

**Szimulált Mars-analóg környezeti tényezők
hatása az intakt, extremofil kriptobiotikus
kérgék fotoszintézisére és túlélésére**

Radnai Zsófia
Nappali tagozat
Biológia szak
Harmadik évfolyam
Eszterházy Károly Főiskola
Növényélettani Tanszék
Témavezető: Dulai Sándor
tszv. főiskolai tanár

Eger, 2015

Tartalomjegyzék

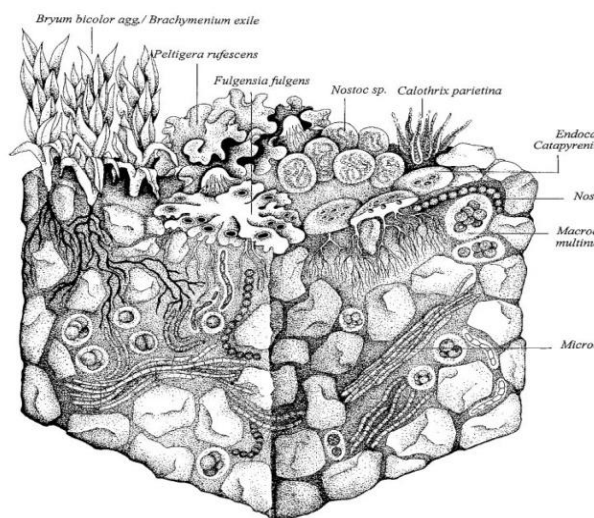
1. Bevezetés	3
1.1. A fluoreszcencia indukciós módszer és alkalmazása a funkcionális ökológiában	5
1.1.1. A módszer alkalmazása cianobaktériumok fotoszintézis-ökofiziológiai vizsgálatában	6
1.2 A kriptobiotikus kéreg sajátos válaszai az abiotikus környezeti tényezők hatásaira összefüggésben a földi és a marsfelszíni ökológiai adottságokkal	8
1.2.1. A Mars bolygón feltételezhető speciális élőhelyek: a sötét dűnefoltok, környezeti viszonyaik, és a DDS-MSO hipotézis lényege	9
1.2.2. Szárazságtűrés, kiszáradás tolerancia, sótűrés	11
1.2.3. Hőmérsékleti tolerancia	12
1.2.4. A látható fény és az UV-sugárzás hatásai és tűrése	13
1.2.5. Az oxidatív stresszekkel szembeni tolerancia	16
1.2.6. A kriptobiotikus kéreg túlélő képessége	17
2. Célkitűzés	18
3. Anyagok és módszerek	19
3.1. A gyűjtőhelyek és rövid jellemzésük	19
3.1.1. Ausztrália Északi Terület West McDonell Ranges, Ny-Ausztrália	19
3.1.2. Dél-Tunézia Chott El Jerid és környéke	20
3.1.3. A Thoros-hegység és Közép-Anatólia	20
3.2. A vizsgálatokba bevont kéreg	21
3.3. Szimulációs kezelések	22
3.4. Klorofill fluoreszcencia indukciós mérések	23
4. Eredmények és diszkusszió	25
4.1. A kéreg kombinált Mars-szimulációs kezelése és túlélése	25
4.2. Az egyfaktoros kezelések és a kéreg túlélése	29
4.2.1. A vizsgált kéreg sótoleranciája	29
4.2.2. A vizsgált kéreg oxidatív stresszekkel szembeni toleranciája	30
4.2.3. A perklórsav hatása a kéreg fotoszintézisére és túlélésére	33
5. Összefoglalás	35

1. Bevezetés

A kriptobiotikus kéreg (cryptobiotic crust, CBC, 1. ábra) főleg cianobaktériumokat és más kriptogám élőlényeket (algák, mikrogombák, zúzmók, kis méretű máj- és lombosmohák), kőzetmálladékot (talaj), ill. gyakran elhalt növényi, valamint a talajfauna állatait és maradványukat tartalmazó, összefüggő réteget alkotó „mikro”- életközösség, amely 0,05-5 mm vastagságú (Pócs 2006; 2008). Pár endolitikus típus néhány cm-ig is előfordulhat kőzetek belsejében. Ezeket a formációkat korábban gyakran nevezték algakéregnek (P. Komáromi 1979; 1980; 1983), mikrobiotikus talajkéregnek (Eldridge és Greene 1994), biológiai talajkéregnek (Belnap *et al.* 2001), vagy kriptogám kéregnek (Strandling *et al.* 2002; Pócs 2008). Napjainkban azonban általánosan elfogadottá vált a kriptobiotikus kéreg elnevezés (Pócs 2008). Mint azt Pócs (2006) megállapítja, a CBC a Föld sugárzási felszínein, határfelületként közvetítő szerepet tölt be a szilárd kéreg, valamint az atmoszféra között, elemei egymással, valamint az atmoszférával anyagcsere-kapcsolatban állnak. Ahol nincs összefüggő magasabb rendű vegetáció ez a képződmény hasznosítja a fotoszintetikusán aktív radiációt (PAR), ill. hozzájárul a bioszféra szén- és nitrogénforgalmához. Ugyanakkor azt is megjegyzi, hogy a fogalomkörbe nemcsak az élettelen felszínen, hanem a vegetáció borításával módosuló aktív felszínen kialakuló corticol, epiphyll bevonatokat, de a mesterséges felszíneket is ide szükséges sorolni, amennyiben azok megfelelnek a CBC definíciós követelményeinek. A CBC-k a legnagyobb összefüggő bevonatokat a Föld arid és szemi-arid sivatagos területein alkotnak (Johansen 1993; Pócs 2006), de jelentős mértékben elterjedtek a szavanna és mediterrán zónában is. A mérsékelt övben legnagyobb mennyiségben a füves és az erdős sztyep zónában találhatók, elterjedtek a Kárpát-medence szikes területén, homokpuszta-gyepjeiben és löszfalain is. Szintén jelentős mennyiségben fordulnak elő magashegyi és arktikus területeken (P. Komáromi 1976; 1979; 1980; 1983; 1985, Pócs, 2006).

A CBC-k intenzív kutatását Friedmann és munkatársai kezdték el a az izraeli sivatagos területeken, majd az Antarktisz sivatagainak területén, ahol a megfelelő termodinamikai állapotban lévő víz csak időszakosan és erősen korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre (Friedmann *et al.* 1967; Friedmann 1971; 1972; Friedmann és Galun 1974; Friedman *et al.* 1976; Friedmann, 1993; Friedmann *et al.* 1994). Magyarországon a CBC-k rendszertani és ökológiai vizsgálata tekintetében P. Komáromi és Pócs végeztek alapvető jelentőségű munkát (P. Komáromi 1979; 1980; 1983; 1984; Pócs 2006; 2008).

A CBC-k szerkezeti kutatása és típusokba sorolása viszonylag rövid múltra tekint vissza. A morfológiai alapon történő osztályzás tekintetében P. Komáromi (1976) végzett



1. ábra A kriptobiotikus kéreg sematikus felépítése (Klein-Rödger illusztrációja, Belnap et al. 2001 tanulmányából)

úttörő kutatásokat, aki a kérgeket hat növekedési alaptípusba sorolta. Belnap 2001-ben publikált munkájában morfológiai és funkcionális karaktereket is figyelembe vesz, főleg a fagyos időszak alatti viselkedést illetően. A kriptobiotikus kérgék legújabb és legátfogóbb tipizálását Pócs (2008) végzi el egy nagyon gazdag, mind az öt kontinenst átölő vizsgálati anyagra támaszkodva, és mintegy 10 talajlakó és 12 sziklalakó típust különít el. Habár a tipizálást főleg morfológiai alapokon végzi, a típusok következtetni engednek az élőhelyen uralkodó környezeti tényezőkre és túlélési stratégiákra is. Az egyes típusok ismertetése meghaladja az alfejezet kereteit, ezért csak a dolgozat lényegét érintő, legfontosabb összetételbeli kérdésekkel foglalkozom.

A CBC-k szén- és nitrogén-forgalmát tekintve legfontosabb és általában uralkodó építőelemei a cianobaktériumok. Fotoszintetizáló képességük miatt a kéreg fénnyel még jól ellátott, felső rétegében helyezkednek el, a producens szintet képviselve. Fotoszintetizáló apparátusuk bizonyos esetekben rendkívül stressztoleráns, ill. a nagymértékben korlátozott időszakot képesek inaktív állapotban átvészelni, majd a körülmények javulásával gyorsan regenerálódni. Rajtuk keresztül történik a levegő nitrogén tartalmának megkötése és továbbítása az életközösség más elemei felé (Moore 1998). A kérgék cianobaktérium diverzitása általában még sivatagi, vagy arktikus körülmények között is magas (Golubič 1967; Patova és Sibkov 2001; Pócs 2006). A kékbaktériumok mellett fotoautotróf komponensként a kérgék gyakran tartalmaznak eukarióta algákat is, amelyek főleg zöld és sárgásmoszatok. Sziklás felületen, vagy száraz klímában részarányuk csökken, előfordulásuk kevésbé tömeges mint a cianobaktériumoké (Austin 1998, Pócs 2006).

Mind a kéregtelepű, mind a leveles zúzmók fontos alkotórészei a CBC-knek. Tulajdonképp maga a zúzmószimbiózis is a CBC evolúciójával párhuzamosan alakulhatott ki

(Pócs 2006). Sivatagos, vagy félsivatagos területeken a kéregben gyakran uralkodóvá válnak. Kísérleteink jelentős hányadát én is sivatagi eredetű zúzmótelepeken végeztem. A zúzmók mellett a kéreg alsóbb rétegeiben viszonylag nagy faj-és egyedszámban fordulnak elő szaprofita gombák. A kéregben néha tömegesen jelennek meg telepes májmohák, de az apró termetű aprokarp lombosmohák is szinte állandó tagjai a sivatagi, félsivatagi kéregnek. A májmohák általában a rövid ideig nedves kéregre jellemzőek, több nemzetséghez tartozó faj is tömegesen fordul elő, melyek rhizoidjai átszövik a cianobaktérium kérget. A lombosmohák közül főleg a *Pottiaceae*, a *Ditrichaceae* és *Funariaceae* családok fajai gyakoriak (Pócs 2006).

A kérgeket nagy változatosságban lakják egyéb prokarióta szervezetek is, mint a vas- és kénbaktériumok. Az előbbieket tevékenysége során a kéregben egy vas-oxid réteg is megjelenhet (Straub *et al.* 1996), jelentős szerepük van a ferro- és ferri-vegyületek átalakításában, az utóbbiaknak pedig a szulfátredukcióban. A nitrifikáló és denitrifikáló baktériumok szerepe közismert. Ezen kívül még számos heterotrof baktérium is él a kéreg alsó rétegeiben, vagy a cianobaktériumok kocsonyaburkában, így ezek a dekompozícióban is szerephez jutnak (Pócs 2006).

1.1. A fluoreszcencia indukciós módszer és alkalmazása a funkcionális ökológiában

Amennyiben egy sötétadaptált fotoszintetizáló objektumot megvilágítunk, azt tapasztaljuk, hogy a klorofill-a fluoreszcenciájának intenzitása (pontosabban kvantumhatásfoka) az időben változik, jól definiálható lokális maximumok és minimumok sorozatán keresztül éri el az egyensúlyi (steady state) értéket. Ezt a jelenséget fluoreszcencia indukciónak, vagy első leírója nyomán Kautsky-effektusnak nevezzük (Kautsky és Hirsch 1931). A jelenség hátterében álló folyamatok részletezése a dolgozat kereteiben nem indokolt, ezért a továbbiakban csak a vizsgálati eredmények megértése szempontjából fontosabb összefüggésekre szorítkozom.

A fluoreszcens fény intenzitása és kinetikája alapján lehetőség nyílik a gerjesztési energia fotoszintetikus folyamatokban történő hasznosulásának meghatározására (Krause és Weiss 1991). Amennyiben az első stabil akceptor (Q_A) oxidált, akkor megnő a fotokémiai energiahasznosítás valószínűsége, ami fluoreszcencia csökkenést eredményez. Az ezzel kapcsolatba hozható kioltási folyamat a fotokémiai kioltás (qP). A redukált Q_A azonban nem képes újabb elektront fogadni a reakciócentrum felől, így megnő az alternatív folyamatok, azaz a fluoreszcencia és a hő formájában történő energia-disszipáció valószínűsége. A hő formájában megvalósuló energia-disszipáció hátterében bonyolult molekuláris

mechanizmusok állnak (Horton *et al.* 1991; Horton és Ruban 1992; Ruban és Horton 1992; Ruban *et al.* 1992), melyek szerepe esszenciális a PS II fénybefogásának regulációjában, és összefoglaló néven nem-fotokémiai kioltásnak (q_N , NPQ) nevezzük. Ezt az irodalomban, kialakulásának mechanizmusától függően, valamint különböző inhibitorok alkalmazásával még további komponensekre osztották: q_E , energia függő kioltás; q_T , a state átmenetekhez kapcsolható kioltás; q_I , a lassan, vagy egyáltalán nem reverzibilis kioltási komponens (Demming és Winter 1988; Horton és Hauge 1988; Walters és Horton 1991).

Amennyiben egy fotoszintetizáló objektumra erős korlátozó tényezők hatnak az elnyelt fényenergia egyre kisebb hányada hasznosulhat fotokémiai úton, valamint fordítódhat a CO₂ megkötésére és redukciójára (Smirnoff, 1993). Habár a túlzott mértékű gerjesztési energia egy része szabályozott (hő) formában disszipálódhat (Demming-Adams *et al.* 2006), megnő az elektrontranszport-lánc túlredukálódásának a valószínűsége ami oxidatív károsodáshoz vezet (Smirnoff 1993, Flexas *et al.* 2006, Hideg *et al.* 2000, Dulai *et al.* 2014). Ezeknek a károsodásoknak, ill. a fotoszintetikus folyamatok korlátozott időszak alatti leszabályozásnak detektálására, valamint a fényenergia-kémiai energia konverzió hatásfokának becslésére bizonyos fluoreszcencia quenching-paraméterek edényes, kriptogám növényekben és cianobaktériumokban is alkalmasak (Björkmann és Demming-Adams, 1994; Screiber *et al.* 1994). A módszert érzékenysége és informatív volta miatt a funkcionális ökológiai és az asztrobiológiai kutatásokban is széles körben alkalmazzák (Tuba *et al.* 1994; 1996; Ball *et al.* 1995; Dulai *et al.* 1998; 2012; 2013; Vizi *et al.* 2013; de Vera *et al.* 2014, Dulai *et al.* 2014).

1.1.1. A módszer alkalmazása cianobaktériumok fotoszintézis-ökoфизиológiai vizsgálatában

Mivel a vizsgálataimat jelentős részben intakt cianobaktérium kergeken, vagy cianobaktériumos CBC-ken végeztem, szükségesnek érzem azoknak a jellegzetességeknek és eltéréseknek a bemutatását amelyek a cianobaktériális quenching analízist (6B. ábra) a növényekre jellemzőtől megkülönböztetik. A klorofill fluoreszcencia indukciós módszert alapvetően növényekre fejlesztették, azonban a cianobaktériumok fotoszintézisének és ökoфизиológiai folyamatainak tanulmányozására is alkalmas (Büchel és Wilhelm. 1993; Hovenden és Seppelt 1995; Lüttge *et al.* 1995; Campbell és Öquist 1996; Jensen és Siebke 1997; Leisner *et al.* 1997; Campbell *et al.* 1998). Ez részben annak köszönhető, hogy a kékbaktériumok fotoszintetizáló apparátusának felépítése és működése nagymértékben hasonló a kloroplasztiszokéhoz. Ugyanakkor néhány alapvető különbséget szükséges megállapítanunk.

- A cianobaktrériumok belső membránrendszere nemcsak fotoszintetizáló, hanem egyben légző membrán is. Ennek megfelelően tartalmazza mind a fotoszintézis, mind a respiráció makromolekuláris komponenseit és folyamatrendszerait (Jones és Myers 1963; Scherer *et al.* 1982), sőt bizonyos esetekben a fotoszintetikus és a légzési elektrontranszport szimultán megy végbe. Ennek megfelelően a cianobaktériumok jellegzetes fluoreszcencia szignálja a fotoszintetikus és a légzési folyamatok interakciójának eredménye (Campbell *et al.* 1998), ennek megfelelően bizonyos mértékig eltér a kloroplasztiszt tartalmazó eukariótákétól (6. ábra).
- Különbség mutatható ki a pigment-összetételben és a pigment-protein komplexek szerveződésében is. Míg a klorofillos növényekben az *in vivo* chl. fluoreszcencia nagyrészt a PS II chl. típusú pigmentjeiből ered, addig a cianobaktériumokban a fikobilinek is szerepet játszanak ebben a folyamatban, melyek fluoreszcencia spektruma átfedi a klorofillok spektrumát. Mindamellet, a cianobaktériumok fénygyűjtő rendszere részben eltér a kloroplasztiszokban lokalizált fotoszintetizáló apparátusétól. A cianobaktériumokban ui. a fikobiliproteinek a tilakoid membránok felszínén helyezkedő, hatékony fényabszorbeáló struktúrákba, az ún. fikobiliszómákba szerveződnek, míg a növényekben ezt a funkciót a membrán integráns LHC II tölti be. E fénybegyűjtésben tapasztalható különbségek a fluoreszcencia határfok változásaiban is megnyilvánulnak (Campbell *et al.* 1998).
- A fénygyűjtő rendszerek mellett a két fotokémiai rendszer egymáshoz képesti aránya is eltérhet a klorofillos növényekétől. Irodalmi adatok szerint a cianobaktériumokban a PS II részaránya kisebb, ill. kisebb hányadát adja az összklorofill-tartalomnak (Myers *et al.* 1980; Papageorgiu 1996). Emiatt a változó fluoreszcencia (F_v) megítélése is nehezebb, hiszen itt az iniciális (F_0) fluoreszcenciában a PS II, a fikobiliproteinek és valószínűleg a PS I klorofill tartalma is szerepet játszik (Papageorgiu 1996). Ennek megfelelően az F_0 jelentős mértékben függ a fikobilin koncentrációtól. A magasabb rendűekben, a sötétadaptált helyzetben mért maximális kvantumhatásfok (F_v/F_m) pontosan tükrözi a PS II elméletileg lehetséges maximális hatékonyságát hiszen itt mind az F_0 , mind az F_v nagyrészt a PS II-ből ered (Björkman és Demming 1987). Mivel a cianobaktériumokban az F_0 kialakulásában a fikobilinek is részt vesznek, valamint a PS II az összklorofill-tartalom csak kisebb hányadát adja a fenti megállapítás sokkal óvatosabban kezelendő (Büchel és Wilhelm 1993; Papageorgiu 1996; Schreiber *et al.* 1995, Campbell *et al.* 1998). Ezt az is alátámasztja, hogy a fikocianin hiányos mutánsok F_v/F_m értékei jóval meghaladják a vad típus ugyanezen értékeit (Campbell *et al.* 1998).

- Cianobaktériumokban és az ezeket tartalmazó zúzmókérgekben a fotokémiai kioltás (qP) a nevelési fényintenzitáson általában magasabb mint az edényes növényekben és kevésbé érzékeny a gerjesztési energia növelésére (Clarke *et al.* 1993; Lüttge *et al.* 1995; Strasser *et al.* 1995; Campbell *et al.* 1996; Clark és Campbell, 1996; Campbell *et al.* 1998). Ezzel szemben a magasabb rendűekben qP értéke a gerjesztési energia emelésével párhuzamosan csökken. Mindez valószínűleg az összetett és flexibilis elektrontranszport-rendszernek, valamint a alacsony PS II/PS I aránynak köszönhető, amelyek közvetve csökkentik a PS II akceptor oldali túlredukáltságának mértékét (Hirano *et al.* 1980; Badger és Schreiber 1993; Geerts *et al.* 1994; Meunier *et al.* 1995; Campbell *et al.* 1996; 1998). Másrészt, mivel a fotoszintetikus és a légzési elektrontranszport kapcsolt, az elektronok „elszívásában” az oxigén, mint a légzési lánc végső akceptora is szerepet játszik (Miller *et al.* 1990; Miller *et al.* 1991; Schreiber *et al.* 1995). Mindezt az is alátámasztja, hogy a fotoszintetikus elektron transzport részleges cianid érzékenységet mutat (Schubert *et al.* 1995).
- Míg a növényekben a nem-fotokémiai fluoreszcencia kioltás (NPQ) legfontosabb komponense a lumensavanyodás másodlagos következményeként értelmezhető energiafüggő-kioltás (qE ; Adams és Demmink-Adams 1993; Gilmore és Yamamoto 1993; Gilmore 1997), addig a cianobaktériumokban leginkább a két fotokémiai rendszer közti energiamegoszlást tükrözi (Campbell 1996; Sundberg *et al.* 1997; Campbell *et al.* 1998), amely az ún. state-átmenetek során valósul meg. Ez összefüggésben áll a fikobiliszómák két fotokémiai rendszer közti laterális elmozdulásával (Mullineaux *et al.* 1997). Másrészt az NPQ számításához szükséges korrekt F_m meghatározása a cianobaktériumokban diuron kezeléssel történik a quenching analízis végén (6B. ábra), amely a baktérium sejtre nézve letális.

Hasonlóan az edényes növényekhez és az eukarióta algákhoz, mind a vízi, mind a teresztris cianobaktériumok fotoszintetikus aktivitásának becslésére széles körben elfogadott a PS II effektív (aktuális) kvantumhatásfoka ($\Delta F/F_m'$, 6. ábra, Genty *et al.* 1989; Lüttge *et al.* 1995; Rascher *et al.* 2003) mérsékelt és extrém korlátozó tényezők hatása alatt egyaránt. Hasonlóan ezekhez a tanulmányokhoz mind a Mars-szimulációs kamrában végzett kezelések, mind az egyéb tesztek esetében fő paraméterként én is alkalmazom.

1.2.2. A kriptobiotikus kéreg sajátos válaszai az abiotikus környezeti tényezők hatásaira, összefüggésben a földi és a marsfelszíni ökológiai adottságokkal

A CBC aktív sugárzási felszíneken alakult ki (Pócs 2006), ezért ezek a kérgek legtöbbször olyan „stresszdús” környezetben élnek, ahol az abiotikus környezeti faktorok

gyakran szélsőséges értékek között váltakoznak (Friedmann *et al.* 1967; Friedmann 1971; 1972; Friedmann és Galun 1974; Friedman *et al.* 1976; Friedmann, 1993; Friedmann *et al.* 1994), ami fellendítette a domináns cianobaktériumok funkcionális ökológiai és stresszélettani vizsgálatát. Az élőhelyekre jellemző magas inszoláció, UV-sugárzás, szalinitás, a folyékony víz krónikus hiánya, a szélsőséges hőmérsékletjárás és az ezek következtében kialakuló oxidatív stressz sajátos, ma még csak részben feltárt alkalmazkodási (adaptációs és akklimációs) mechanizmusokat és széles tolerancia intervallumot követel meg. Nem meglepő, hogy alkotóelemeiket több kutató extremofil szervezetekként kezeli, és a kérgeknek az asztrobiológiai kutatásokban is jelentős szerepet tulajdonítanak (Friedmann 1986; Rothschild és Mancinelli 2001; Pócs 2006; Dulai *et al.* 2012; 2013; Billi *et al.* 2013; de Vera *et al.* 2014). Ezeket az eredményeket felhasználva, a kéréket később a feltételezhető marsi élettel is kapcsolatba hozzák, mint földi eredetű modellszervezeteket (Gánti *et al.* 2006. Horváth *et al.* 2006; Szathmáry *et al.* 2007; Dulai *et al.* 2012; 2013; de Vera *et al.* 2014), sőt laboratóriumi és Mars-szimulációs vizsgálatokra alkalmas mennyiségben való gyűjtésükre expedíciókat is szerveznek (Kereszturi *et al.* 2014).

1.2.1. A Mars bolygón feltételezhető speciális élőhelyek: a sötét dűnefaltok, környezeti viszonyaik, és a DDS-MSO hipotézis lényege

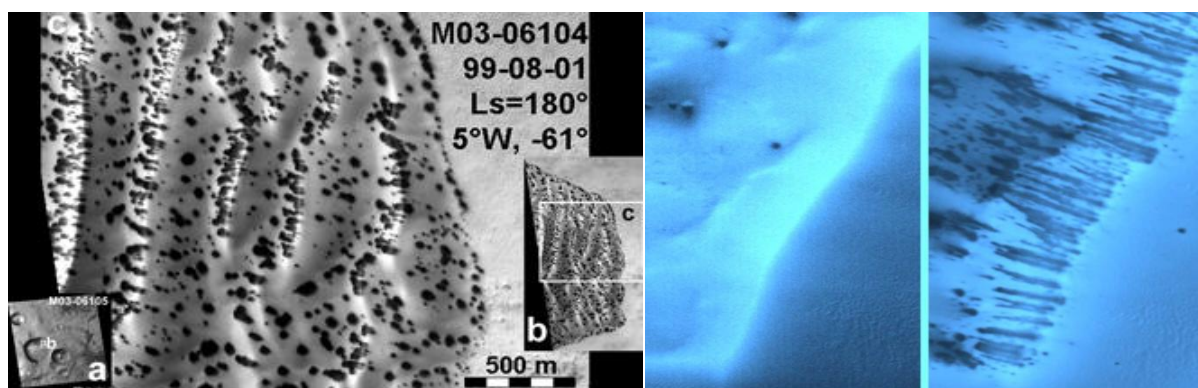
A Marson az átlagos légnyomás és hőmérséklet nagyon alacsony, ezért az ott viszonylag nagy mennyiségben jelenlévő víz szilárd, vagy légnemű halmazállapotban fordul elő (a víz a jég szublimációjával kerül a légkörbe). A két pólust övező hósapka összetétele ugyan pontosan nem ismert, de ez feltételezhetően szén-dioxid- és vízjég, valamint szén-dioxid-klarát is előfordulhat (Horváth *et al.* 2006). Bár a bolygó felszínéről ismertek bizonyos fiatal vízmosásra emlékeztető formációk, a légkör fizikai viszonyai miatt ezek csak rövid ideig tartalmazhatnak folyékony vizet, hiszen az gyorsan elpárolog. Egy magyar asztrobiológiai kutatócsoport munkatársai azonban feltételezik, hogy bizonyos területeken, speciális körülmények között folyékony víz olyan rendszerességgel előfordulhat, hogy az biotópot képezhet egyszerűbb, hipotetikus élőlények számára (Horváth *et al.* 2001; Gánti *et al.* 2003, Horváth *et al.* 2006; Szathmáry *et al.* 2007; Gánti *et al.* 2009).

1998-ban Malin és Edget a Mars poláris régióiban (2. ábra) a *Mars Global Surveyor* (MGS) űrszonda felvételein sötét foltokat fedeztek fel, majd publikálták az un. szublimációs elméletüket (Malin és Edget 2000). Habár a sötét foltok eredetét pusztán fizikai folyamatokkal magyarázták, felfedezésük részleges áttörést jelentett a Mars életre alkalmas területeinek vizsgálatában. Később erre a megfigyelésre épült egy olyan elmélet, amely a sötét

foltokat a feltételezett Mars-felszíni szervezetek (*Mars surface organisms*, MSOs) lehetséges élőhelyének tekinti, és ezeket a szervezeteket is esszenciálisnak tartja azok kialakulásában (Gánti *et al.* 2003. Szathmári *et al.* 2007; Gánti *et al.* 2009).

A Malin és Edget által felfedezett foltok (pl. déli szélesség $70.^{\circ}$ környékén) un. „fekete dűnéken” találhatók, amelyeket Horváth és munkatársai (2001) később sötét dűnefoltoknak neveztek (*Dark Dune Spots*, DDSs, 2. ábra). Az is elképzelhető, hogy ezekben a DDS-ekben bár periodikusan, de hosszabb ideig folyékony víz is előfordulhat, sőt a víz maguknak a foltoknak a kialakulásában is szerepet játszhat. Ezt az is alátámasztja, hogy foltok a lejtővel párhuzamosan ellipszoid formát vehetnek fel, de megfelelő lejtőszög esetén ezekből a gravitáció mentén folyásra emlékeztető képződmények is kiindulnak (2. ábra; Horváth *et al.* 2006). Lejtős területen a jég alatt is hat a gravitáció, azaz folyások a jég alatt is kialakulhatnak, sőt itt a gyakorlatilag 100 %-os relatív páratartalom miatt a folyékony víz az alacsony légnyomás ellenére is hosszabb ideig megmaradhat. Megjegyzendő továbbá, hogy DDS-ek a marsi tél végén, tavasz elején jelennek meg, amikor a hőmérsékleti viszonyok – különösen a szigetelő, de fényáteresztő jégréteg alatt – kedvezőbbek.

Mivel a DDS-ek kialakulása nem magyarázható pusztán fizikai folyamatokkal (Horváth *et al.* 2006) felvetődött, hogy kialakulásukban feltételezhetően biológiai folyamatok is szerepet játszanak. A fentiek ismeretében állították fel Gánti és munkatársai (Horváth *et al.* 2001; Gánti *et al.* 2003) az un. DDS-MSO (*Mars Surface Organisms*) – elméletet, amelyet később pontosítottak (Szathmári *et al.* 2007, Gánti *et al.* 2009). Az elmélet lényege, hogy a Mars poláris régióiban kora tavasszal megjelenő foltok folyékony vízre vezethetők vissza, amelyek a jég és a marstalaj határán, a napsugárzás hatására jönnek létre, talán a hipotetikus MSO-k



2. ábra A Mars déli poláris régióiban kialakuló sötét dűnefoltok (DDS-ek, balra), valamint az azokból kiinduló folyásszerű képletek (jobbra). (Forrás: NASA/JPL/Malin Space Science Systems, Collegium Budapest)

közreműködésével, de mindenesetre életteret biztosítva a számukra. Eszerint, amennyiben a DDS-ekben valóban fotoautotrof élet feltételezhető, a hipotetikus MSO-k cianobaktérium-, esetleg zúzmó-szerű élőlények lehetnek. Mindenesetre itt jegyzem meg, hogy hatékony energiaátalakító-apparátussal szükséges rendelkezniük, hiszen a környezeti körülmények miatt viszonylag rövid idő áll rendelkezésre az autotrof energiaátalakításra. Horváth és munkatársai (2006) szerint az is elképzelhető, hogy ezek a bolygó, korábbi kedvezőbb stádiumában széles körben elterjedt élet egyszerűbb képviselőinek végletekig alkalmazkodott utolsó maradványai. Pócs (2006) szerint a hipotetikus MSO-k legjobb földi analógja a jelentős részben cianobaktériumokból álló un. kriptobiotikus kéreg (*Cripto biotic Crust*, CBC). A továbbiakban a CBC-k, vagy adott esetben bizonyos komponenseik sajátos alkalmazkodását, ill. a környezeti tényezőkre adott ökofiziológiai válaszait a fentiekkel összefüggésben ismertetem.

1.2.2. Szárazságtűrés, kiszáradás tolerancia, sótűrés

Földi körülmények között a CBC-k –hasonlóan a Marson feltételezett MSO-khoz a vízellátottság szempontjából erőteljesen korlátozott időszakokat képesek átvészelni. Ez azt jelenti, hogy sokkal hosszabb időt töltenek kiszáradt állapotban, mind víztelített formában (Pócs 2006). A marsi dűnefoltokra jellemző körülmények hasonlóbbak a sarkvidéki permafroszt talajokhoz, ahol a folyékony víz hiánya korlátoz (Horváth *et al.* 2006), hiszen a jég számukra hasznosíthatatlan, míg a trópusi, vagy a szubtrópusi sivatagok esetében a víz hosszú időn át ténylegesen hiányzik. Ennek következtében a CBC-k viszonylag rövid időszakokat töltenek hidratált állapotban, ezért a fotoszintézisük és az egyéb metabolikus folyamataik nagyrészt erre az időszakra korlátozódnak. A cianobaktériumok kiszáradás toleranciája a száraz időszak átvészelésének egyik leghatékonyabb módja (Potts és Friedmann 1981; Potts 1994). A mérsékelt, vagy a köztes vízvesztés kivédése részben lehetséges kompatibilis oldatok segítségével. Bizonyos diszcharidok (trehalóz, szacharóz) védelmet nyújthatnak a sejtfelhérjék hidrátburkának a megőrzésében (Reed *et al.* 1984, Flechtner 2007). A trehalóz szerepe ezen túlmenően a membránok szerkezetének és funkcióinak fenntartásában is szerepet játszhat (Potts 1994). Egyes vélemények szerint (Broady 1986; Warr *et al.* 1988) ezek a vegyületek a sós sivatagok fajainak túlélése szempontjából jelentősek. A kiszáradás toleranciában ezen kívül bizonyos poliszacharidok extracelluláris kiválasztása is szerepet játszhat, amelyek bizonyos kékbaktériumok védőbevonatának alkotóelemei. Ebben a védőburokban különböző pigmentek is felhalmozódhatnak (gloeocapsin, fuscorhodin, foschoclorin), melyek egyéb funkciók mellett a vízhiány elviselését is segíthetik (Flechtner

2007). Egy másik védekező mechanizmus lehet az ún. akinéta képzés. Ezek kitartósejtek minden bizonnyal szerepet játszhatnak a száraz időszak átvészelésében, de képződésükre és pontos feladataikra egyértelmű válasz eddig nem született (Potts 1994; Flechtner 2007).

A hatékony fotoszintézis gyors helyreállítása az újranedvesedés során esszenciális a kéreg minden fotoautotrof alkotójának. Ezzel kapcsolatban a kiszáradás-tolerancia két stratégiája is kialakult. Az egyik a poikiloklorofill (PDT) a másik a homoioklorofill (HDT) „életforma”. Az előbbi a kedvezőtlen időszakot a klorofill tartalom lebomlása mellett, a második azt megőrizve vészeli át (Tuba 1987; Tuba *et al.* 1996; 1998), így a gyors relaxáció szempontjából az utóbbi kétségtelenül előnyösebb. A rövid idejű kedvező időszak kihasználása nemcsak a fotoszintetikus apparátus hatékony működésén, hanem a nagy fajlagos fotoszintetizáló felszínen is múlik. Ez a cianobaktériumoknál és az eukarióta algáknál a kis méret miatt adott, a mohák esetében pedig különböző felületnagyságból képletek segítségével valósul meg (Krupa 1984; Frey és Kürschner 1988, Pócs 2006).

A magas szalinitás a vízhiányhoz hasonlóan ozmotikus stresszt is jelent, másrészt számolhatunk egy erős ionikus hatással is (Allakhverdiev *et al.* 2000a; 2000b; 2002; Dulai *et al.* 2010). A sótűrés tanulmányozása a kitűzött célok mentén azért is fontos, mert ha a Marson folyékony víz elő is fordul, akkor az valószínűleg koncentrált fémoldat, ami mind a hipotetikus MSO-k vízfelvételét, mind az energia átalakító mind az információs rendszerüket károsíthatja. Erre az egyik legjobb példa, hogy cianobaktériumokban a közeg magas sótartalma nem csak a II. fotokémiai rendszer (PS II) reakciócentrum proteinjét (D_1), képes károsítani, hanem annak *de novo* szintézisét is, transzkripció, vagy transzláció szinten. Mindez valószínűleg reaktív oxigén gyökök (ROS) keresztül valósul meg (Allakhverdiev *et al.* 2002). Természetesen a cianobaktériumok sótűrése közismert, hiszen nagy mennyiségben fordulnak elő tengerpartokon, vagy szikesek és sós sivatagok CBC-iben is (Oren és Seebach 2001, Pócs *et al.* 2006). Mindezek az ozmotikus stressz elviselésén túl az ionok kizárásával vagy semlegesítésével kapcsolatban hatékony védekező mechanizmusokat feltételeznek (Oren 1993).

1.2.3. Hőmérsékleti tolerancia

Amikor az élő szervezetek hőmérséklettűréséről beszélünk magas és alacsony hőmérsékleti hatásokat célszerű figyelembe venni. A dolgozatnak nem tárgya a magas hőmérséklettel szembeni tolerancia hátterében álló mechanizmusok ismertetése, habár a CBC-k közismert élőhelyeiken gyakran ki vannak téve hőstressznek és sok esetben annak extrém mértékét is elviselik. Ugyanakkor érdekes módon gyakran ugyanazok a fajok fordulnak elő

extrém fagyos és extrém meleg élőhelyeken (Pócs 2006). Legjobb példa erre, hogy az egyes *Gloeocapsopsis*, vagy *Microcoleus* fajok mind az Antarktiszon mind a Szahara talaján megtalálhatók, így elméletileg az abszolút tolerancia intervallum elérheti a 140 °C-ot (természetesen nem egy adott populációé, hanem a fajé) (Horváth *et al.* 2006; Pócs *et al.* 2006). Mindenesetre a hőmérsékleti szélsőségekkel szembeni hatékony védekező/alkalmazkodó képesség lehet az oka ennek a széles, ráadásul extrém élőhelyeken történő elterjedésnek és ezért utalnak ezekre a szervezetekre, mint Mars-analóg élőlényekre (Friedmann és Ocampo-Friedmann 1995).

A marsi dűnefoltok területén a hőmérséklet a -60, -70 °C-ot is elérheti, ugyanakkor a képződött jég alatt a víz valószínűleg mégsem fagy meg. Erre a választ részben a jégréteg és a benne rekedt gázfázis jó szigetelő képessége (Horváth *et al.* 2006) adja meg. Másrészt a jégrétegen a napsugárzás áthatol, melegítve ezzel az alatta lévő teret, ill. a víz sótartalma a fagyáspontot is csökkenti. A Mars déli féltekéjének tavasza elején, amikor a napsugárzás beesési szöge megnő, kiterjed a DDS-ek területe is, ami a jég alatti vízlencse térfogat növekedésével járhat együtt. A felületi jég elszublimálása után a nyílt sötét területek valószínűleg még több fényt nyelnek el, mint a jég alattiak, így melegedésük erőteljesebb lehet. Ilyenkor a nyílt felszínek hőmérséklete kissé 0 °C fölé is emelkedhet. Ugyanakkor az is ismert, hogy bizonyos prokariota szervezetek -15 °C alatt néhány fokkal is képesek bizonyos növekedésre (Horváth *et al.* 2006), de akár -30 °C-ig asszimilálhatnak is. Földi körülmények között ezek a szervezetek akár az arktikus gleccserjég vízlencséiben is megélnek (Mueller *et al.* 2001), és elviselik a fagyást is (Zakhia *et al.* 2008). Az is ismert, hogy az antarktiszi sivatagok télen – 70 °C alá hűlnek, mégis nagy diverzitású CBC-kkel rendelkeznek. Mindez maga után vonja belső membránrendszereik erős alacsony hőmérsékleti stabilitását, még akkor is ha a különösen hideg periódust inaktív állapotban vészelik át.

1.2.4. A látható fény és az UV-sugárzás hatásai és tűrése

A fotoszintetikus apparátus felépítése révén képes egy meghatározott mennyiségű fényenergia elnyelésére és kémiai energiává történő átalakítására. Ehhez képest az aktuális fényintenzitás lehet kevesebb vagy több. Amennyiben a fényintenzitás kevesebb, mint amit a növény átalakítani és hasznosítani képes, a fény gyakorlatilag maximális hasznosítása mellett is, a fotoszintézis alacsony intenzitással működik. Ebben az esetben a pigment összetétel és a fotoszintetikus apparátus felépítésének módosítása révén lehetőség van – hosszútávon – az abszorbeált fényenergia mennyiségének növelésére (Lichtenthaler *et al.* 1984). Ezzel szemben a fényintenzitás növelésével mindaddig nő a fotoszintetikus folyamatok intenzitása,

amíg el nem éri a maximális kapacitást. Ilyenkor azok a folyamatok válnak egyre jelentősebbé, melyek arra irányulnak, hogy az abszorbeált, de már hasznosulni nem képes fényszerkeziát, olyan formává alakítsák át vagy vezessék el, ami kevésbé károsító (leszabályozó mechanizmusok).

Amennyiben a gerjesztési energia mennyisége meghaladja a védekező és szabályozó folyamatok kapacitását, képes károsítani a fotoszintézist, és az un. fénygátláshoz vezet (Kok, 1956; Kyle *et al.* 1984; Barber and Andersson 1992; Aro *et al.* 1993; Andersson és Aro, 1999). Az erős fényintenzitás legfontosabb hatása a PS II core komplexében elhelyezkedő D₁ (reakciócentrum) protein degradálása reaktív oxigén gyökökön (ROS) keresztül, melynek következtében csökken az elsődleges töltés-szétválasztás és a PS II által hajtott elektrontranszport kvantumhatásfoka (Vass *et al.* 1992; Aro *et al.* 1993; Hideg *et al.* 1994; Andersson és Barber, 1996).

Mivel természetes körülmények között a CBC-k az év nagyobb részében ki vannak téve az erős besugárzásnak a magas fényintenzitáshoz egyrészt alkalmazkodhattak, másrészt a nap nappali szakaszában jellemző körülményeket gyakran inaktív állapotban vészelik át, mivel ekkora víztartalmuk nagyobb részét elvesztik. Emellett a kérgék cianobaktérium komponenseinek esetében ismert jelenség az un. motilitás, ami a fény és hőmérsékleti viszonyoktól függő vertikális mozgást eredményez (Garcia-Pichel *et al.* 1994; Pócs *et al.* 2006). Harmadrészt - habár a feltételezett MSO-k – energia átalakító apparátusáról csak feltételezéseink lehetnek, marsi körülmények között a poláris régiók felszíni fényintenzitása kb. $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tehát viszonylag alacsony. Nem is beszélve arról, hogy ezeknek a hipotetikus szervezeteknek a feltételezett élőhelye a jég, vagy a néhány mm vastag regolit réteg alatt található. Néhány cianobaktérium tartalmú CBC földi körülmények között is hasonló élőhelyeket preferál (Friedmann *et al.* 1984; Rothschild 1995).

Marsi viszonyok között a magas fényintenzitásnál sokkal nagyobb problémát jelent az UV-sugárzás. A Mars légköre ui. csak nagyon korlátozott védelmet nyújt az elektromágneses sugárzás e tartományával szemben (Patela *et al.* 2002). A legnagyobb problémát az jelenti, hogy a 280 nm alatti kemény UV (C) is szinte akadálytalanul jut le a felszínre (Horváth *et al.* 2006), amit a feltételezett MSO-k a felszínen csak valamilyen speciális, általunk nem ismert védekező mechanizmussal élhetnének túl, vagy olyan helyeken ahol a sugárzás intenzitása alacsonyabb. A Földön 290 nm alatti hullámhosszú sugárzás nem jut le a felszínre. Irodalmi adatok is inkább csak az UV-A, ill. -B hatásairól állnak rendelkezésre (Bebout és Garcia-Pichel 1995; Quesada és Vincent 1997; Sass *et al.* 1997; Ehling-Sculz és Sherer 1999; Vass *et al.* 1999; Oren és Seckback 2001; He *et al.* 2002; Latifi *et al.* 2009).

A földi CBC-k az arid, vagy szemiarid területeken ki vannak téve jelentős mértékű UV sugárzásnak. A sugárzás szezonálisának szerepe az északi, ill. a déli hidegöv felé haladva csillagászati földrajzi okok miatt a erősödik. Az UVA és B DNS-re és a fotoszintézisre kifejtett károsító hatásai közismertek (Sass *et al.* 1997; Oren és Seckbach 2001; Shevela *et al.* 2013). A szervezetek többsége azonban bizonyos szintig tolerálja a sugárzást, másrészt bizonyos védelmi képességekkel is rendelkezik (Mitchell és Karenz 1993).

A cianobaktériumok extra- és intracellulárisan is képesen bizonyos védőanyagok szintézisére és felhalmozására (Pócs 2006). A teresztris cianobaktériumok külső nyálkaburkában történő scytonemin felhalmozás a kérgek felületét sötétre festi és egyben eredményes UV-szűrő pigment is (Garcia *et al.* 1991; 1992; 1994a; 1996; Proteau *et al.* 1993). Egy másik extracellulárisan előforduló védőpigment a gloeocapsin elsősorban a sziklalakó kérgek esetében jellemző és a scytonemin-nel együttesen is előfordul. A zúzmók esetében a pigmentek a kéregrétegben fordulnak elő (Rikkinen 1995), védve a gonidiumos réteg fotobiontáit. Ilyen pl. a sárga calycin, amely főleg a magashegyek (4000-6000 m) kitettebb részein előforduló telepek védelmében játszik szerepet. Képződését az e területekre jellemző magas UV sugárzás váltja ki (Obermayer és Poelt 1992). A cianobaktériumok sejten belül is halmoznak fel védőpigmenteket. Ilyenek a mycosporin jellegű vegyületek (MAA), amelyek főleg UV-B-ben míg diszubsztituált változataik UV-A-ban nyelnek el (Oren és Seckbach 2001). A zöld és a sárgásmoszatokban szintén megtalálhatók, ahol a scytonemin nem fordul elő. Védőszerepük ezért ezekben az algákban különösen fontos lehet (Garcia *et al.* 1993). Egyes vélemények szerint (Pócs 2006) a hóalgákban a karotinoid típusú pigmentek is szerepet játszhatnak a magasabb hullámhosszakkal szembeni védelemben. A kérgekben előforduló mohák is rendelkeznek bizonyos szintű UV-toleranciával (Proctor 1981). Közismert a mérsékletövi kérgekben gyakori *Syntrichia (Tortula) ruralis* moha erős toleranciája és alkalmazkodó képessége (Takács *et al.* 1999), amelyet a fotoszintetizáló apparatus flexibilis viselkedésével magyaráznak.

Mint már említettem a Mars légköre nem nyújt védelmet az UV sugárzással szemben (Patela *et al.* 2002). Felvetődik a kérdés, hogy a feltételezett MSO-k hogyan élhetik túl ezt a jelenséget. Horváth és munkatársai (2006) szerint a kérdést két részre kell osztani abból a szempontból, hogy mi történik funkcionális és kiszáradt, inaktív állapotban. Működőképes állapotban ui. az MSO-k feltételezhetően jég, ill. hó alatt találhatók, ami egyrészt az UV sugárzást is szűri (Cockell *et al.* 2005; Cordoba-Jabonero *et al.* 2005), másrészt biztosítja a megfelelő mikroklimát. Ugyanakkor a jég olvadásával az organizmusok néhány mm-es porréteg alá is vándorolhatnak. Rothschild (1995) földi körülmények között is megfigyelt

hasonló jelenséget, amikor is a Kaliforniai-öbölben a felszíni porréteg alatt talált fotoszintetizáló kékbaktérium telepeket. Ezzel összhangban Marschall és munkatársai (2012) kimutatták, hogy egy néhány mm vastag Mars-szimuláns talaj, a hatékony UV-védelem mellett, még valószínűleg elegendő fényintenzitást biztosít a cianobaktériumok fotoszintéziséhez. Végül az is lehetséges, hogy az MSO-k az evolúciójuk során a fent említett földi példánál valamilyen hatékonyabb védelmet fejlesztettek ki az UV sugárzással szemben.

1.2.5. Az oxidatív stresszekkel szembeni tolerancia

A kérdéskör tanulmányozása több szempontból is fontos. Egyrészt az extrém mértékű környezeti tényezők hatásai nyomán közvetve, vagy közvetlenül intracellulárisan reaktív oxigén gyökök (ROS) keletkeznek, és a közvetlen károsító hatásokat gyakran ezek váltják ki. Szinte minden ténylegesen ható abiotikus környezeti tényező (fény, UV sugárzás, alacsony és magas hőmérséklet, vízhiány/kiszáradás, só, stb.) korlátozó hatásai visszavezethetők a ROS képződésére (Latifi *et al.* 2009). Másrészt ez nem hanyagolható el a Mars felszínén sem. Itt ui. a talaj vörös színét a benne található vasvegyületek, főleg a hematit okozza. Már a Viking űrszonda megállapította, hogy a marstalaj erősen oxidáló hatású. Ezt arra vezetik vissza, hogy az erős UV sugárzás a vas-oxidokkal kölcsönhatásban peroxidokat és szuperoxidokat produkál (Horváth *et al.* 2006). A sötét dűnék területén a felszín nem vörös, hanem sötétkék/lila. Ez arról árulkodik, hogy a vas-oxid tartalom alacsonyabb, így a peroxidok is kisebb mennyiségben képződnek. Ezért a feltételezhető MSO-k nincsenek olyan mértékű oxidatív stressznek kitéve (pl. nyári kiszáradáskor), mint a bolygó egyéb területein, tehát túlélési esélyeik is nagyobbak.

ROS több úton is keletkezhetnek a baktériumsejtben. Az egyik legfontosabb forrás a fotoszintézis, ahol fotoinhibíciós körülmények alatt a PS II-ben a triplet klorofill közreműködésével szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$) (Fufezan *et al.* 2007), vagy a PS I akceptor oldalán a ferredoxin közreműködésével szuperoxid (O_2^-) keletkezik (Mehler 1951). Természetesen a két említett fajtán kívül hidrogén-peroxid és toxikus hidroxil gyökök is keletkeznek. Mint azt Vass (1992) megállapította a fénygátlás elsődleges oka a D_1 protein $^1\text{O}_2$ általi károsodása, mások ugyanakkor a ROS *de novo* (D_1) protein szintézist transzkripció, vagy transláció szinten történő gátlását emelik ki (Nishiyama *et al.* 2001; 2004; Kojima *et al.* 2007). A fentiek mellett a ROS károsíthatják a membrán külső felszínén elhelyezkedő fikobiliszómákat is, ami csökkentheti a reakciócentrumok felé irányuló energiaátvitel hatásfokát (Liu *et al.* 2005). A fotoszintetikus folyamatokon kívül a respirációs folyamatok során is keletkezhetnek reaktív oxigén fajták (Imlay 2003; Giorgio *et al.* 2007). A részletes keletkezési, hatás- és védekező

mechanizmusok ismertetése nem feladata a dolgozat e fejezetének, ezért csak a cianobaktériumokra jellemző, a dolgozat szempontjából legfontosabb tényekre szorítkozom.

A cianobaktériumok, mint a CBC-k fotoautotrof szervezetei változatos védekezési mechanizmusokat fejlesztettek ki az oxidatív stresszekkel szemben (Imlay 2003; Latifi *et al.* 2009). Ezek közül több mechanizmus enzimátikus (pl. katalázok, peroxidázok, szuperoxid-dizmutázok) mások pedig nem-enzimátikusak (glutathion, bizonyos vitaminok, karotinoidok, stb.). Másrészt a gyors reparációs folyamatok (pl. PS II repair ciklus) is a károsodással szemben hatnak (Nishiyama *et al.* 2001; 2004; 2006; Ohnishi *et al.* 2005). Egyes vélemények szerint bizonyos cianobaktériumokban három *PsbA* gén kódol két különböző D₁ izoformát (D1:1; D1:2) Golden *et al.* 1986). A normál D₁ magas fényintenzitáson gyorsan helyettesíthető az izoformájával, amely a fénygátlással szemben ellenállóbb (Campbell *et al.* 1995). Ezek az ellenállóbb formák más stresszfaktorokkal (pl. UV-B) szemben is hatékonyabb védelmet nyújthatnak (Bouchard *et al.* 2006).

Persze az egyik leghatékonyabb „védelmi” mechanizmus maguknak a ROS keletkezésének az elkerülése. Erre gyors és jó lehetőséget biztosít a non-radiatív energia disszipáció. A nem-fotokémiai kioltás (ill. ennek gyors komponense a qE) a lumensavanyodás másodlagos hatásaként értelmezhető, amely az excitációs energiát a fénygyűjtő rendszerben hő formában csengeti le (Szabó *et al.* 2005). Természetesen a cianobaktériumok nem tartalmazznak LHC II-t, ennek ellenére feltételezhetők alternatív utak a túlzott mértékű gerjesztési energia „eldisszipálására” (El Bissati *et al.* 2000; He *et al.* 2001; Rakhimberdieva *et al.* 2004; Yao *et al.* 2007; Latifi *et al.* 2009).

Mint azt megállapítottuk számos, az élőhelyen ható abiotikus környezeti tényező korlátozó hatása képes megbontani az oxidánsok és az antioxidánsok közti egyensúlyt (Latifi *et al.* 2009). Ennek az ökológiai jelentősége a dolgozat témaválasztása szempontjából is rendkívül fontos, hiszen azok az extrém faktorok, amelyeket a szimulációs kezelések során alkalmazásra kerültek minden bizonnyal ROS keletkezését is indukálják. Másrészt vizsgálataim során külső hidrogén-peroxid kezeléseket is alkalmaztam, ill. metil-viologén (paraquat, PQ) kezelésekkal oxidatív stresszt sejten belül is próbáltam generálni.

1.2.6. A kriptobiotikus kérgek túlélő képessége

Pócs (2006) szerint az extrém környezeti tényezők között élő szervezetek számára a korlátozott időszak(ok) átvészelésére az egyik legmegfelelőbb stratégia az anabiotikus túlélés. Az arid és fagyos területeken élő CBC-k (ill. elemeik) csaknem mindegyike rendelkezik ezzel a képességgel. A nyálkaburokkal rendelkező fajok esetében a burok hosszú ideig képes

megőrizni a vizet, kiszáradva pedig megszilárdul, így fizikailag is védi az alkotókat (Dor és Danin 2001).

Egyes típusok, vagy fajok nagyon különböző hosszúságú időszakokat képesek anabiotikus állapotban átvészeltetni. HDT zúzmó (*Cladonia*) és moha (*Syntrichia ruralis*) laboratóriumi körülmények közt mintegy 6 hónapos túlélését bizonyították (Benkő *et al.* 2002). PDT edényes növények közül a *Xerophyta scabrida* 2, egy afrikai sásféle 11 éves túlélést mutatott. Laboratóriumi körülmények között egy *Microcoleus* cianobaktériumot (a CBC-k egyik legelterjedtebb tagja) 19 év után is sikerült újranedvesíteni, úgy, hogy az a továbbiakban is életképes maradt. Ennél azonban sokkal meglepőbb eredményeket is dokumentáltak. Nem ritka, hogy néhány tízezer (Vallentyne 1955), ill. millió éves üledékben fototrof, vagy más, funkcióképes baktériumokat találtak. Friedmann és munkatársai (1994) az antarktiszi permafrosztban 2-15 millió éves baktériumokat fedezett fel, míg Gilichinsky (1995), ill. Viscnivetskaja és munkatársai (2001) Kolimában pleisztocén üledékből (permafrost) nagy mennyiségben izoláltak hét nemzetséghez tartozó életképes, kitenyészthető cianobaktériumokat. Pócs (2006) szerint éppen ezekből a felfedezésekből kiindulva alakult ki az a vélemény, miszerint a Marson, rejtett refugiumokban maradhatott fenn valamilyen kékbaktériumokhoz hasonló életforma (Friedmann 1986; Horváth *et al.* 2001; 2002a; 2002b; 2006; Gánti *et al.* 2002). Feltételezhetően a Mars déli poláris régióinak DDS-eiben időszakosan alkalmas életfeltételek lehetnek cianobaktérium-szerű élőlények számára, mivel ezek a szervezetek hosszabb időt képesek inaktív állapotban tölteni (vö. DDS-MSO elmélet). Ez azonban mindaddig csak elméletként kezelendő, míg arra kísérleti bizonyítékokat nem szolgáltatnak. Ezen a területen eddig olyan spektroszkópiai mérések, melyek adatokat szolgáltatnának az elmélet alátámasztására nem történtek.

2. Célkitűzés

A fentebb említetteknek megfelelően munkám célja az volt, hogy megvizsgáljam a változatos földi területekről származó extremofil CBC-k túlélőképességét és fotoszintézisük toleranciáját a marsi körülmények közt jellemző extrém környezeti faktorokkal szemben, valamint további részletesebb ökofiziológiai vizsgálatokra alkalmas vonalakat derítsek fel. Ennek érdekében bizonyos kérégek Mars-szimulációs kezeléseken estek át, ahol a Marsra jellemző legfontosabb globálisan ható környezeti faktorokat adott kombinációban szimulálták.

Egyfaktoros szimulációs kísérletekkel annak igazolása, hogy ezek a szervezetek túlélnek azokat a kedvezőtlen ökológiai körülményeket (magas sótartalom, oxidatív stressz, egyéb

roncsoló hatások) amelyek a feltételezhető marsi mikrokörnyezetben (DDS-ek) jellemzők és ezek hatása alatt is képesek hatékony fotoszintézisre.

Mivel kísérleti bizonyítékok a DDS-MSO hipotézis helytállóságára eddig sem közvetett, sem közvetlen módon nem álltak rendelkezésre közvetett bizonyítékokkal szerettem volna alátámasztani a Gánti és munkatársai (2003) által megalkotott, fentebb már részletezett DDS-MSO elméletet.

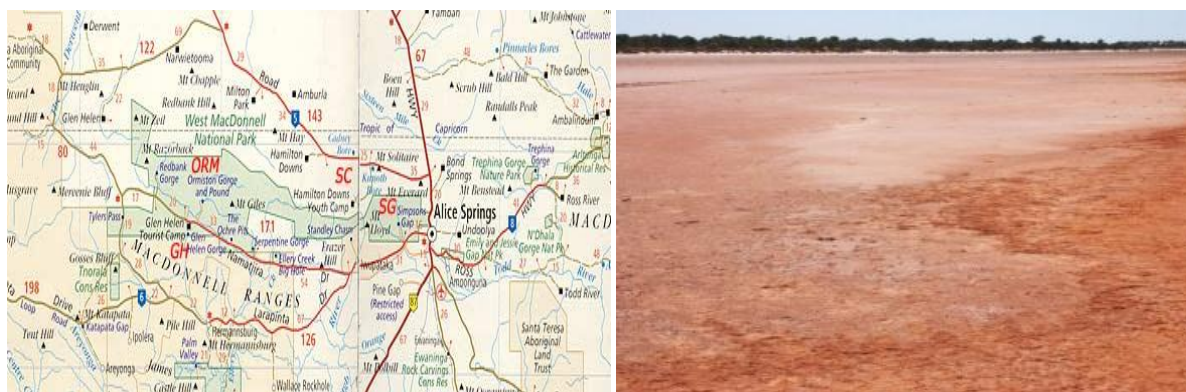
3. Anyagok és módszerek

3.1. A gyűjtőhelyek és rövid jellemzésük

A vizsgálatokba bevont, nagyobb mennyiségben gyűjtött CBC-k gyűjtési helyszíneinek rövid jellemzését külön megadom, rövid alfejezetekben. Bizonyos esetekben más területekről származó mintákat is megvizsgáltam (Románia, Bihar-hegység; Szlovákia, Slovensky Raj; Egyesült Arab Emírátsok, Jebel Ali).

3.1.1. Ausztrália: Északi Terület, West McDonnell Ranges- és Nyugat-Ausztrália

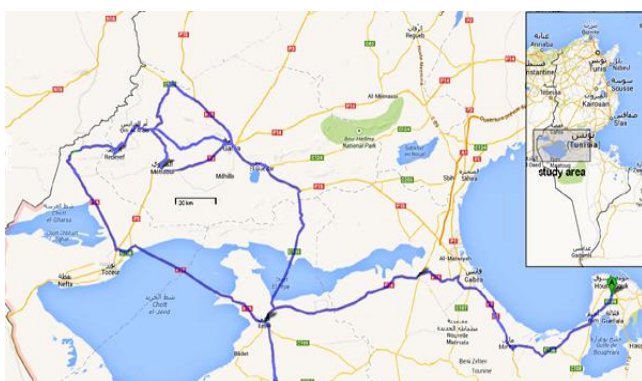
Az első helyszín közigazgatásilag az Északi Területhez tartozik, de annak déli területén található, Közép-Ausztráliában (3. ábra). Éghajlata sivatagi, félsivatagi, hegyszorosokkal, szurdokvölgyekkel tarkított 1500 m körüli magasságú csúcsokkal rendelkező hegységekkel. A területen mint extrém élőhely többféle sziklatípus, főleg vörös színű kvarcit, gránit, mészkő, homokkő és különböző konglomerátumok fordulnak elő. A másik ausztrál gyűjtési helyszín NY-Ausztrália egyik frekventált területe, a terület második legnagyobb tava (*Lake Barlee*, 3. ábra). Bizonyos részei rendszeresen kiszáradnak. Sós tó, területe 1980 km². A visszamaradó fenék sós felszínéről intakt kérgek gyűjthetők. A területeken Pócs 2004-ben gyűjtött cianobaktérium kérgeket.



3. ábra. A McDonnell Ranges elhelyezkedése, és a Ny-ausztráliai Lake Barlee kiszáradt alzata (Pócs T. felvétele)

3.1.2. Dél-Tunézia, Chott El Jerid és környéke

A Chott El Jerid Mars-analóg területen a gyűjtő utat 2013-ban szeptemberében és októberében szervezték (4. ábra). A területről laboratóriumi vizsgálatokra alkalmas mennyiségben gyűjtöttek nagy számú intakt kérget. A terület központja extrém száraz sós sivatag, földi körülmények közt erősnek mondható UV sugárzással. A gyűjtések különböző alapkőzetű sziklák, kiszáradt sós felszínek, homok és talaj felületéről történtek. Emellett néhány esetben gipsz sziklákból endolitikus szervezeteket is gyűjtöttek (4. ábra). Az egy faktoros szimulációkhoz általam használt kergek nagyrészt erről a területről származnak.



4. ábra A tunéziai (Chott El Jerid régió) gyűjtőút (2013) által érintett területek és endolitikus szervezetek gyűjtése gipsz sziklából (Forrás: Kereszturi et al. 2014, Kereszturi Á. felvétele)



5. ábra A 2014-es törökországi (Thoros-hegység, Közép-Anatólia) útvonala (Kereszturi Á. és Taborská J. nyomán) és kriptobiotikus bevonatok egy mészkő sziklatömbön (Thoros-hegység, Dulai S. felvétele)

3.1.2. A Thoros-hegység és Közép-Anatólia

2014-ben A Thoros-hegység és Közép-Anatólia (Törökország) területén történtek gyűjtések (5. ábra). A mintegy 2800 km-es úton 49 helyszínen történt gyűjtés, azonban nem minden esetben olyan mennyiségben, amely laboratóriumi vizsgálatokra is alkalmas. Az expedíció jelentőségét az adta, hogy a tunéziai helyszínekkel ellentétben nemcsak extrém

1. táblázat A Német Légekörfizikai Kutatóintézet (DLR, Berlin) Mars-szimulációs kamrájában kezelt minták.

Azonosítószám	Származás	Taxonok	Leírás
11-17 (05128/III)	Bihar-Hegység, Romania	<i>Gloeocapsopsis pleurocapsoides</i> , <i>Gloeocapsa alpina</i> , <i>Gloeocapsopsis dvorakii</i>	Félárnyékos, mérsékelt, egyenletes hőmérsékletjárású felület, a Medve- barlang bejárata mellett. Tszf. 500m.
11-17 (07080/III)	Szlovákia, Slovenský Raj. Stratenská-tól 2 km-re ÉK-re (többör pereme)	<i>Chroococcus lithophilus</i> (domináns), <i>Gloeocapsopsis pleurocapsoides</i>	Száraz, napos mészkő szikla. Tszf. 890 m.
21-27 (01069)	Ausztrália, Northern Territories, W. McDonnell Ranges	<i>Tolypothrix byssoidea</i> (domináns), <i>Gloeocapsopsis pleurocapsoides</i> , <i>Nostoc microscopicum</i> és <i>N.</i> <i>minutissimum</i> a felső rétegben, a -0.1-0.4 mm mély alsó rétegben <i>Schizothrix</i> aff. <i>kialingensis</i>	Nyílt, Chenopodiaceae dominált fűsivatag. Időszakosan vízzel borított terület. Tszf. 630 m.
21-27 (09001/I)	Egyesült Arab Emírségek, 25 km-re DNY Dubaitól	<i>Chroococcales</i>	Bazalt homokban alacsony sejtsűrűség. <i>Chenopodiaceae</i> dominált nyílt fűsivatag.
31-37 (04197/I)	Nyugat Ausztrália, Lake Barlee	<i>Tolypothrix byssoidea</i> (domináns, felső rétegben), <i>Microcoleus paludosus</i> . Felszín alatti réteg 0–1 mm: <i>Crinalium</i> <i>epipsammum</i> , <i>Symplocastrum friesii</i> (domináns), <i>Microcoleus vaginatus</i> . Alsó réteg 1–3 mm: <i>Symplocastrum</i> <i>penicillatum</i> . <i>Lyngbyella</i> sp	Időszakosan kiszáradó só tó. Tszf. 409 m.
31-37 (04195/I)	Nyugat Ausztrália. Lake Barlee	Felső réteg: <i>Tolypothrix byssoidea</i> (domináns), <i>Microcoleus</i> <i>paludosus</i> . Felszín alatti réteg: 0-1 mm: <i>Crinalium</i> <i>epipsammum</i> , <i>Symplocastrum friesii</i> (domináns), <i>Microcoleus vaginatus</i> . Alsó réteg 1-3 mm: <i>Symplocastrum</i> <i>penicillatum</i> . <i>Lyngbyella</i> sp.	Időszakosan kiszáradó só tó alzata Tszf. 410m
41-44 (04197/I)	Nyugat Ausztrália.	Felső réteg: <i>Tolypothrix byssoidea</i> (domináns), <i>Microcoleus</i> <i>paludosus</i> . Felszín alatti réteg: 0-1mm: <i>Crinalium</i> <i>epipsammum</i> , <i>Symplocastrum friesii</i> , <i>Microcoleus vaginatus</i> . Alsó réteg -1-2 mm: <i>Lyngbiella</i> sp., <i>Symplocastrum penicillatum</i> .	Októbertől áprilisig száraz sós tó alzata. Tszf. 410 m.
41-44 (09001/B)	Egyesült Arab Emírségek, Jebel Ali, 25 km DNY Dubaitól	<i>Collema</i> sp.	Talajlakó zúzmó, parti „Sabha” vegetációból. Tszf. 6 m.

száraz, hanem a téli félévben hideg élőhelyekről is származnak minták. Az egyfaktoros szimulációs vizsgálatokhoz használt kéreg részben innen származnak.

3.2. A vizsgálatokba bevont kéreg

A Mars-szimulációs kamrában (DLR, Berlin) végzett kezelések 2013 előtt gyűjtött kéregen történtek. A kezelésekre bevont minták adatait az 1. táblázat tartalmazza. A CBC-k közül egy viszonylag mérsékelt hőmérséklet járású, közepes vízellátottságú területről (051128III, Bihar-hg., Medve-barlang bejárata) származott. Egy minta (07080III) Szlovákiából (Slovesky Raj) egy dolina D-i kitettségű pereméről került begyűjtésre. Két kéreg az Arab-sivatagból (09001I, 09001B), a többi Ausztrália különböző területeiről (01069,

04197I, 04195I, 04197I). Az egyfaktoros kezelésekhez használt minták Tunézia (a 13-as kódszámúak) sivatagos területeiről, vagy Törökország (14-es kódszámúak) magashegyi, ill. középső száraz területeiről származnak (2. táblázat).

3.3. Szimulációs kezelések

A Mars-szimulációs kezeléseket a Német Légkörfizikai Kutatóintézet (DLR, Berlin) szimulációs kamrájában végezték de Vera, J-P. irányítása mellett 24 órás újrandedvesítés után. A kezelések típusait a 3. táblázat tartalmazza. A kamra alkalmas az egyes környezeti faktorok (légkörösszetétel, relatív légnedvesség, légnyomás, hőmérséklet, besugárzás /látható, UV, infravörös/) és azok periodikus változásainak szimulálására egyenként, vagy kombinálva. A 7. szimulációs program négy teljes marsi napi ciklust szimulált (3. táblázat), minden vizsgált kergén (1. táblázat). Ebben az esetben a chl. fluoreszcencia méréseket nem én végeztem.

Az egyfaktoros szimulációs kezeléseket az Eszterházy Károly Főiskola Növényélettani Tanszékének laboratóriumaiban végeztem. A vizsgálatok minden esetben 25 °C-on, normál légköri nyomáson és szén-dioxid koncentráció mellett történtek 24 órás desztillált vízzel történő újrandedvesítés után. A kergek sótűrését 0 és 5 M nátrium-klorid koncentráció

2. táblázat Az egyfaktoros vizsgálatokhoz használt minták.

Azonosító szám	Származás	Taxonok	Leírás
13157	Tunézia, 8 km DNY Gabes-től N 33°51.614', E 10°01.423', tszf. 51 m	n.a. zúzmó	Wadi alzata törpe cserjés (<i>Helianthemum lippii</i>) félsivatag
13159	Tunézia, El Ksour, 2,5 km NY Tatounine-től N 32°55.307', E 10°23.743', tfesz. 290 m	<i>Tortula atrovirens</i> <i>Didymodon cf. acutus</i> <i>Didymodon nicholsonii</i> <i>Endocarpon sp</i>	Nyitott, sziklás félsivatag, elszórt törpe cserjékkel
13160D	Tunézia El Ksour, 17 km NY Tatounine-től N 32°55.003', E 10°16.365', tszf. 360 m	<i>Didymodon luridus</i> <i>Didymodon nicholsonii</i>	Mészhomokkő sziklák félsivatagi növényzettel
13145E	Tunézia, El Jerid, 12 km KDK Moularet-től N 34°27.464', E 08°22.561', tszf. 410 m	n.a. zúzmó	Törpe cserjés sivatag, nagyon kis foltokban zúzmók (<i>Collema</i>). A talaj köves.
13169	Tunézia, Medinine, tengerpart 33°27.357', E 10°35.943', tszf. 30 m	n.a. zúzmó	Homokos talaj egy <i>Eucalyptus</i> ültetvényen.
13160A	Tunézia, El Ksour 17 km Ny Tatouine-től N 35°32', E 09°30', tszf. 360 m	n.a. zúzmó	Mészhomokkő sziklák félsivatagi növényzettel
13150D	Tunézia, néhány km É Redeyef-től 34°24.790', E 08°06.545', tszf. 529 m	<i>Grimmia capillata</i> <i>Crossidium squamiferum</i>	ÉÉNy-i kitettség, lejtőn mészkő konglomerátum félsivatagi növényzet, viszonylag gazdag a mohákban.
13161A	Tunézia, El Ksour, Ghomrassen K-I vége 33°53.643', E 09°49.808', tszf. 247	n.a. zúzmó	Mészkő szikla
1426	Törökország, Thoros-hg., Üzüncabur Olba között N 36°31.965', E 33°56.556', tfesz. 890 m	n.a. zúzmó	<i>Pinus brutia</i> erdő, mészkőszikla
1444	Törökország, Erenler Dağı, 8 km NYDNY Yesildere-től N 37°34.200', E 32°08.832', tszf. 1820 m	n.a. zúzmó	Lombhullató tölgyerdő, szilikát alapköveten

között vizsgáltam, a koncentrációt 24 órás ciklusokban növelve, amit 48 órás relaxáció követett. A Mars felszínén jellemző oxidatív hatásokat részben 24 órás 0,5 M-os hidrogén-peroxid (H₂O₂) kezeléssel szimuláltam, majd ismét egy 24 órás ciklusban a koncentrációt 1 M-ra növeltem, amit szintén 48 órás relaxáció követett. A sejten belüli oxidatív stressz előidézésére metil-viologént (paraquat) is alkalmaztam 25 és 50 µM-os koncentrációban, ami a baktériumsejtbe bejutva működő fotoszintézis mellett szuperoxid (O₂⁻) gyököt generál. Ezért a mintákat a mérések megkezdése előtt 4 órán keresztül 400 µE m⁻² s⁻¹ intenzitású előmegvilágításban részesítettem. A marstalajban viszonylag nagy mennyiségben fordulnak elő perklorátok. Ezt 0,6 és 1,2 %-os perklorásv (HClO₄) kezeléssel szimuláltam. A 0,6 %-os perklorát koncentráció megfelelt a Phoenix űrszonda leszálló egység (Wet Chemistry Laboratory) méréseinek (Hecht *et al.* 2009; Kounaves *et al.* 2010).

3. táblázat A Német Légkörfizikai Kutatóintézet (DLR, Berlin) Mars-szimulációs kamrájában lefuttatott szimulációs programok és az érintett minták. A jobb oldali oszlop az egyes kékbaktérium taxonok adott kezelésre mutatott túlélési arányát mutatja. Bizonyos taxonok egy kéregben fordulnak elő, de itt külön-külön vették figyelembe.

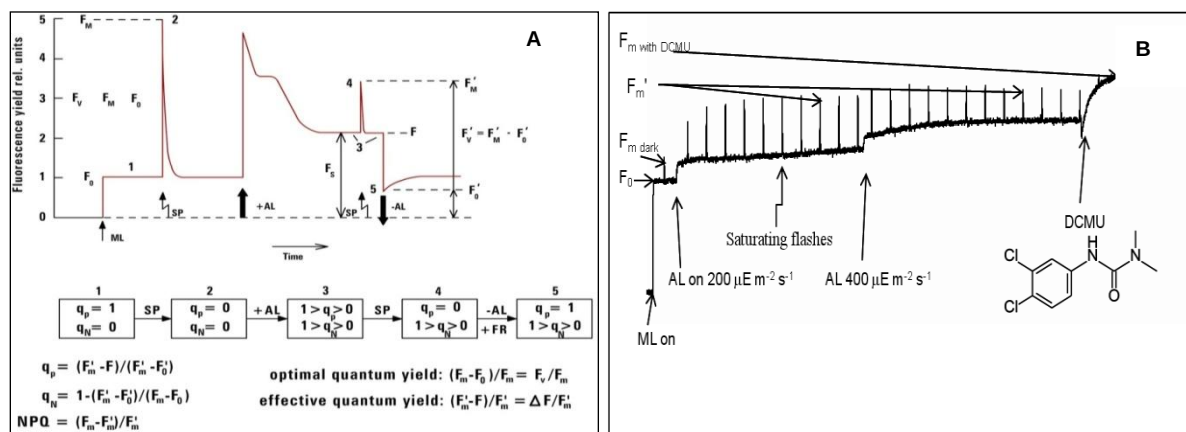
Sor-szám	Gázösszetétel	RH (%)	Nyomás (Pa) Hőmérséklet (°C)	Besugárzás	A kitettség ideje	Minták	Túlélés (%)
1	Föld-szerű (380 ppm CO ₂)	75-100	Földi légnyomásról (p=101300 Pa) csökkentve marsira (p=600 Pa)	LED (UVB/VIS/PAR)	1 nap	05128 II (11), 01069(21), 09001 II (21), 04197 I (31), 04195 II(31), 04195 I (41), 09001 B (41)	82 14/17
2	CO ₂	75-100	Földi légnyomásról (p=101300 Pa) csökkentve marsira (p=600 Pa)	LED (UVB/VIS/PAR)	1 nap	05128 II (12), 07080 III (12), 01069 I (22), 09001 I (22), 04197 I(32), 04195 III (32), 01195 I (42), 09001 B(42)	69 11/16
3	Föld-szerű (380 ppm CO ₂)	0	Földi légnyomásról (p=101300 Pa) csökkentve marsira (p=600 Pa)	LED (UVB/VIS/PAR)	1 nap	05128 II (13), 01069(23), 04197 I (33), 07080 II (13), 09001 I(23), 04195 III (33)	28 5/18
4	CO ₂	0	Földi légnyomásról (p=101300 Pa) csökkentve marsira (p=600 Pa)	LED (UVB/VIS/PAR)	1 nap	05128 II (14), 01069 I(24), 04197 I (34), 07080 III (14), 09001 I (24), 04195 III (36)	75 12/16
5	CO ₂	75 -100	Földi légnyomásról (p=101300 Pa) csökkentve marsira (p=600 Pa)	UV λ≈200 nm	1 nap	05128 II (16), 01069(26), 04197 I (36), 04195 I (43), 07080 III(15), 09001 I (25), 04195 III (35), 09001 B (43)	69 9/13
6	CO ₂	0	Földi légnyomásról (p=101300 Pa) csökkentve marsira (p=600 Pa)	UV λ≈200 nm	1 nap	05128 II (16), 01069(26), 04197 I (36), 07080 III(15), 09001 I (25), 04195 III (35),	77 10/13
7	CO ₂	0 -100 (marsi napi ciklusokban)	Marsi légnyomás (p=600 Pa) -40°C +20°C (marsi diurnális ritmusnak megfelelően)	LED (UVB/VIS/PAR)	4 nap	0518II (17), 01069I (27) 04179 (37), 01495 I (44), 07080 III(17), 09001 I (27), 4195 (37), 09001 B(44)	90 9/10

3.4. Klorofill fluoreszcencia indukciós mérések

A fluoreszcencia határfok változását amplitudó és frekvencia-modulált klorofill-fluorométerekkel (PAM 101-103, IMAGING PAM M –series, mini feltétellel, Walz, Effenrich,

Németország) követtem nyomon. A kioltási (quenching) analízisek előtt, a mintákat 30 percig sötétadaptáltam. A quenching analízisek első lépéseként a kezdeti fluoreszcencia szintet határoztam meg (6A. ábra). Ehhez egy adott frekvencián modulált, 650 nm-es gyenge intenzitású mérőfényt (ML) alkalmaztam. E modulált mérőfényt a fluoreszcencia gerjesztésére szolgál, s intenzitása nem elegendő a fotoszintézis gerjesztéséhez, így az elsődleges töltésszétválás kiváltásához (az összes Q_A oxidált). A modulált mérőfényt által gerjesztett fluoreszcencia a mérőfényvel azonos módon volt modulált, így egy erre a modulációra hangolt detektor egységgel azt detektálni tudtam. Második lépésként meghatároztam a maximális fluoreszcenciát (F_m). Ehhez egy 0,8 s-os ún. telítési fényintenzitású *flash*-t (SP) használtam, ami pillanatszerűen redukálta a sötét adaptálás által oxidált állapotba hozott összes Q_A -t. A cianobakteriális quenching analíziseknél a F_m meghatározása a mérés végén diuron hozzáadásával történt (6B. ábra). A maximális fluoreszcencia F_0 szintre való lecsengése után aktinikus fénnel (AL) gerjesztettem a fotoszintézist. Az AL intenzitása 10, 30, 200 és 400 $\mu E m^{-2} s^{-1}$ volt 10-10 perces gerjesztési szakaszokban, a növekvő fényintenzitás felé haladva. A 400 $\mu E m^{-2} s^{-1}$ AL megfelelt a Mars 70. szélessége körül feltételezett átlagos fényintenzitásnak, a 10 és a 30 $\mu E m^{-2} s^{-1}$ edig a néhány mm-es por (JSCII mars szimulációs talaj)-, ill. jég réteg alatt valószínűsítettnek (Marschall *et al.* 2012) Eközben egy perces időközökben adott, az F_m meghatározásához használt telítési intenzitású flash-ekkel határoztam meg az F_m' értékeit. Az IMAGING-PAM-mal végzett mérések esetében (egyfaktoros szimulációk) az AL intenzitások 11, 32, 231 és 440 $\mu E m^{-2} s^{-1}$ között változtak az állítási lehetőségeknek megfelelően.

A quenching analízisek során van Kooten és Snel (1990) nomenklaturáját követve a következő paramétereket mértem, illetve számítottam:



6. ábra A növényekre (A) és a cianobaktériumokra (B) jellemző tipikus fluoreszcencia quenching analízisek

F_0 - a sötét adaptálás után mért kezdeti fluoreszcencia;

F_m - a sötét adaptálás után (cianobaktérium kérgék esetén a diuron kezelés mellett) mért maximális fluoreszcencia;

F_m' - a fotoszintézis gerjesztése közben mért maximális fluoreszcencia;

F_s - az adott fényintenzitás hatására kiváltott fluoreszcencia egyensúlyi szintje;

F_v - a sötét adaptálás után meghatározott változó fluoreszcencia ($F_v = F_m - F_0$);

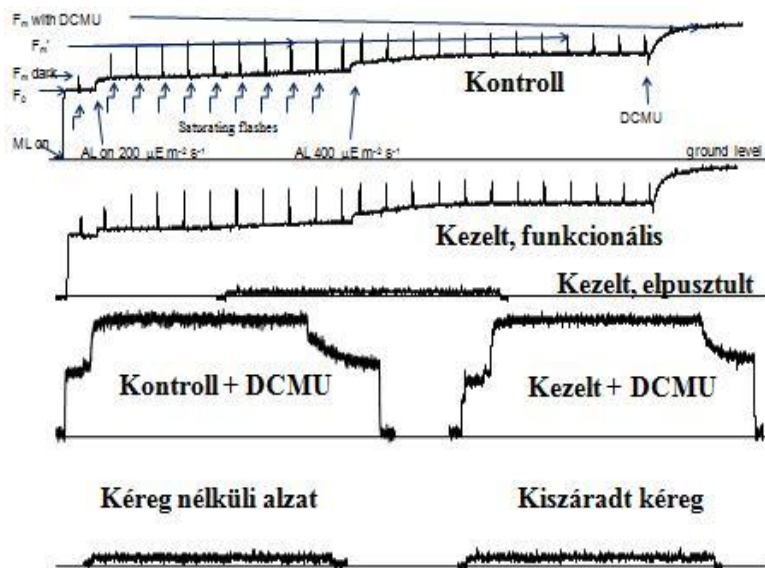
F_v/F_m - optimális quantum hatásfok;

$\Delta F/F_m'$, effektív quantum hatásfok (Genty *et al.*, 1989;).

4. Eredmények és diszkusszió

4.1. A kérgék kombinált Mars-szimulációs kezelése és túlélésük

A 8. ábra mutatja azokat a jellemző quenching analíziseket, amelyeket a kontroll és a szimulációs kezeléseken átesett minták, azok alzata, a kiszáradt kérgék, valamint a kezelések hatására elpusztult cianobaktériumos CBC-k mutattak. Mivel az asztrobiológiai szempontoknak megfelelően bizonyítani szükséges, hogy a valóban az adekvát jelet fogjuk, ezért szükségesnek látom annak bemutatását, hogy a kéreg nélküli alzat (alapkőzet) valamint a kiszáradt kéreg nem adja azt a speciális regisztrátumot, ami az újrantedvesített élő mintákra jellemző. Abban az esetben, amennyiben az újrantedvesített minta nem élte túl a kezeléseket, hasonlóan az előző esethez csak elektronikus zajt regisztráltunk. Jól látható, hogy az újrantedvesített, kezeltetlen minta egy tipikus, a cianobaktériumiokra általában jellemző quenching analízis (Campbell *et al.* 1998) regisztrátumát adta. Abban az esetben, ha a kezelt minta a szimulációt nagyobb károsodás nélkül túlélte ehhez hasonló jelet kaptam. Felvetődik a kérdés, hogy mi történhet akkor, ha a minta túléli a kezeléseket, de a fotoszintetizáló apparátusa erősen károsodik. Ebben az esetben a diuron kezelésekhöz hasonló jelet kellett volna kapnom, hiszen a diuron a D_1 protein Q_B kötőhelyére kapcsolódva irreverzibilisen gátolja a PS II által hajtott elektrontranszport folyamatokat (Vernotte *et al.* 1979; Metz *et al.* 1986). Ehhez hasonló jeleket azonban csak az újrantedvesítés korai szakaszaiban voltak jellemzőek (30-60 percen belül), amikor a fotoszintetizáló apparátus még nem regenerálódott. A jó túlélést mutató minták esetében fotoszintézis mind a kontroll, mind a kezelt mintákon hasonló időfüggésben állt helyre, így a kezdeti alacsonyabb aktivitás nem lehetett a szimulációs kezelésekre következménye.

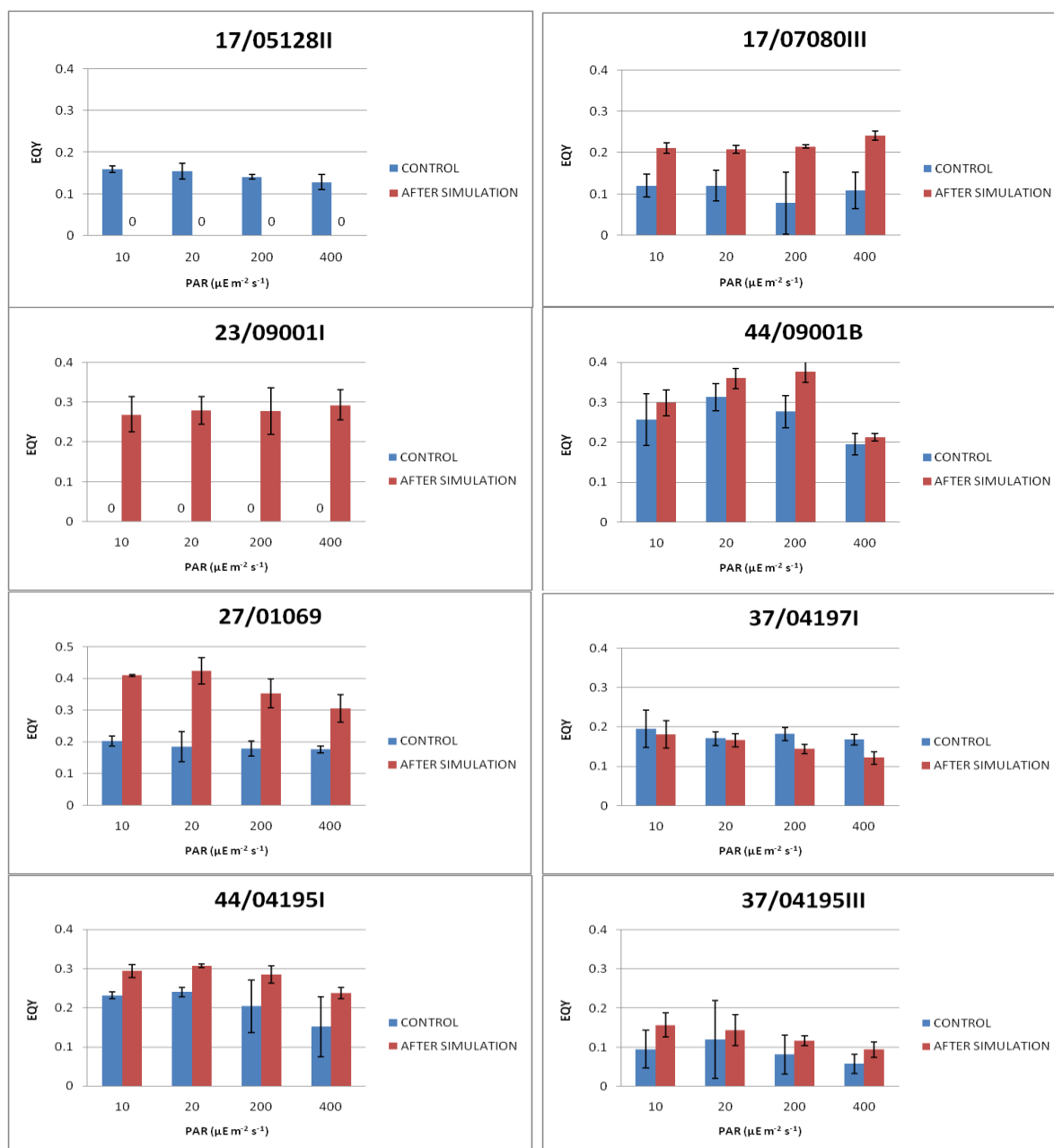


8. ábra A kontroll és kezelt minták, valamint az alzat és a kiszáradt kéreg fluoreszcencia szignáljai

Amennyiben a kéregben megtalálható egyes cianobaktérium taxonok adott kezelési típus szerinti túlélését vizsgáljuk akkor az a 3. sz. kezelést kivéve - ahol a túlélést csak 29 %-os – minden esetben eléri, vagy meghaladja a 69 %-ot. Érdekes módon, legnagyobb túlélési arány minden esetben a 7 sz. kezelés estében tapasztalható (3. táblázat), ahol a túlélő 9 taxon 7 intakt kéreghez tartozik. A különböző nemzetségekhez tartozó kékbaktériumok egy része az összes kezelést túlélte. Mindenesetre a túlélő kéreg alkalmasak lehetnek, további a Marsra jellemző körülmények között történő részletes ökofiziológiai vizsgálatokra, amely vonalak felderítése munkánk egyik célja volt. Amennyiben azt vizsgáljuk, hogy melyek azok a taxonok amelyek az összes kezelési típust túlélnek a következő sorrendet állapíthatjuk meg: *Nostoc* 100 %; *Crinalium* és *Microcoelius*, 82-82 %; *Tolipothrix* 79 %; *Symplocastrum* 59 %; *Gloeocapsopsis* és *Gloeocapsa* 41-41 % (cianobaktériumok); *Chroococcus* 25 % (zöldalga).

A 8. ábra mutatja a szimulációs kezeléseken átesett és a kontroll minták effektív kvantumhatásfokait ($\Delta F/F_m'$) különböző AL intenzitások mellett. Jól látható, hogy az AL növelése $200 \mu E m^{-2} s^{-1}$ -ig nem váltja ki a $\Delta F/F_m'$ csökkenését - ami még $400 \mu E m^{-2} s^{-1}$ -ig is mérsékelt marad - mint azt kloroplasztiszt tartalmazó növényekben várnánk. Ebből pedig az következik, hogy a vizsgált, cianobaktériumok dominálta kéreg fotokémiai folyamatai kevésbé érzékenyek a gerjesztő fény intenzitásának az emelésére (Campbell *et al.* 1998). Ez akár kapcsolatban állhat az összetett és flexibilis elektrontranszport-rendszerrel, valamint az alacsony PS II/PS I aránnyal, amelyek közvetve csökkentik a PS II akceptor oldali túlredukáltságának mértékét (Hirano *et al.* 1980; Badger és Schreiber 1993; Geerts *et al.* 1994; Meunier *et al.* 1995; Campbell *et al.* 1996; 1998). Mindezek valószínűleg szerepet játszhatnak az extrém kondíciók kivédésében is. Ugyanakkor az is valószínű, hogy a

túlélésben az alkalmazkodási mechanizmusoknak is szerepet tulajdoníthatunk. A kérgek a 05128II kivételével nagyobb részt magas fényintenzitásnak kitett, extrém száraz élőhelyekről származnak, és képesek tolerálni az eredeti élőhelyekre jellemző mostoha körülményeket (Pócs 2006). Ezek a kezeléseket túléltek, míg az árnyékos, folyamatosan nedves és viszonylag egyenletes hőmérsékletjárású területéről származó 05128II nem. Egy másik szembeötlő jelenség, hogy a 07080III, valamint a 01069-es számú minta esetében a kezelt kérgek kvantumhatásfoka adott AL intenzitáson csaknem kétszerese a kezeletlen kontrollénak ($P \leq 0,01$). Ez a különbség – figyelembe véve az egyéb kérgek effektív kvantumhatásfokának



8. ábra A Mars-szimulációs kamrában (DLR, Berlin) szimulációs kezelésen átesett (7. teszt, 4 teljes marsi napi ciklus) minták effektív kvantumhatásfokai a kezelésekek előtt és után. A 09001 sz. minta kontrollja az alacsony sejtsűrűség miatt nem volt korrekten mérhető.

alakulását - nem tűnik indokoltnak, habár az ökofiziológiai és stresszélettani irodalom ezzel kapcsolatban ismeri az edződés jelenségét (Beckett *et al.* 2005).

Irodalmi adatok szerint a legkritikusabb tényezőnek a szimulációs kísérletek során alkalmazott alacsony hőmérséklet tartják (de Vera *et al.* 2014), habár ennek ellent mond, hogy a minták túlnyomó többsége túlélte a kezeléseket (3. táblázat, 7. teszt; 9. ábra), ill. kérges cianobaktérium diverzitása általában még arktikus körülmények között is magas (Patova és Sibkov 2001; Pócs 2006). Gyakran ugyanazok a fajok fordulnak elő extrém fagyos és extrém meleg élőhelyeken: az egyes *Gloeocapsopsis*, *Microcoleus*, vagy *Nostoc* fajok mind az Antarktisz mind a Szahara talaján megtalálhatók (Hotváth *et al.* 2006; Pócs *et al.* 2006). Habár a tesztekben technikai okok miatt csak -40 °C-ig lehetett csökkenteni a hőmérsékletet, marsi körülmények között ennél jóval alacsonyabb értékek is előfordulnak, sőt a CO₂ fagyáspontja a nyomás függvényében -122 °C (Kahn 1985; Kieffer *et al.* 2000) is lehet. Az első szempont ami miatt az alacsony hőmérsékletet kritikusnak tartják, az a metabolikus folyamatok extrém lelassulása (de Vera *et al.* 2014), ami több környezeti - itt most nem részletezett - tényezővel szemben érzékenyvé teheti a növényeket (Anderson és Barber 1996), és a cianobaktériumokat is. A másik a jégképződés következtében bekövetkező mechanikai károsodás (Steponkus 1984; Gusta *et al.* 2004, de Vera *et al.* 2014). Egyes vélemények szerint ugyanakkor bizonyos cianobaktériumok fagytoleranciája kifejezett, amit a kiszáradás tolerancia még tovább fokoz, hiszen a fagystressz kivédéséhez elengedhetetlenül fontos a víz kimozgatása az extracelluláris térbe (Lin *et al.* 2004). Emellett a kiszáradás toleráns *Nostoc commune*-ben még -36 °C-on is kimutattak intracellulárisan folyékony vizet (Lin *et al.* 2004).

A 8. ábra világosan mutatja, hogy a 7. tesztprogram (3. táblázat) extrém alacsony hőmérsékleti kezelését hét kéregtípus is túlélte, sőt a kezeléseket után hatékony fotoszintézisre is képes volt. Mindez azt jelenti, hogy komponenseik képesek elviselni azt a hőmérsékleti ingadozást, ami a marsi dűnefoltokra jellemző. Ez feltételezhetően részben már kiszáradt állapotban tették, hiszen a szimulációs kamra alacsony nyomása miatt a kérges gyorsan vizet veszíthettek. Marsi körülmények közt ugyanakkor akár -75 °C-ig előfordulhatnak vékony interfaciális folyékony vízrétegek (Mohlmann 2004; Kereszturi és Appéré 2014). A DDS-ek területén pedig a vízjég alatt folyékony vízlencsék is feltételezhetők, melyek hőmérséklete szezonálisan a 0 °C-ot is meghaladhatja (Horváth *et al.* 2006).

A szimulációs kamrában végzett kísérletekkel kapcsolatban az alábbi fontosabb megállapítások tehetők. Mivel a kérges minden tesztípust viszonylag nagyobb arányban

túléltek, valószínű nem feltételezhetünk egy abszolút mértékben limitáló faktort. A túlélési ráta mind a tesztekre, mind a taxonokra vonatkoztatva, a 3. sz. tesztet kivéve, viszonylag magas. A Mars-analóg légkör (95,72 % CO₂, 2,7 % N₂, 1,6 % Ar, 0,13 % O₂) nem tűnik erős korlátozó tényezőnek, hiszen a földi légkörre jellemző gázösszetétel (380 ppm CO₂ 21% O₂ 79 % N₂) nem javította minták túlélési arányait. A 3 –as sz. teszt feltűnően rossz túlélési arányait nem tudjuk magyarázni, bár limitáló CO₂ koncentráció (380 ppm) és alacsony légnedvesség csak erre a kezelésre volt jellemző.

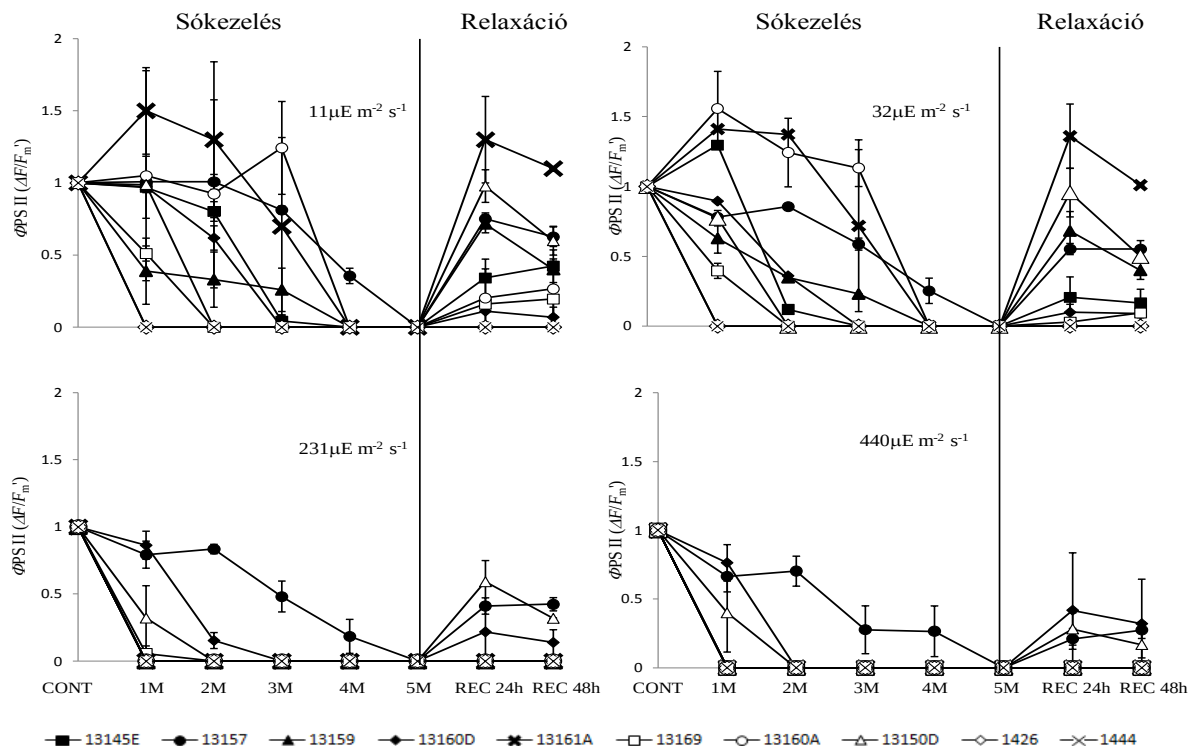
4.2. Az egyfaktoros kezelések és a kergek túlélése

A Mars-szimulációs kamrában végzett kísérletek mellett olyan, laboratóriumi körülmények között végzett egyfaktoros kezeléseket is végeztem, amelyek a globálisan ható marsi környezeti tényezők mellett a Mars talajára, ill. azokra a feltételezett élőhelyekre jellemzőek, amelyek területén a hipotetikus MSO-k élhetnek. Ezek keretében vizsgáltam a magas sótartalom, a marstalajra jellemző oxidatív környezet, ill. a perklorátok hatását. Ezek a kísérletek a 2013-ban Tunéziában és a 2014-ben Törökországban gyűjtött mintákon történtek, mivel a szimulációs kamrában tanulmányozott kergekből már nem állt rendelkezésre megfelelő mennyiség.

4.2.1. A vizsgált kergek sótoleranciája

Habár a CBC-k jelentős része olyan élőhelyekről származik, ahol a magas szalinitás általában erősen korlátoz, szükségesé vált a magas sókoncentrációval szemben mutatott tolerancia vizsgálata. Edényes növényekben már a 200-300 mM-os koncentráció is kifejezetten gátolja mind a fotoszintézist, mind az egyéb életfolyamatokat (*Dulai et al.* 2010; *Darkó et al.* 2014), az általunk alkalmazott kezelések viszont 24 órás ciklusokban egészen 5 M-os koncentrációig történtek, mely gyakorlatilag tömény sóoldatnak felel meg. Mindezt az is indokolta, hogy amennyiben a feltételezett marsi élőhelyeken folyékony víz elő is fordul akkor az magas koncentrációjú fémsóoldat lehet (*Tosca et al.* 2008; *Altheide et al.* 2009; *Mohlmann és Thomsen* 2011), ezért a sótűrés az egyik legfontosabb tényező a hipotetikus MSO-k túlélése szempontjából.

Mint azt a 9. ábra mutatja a kezeléseket 8 minta is túléli, és alacsony gerjesztő fényintenzitások (11, 31 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mellett még 3 M-os koncentráció esetében is kielégítő fotoszintetikus aktivitást mutat. Általános tendencia, hogy az AL további növelésével a $\Delta F/F_m$ a vonalakban gyakorlatilag nullára csökken. *Osmond et al.* 1986 véleménye szerint az egymással kombinálódva ható korlátozó tényezők gyakran eltérő válaszokat válthatnak ki

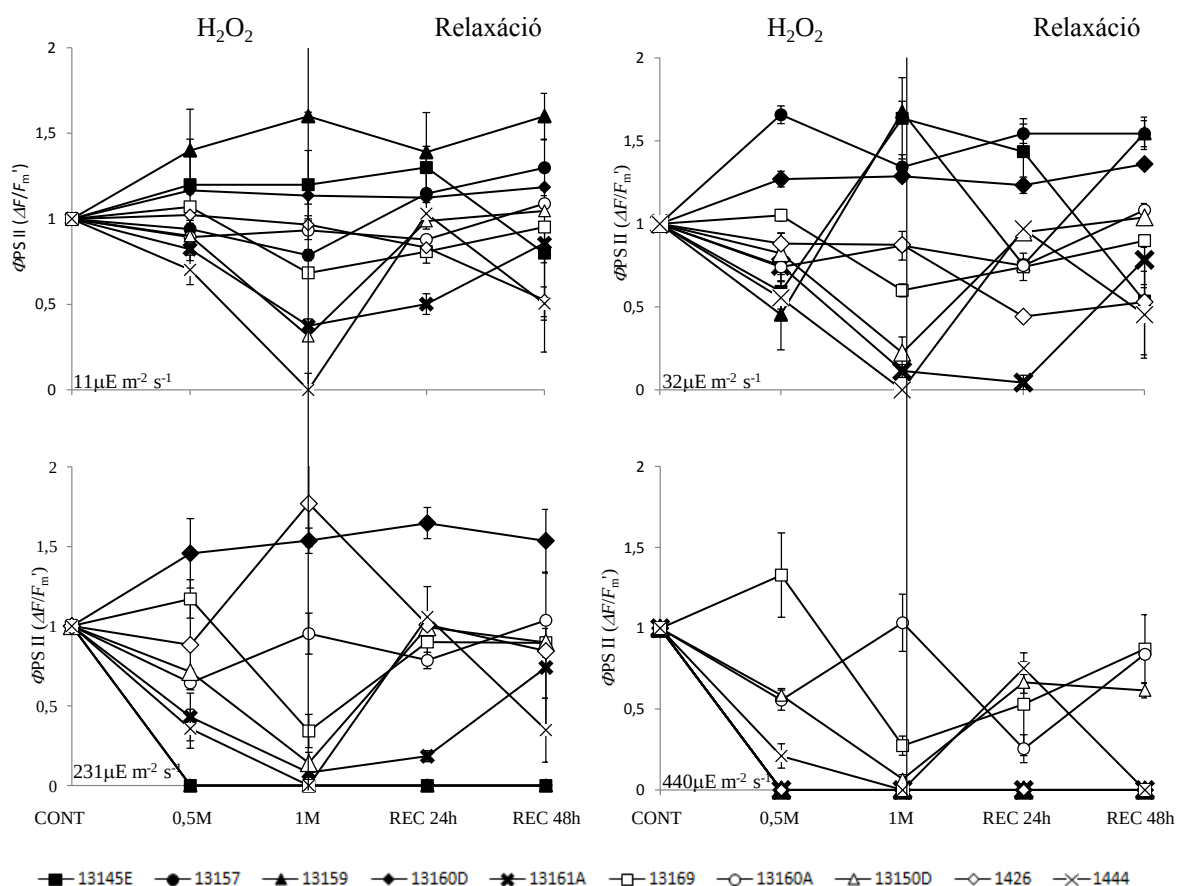


9. ábra A vizsgált kérégek effektív kvantumhatásfokának változásai a folyamatosan erősödő sókezelés és az azt követő relaxáció alatt. Az ábrán megjelenített adatpontok 5-5 független mérés matematikai középértékei

mint az egyedüli faktor, serkentve, elfedve, vagy ellensúlyozva egymás hatását. Ennek megfelelően az erős sókezelések alatt, már a viszonylag alacsony gerjesztési energia is túlzott mértékűvé válhat, ami gátolhatja a PS II által hajtott elektrontranszportot. A 13157-es vonal azonban még 4 M-os NaCl tartalom és $440 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ AL intenzitás esetén is megtartja az eredeti aktivitás legalább 25 %-át, ami nagyon erős toleranciát jelent, feltételezhetően ebből a szempontból a marsi körülmények elviselésére is alkalmassá teszi a mintát. Az is ismert, hogy a magas sókoncentráció részben ozmotikus, részben ionikus hatással bír (Allakhverdiev *et al.* 2000a; 2000b; 2002). Mivel a kérégek kiszáradás toleránsak az ozmotikus hatásnak kisebb jelentőséget tulajdoníthatunk, tehát az aktivitás csökkenéséért valószínűleg az ionikus stressz lehet felelős. Mivel az ionok kizárása vagy semlegesítése esszenciális a védekezés szempontjából (Oren 1993) feltételezhető, hogy a 13157-es, egy sivatagi wadi alzatáról származó zúzmókéreg kifejezetten hatékony védekező mechanizmusokkal rendelkezik.

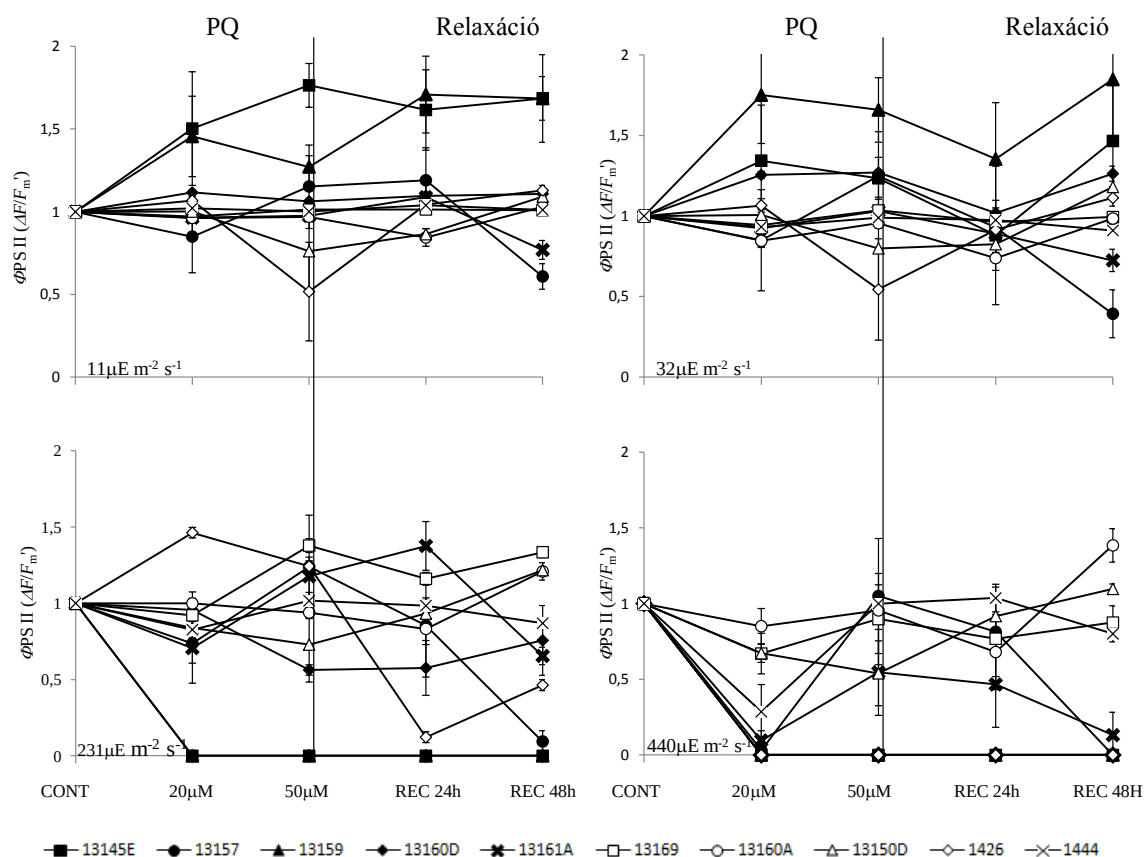
4.2.2. A vizsgált kérégek oxidatív stresszekkel szembeni toleranciája

A kérdéskör tanulmányozása két szempontból is fontos. Egyrészt elvileg minden fontosabb abiotikus korlátozó tényező hatása visszavezethető reaktív oxigén gyökök (ROS) képződésére (Latifi *et al.* 2009), melyek már ismert módon károsíthatják a sejt szerkezeti elemeit.



10. ábra A vizsgált kergek effektív kvantumhatásfokának változásai a folyamatosan erősödő hidrogén-peroxid-kezelés és az azt követő relaxáció alatt. Az ábrán megjelenített adatpontok 5-5 független mérés matematikai középértékei

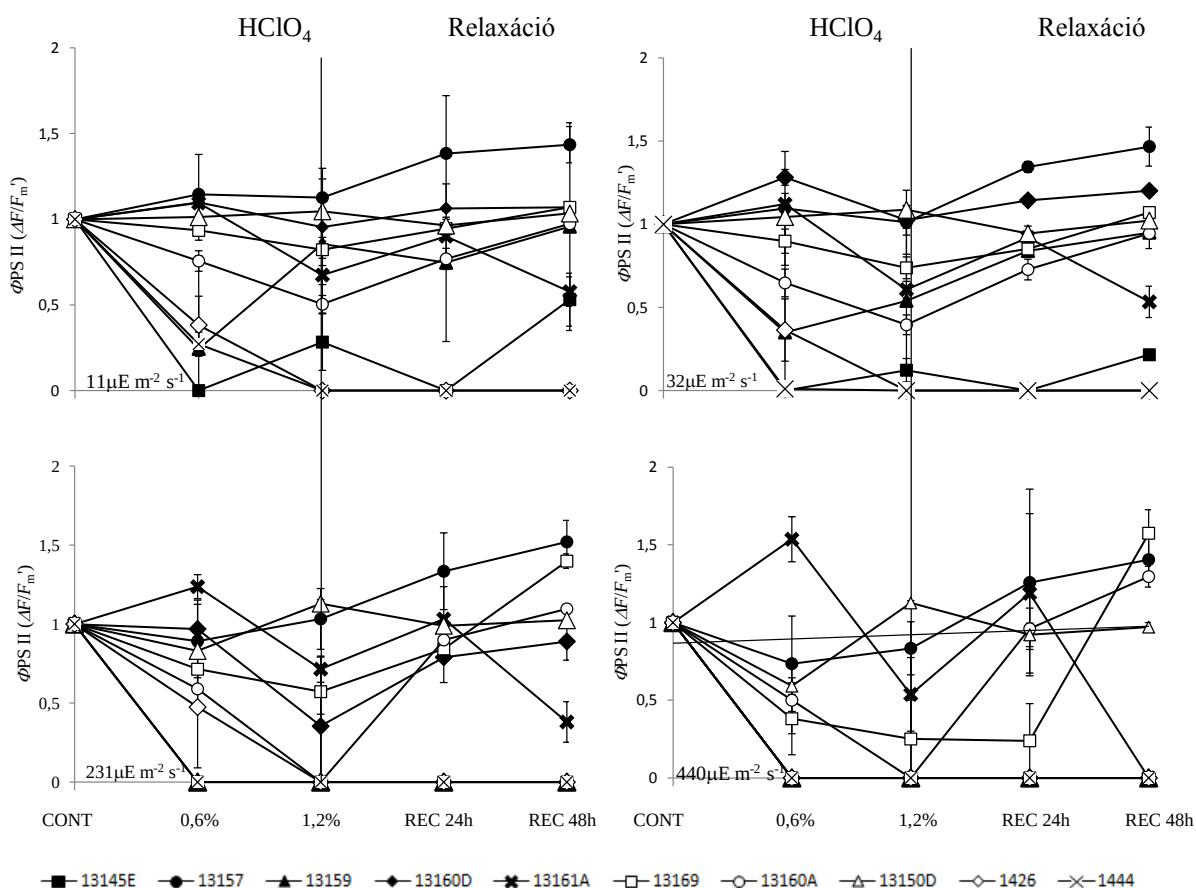
Ugyanakkor, mint azt már a Viking űrszonda leszálló egységének méréseiből is kiderült, a marstalaj is nagyobb mennyiségben tartalmaz oxidáló ágenseket (Klein 1999; Horváth *et al.* 2006). A marstalaj felszínén fellépő oxidatív hatásokat hidrogén-peroxiddal szimuláltam 0,5 és 1 M-os kezelésekkel. A 10. ábra szerint a kezelést minden vonal túlélte. Habár az 1 M-os koncentráció a 1444-es vonal effektív kvantumhatásfokát nullára csökkentette, a desztillált vizes átmosás után ez is visszanyerte fotoszintetizáló képességét. Hasonlóan a sóstresszhez a magasabb fényintenzitás itt is csökkentette a minták kvantumhatásfokát. Az exogén H_2O_2 adagolás mérsékelt fényintenzitáson tehát csak gyengébb gátlást okozott. Ez részben azzal magyarázható, hogy a mérések a kezelések 24. órájában történtek, a hidrogén peroxidról pedig köztudott, hogy viszonylag bomlékony. Másrészt az oxidatív stresszekkel szemben bizonyos prokarióták meglehetősen erős toleranciával rendelkeznek (Derecho *et al.* 2014). Ez a tolerancia valószínűleg összefüggésbe hozható a különböző védekező mechanizmusaikkal (Imlay 2003; Latifi *et al.* 2009), ez esetben pl. a magas kataláz aktivitással (Derecho *et al.* 2014).



11. ábra A vizsgált kérgek effektív kvantumhatásfokának változásai a folyamatosan erősödő paraquat-kezelés és az azt követő relaxáció alatt. Az ábrán megjelenített adatpontok 5-5 független mérés matematikai középértékei

Természetesen azt sem zárható ki, hogy a sejtek valamilyen mechanizmussal kizárták a vegyületet.

A fentiek figyelembe vételével a kérgeket metil-viologén (paraquat, PQ) kezeléseknél is alávettem (11. ábra), amely a sejten belül, PS I akceptor oldalán szuperoxid gyököt és más reaktív oxigén fajtákat generál abban az esetben, ha a fotoszintetikus elektrontranszport működik (Summers 1980; Halliwall 1984; Lehoczki *et al.* 1992). Ezért a mérések megkezdése előtt a kérgeket 4 órás $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ -s elő-megvilágítást kaptak, amely elegendő a hatás kiváltásához. Ez esetben, amennyiben a sejtek oxidatív stresszekkel szemben védő folyamatai nem képesek eliminálni a keletkező ROS-et a fotoszintetizáló apparátus is károsodásokat szenved. Hasonlóan a H_2O_2 -kezelésekhez a vizsgált kérgek mind a 25, mind az $50 \mu\text{M}$ -os PQ kezelést túléltek, ill. a fotoszintézist gátló hatásuk is csak magas fényintenzitáson, a minták egy kisebb részén mutatkozott. Mivel irodalmi adatok szerint már az $5\text{-}10 \mu\text{M}$ -os kezelés is erősen korlátozta a *Synechocystis* PCC 6803 oxigén kiválasztását (Nishiyama *et al.* 2001), a vizsgált CBC-k PQ-ra és az általa kiváltott oxidatív hatásokra erősen toleránsnak tekinthetők.



12. ábra A vizsgált kérgek effektív kvantumhatásfokának változásai a folyamatosan erősödő perklórsav-kezelés és az azt követő relaxáció alatt. Az ábrán megjelenített adatpontok 5-5 független mérés matematikai középértékei

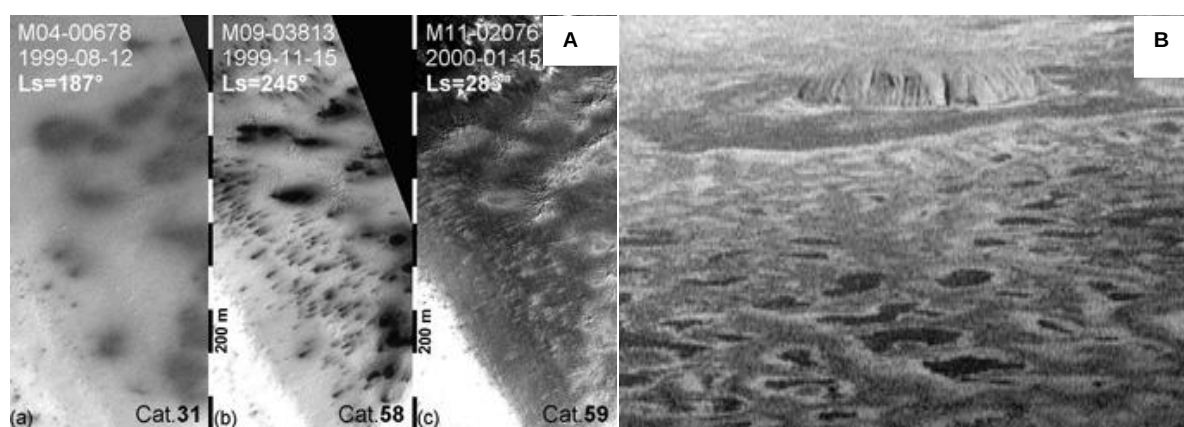
Mindez mind az exogén H_2O_2 , mind a PQ kezelés esetében kapcsolatba hozható a gyors detoxifikációval, azaz az antioxidáns enzimszisztémák (szuperoxid-dizmutáz, aszkorbát-peroxidáz, glutathion-reduktáz) hatékony működésével (Gressel 1986;), esetleg a PQ hatóhelyéről történő távoltartásával (Vartak és Bhargava 1999). A mars felszínén az UV sugárzás hatására kialakuló szuperoxidok és peroxidok (Horváth *et al.* 2006) feltételezett hatását tehát egyes földi eredetű CBC-k is képesek meglepően ígéretes szinten tolerálni.

4.2.3. A perklórsav hatása a kérgek fotoszintézisére és túlélésére

A valószínűleg légköri eredetű (Catling *et al.* 2010) perklorát (ClO_4^-) globálisan elterjedt a Mars bolygón a regolit felső, néhány centiméteres rétegében (Davila *et al.* 2013) 0,5 és 1 %-os koncentráció között. Az élő szervezetekre a perklorát – az ezt hasznosító baktériumokat kivéve – már általában nagyon alacsony (μg) mennyiségben is toxikus (Bardiya és Bae 2011). Ez indokolta az erősen maró hatású perklórsav kezeléseket ami sokkal

roncsolóbb hatású mint a sói. A 0,6 %-os perklorát koncentráció megfelelt a Phoenix űrszonda leszálló egység (Wet Chemistry Laboratory) méréseinek (Hecht *et al.* 2009; Kounaves *et al.* 2010). A kezelések hatására csak 1444-es minta károsodott irreverzibilisen. Alacsony AL intenzitáson ($11, 31 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a kérgek zöme kielégítő fotokémiai aktivitást mutatott (12. ábra), ami nagyrészt magasabb AL intenzitásokon is megmaradt. Mindez világosan mutatja, hogy az általam vizsgált CBC-k egy kivétellel képesek túlélni a marstalaj felső rétegében mért, a földi szint többszörösét kitevő (Davila *et al.* 2013), perklorát koncentrációt és nagyrészt a kezelések alatt is hatékony fotoszintézist folytatnak, annak ellenére, hogy azok erősen maró hatású perklórsavval történtek.

A fejezet végén, habár nem az én munkámon alapul, de mint diszkussziós elemet, érdemesnek tartom megemlíteni az alábbiakat. Horváth és munkatársai (2006) szerint a Mars poláris régióiban kialakuló sötét dűnefoltok tél végén, tavasz elején jelennek meg, amikor feltételezhetően a foltokban folyékony víz is előfordul, majd a nyár közepén eltűnnek (13A. ábra). Mindenképp figyelemre méltó, hogy a következő tavasszal a foltok 50-65 %-os gyakorisággal az előző foltok helyén képződnek újra. Nyáron – feltehetően a víz elpárolgásával párhuzamosan - a foltok területe kifakul, tehát azokat valószínűleg valamilyen eltérő tulajdonságú anyag fedi (13A/c ábra, Horváth *et al.* 2006). Ehhez hasonló képződmények a Földön is megfigyelhetők a vízhiány által korlátozott területeken, a hozzáférhető mennyiségű víz függvényében. Az Ausztrál-sivatagban a még vízzel borított sötét területeken funkcionális, a kiszáradt fakó foltokban pedig nyugalmi állapotban lévő CBC-k találhatók (13B. ábra).



13. ábra A Mars déli poláris régióiban kialakuló sötét dűnefoltok (DDS-ek, **A**) és a nyáron helyükön észlelhető kifakult foltok (**A/c**), valamint az Ausztrál-sivatagban, megfigyelhető sötét foltok (**B**) és a vízvesztés következtében történő színváltozásuk (háttérben az Ayers Rock).
Forrás: NASA/JPL/Malin Space Science Systems, Collegium Budapest; Pócs T. légifelvétele

5. Összefoglalás

Dolgozatomban nagyrészt extremofil, intakt kriptobiotikus kéreg túlélését és fotoszintetikus aktivitását vizsgáltam szimulált, egymással kölcsönhatásban ható és egyszerű Mars-analóg környezeti tényezők hatása után és alatt chl. fluoreszcencia indukciós módszerrel.

A vizsgálatok alapján sikerült olyan kéregtípusok felderítése, amelyeken a továbbiakban a marsi körülmények alatti viselkedéssel kapcsolatos részletesebb vizsgálatok elvégzése indokolt.

A szimulációs kamrában végzett tesztek és a vizsgált minták túlélési aránya meghaladta a 60 %-ot. Mivel az egyes tesztípusokat több taxon, ill. intakt kéreg is túlélte megállapíthatjuk, hogy a szimulált Mars-analóg környezeti tényezők egyike sem limitált abszolút mértékben. A Marsra jellemző nyomás és légkörösszetétel nem volt károsítóbb, mint a Föld-szerű abban az esetben, ha más faktorok a marsfelszínhez hasonlóan alakultak.

A szimulációs körülmények között a kéreg túlélése sokkal inkább függött a kéreg eredeti élőhelyén uralkodó viszonyoktól és a kéreg típusától, mint azoktól az extrém faktoroktól amelyeknek a szimuláció során kitétettek. Általában a száraz, sós sivatagokból származó minták mutatták a legjobb túlélési arányt (Egyesült Arab Emírségek: Jebel Ali; Ausztrália: McDonnell Ranges, Lake Barlee), azaz az élőhelyek extremitásának fokozódásával a túlélés is valószínűbb volt.

Mínthogy az intakt kéreg általában magas túlélést mutattak, a jövőben valószínűleg érdemes lenne részletesebb, az okokat feltáró vizsgálatokat tervezni a mikro életközösségek szintjén (természetesen az egyedi taxonok tanulmányozása mellett), ill. feltárni azokat a védekező, szabályozó és alkalmazkodási mechanizmusokat, amelyek közösségi szinten a kéreg „védelmében” valószínűsíthetők.

A laboratóriumi körülmények között végzett, „egyfaktoros” szimulációs kísérletekkel – reményeim szerint - sikerült igazolni, hogy külön-külön, több kéregtípus is elviseli a marsi talajfelszínen, ill. a sötét dűnefoltok területén uralkodó extrém tényezőket, valamint ezek hatása alatt is aktív fotoautotrof anyag- és energiaátalakítást folytat. Ezzel kapcsolatban legígéretebb a 13157- sz. Tunéziából származó minta. Ezeket a faktorokat a későbbiekben egymással kölcsönhatásban alkalmazva is érdemes lesz vizsgálatokat végezni.

Eredményeim bizonyos mértékig, közvetve alátámasztják a Gánti és munkatársai által kidolgozott DDS-MSO hipotézis helytállóságát.