen voor onderhoud en actieve translocatie blijven over waardoor  $E_i$  trager afneemt.



Figuur 5.4: (a) stelt de experimenteel bepaalde macroscopische karakteristieken (totale hyfelengte, aantal tippen en HGU) voor van *Aspergillus niger* [3]. De macroscopische karakteristieken voor het gesimuleerde myceliumnetwerk met parameterwaarden en initiële conditie uit Tabel 4.1 met  $s_i(c_k, 0) = 10^{-6}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] met (b) de totale hyfelengte i.f.v de tijd, (c) het aantal hyfetippen i.f.v de tijd en 5.4(c) HGU i.f.v de tijd.

Adams [16] en Lopez-Franco et al. [98] sugereren dat de hyfen van filamenteuze schimmels in pulsen groeien. Wanneer de groeisnelheid van de virtuele schimmel in functie van de tijd bekeken wordt, komen deze groeipulsen duidelijk tot uiting (Figuur 5.7(a)). In Figuur 5.7(a) wordt de groeisnelheid telkens uitgemiddeld over een tijdsinterval gelijk aan 400  $\Delta t$ . Aangezien de ruimte gediscretiseerd werd aan de hand van hexagonale cellen met diameter  $\Delta x$  [mm] kan er enkel gegroeid worden in discrete stappen gelijk aan  $\Delta x$  [mm]. Neem nu bijvoorbeeld een stuk hyfe dat tijdens 100  $\Delta t$  een afstand  $\Delta x$  groeit dan is er gedurdende 99 tijdstappen geen groei geweest en is deze afstand afgelegd in een tijdstap. Dit geeft een pulsatie in groeisnelheid die er in realiteit niet is, als oplossing kan het gemiddelde genomen worden over 100 tijdstappen. Indien de maximale  $s_i(c_k, t)$  gelijk is aan  $10^{-5}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] dan zal er overeenkomstig de berekening in Sectie ongeveer 100  $\Delta t$  nodig zijn om een afstand  $\Delta x$  te groeien. Om zeker te zijn dat de intrinsieke pulsatiele groei afkomstig van sprongsgewijze groei in een gedisceti-



Figuur 5.5: De gesimuleerde totale hyfelengte (a) en het aantal hyfetippen (b) volgens [7].



**Figuur 5.6:** De gemiddelde hoeveelheid intern beschikbare energie  $E_i$ , uitgedrukt in mol glucose, gedurende 10 simulaties van vijf uren. Het gekleurde gebied stelt de standaardafwijking voor op de simulaties.

seerde oppervlak niet aan de basis ligt van een gepulseerde groeisnelheid wordt het tijdsinterval gelijk aan 400  $\Delta t$  gekozen. De pulsaties van de groeinsnelheid die in Figuur 5.7(a) naar voor komen kunnen een gevolg zijn van de zware investering die een hyfetip moet doen om te groeien doordat het aanwezige interne substraat dient gedeeld te worden met de nieuw gevormde hyfe. Hierdoor halveert  $s_i$  en bijgevolg de kansen op groei ( $\lambda$ ,  $\eta$  en  $\mu$ ), echter na een periode van actieve en passieve translocatie stijgt  $s_i$  opnieuw zodat de groeikansen terug stijgen, wat de pulsatie in groeisnelheid zou kunnen verklaren. Echter, dit fenomeen doet zich gelijktijdig voor over alle hyfetippen en niet enkel bij individuele hyfetippen. Dit zou een gevolg kunnen zijn van de symmetrie die schimmelgroei vertoont wanneer deze plaats vindt in een homogenen omgeving. Indien dit het geval is zou het groeien in een medium met een heterogene verdeling van de substraatconcentratie het synchroon groeien kunnen doorbreken. In Figuur 5.7(b) wordt geillustreerd dat bij een hogere  $s_i(c_k, 0)$  meer groei zal zijn, dus hogere initiële groeisnelheden geeft, echter deze vlakken af omdat door het delen van het intern substraat over een groter oppervlak, deze sterk daalt waardoor de groeikansen afnemen zoals dit ook het geval was voor Figuur 5.3. In Figuur 5.7(b) moet opgemerkt worden dat er initieel minder pulsen zijn, wat een gevolg is van

 $\Delta t$  bij een hoge  $s_i$  die veel lager is cfr. voorgaand voorbeeld. Hierdoor zal door het uitmiddelen over 400  $\Delta t$  een groot deel van de pulsen uitgemiddeld worden.



**Figuur 5.7:** De gesimuleerde groeisnelheid van het myceliumnetwerk in een heterogene omgeving die wordt uitgemiddeld over een tijdsinterval gelijk aan 400  $\Delta t$  indien er (a)  $s_i(c_k, 0) = 10^{-6}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] of (b)  $s_i(c_k, 0) = 3 \ 10^{-5}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>].

# 5.2 Benchmark situaties

#### 5.2.1 Overzicht

Een overzicht van de benchmark situaties aangaande de initiële verdeling van het extern substraat in de cellen  $c_z$  waaruit de tesselatie is opgebouwd wordt gegeven in Tabel 5.1 en gevisualiseerd in Figuur 5.10 waarbij het initiële myceliumnetwerk voorgesteld wordt in Figuur 5.8.



**Figuur 5.8:** Het initiële myceliumnetwerk voor de verschillende benchmark situaties. De rode cellen bevatten hyfetippen, de grijze cellen bevatten enkel mycelium. Dit wordt voorgesteld door pijlen waarbij de tip een hyfetip voorstelt.

De simulaties worden uitgevoerd overeenkomstig het ontwikkelde CA-gebaseerde model met parameterwaarden en initiële conditie zoals gegeven in Tabel 4.1. Bij de visualisatie van

 Tabel 5.1: Overzicht benchmark situaties met betrekking tot de initiële verdeling van het externe substraat.

Situatie 1	$s_e(c_z, 0) < 3 \ 10^{-5}, \forall \mathbf{k}$
Situatie 2	$s_e(c_z,0) \sim U(0,3\;10^{-5}) \forall  {\rm k}$
Situatie 3	$s_e(c_z, 0) = \begin{cases} 3 \ 10^{-5} &, \forall y \land \forall x < 0.4 \\ 0 &, \forall y \land \forall x \ge 0.4 \end{cases}$
Situatie 4	$s_e(c_z, 0) = 3 \ 10^{-5}$ voor een groepje cellen 0.05 mm onder het inoculum
Situatie 5	$s_e(c_z, 0) = 3 \ 10^{-5}$ voor twee groepjes cellen binnen een straal van 0.1 mm rond het inoculum
Situatie 6	$s_e(c_k, 0) = 3 \ 10^{-5}$ voor meerdere groepjes cellen binnen een straal van 1mm rond het inoculum

het gesimuleerde myceliumnetwerk zal  $s_i$  van  $c_k$  voorgesteld worden door de kleurenlegende in Figuur 5.9. Hierbij wordt  $s_i(c_k, t)$  gedeeld door 3/8  $s_i(c_k, 0)$ , indien dit quotiënt groter is dan 1 zullen de cellen ook rood gekleurd zijn. Deze kleurenlegende zal gedurende deze Sectie gebruikt worden om de verdeling van het interne substraat in het gesimuleerde myceliumnetwerk (aanwezig in de cellen  $c_k$ ) aan te duiden. Het externe substraat wordt aangeduid overeenkomstig grijstinten, indien  $s_e$  in een cel gelijk is aan 3  $10^{-5}$  zal deze zwart gekleurd worden, hoe lager

#### HOOFDSTUK 5. RESULTATEN

 $s_e$  hoe lichter de grijstint. Aan de hand van deze kleurencode voor  $s_e$  in cellen  $c_z$  zullen de verschillende benchmark situaties gevisualiseerd worden.



**Figuur 5.9:** Kleurenlegende overeenkomstig  $s_i(c_k, t)$  gedeeld door 3/8  $s_i(c_k, 0)$ , als dit quotiënt naar nul gaat zullen de cellen  $c_k$  blauw ingekleud worden, anders rood.


**Figur 5.10:** Overzicht van de benchmarksituaties aangaande de verdeling van  $s_e(c_k, 0)$  voor (a) Situatie 1, (a) Situatie 2, (c) Situatie 3, (d) Situatie4, (e) Situatie5 en (f) Situatie6. De cellen met  $s_e(c_k, 0)=0$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] worden lichtgrijs ingekleurd en de cellen met  $s_e(c_k, 0) = 1.5 \ 10^{-9}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] donkerder grijs en  $s_e(c_k, 0) = 3 \ 10^{-5}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] zwart. De cellen waar het inoculum aangebracht worden zijn in het blauw gekleurd.

#### 5.2.2 Situatie 1

In situatie 1 wordt de groei van het myceliumnetwerk in een medium  $\operatorname{met}_{s_e}(c_z, 0) = 3 \ 10^{-5}$ ,  $s_e(c_z, 0) = 3 \ 10^{-6}$  [mol glucose  $\operatorname{mm}^{-2}$ ] (Figuur 5.11) en  $s_e(c_z, 0) = 1.5 \ 10^{-9}$  [mol glucose  $\operatorname{mm}^{-2}$ ] gesimuleerd. Het is duidelijk in Figuur 5.11(b) dat de groei niet belemmerd wordt aangezien  $s_e(c_z, 0)$  nog altijd veel groter is dan  $K_m$  (9  $10^{-9}$  [mol glucose  $\operatorname{mm}^{-2}$ ]). De macroscopische karakteristieken zoals totale lengte van het mycelium als HGU blijven constant in een grote range van  $s_e$  zoals dit bevestigd wordt in [97]. Dit is tevens een indicatie dat de opnamesnelheid gelimiteerd is aangezien anders een hogere  $s_e$  telkens voor een hogere opname zorgt en bijgevolg meer groei teweeg brengt. Indien  $s_e(c_k, 0)=3 \ 10^{-5}$  ligt de opnamesnelheid wel veel onder de maximale zodat  $s_i$  veel lager is in de hyfen (Figuur 5.11(c)) waardoor de groei wel belemmerd wordt.



**Figuur 5.11:** Gesimuleerd myceliumnetwerk door het ontwikkelde CA-gebaseerde model met parameterwaarden en intitiële condities overeenkomstig Tabel 4.1 na een gesimuleerde periode van 8 uren waarbij (b)  $s_e(c_k, 0)=3 \ 10^{-5}$ , (c)  $s_e(c_k, 0)=3 \ 10^{-6}$  en **??**  $s_e(c_k, 0)=1.5 \ 10^{-9}$ .

### 5.2.3 Situatie 2

In Situatie 2 wordt de groei van het myceliumnetwerk gesimuleerd in een medium waar de  $s_e$  heterogeen verdeeld is (Figuur 5.12(b)). De pulsen in de groeisnelheid, zoals weergegeven in Figuur 5.7(a), kwamen tot uiting bij groei in een homogene omgeving (Figuur 5.12(a)) maar zoals aangestipt in Sectie 6.1 zou de groei in een homogene omgeving kunnen leiden tot deze groeipulsen. Echter, er wordt nog steeds pulsatiele groei waargenomen in Figuur 5.12(b) ondanks dat er in een heterogene omgeving gegroeid wordt waarbij elke hyfe van het ontwikkelende mycelium onderworpen wordt aan een verschillende  $s_e$ . De groeisnelheid van het myceliumnetwerk in Situatie 2 wordt gegeven in Figuur 5.12(b). Het is dus niet een gevolg van de omgeving dat deze groeipulsen ontstaan maar van interne processen zoals opname en translocatie.



**Figuur 5.12:** De gesimuleerde groeisnelheid van het myceliumnetwerk in een heterogene omgeving die wordt uitgemiddeld over een tijdsinterval gelijk aan 400  $\Delta t$  indien er (a) in een homogene omgeving of (b) in een heterogene omgeving gegroeid wordt.

#### 5.2.4 Situatie 3

In Situatie 3 wordt de groei in het rechtervlak waar  $s_e = 3 \ 10^{-5}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] gestimuleerd en minder in het linkervlak waar  $s_e=0$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] zoals weergegeven wordt in Figuur 5.13(b). Dit is het gevolg van een grotere opname van substraat waardoor  $s_i$  stijgt en hierbij ook de groei- en vertakkingskans. Dit heeft als gevolg dat het gesimuleerder myceliumnetwerk een gebied met een hoge  $s_e$  meer zal exploreren dan een gebied waar een lage  $s_e$  is. Indien  $\Delta t$  niet meer bijgestuurd wordt door de CFL-voorwaarde maar enkel door de groeikans begrensd wordt zal er meer groei zijn in het substraatrijke rechtervlak. Dit toont mooi aan dat de passieve translocatie belemmerd wordt waardoor  $s_i$  op plaatsen met een hoge  $s_e$  hoog blijft en er bijgevolg meer groei is (Figuur 5.14(a)). Op Figuur 5.14.



Figuur 5.13: (a) Het inoculum weergegeven overeenkomstig de locatie in het vlak. (b) Gesimuleerd myceliumnetwerk met parameterwaarden en intitiële condities overeenkomstig Tabel 4.1 na een gesimuleerde periode van 40 uren met als enige aanpassing de initiële  $s_e$  overeenkomstig Tabel 5.1 voor Situatie 3.



**Figuur 5.14:** Gesimuleerd myceliumnetwerk door het CA-gebaseerde model voorgesteld in [9] met parameterwaarden en intitiële condities overeenkomstig Tabel 4.1 met als enige aanpassing de initiële verdeling van  $s_e$  zoals voorgesteld in Tabel 5.1 voor Situatie 2. (a) geeft de tesselatie weer waarin elke cel k zijn  $s_i$  weergegeven is aan de hand van de kleurenlegende die bovenaan de figuur is meegegeven, de overige cellen krijgen worden zwart ingekleurd als ze een  $s_e = 10^{-6}$ [mol glucose mm<sup>-2</sup>] hebben en wit als deze nul is. (b) geeft de het myceliumnetwerk weer zoals dit in de Hyfelijst bijgehouden wordt

### 5.2.5 Situaties 4 en 5

In Situatie 4 wordt bij het vinden van de voedingsbron, die onderaan het inoculum gelegen is, de groei sterk gestimuleerd in de richting van de voedingsbron, de hyfe die de voedingsbron doorkruist is namelijk veel langer dan de andere zoals weergegeven is op Figuur 5.15. De hyfe die een voedingsbron vindt zal door de opname van  $s_e$  een verhoogde  $s_i$  hebben waardoor de groei-en vertakkingskans verhoogt en translocatie van intern substraat op gang komt.

In Situatie 5, weergegeven in Figuur 5.16, wordt bevestigd dat de ontdekking van een voendingsbron het aantal vertakkingen doet toenemen. Dit was reeds duidelijk in Situatie 3 (Figuur 5.14). Het myceliumnetwerk verbindt de twee voedingsbronnen en blijft investeren in de hyfen die groeien in een gebied waar nog geen glucose gevonden is. Dit is te wijten aan de actieve translocatie naar de hyfetippen toe en de diffusie van glucose naar cellen  $c_k$  met een lagere  $s_i$ . Tenslotte is de  $s_i$  van de cellen op de rechte tussen deze twee voedingsbronnen veel hoger. De passieve translocatie als gevolg van diffusie zal namelijk het optimale pad het meest bevoordelen.Indien de voedingsbronnen uitgeput raken en de virtuele schimmel afsterft zullen uiteindelijk de hyfen met de hoogste  $s_i$  overblijven. Overeenkomstig Figuur 5.16 zou dit op de rechte zijn tussen deze twee voedingsbronnen. De rechte tussen twee punten is tevens het optimale pad waardoor



**Figuur 5.15:** Door het ontwikkelde CA-gebaseerde model gesimuleerd muceliumnetwerk met parameterwaarden en intitiële condities overeenkomstig Tabel 4.1 met als enige aanpassing de initiële verdeling van  $s_e$  zoals voorgesteld in Tabel 5.1 voor situatie 3.(a) geeft de tesselatie weer waarin elke cel k zijn  $s_i$  weergegeven is aan de hand van de kleurenlegende die bovenaan de figuur is meegegeven, de overige cellen krijgen worden zwart ingekleurd als ze een  $s_e = 10^{-6}$  [mol glucose mm<sup>-2</sup>] hebben en wit als deze nul is. (b) geeft de het myceliumnetwerk weer zoals dit in de Hyfelijst bijgehouden wordt.

## 5.2.6 Situatie 6

Het optimaal verbinden van voedingsbronnen werd bij *Physarum polycephalum* opgemerkt door Tero et al. [8] (Figuur 5.17) die eveneens een verband zag met de verbinding van steden door het treinnet. Indien de voedingsbronnen geplaatst worden overeenkomstig de plaatsen waar steden liggen komt het uiteindelijke myceliumnetwerk overeen met een optimale verbinding tussen de steden die ook door het treinnet gevolgd wordt [8]. In Figuur 5.17 wordt dit voor *Physarum polycephalum* geïllustreerd. Het CA-gebaseerde model, indien het de werkelijkheid goed benaderd, zou op lange termijn ook aanleiding moeten geven tot een optimale verbinding van de voedingsbronne. In Situatie 6 werden er meerdere voedingsbronnen in de buurt van het inoculum geplaatst. De locaties van deze voedingsbronnen zijn niet willekeurig gekozen, maar overeenkomstig de locatie van de belangrijkste steden in België zoals weergegeven op Figuur 5.18.

Het gesimuleerde myceliumnetwerk van *R. solani* vindt uiteindelijk al na 14 uren de verschillende voedingsbronnenn uitgezonderd deze in de uithoeken (Figuren 5.19(a) en 5.19(b)). Het optimale pad, zoals dit door *Physarum polycephalum* gevonden wordt [8], komt niet tot uiting aangezien er nog altijd suboptimale verbindingen aanwezig blijven. Langer simuleren zou een optie zijn was het niet dat de rekentijd exponentieel toeneemt met het aantal cellen. Figuur 5.19(a) komt immers overeen met foto links onder in Figuur 5.17. Op deze laatstgenoemde Figuur komt tot uiting dat een model ter benadering van schimmelgroei, indien het de werkelijke schimmelgroei goed benadert, op lange termijn evolueert naar een optimale verbinding tussen



**Figuur 5.16:** Door het ontwikkelde CA-gebaseerde model gesimuleerd muceliumnetwerk door het ontwikkelde CA-gebaseerde model met parameterwaarden en intitiële condities overeenkomstig Tabel 4.1 met als enige aanpassing de initiële verdeling van  $s_e$  zoals voorgesteld in Tabel 5.1 voor situatie 4... (a) geeft de tesselatie weer waarin elke cel k zijn  $s_i$  weergegeven is aan de hand van de kleurenlegende die bovenaan de figuur is meegegeven, de overige cellen krijgen worden zwart ingekleurd als ze een  $s_e = 10^{-6}$ [mol glucose mm<sup>-2</sup>] hebben en wit als deze nul is. (b) geeft de het myceliumnetwerk weer zoals dit in de Hyfelijst bijgehouden wordt.

de voedingsbronnen.

Zoals in Situatie 5 werd vermeld, zullen de hyfen met een hoge substraatconcentratie ook het langst actief blijven waardoor een ruwe schatting kan gemaakt worden waar de overblijvende hyfen zullen liggen. Dit wordt in Figuur 5.19(c) weergegeven door de blauwe cellen. Ook hier is te zien dat de hyfen tussen twee voedingsbronnen gelegen meer intern substraat bevatten. Een probleem is dat de hyfen die een suboptimale verbinding vormen nog lang actief blijven aangezien w gelijk is aan 10<sup>-13</sup> [mol glucose mm<sup>-2</sup>]. Een parametrisatie van de parameter w, die aangeeft vanaf welke waarde van  $s_i$  de hyfe inactief wordt, zou hier nuttig zijn. Overeenkomstig het mierenkolonie algoritme ter bepaling van het optimum, waarbij het pad met de hoogste concentratie aan feromoon als optimale pad gekozen wordt, zo zou hier de hyfe die een optimale verbinding vormt over blijven als gevolg van een hogere  $s_i$  in de optimale hyfen (verbindingen).



**Figuur 5.17:** Het myceliumnetwerk van *Physarum polycephalum*(geel) dat de voedingsbronnen (wit) op zijn pad optimaal verbindt [8].



**Figuur 5.18:** (a) België met aanduiding van de belangrijkste steden en (b) de indeling van de voedingsbronnen in het medium overeenkomstig de locatie van deze steden.



**Figur 5.19:** (a) Het gesimuleerde myceliumnetwerk na 12 uren groei met parameterwaarden en intitiële condities overeenkomstig Tabel 4.1 met als enige aanpassing de initiële verdeling van  $s_e$  zoals voorgesteld in Tabel 5.1 voor situatie 6. (b) Myceliumnetwerk weergegeven door de hyfen. (b) Geeft de tesselatie weer waarin  $s_i(c_k, 12)$  weergegeven is aan de hand van de kleurenlegende in Figur 5.9, de overige cellen worden zwart ingekleurd als ze een  $s_e = 10^{-6}$ [mol glucose mm<sup>-2</sup>] hebben en wit als deze nul is. Indien er mycelium aanwezig is wordt  $s_i$  gevisualiseerd anders  $s_e$ . (c) Geeft de cellen  $c_k$  met  $s_i > 4 \ 10^{-6}$ [mol glucose mm<sup>-2</sup>] weer a.h.v een blauwe kleur.

# 6 Algemene conclusie en verder werk

Het ontwikkelde CA-gebasserde model voor filamenteuze schimmelgroei beschrijft zowel het gedrag van individuele hyfen als het gedrag van het volledige mycelium zoals naar vore gebracht in Hoofdstuk 6. Aangezien de resultaten van het voorgestelde model duidelijk overeenkomen met experimentele gegevens mag gesteld worden dat de basisprocessen, verantwoordelijk voor filamenteuze schimmelgroei, erin vervat zijn. Pulsatiele groei, zoals dit waargenomen werd door Adams [16] en Lopez-Franco et al. [98], komt zowel in een homogene omgeving als in Situatie 2 naar boven. Het al dan niet aanpassen van  $\Delta t$  volgens de CFL voorwaarden levert een duidelijk verschil in Situatie 3, er wordt namelijk meer substraat getransloceerd naar gebieden waar (nog) geen extern substraat gevonden werd indien  $\Delta t$  begrensd wordt door de CFL voorwaarde. In Situaties 4,5 en 6 komt de eigenschap naar boven om voedingsbronnen optimaal te verbinden, aangezien  $s_i$  in de hyfen die twee voedingbronnen met een rechte verbinden systematisch hoger zijn. Echter, het elimineren van suboptimale verbindingen (hyfen) wordt niet vastgesteld aangezien w verondersteld werd heel laag te zijn in [9]. Dit werd wederom verondersteld omdat de interne substraatconcentratie tot op heden niet gemeten kan worden.

De rekentijd die nodig is om filamenteuze schimmelgroei te simuleren stijgt exponentieel als de duur van de simulatieperiode toeneeemt. Een efficiënter algoritme of een paralelle implementatie van het model is in de toekomst aan de orde wanneer er simulaties over een lange tijd en op grote schaal uitgevoerd zouden worden. Het programmeren in Mathematica heeft als voordeel dat er talrijke reeds ingebouwde functies gebruikt kunnen worden wat het schrijven van de code vereenvoudigt maar een verlies in efficiëntie inhoudt aangezien dit geen efficiënte programmeertaal is. Het herschrijven van het algoritme in een programmeertaal als C++ zou de rekentijd kunnen reduceren. Het parallel programmeren, waarbij verschillende computers tegelijk rekenen aan een simulatie, is mogelijk aangezien hyfen die aan de andere kant van het mycelium groeien onmogelijk elkaar kunnen tegenkomen waardoor anastomosis enkel in een afgebakende zone van het mycelium of aan de grenzen van deze zones kan voorkomen. Hierbij zal elke computer slechts het mycelium modelleren over een afgebakend deel van het medium. Aangezien de rekentijd exponentieel toeneemt overeenkomstig het aantal cellen waarin het mycelium aanwezig is zal deze hierdoor sterk gereduceerd worden. Het is belangrijk hierbij op te merken dat de tijdstap sterk verlaagd werd ten opzichte van het CA-gebaseerde model in [9] ten einde een stabiele discretisatie te hebben. Indien enkel de groeikans als maatstaf dient om  $\Delta t$  bij te sturen is deze 100 keer groter in een tesselatie bestaande uit hexagonale cellen met diameter 0.03 mm en een maximale  $s_i(c_k, t) = 10^{-5}$ [mol glucose mm<sup>-2</sup>]. Wanneer de CFL-voorwaarde toegepast wordt cfr. Vgl. (4.1) kan de tijdstap maximaal 2.25 s zijn. Hierdoor neemt de nodige rekentijd evenwel sterk toe.

Een verdere uitbreiding van de opname kinetiek zou een Michaelis-Menten kinetiek zijn waarbij  $v_{max}$  niet lineair afneemt in functie van  $s_i(c_k, t)$  maar ook een Michaëlis-Menten kinetiek volgt. Hierdoor zal  $v_{max}$  een bovengrens krijgen, en deze bij lager  $s_i$  ook langer kunnen aanhouden. Vanaf  $s_i$  onder  $K_m$  ligt zal de opname sterk afnemen. Echter, deze  $K_m$  is in de literatuur nog niet beschikbaar aangezien het meten van  $s_i$  moeilijk is.

Een andere benadering voor de beschrijving van myceliumnetwerken is het 'lattice free' model, waarbij er geen tesselatie van de ruimte wordt gebruikt en aldus niet van cel tot cel gegroeid wordt. Hierdoor is de hoek waarover vertakt wordt of waarover een bocht genomen wordt niet meer vast (60 graden) maar kan een keuze gemaakt overeenkomstig een normaal verdeelde distrbutie met gemiddelde 60 graden [99]. Dit zou het vertakken van de hyfe en het groeien van de hyfetippen beter benaderen aangezien in werkelijkheid de hoeken waarover vertakt worden niet vast zijn.

De ruimte waarin het myceliumnetwerk gesimuleerd wordt zou in verder werk kunnen uitgebreid worden tot drie dimensies. Hierbij zal het aantal cellen  $c_k$  veel groter worden dan in een 2D ruimte zodat het efficiënt programmeren van het algoritme een essentiële rol zal spelen. Indien een extra toestand van de cellen ingevoerd wordt aangaande aanwezigheid van hout, zou er bij het inladen van een 3D scan van hout, een simulatie kunnen gebeuren in deze houtstructuur. Aan de hand van CT-scans kunnen reeds beelden gevormd worden van het myceliumnetwerk in houtstructuren [11], die een validatie van de bekomen simulaties mogelijk maken. Op deze manier zou een CA-gebaseerd model ontwikkeld kunnen worden dat de afbraak van hout na schimmelinfectie kan modelleren, wat vele toepassingen kan hebben.

# Bibliografie

- [1] J. A. Stalpers, A revision of the genus sporotrichum, Studies in mycology (24) (1984) 1–100.
- [2] L. H. Grimm, S. Kelly, R. Krull, D. C. Hempel, Morphology and productivity of filamentous fungi, Applied microbiology and biotechnology 69 (2005) 375–84.
- [3] A. P. J. Trinci, A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia, General Microbiology 81 (1974) 225–236.
- [4] S. D. Harris, N. D. Read, R. W. Roberson, B. Shaw, S. Seiler, M. Plamann, M. Momany, Polarisome meets spitzenkorper: Microscopy, Genetics, and Genomics Converge, Society 4 (2005) 225–229.
- [5] G. Steinberg, Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper, American Society for Microbiology 6 (2007) 351–60.
- [6] S. Wolfram, A new kind of science, 13th Edition, Wolfram Media, Inc., 2002.
- [7] G. P. Boswell, Modelling mycelial networks in structured environments, Mycological Research 112 (2008) 1015–25.
- [8] A. Tero, S. Takagi, T. Saigusa, K. Ito, D. P. Bebber, M. D. Fricker, K. Yumiki, R. Kobayashi, T. Nakagaki, Rules for biologically inspired adaptive network design., Science (New York, N.Y.) 327 (2010) 439–42.
- [9] G. P. Boswell, H. Jacobs, K. Ritz, G. M. Gadd, F. a. Davidson, The development of fungal networks in complex environments., Bulletin of Mathematical Biology 69 (2007) 605–34.
- [10] G. Boswell, Growth and Function of Fungal Mycelia in Heterogeneous Environments, Bulletin of Mathematical Biology 65 (2003) 447–477.
- [11] J. Van den Bulcke, M. Boone, J. Van Acker, L. Van Hoorebeke, Three-dimensional x-ray imaging and analysis of fungi on and in wood., Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada 15 (5) (2009) 395–402.
- [12] B. A. Ferguson, T. A. Dreisbach, C. G. Parks, G. M. Filip, C. L. Schmitt, Coarse-scale population structure of pathogenic Armillaria species in a mixed-conifer forest in the Blue Mountains of northeast Oregon, Management 623 (2003) 612–623.

- [13] R. H. MacArthur, Geographical Ecology, Princeton University Press, 1972.
- [14] R. Courant, F. K., H. Lewy, On partial difference equations of mathematical physics, IBM Journal of Research and Development 11 (1967) 215–&.
- [15] C. R. Voisey, Intercalary growth in hyphae of filamentous fungi, Fungal Biology Reviews 24 (2010) 123–131.
- [16] H. L. Adams, C. R. Thomas, The use of image-analysis for morphological measurements on filamentous microorganisms, Biotechnology and bioengineering (1988) 707–712.
- [17] S. L. Jackson, Do hyphae pulse as they grow?, New Phytologist 151 (2001) 556–560.
- [18] F. Hammad, R. Watling, D. Moore, Artifacts in video measurements cause growth-curves to advance in steps, Journal of microbiology methods 18 (1993) 113–117.
- [19] H. Maeda, Y. Yamagata, K. Abe, F. Hasegawa, M. Machida, R. Ishioka, K. Gomi, T. Nakajima, Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*, Applied Microbiology and Biotechnology 67 (2005) 778–788.
- [20] M. Borchert, J. A. Libra, Decolorization of reactive dyes by the white and rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing bath reactors, Biotechnology and Bioengineering 57 (2001) 313–321.
- [21] R. A. Kanaly, I. S. Kim, H. G. Hur, Biotransformation of 3-methyl-4-nitrophenol, a main product of the insecticide fenitrothion, by *Aspergillus niger*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (2005) 6426–6431.
- [22] S. Sumathi, B. S. Manju, Uptake of reactive textile dyes by Aspergillus foetidus, Enzyme and Microbial Technology 27 (2000) 347–355.
- [23] J. R. Han, C. H. An, J. M. Yuan, Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional value, Applied Microbiology 99 (2005) 910–915.
- [24] M. Papagianni, Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes, Biotechnology Advances 22 (2004) 189–259.
- [25] R. P. Elander, Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics, Applied Microbiology and Biotechnology 61 (2003) 385–392.
- [26] D. B. Finkelstein, Improvement of enzyme production in aspergillus, Antonie Van Leeuwenhoek 53 (1987) 349–352.
- [27] M. Ward, C. Lin, C. V. Doreen, P. F. Bryan, A. F. Judith, L. W. David, J. M. Hendrik, P. P. Jeff, B. F. Robin, H. H. Meng, T. Naoya, G. Christine, P. Minha, W. Huaming, Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*, Applied and Environmental Microbiology 70 (2004) 2567–2576.

- [28] P. J. Punt, N. van Biezen, A. Conesa, A. Albers, J. Mangnus, C. van den Hondel, Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production, Trends in Biotechnology 20 (2002) 200–206.
- [29] L. Grimm, S. Kelly, J. Hengstler, A. Gobel, R. Krull, D. C. Hempel, Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia, Biotechnol Bioeng 87 (2004) 213–218.
- [30] W. Petri, A. Kandelbauer, Laccase applications in the forest products industry: A review, Enzyme and Microbial Technology 42 (2007) 293–307.
- [31] F. Martin, A. Aerts, D. Ahren, A. Brun, E. G. Danchin, F. Duchaussoy, J. Gibon, A. Kohler, E. Lindquist, V. Pereda, A. Salamov, H. J. Shapiro, J. Wuyts, D. Blaudez, M. Buee, P. Brokstein, B. Canback, D. Cohen, P. E. Courty, P. M. Coutinho, C. Delaruelle, J. C. Detter, A. Deveau, S. DiFazio, S. Duplessis, L. Fraissinet-Tachet, E. Lucic, P. Frey-Klett, C. Fourrey, I. Feussner, G. Gay, J. Grimwood, P. J. Hoegger, P. Jain, S. Kilaru, J. Labbe, Y. C. Lin, V. Legue, F. Le Tacon, R. Marmeisse, D. Melayah, B. Montanini, M. Muratet, U. Nehls, H. Niculita-Hirzel, M. P. Oudot-Le Secq, M. Peter, H. Quesneville, B. Rajashekar, M. Reich, N. Rouhier, J. Schmutz, T. Yin, M. Chalot, B. Henrissat, U. Kues, S. Lucas, Y. Van de Peer, G. K. Podila, A. Polle, P. J. Pukkila, P. M. Richardson, P. Rouze, I. R. Sanders, J. E. Stajich, A. Tunlid, G. Tuskan, I. Grigoriev, The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis, Nature.
- [32] F. A. Davidson, S. Olsson, Translocation induced outgrowth of fungi in nutrient-free environments, Journal of Theoretical Biology 205 (2000) 73–84.
- [33] F. A. Davidson, A mathematical model for fungal development in heterogeneous environments, Applied Mathematics Letters 11 (1998) 51–56.
- [34] M. E. Zain, Impact of mycotoxins on humans and animals, Journal of Saudi Chemical Society 15 (2010) 129–144.
- [35] L. Boddy, S. C. Watkinson, Wood decomposition, higher fungi, and their role in nutrient redistribution, Canadian Journal of Botany 73 (1995) 1377–1383.
- [36] J. Cairney, Basidiomycete mycelia in forest soils: dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution, Mycological Research 109 (2005) 7–20.
- [37] M. D. Fricker, J. A. Lee, D. P. Bebber, M. Tlalka, J. Hynes, P. R. Darrah, S. C. Watkinson, L. Boddy, Imaging complex nutient dynamics in mycelial networks, Journal of Microscopy 231 (2008) 317–331.
- [38] J. Odenbaugh, The structure of population ecology: Philosophical reflections on unstructured and structured models, Paradigm's Lost: Theory Change in Ecology.
- [39] B. Metz, E. W. Bruijn, J. C. Suijdam, Method for quantitative representation of the morphology of molds, Biotechnology and Bioengineering 23 (1981) 149–162.

- [40] H. L. Adams, C. R. Thomas, The use of image analysis for morphological measurements on filamentous microorganisms, Biotechnology and Bioengineering 32 (1988) 707–712.
- [41] M. N. Pons, H. Vivier, Beyond filamentous species, Advances in biochemical engineering biotechnology 60 (1998) 61–93.
- [42] A. Spohr, C. Dam-Mikkelsen, M. Carlsen, J. Nielsen, J. Villadsen, On-line study of fungal morphology during submerged growth in a small flow-through cell, Biotechnology and Bioengineering 58 (1998) 541–543.
- [43] a. P. Trinci, A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia., Journal of general microbiology 81 (1974) 225–36.
- [44] J. I. Prosser, A. Trinci, A model of hyphal growth and branching, Gen Microbiol 111 (1979) 153–164.
- [45] S. Bartnicki-garcia, F. Hergbert, G. Gierz, Computer-simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth, Protoplasma 153 (1989) 46–57.
- [46] R. Fischer, N. Zekert, N. Takeshita, Polarized growth in fungi-interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains., Molecular microbiology 68 (2008) 813–26.
- [47] A. Brand, N. R. Gow, Mechanisms of hypha orientation of fungi., Current opinion in microbiology 12 (2009) 350–7.
- [48] M. Riquelme, R. Fischer, S. Bartnicki-Garcia, Apical growth and mitosis are independent processes in aspergillus nidulans, Protoplasma 222 (2003) 211–215.
- [49] S. Seiler, F. E. Nargang, G. Steinberg, M. Schliwa, Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in neurospora crassa, The EMBO Journal 16 (1997) 3025–3034.
- [50] J. Cheng, T. S. Park, A. S. Fischl, X. S. Ye, Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in *Aspergillus* nidulans, American Society for Microbiology 6198–6209.
- [51] D. Katz, D. Goldstein, R. F. Rosenberger, Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters., Journal of bacteriology 109 (1972) 1097–100.
- [52] J. I. Prosser, A. P. J. Trinci, Model for hyphal growth and branching, JOURNAL OF GE-NERAL MICROBIOLOGY 111 (MAR) (1979) 153–164.
- [53] S. Bartnicki-Garcia, Fundamental aspects of hyphal morphogenesis, Symposia of the Society of General Microbiology 23 (1973) 245–267.

- [54] H. Yang, R. King, U. Reichl, E. D. Gilles, Mathematical-model for apical growth, septation, and branching of mycelial microorganisms, Biotechnology and Bioengineering 39 (1) (1992) 49–58.
- [55] L. B. Leopold, Trees and streams efficiency of branching patterns.
- [56] R. E. Horton, Erosional development of streams and their drainage basins; hydrophysical approach to quantitative morphology, Geological Society of America 56 (1945) 275–370.
- [57] K. Gull, Mycelium branch patterns of *Thamnidium elegans*, Transactions of the British Mycological Society 64 (1975) 321–324.
- [58] M. Obert, P. Pfeifer, M. Sernetz, J.-l.-u. Giessen, Microbial Growth Patterns Described by Fractal Geometry, Microbiology 172 (3) (1990) 1180–1185.
- [59] K. Ritz, J. Crawford, Quantification of the fractal nature of colonies of *Trichoderma viride*, Mycological Research 94 (1990) 1138–1141.
- [60] C. L. Jones, G. T. Lonergan, D. E. Mainwaring, A rapid method for the fractal analysis of fungal colony growth using image processing, Binary. 5 (1993) 171–180.
- [61] E. E. Holmes, M. A. Lewis, J. E. Banks, R. Veit, Partial differential equations in ecology: Spatial interactions and population dynamics, Ecological Society of America 75 (1994) 17–29.
- [62] M. Coleman, An introduction to partial differential equations with Matlab, Chapman and Hall, 2005.
- [63] A. R. A. Anderson, A hybrid discrete-continuum technique for individual-based migration model, in: Alt, W and Chaplain, M and Griebel, M and Lenz, J (Ed.), Polymer and cell dynamics, Mathematics And Biosciences In Interaction, DFG Res Program, BIRKHAUSER VERLAG AG, VIADUKSTRASSE 40-44, PO BOX 133, CH-4010 BASEL, SWITZER-LAND, 2003, pp. 251–259, International Workshop on Numerical Simulations of Polymer and Cell Dynamics, BAD HONNEF, GERMANY, JUN, 2000.
- [64] A. R. A. Anderson, M. A. J. Chaplain, Continuous and discrete mathematical models of tumor-induced angiogenesis, Bulletin of Mathematical Biology 60 (1998) 857–899.
- [65] C. Zhang, Z. Shi, P. Gao, Z. Duan, Z. Mao, On-line prediction of products concentrations in glutamate fermentation using metabolic network model and linear programming, Biochemical Engineering 25 (2005) 99–108.
- [66] K. Paustian, J. Schnure, Fungal growth response to carbon and nitrogen limitation: a theoreticalmodel, Soil Biology and Biochemistry 19 (1987) 613–620.
- [67] I. Health, Tip Growth in Plants and Fungi, Academic press London.
- [68] L. Edelstein, The propagation of fungal colonies a model for tissue-growth, Journal of Theoretical Biology 98 (4) (1982) 679–701.

- [69] E. Ferret, J. H. Siméon, P. Molin, H. Jorquera, G. Acuña, R. Giral, Macroscopic growth of filamentous fungi on solid substrate explained by a microscopic approach., Biotechnology and Bioengineering 65 (5) (1999) 512–22.
- [70] L. Edelstein, The propagation of fungal colonies a model for tissue-growth, Journal of Theoretical Biology 98 (1982) 679–701.
- [71] Branching Morphogenesis, Davies, J., 2005, p. Chapter 4.
- [72] F. A. Davidson, B. D. Sleeman, A. D. M. Rayner, J. W. Crawford, K. Ritz, Contextdependent macroscopic patterns in growing and interacting mycelial networks, Proceedings of the Royal Society of London Series B-Bilogical Sciences 263 (1372) (1996) 873–880.
- [73] F. A. Davidson, B. D. Sleeman, J. Crawford, Travelling waves in a reaction-diffusion system modelling fungal mycelia, IMA Journal of Applied Mathematics 58 (1997) 237–257.
- [74] F. A. Davidson, B. D. Sleeman, A. D. M. Rayner, J. W. Crawford, K. Ritz, Travelling waves and pattern formation in a model for fungal development, Journal of Mathematical Biology 35 (1997) 589–608.
- [75] F. A. Davidson, Large-scale behavior of fungal mycelia, Mathematical and Computer Modelling 24 (1996) 81–87.
- [76] S. Olsson, D. H. Jennings, Evidence for diffusion being the mechanism of translocation in the hyphae of 3 molds, Experimental Mycology 15 (1991) 302–309.
- [77] C. Persson, S. Olsson, H. Jansson, Growth of Arthrobotrys superba from a birch wood resource base into soil determined by radioactive tracing, FEMS Microbiology Ecology 31 (2000) 47 – 51.
- [78] L. Edelstein, L. A. Segel, Growth and metabolism in mycelial fungi, Journal of Theoretical Biology 104 (1983") 187 – 210.
- [79] G. Boswell, Growth and Function of Fungal Mycelia in Heterogeneous Environments, Bulletin of Mathematical Biology 65 (3) (2003) 447–477.
- [80] G. P. Boswell, H. Jacobsz, F. A. Davidson, G. M. Gaddz, K. Ritzy, Functional Consequences of Nutrient Translocation in Mycelial Fungi, Crop Research (2002) 459–477.
- [81] D. Cohen, Computer simulation of biological pattern generation processes, NATURE 216 (1967) 246–&.
- [82] A. Lindenmayer, Mathematical models for cellular interactions in development .i. filaments with 1-sided inputs, Journal of Theoretical Biology 18 (1968) 280–&.
- [83] S. A. Hutchinson, P. Sharma, K. R. Clarke, I. Macdonald, Control of hyphal orientation in colonies of mucor-hiemalis, Transactions of The British Mycological Society 75 (1980) 177–191.

- [84] A. D. Bell, The simulation of branching patterns in modular organisms, Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series Biological Sciences 313 (1986) 143– &.
- [85] V. Kotov, S. V. Reshetnikov, A stochastic-model for early mycelial growth, Mycological Research 94 (1990) 577–586.
- [86] G. B. Ermentrout, L. Edelstein-Keshet, Cellular automata approaches to biological modeling, Journal of Theoretical Biology 1 (1993) 97–133.
- [87] F. Soddell, R. Seviour, J. Soddell, Using lindenmayer systems to investigate how fila- mentous fungi may produce round colonies, Complexity international.
- [88] C. Regalado, J. Crawford, K. Ritz, B. Sleeman, The origins of spatial heterogeneity in vegetative mycelia: a reaction-diffusion model, Mycological Research 100 (12) (1996) 1473–1480.
- [89] A. Meskauskas, L. J. McNulty, D. Moore, Concerted regulation of all hyphal tips generates fungal fruit body structures: experiments with computer visualizations produced by a new mathematical model of hyphal growth, Mycological Research 108 (2004) 341–353.
- [90] A. R. A. Anderson, I. M. Young, B. D. Sleeman, B. S. Griffiths, W. M. Robertson, Nematode movement along a chemical gradient in a structurally heterogeneous environment .1. Experiment, Fundamental and Applied Nematology 20 (1997) 157–163.
- [91] M. J. Carlile, Chemotaxis and chemotrophism in fungi and algae, Academic Press, 1998.
- [92] M. Fomina, K. Ritz, G. Gadd, Negative fungal chemotropism to toxic metals, FEMS Microbiology Letters 193 (2000) 207–211.
- [93] S. Fischer-Parton, R. Parton, P. Hickey, J. Dijksterhuis, H. Atkinson, N. Read, Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae, Journal of Microscopy-Oxford 198 (2000) 246–259.
- [94] H. Jacobs, G. P. Boswell, K. Ritz, F. A. Davidson, G. M. Gadd, Solubilization of calcium phosphate as a consequence of carbon translocation by Rhizoctonia solani, FEMS Microbiology Ecology 40 (1) (2002) 65–71.
- [95] T. R. Jø rgensen, P. a. VanKuyk, B. R. Poulsen, G. J. G. Ruijter, J. Visser, J. J. L. Iversen, Glucose uptake and growth of glucose-limited chemostat cultures of Aspergillus niger and a disruptant lacking MstA, a high-affinity glucose transporter., Microbiology (Reading, England) 153 (Pt 6) (2007) 1963–73.
- [96] F. A. Davidson, Mathematical modelling of mycelia: a question of scale, Fungal Biology Reviews 21 (2007) 30–41.
- [97] V. N. Armentrout, A. J. Downer, S. T. Nameth, A simplified branching assay for rhizoctonia-solani, Mycologia 78 (1986) 657–663.

- [98] R. López-Franco, S. Bartnicki-Garcia, C. E. Bracker, Pulsed growth of fungal hyphal tips., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91 (25) (1994) 12228–32.
- [99] G. P. Boswell, S. Hopkins, Linking hyphal growth to colony dynamics: Spatially explicit models of mycelia, Fungal Ecology 1 (2008) 143–154.