

NARAVNA RADIOAKTIVNOST KOT VIR ENERGIJE ZA ŽIVLJENJE

TINKA DROZDEK

Fakulteta za matematiko in fiziko
Univerza v Ljubljani

V vzorcih vode, vzeti globoko izpod površja Zemlje, so bili najdeni živi mikroorganizmi. Nekateri vzorci so bili od površja izolirani več kot eno milijardo let. Pri večini se je pojavil genski zapis za produkcijo encimov, ki lahko energijo za življenje pridobivajo iz sinteze vodika. Med pomembnejše ugotovitve sodi dejstvo, da velike količine vodika nastanejo z radiolizo vode. To pomeni, da je naravno ionizirajoče sevanje izjemno pomembno in ga lahko opredelimo kot glavni vir za življenje pod površino Zemlje. Radioliza pa bi lahko bila prisotna tudi na drugih nebesnih telesih, ki pod površjem vsebujejo vodo.

NATURAL RADIOACTIVITY AS A SOURCE OF LIFE ENERGY

Living microorganisms have been found in water samples taken deep below the Earth's surface. Some of them have been isolated from the surface for over one billion years. Most of them had the genetic record for the production of enzymes that can obtain life energy from the synthesis of hydrogen. Among the more important findings is the fact that large amounts of hydrogen are produced by radiolysis of water. This means that natural ionizing radiation is extremely important and can be defined as the main source for life under the Earth's surface. Radiolysis could also be present on other celestial bodies that contain water below the surface.

1. Uvod

Mikroorganizmi so veliki reda mikrometer in so nevidni prostemu očesu. Obstajajo v enocelični obliki ali kot kolonija celic. Začetki odkrivanja podzemnih združb mikroorganizmov segajo v osemdeseta leta prejšnjega stoletja, znatna odkritja pa izhajajo predvsem iz vzorcev vode izpod Južne Afrike in Kanade. Vzorci so bili pridobljeni z vrtnanjem globlje od dna rudniških jaškov in vrtnanjem vrtin globoko v oceanske sedimente. Podzemni življenjski prostor mikroorganizmov je odvisen od okoliške vode in po različnih ocenah naj bi imel dvakrat večjo prostornino od oceanov (približno $267 \times 10^7 \text{ km}^3$) ter vseboval reda 10^{30} celic. S tem se ga uvršča med največje, najbolj raznolike in najstarejše habitate na planetu.

Količina organske hrane za mikrobe je globoko v Zemljini skorji končna in hitro izkopni. Sončna svetloba, ki bi omogočala fotosintezo in osvetlila ter segrela prostor, tako velikih globin ne more doseči. Tam tudi ni hidrotermalnih odprtín, ogretil zaradi vulkanske dejavnosti, ki bi omogočale visokotemperaturne procese za ohranjanje podzemeljskega življenja, neodvisnega od fotosinteze. Vsi glavni viri energije za življenje na Zemlji tako ne pridejo v poštev pri razlagi obstoja zgoraj opisanega habitata. Primarno ga vzdržujejo snovi, ki nastanejo, ko je voda izpostavljena radioaktivnemu sevanju zaradi razpada nestabilnih atomov v okoliških kamninah [1].

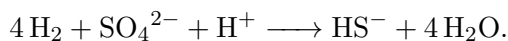
2. Biološke lastnosti mikroorganizmov

2.1 Pod kontinenti

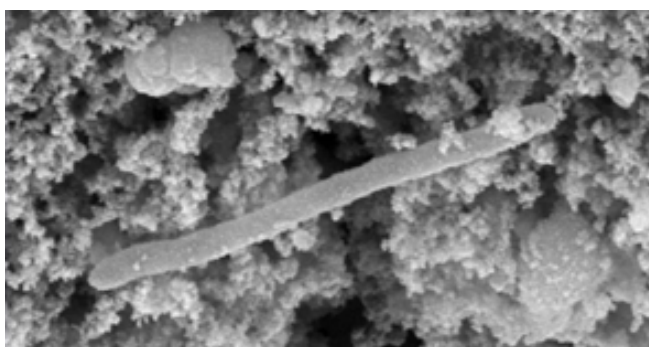
Za odkritje vzroka za preživetje globokega kopenskega okolja je bilo potrebno preučiti raznovrstnost in presnovno aktivnost mikrobov. Vzorci vode so bili vzeti iz neka pod 4 km globoke špranje v 2,7 milijarde let starem metabazaltu (tj. katbonatno bogate, karbonatno-albitne kamnine) [2] in so bili stari od 15 do 25 milijonov let. Špranja se nahaja v najglobljem rudniku zlata na svetu, Mponeng v Južni Afriki. Za boljšo interpretacijo rezultatov analize in možnost primerjave, so bili preiskani tudi vzorci vode, uporabljene za rudarjenje (tj. mešanica vode iz površja in iz razpoke).

Primerki vode iz razpoke so vsebovali enovito združbo mikroorganizmov. Ti so po predvidevanjih v raziskovano območje prodrli med infiltracijo paleometeorne vode (tj. pretokom s talne površine

v tla) med 3 do 25 milijonov let nazaj. Primerek takega mikroorganizma je na sliki 1. V mikrobih je prevladoval na novo odkrit filotip (tj. sekvenčni tip DNK ali skupina sekvenc, ki si je med seboj dovolj podobna [3]), ki se v mikroorganizmih iz vode za rudarjenje ni pojavil. Nosil je genetski zapis o proizvodnji encimov, ki lahko energijo za življenje proizvedejo iz vodika (H_2) in sulfata (SO_4^{2-}). Gre za proces oksidacije vodika in redukcije sulfata. Vodik služi kot donor elektronov, sulfat pa kot akceptor. Sproščena energija pri reakciji ohranja mikrobo pri življenju. Proces se imenuje anaerobno dihanje. Formula za redukcijo sulfata in oksidacijo kisika se glasi:



Analiza je pokazala tudi, da je koncentracija hranilnih snovi za mikrobo znatno nižja v manj globokih predelih skorje. Ugotovitev kaže na to, da je globoka biosfera skorje kljub izoliranosti od površja dovolj energijsko bogata, da je preko posebnih procesov sposobna neomejeno vzdrževati mikrobne skupnosti.



Slika 1. Bakterija iz rudnika Mponeng.

V nadaljevanju so bili analizirani vzorci (slika 2) iz rudnika Kidd Creek [4], ki se nahaja v Kanadi in je najgloblji rudnik cinka in bakra na svetu. V njem se nahajajo vulkanogena najdišča sulfida, nastala zaradi mešanja slane vode z nizkotemperaturnimi (okoli 250°C) hidrotermalnimi sistemi pod morskim dnom. Vzorci vode so bili zbrani iz vrtin dolžine 300–600 metrov na globini 2,4 km pod površjem.

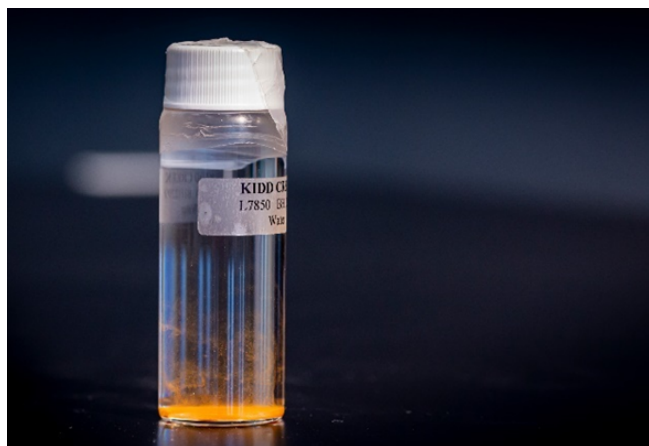
Primerke je bilo potrebno vzeti s sterilizirano opremo in izjemno previdno, da ne bi prišlo do kontaminacije. Za primerjavo je bila analizirana voda, uporabljena za rudarjenje. Pokazala je drugačne rezultate in tako potrdila, da do kontaminacije res ni prišlo. Tudi v vzorcih iz Kanade so prevladovali avtotrofni organizmi, ki za preživetje izkoriščajo vodik in sulfat preko anaerobnega dihanja.

2.2 Pod dnom morja

Tako kot v celinski, so tudi v oceanski litosferi pomemben vir energije za življenje reakcije z vodikom. Pod dnom morja se ga nahaja mnogo več kot ostalih organskih snovi, ki bi bile primerne za vzdrževanje mikroorganizmov. Vodik ponovno služi kot darovalec elektronov, vlogo akceptorja pa ima lahko poleg sulfata tudi na primer oksidirano železo. Nekateri mikrobi pa lahko v energijo za življenje kar neposredno pretvarjajo vodik.

3. Izvor hranilnih snovi

V Zemljini skorji lahko vodik proizvedejo številni dobro raziskani geološki procesi, ki potekajo pri visokih temperaturah in tlakih. Primer so interakcije med vulkanskimi plini, razgradnja nekaterih mineralov v prisotnosti vode in serpentinizacija – kemična sprememba nekaterih vrst kamnin pri



Slika 2. Vzorec starodavne vode iz rudnika Kidd Creek.

reakciji z vodo. Vendar ti procesi najdišč vodik na velikih globinah ne morejo razložiti, saj tam ni potrebnih vrst mineralov, vulkanske aktivnosti ali tokov magme.

Obstoj velike količine H_2 lahko pojasni proces, imenovan radiolitična disociacija vode. To je proces, ki nastane, ko je voda izpostavljena sevanju okoliških nestabilnih atomskih jeder. Radioliza je pomembna tudi pri nastanku sulfata, ki je drugi najpomembnejši del za anaerobno dihanje v celinski litosferi. Nastane, ko produkti radiolize interagirajo z okoliškimi kamninami. Tudi v oceanski litosferi je sulfat radiolitičnega izvora, ni pa edini možen akceptor elektrona. Za lažjo predstavbo je v pomoč shema na sliki 3.

Preden pa razložimo proces radiolize, je pomembno razumeti, kaj radiokativnost je in kakšen vpliv ima na snov.

4. Radioaktivnost

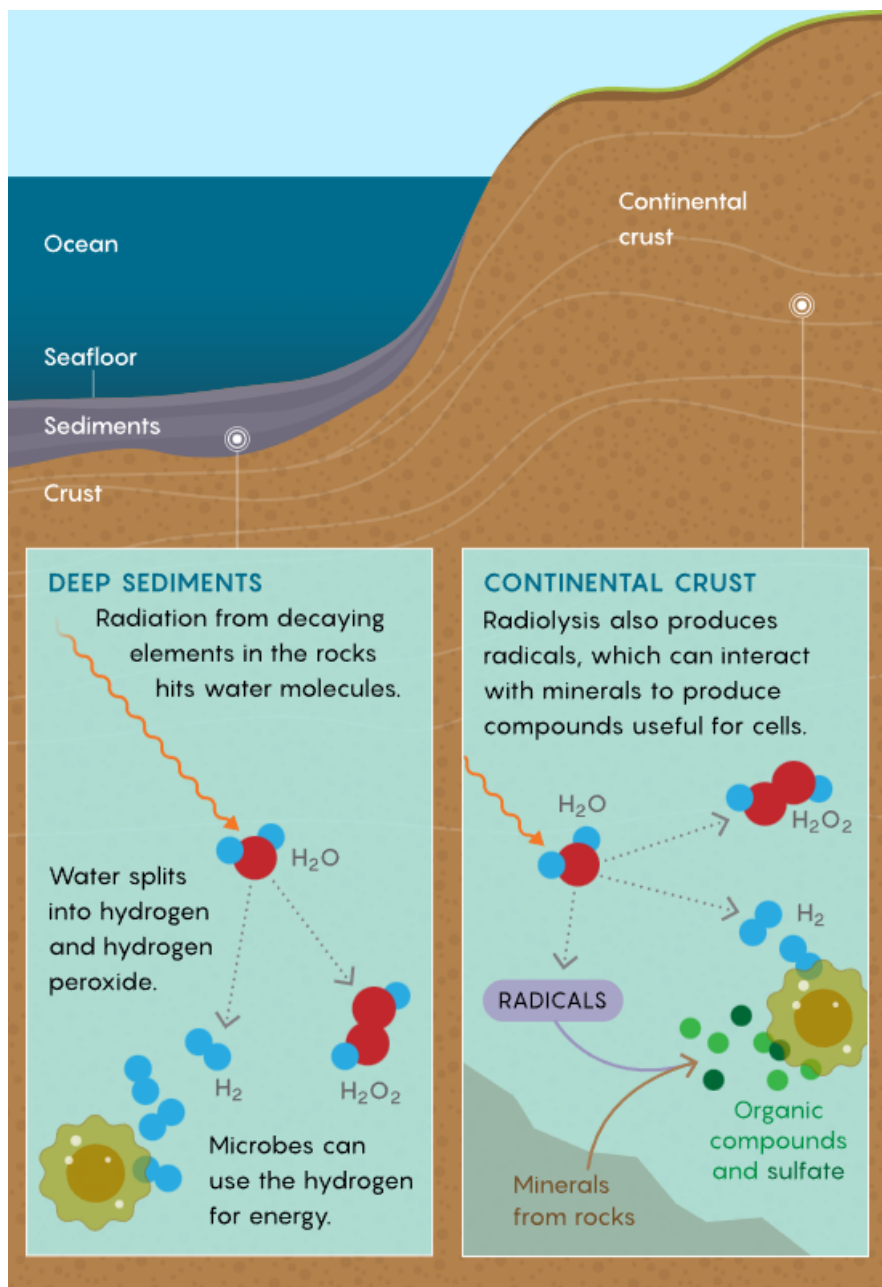
Radioaktivnost pomeni razpad nestabilnih atomskih jeder. Pri razpadu nastane novo jedro, obenem pa se sprošča energija, ki potuje skozi prostor v obliki valovanja (gama) ali delcev (alfa in beta). Povprečno število radioaktivnih razpadov na enoto časa oziroma aktivnost se zmanjšuje eksponentno z radioaktivno konstanto elementa, katere vrednost je odvisna le od njegove narave. Sevanje je prisotno vedno in povsod, bodisi zaradi kozmičnih žarkov, bodisi zaradi naravnih razpadov elementov in drugih delcev, kot so mioni pioni in kaoni.

Če ima radioaktivno sevanje dovolj visoko energijo, da v atomih ali molekulah povzroči ionizacijo oziroma prehod atoma v ion, mu pravimo ionizirajoče sevanje. Prav to se zgodi globoko pod Zemljino površino, kjer ima sevanje, nastalo iz okoliških radioaktivnih snovi, dovolj energije, da ionizira molekule vode.

Učinki ionizirajočega sevanja na snov so odvisni od štirih dejavnikov: vrste sevanja, energije delcev, števila delcev, ki prodrejo v določeno območje na enoto časa in kemične narave materiala, izpostavljenega sevanju. Vsekakor pa pri ionizaciji nastaneta dva nabita dela: molekule oz. atomi z neto pozitivnim nabojem (ioni) in prosti elektron z negativnim nabojem. Imenujemo ga primarni elektron, saj nastane s primarno ionizacijo. Če ima dovolj energije, da pobegne stran od primarnega sevalnega žarka, lahko povzroči nadaljno, sekundarno ionizacijo. Največjo ionizacijsko moč oz. število nastalih ionskih parov na centimeter, proizvedenih ob prehodu sevanja skozi material, imajo delci alfa, sledijo beta delci in nato sevanje gama.

Po ionizaciji lahko sledijo kemične reakcije nastalih ionov, ki spremenijo fizikalno-kemijske in biološke lastnosti snovi. Tako nastane na primer sulfat v habitatu mikroorganizmov. Spremembe molekul se razlikujejo glede na količino absorbirane energije, ne glede na to, od kod energija prihaja.

Glavna fizikalna količina, ki opredeljuje učinek delca ionizirajočega sevanja na snov, je linearni prenos energije (angl. *linear energy transfer* LET) in vpliva na produkte, ki nastanejo ob radiolizi vode. Definiran je preko enakomerne hitrosti izgube energije ionizirajočega delca med prodiranjem v snov $-dE/dx$ v enotah $\text{keV}/\mu\text{m}$ [5]. Delci s primerljivo energijo prodrejo do večje globine, če imajo nižji LET oziroma do manjše globine z višjim LET.



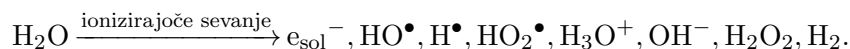
Slika 3. Shema, ki prikazuje prehranjevanje mikrobov.

5. Radioliza vode

Radioliza pomeni disociacijo (tj. razpad na enostavnejše atome, ione ali radikale) molekul z ionizirajočim sevanjem. Proces so prvič opazili na začetku 20. stoletja v laboratoriju Marie Curie.

Izpostavljenost vode ionizirajočemu sevanju povzroči visokoenergijsko radiolizo molekul v solvativiran elektron e_{raz}^- (angl. *solvated electron* e_{aq}^-) ter vodikove H^\bullet in hidroksilne OH^\bullet radikale. S

povečanjem LET se gostota radikalov poveča. Ti prosti radikali lahko nato kemično reagirajo z bližnjimi snovmi tudi po prenehanju prvotnega sevanja in preko rekombinacije (nasprotno od disociacije) proizvedejo vrsto zelo reaktivnih spojin, kot sta superoksid (HO_2) in vodikov peroksid (H_2O_2). Radiolizo vode zapišemo kot:



Tovrstno razgradnjo povzročajo predvsem alfa delci, ki jih zelo tanke plasti vode lahko v celoti absorbirajo.

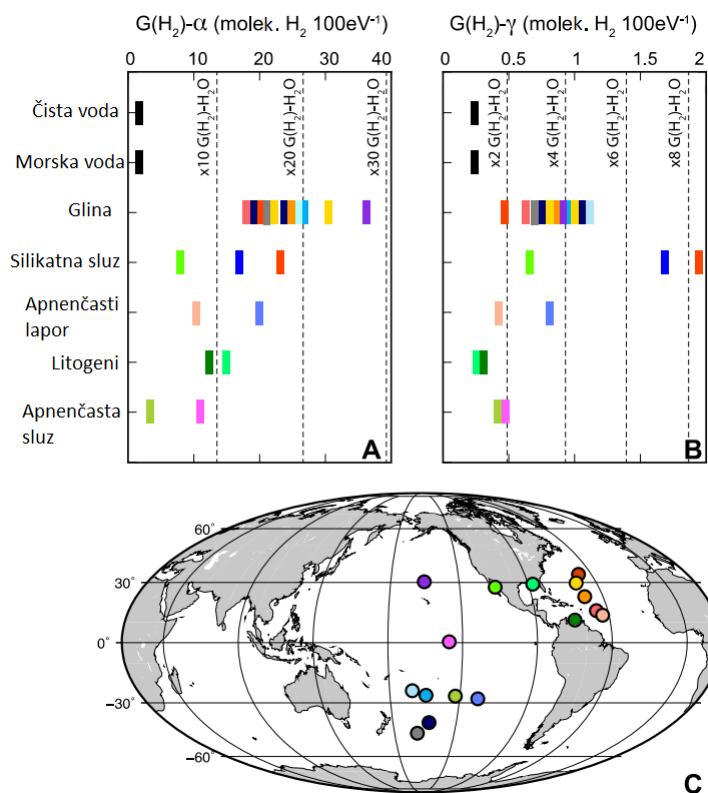
Število nastalih molekul vodika na absorbiranih 100 eV ionizirajočega sevanja imenujemo sevalno kemijski pridelek - $G(\text{H}_2)$. Pomemben je pri določanju učinka različnih primesi v vodi (recimo sedimentov v oceanskih vzorcih), ki je izpostavljena ionizirajočemu sevanju.

6. Vsebnost in hitrost nastajanja vodika ter sulfata

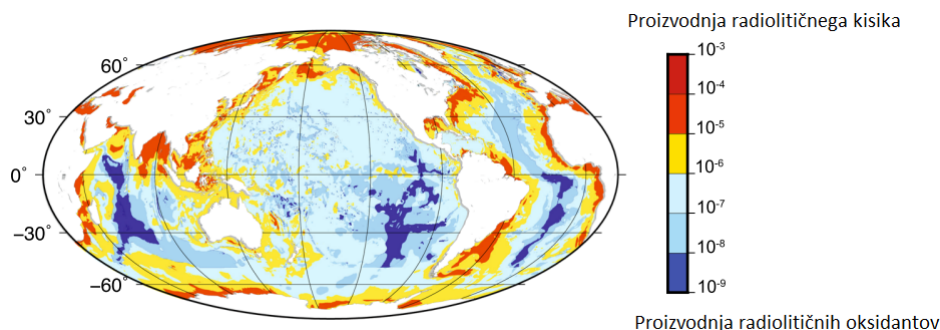
6.1 Vodik v oceanski litosferi

Vzorci mikrobskega okolja se zelo razlikujejo glede na globino in mesto odvzema. Vpliv različnih kamnin in sedimentov na nastajenje radiolitičnega vodika so preučili geomikrobiologi pri Japonski agenciji za znanost in tehnologijo. Študija je trajala skoraj dve desetletji [6]. Lokacije, kjer so zbirali primerke, so prikazane na sliki 4 (C) del. Vzorce so zmešali z vodo, jih izpostavili dovolj močnemu radioaktivnemu sevanju (alfa in gama) in tako eksperimentalno določili hitrost nastajanja vodika. Za primerjavo pa so obsevali še čisto in morsko vodo. Ugotovitve so bile sledeče:

- Nastajanje H_2 raste linearno z absorbirano dozo alfa delcev in gama žarkov za čisto vodo, morsko vodo in morsko vodo z usedlinami.
- Nastajanje radiolitičnega H_2 in radiolitičnih oksidantov je konstantno tekom vseh plasti usedlin in ni maksimalno blizu morskega dna.
- Sevalno kemijski pridelek vodika $G(\text{H}_2)$ oz. število nastalih molekul vodika na absorbiranih 100 eV ionizirajočega sevanja je bilo veliko večje pri obsevanju vode, zmešane z usedlinami, kot pa pri obsevanju čiste vode.
- $G(\text{H}_2)$ se v morski vodi ni razlikoval od količine proizvedenega vodika v čisti vodi.
- Sedimenti so v nekaterih primerih povečali število produktov radiolize celo za faktor 30, kar pomeni, da določene usedline zelo učinkovito pretvarjajo energijo sevanja v kemično energijo, ki jo lahko jedo mikrobi.
- Morski sedimenti imajo katalitični učinek na donos H_2 tako za izpostavljenost alfa delcem kot pri obsevanju z gama žarki. Učinek je veliko večji pri izpostavljenosti alfa delcem.
- Glavni vzrok povečanega donosa v vseh vrstah sedimentov je prenos energije iz delcev sedimenta v vodo preko ekscitonov (vezano stanje elektrona in vrzeli, ki sta vezana zaradi Coulombove sile).
- Zmanjšanje aktivacijske energije za vodo, zmešano s sedimenti, je odvisno od sestave usedlin in vrste sevanja.
- Hitrost globalnega nastanka radiolitičnega H_2 in oksidantov v morskih usedlinah (slika 5) je $2,7 \times 10^{13}$ molov elektronskih ekvivalentov na leto (mol e_{eq}^- /leto). Te stopnje so bistveno višje od ocen radiolitične produkcije vodika v predkambrijski litosferi, kar kaže na to, da je habitat, ki ga vzdržujejo sedimenti globoko pod morskim dnom, še večji od tistega v celinski litosferi.



Slika 4. Povprečenje eksperimentalno določenega donosa vodika za izpostavljenost alfa delcem (A) in gama žarkom (B). Navpične črtkane črte predstavljajo večkratnik proizvodnje v čisti vodi. (C) del prikazuje lokacije, kjer so bili zbrani vzorci iz (A) in (B). Slika vzeta iz [6] in prevedena v slovenščino.



Slika 5. Globalna porazdelitev hitrosti nastajanja radioličnega H_2 in radioličnih oksidantov v morskih usedlinah. Hitrosti so izražene v moljskih elektronskih ekvivalentih/ cm^2 /leto. Slika vzeta iz [6] in prevedena v slovenščino.

6.2 Vodik v celinski litosferi

Za določitev vsebnosti radioličnega H_2 globoko pod površjem [7] so pomembne izmerjene hitrosti prenosa delcev alfa, beta in gama skozi enoto površine ($\text{Nm}^{-2} \text{s}^{-1}$). Delci nastanejo zaradi razpada urana, torija in kalija v okoliških kamninah.

Pri določanju nadaljnih vrednosti je pomembno razmerje med radioličnim vodikom in radiogenim helijem. Pri tem je helij v vlogi inertnega (nereaktivnega) sledilnega plina, ki se v sistemu ne porazgubi. Hitrost nastajanja radiogenega ^4He je mogoče oceniti iz vsebnosti urana in torija v predkambrijskem ščitu površine $1,06 \times 10^8 \text{ km}^2$ (celotna celinska površina meri $1,48 \times 10^8 \text{ km}^2$). Razmerje $\frac{\text{H}_2}{\text{He}}$ je funkcija globine in poroznosti in je skoraj neobčutljivo na mineraloško sestavo.

Če nato vrednost hitrosti nastajanja ^4He pomnožimo z modeliranimi razmerji $\frac{\text{H}_2}{\text{He}}$ in upoštevamo

popravke, dobimo skupno oceno radiolitične proizvodnje H_2 v razpokah predkambrijske skorje, napolnjenih z vodo, v območju od $0,16 \times 10^{11}$ mol/leto do $0,47 \times 10^{11}$ mol/leto. To pomeni, da je v celinski litosferi na leto proizvedenih v območju od 0,3 milijonov ton do 1 milijona ton radiolitičnega vodika (človeška industrija proizvede okoli sto milijonov ton na leto).

Združene ocene nastajanja H_2 iz predkambrijske celinske litosfere z radiolizo in hidracijo mafičnih (kamnine z veliko vsebnostjo magnezija in železa) ter ultramafičnih (kamnine, ki vsebujejo 90–100% mafičnih mineralov) kamnin se gibljejo v območju od $0,36 \times 10^{11}$ do $2,27 \times 10^{11}$ molov na leto. Ocenam je primerljiva količina nastanka H_2 v morski litosferi s hidracijo, ki je reda 10^{11} molov na leto. Ti podatki kažejo na to, da upoštevanje nastanka H_2 iz predkambrijske celinske litosfere lahko podvoji predhodno domnevo o globalni proizvodnji H_2 , ki je sprva temeljila samo na morskih sistemih.

6.3 Sulfat v celinski litosferi

V vzorcih iz rudnika Kidd Creek so bili najdeni žveplov izotopi različnih sestav, ki so nastali iz raztopljenega sulfata (SO_4^{2-}). Za nastanek sulfata imajo zasluge radiolitični radikali, ki reagirajo z okoliškimi kamninami, ki vsebujejo žveplo [8].

Radiolizo vode povzročajo ionizirajoče sevanje radioaktivnih elementov, ki se že od nekdaj nahajajo v tamkajšnjih kamninah. Ti elementi imajo zelo dolg razpolovni čas, vode pa je v razpokah veliko. Tako je zagotovljen dolgoročni vir sulfata (in tudi vodika). Iz tega lahko sklepamo še več; namreč ker so tako sulfidi kot radioaktivni elementi v Zemljini skorji prisotni že od arhejskega obdobja, je zelo verjetno, da se reakcije med radikali in kamninami dogajajo že več milijard let, brez da bi na njih vplival zunanji svet.

7. Nastanek življenja na drugih nebesnih telesih

Radioliza prihaja vedno bolj v ospredje kot ključni element pri naseljivosti nebesnih teles v celi galaksiji, ne samo na Zemlji. Brez sončne svetlobe in visokih temperatur bi teoretično lahko vzdrževala življenje na kateremkoli skalnatem planetu, ki ima v svojem podzemlju vodo.

Analiza vzorcev vode iz kanadskega rudnika Kid Creek je pokazala zelo visoke koncentracije acetata in formata – organskih spojin, ki lahko vzdržujejo življenje bakterij. Te spojine so nastale z reakcijami med radiolitični produkti in okoliškimi kamninami. V članku, objavljenem marca 2021 [9], so opisani rezultati obsevanja vodnih raztopin, ki so vsebovale karbonat, format, acetat ali oksalat. Rezultati so se ujemali s tistimi iz rudniških vzorcev in vzbujajo ugibanja, da je abiotska organska sinteza postavila temelje za nastanek življenja na Zemlji, saj tudi zelo preprosti živi sistemi (na primer sestavljeni samo iz vodika, ogljikovega dioksida in sulfata) vodijo do izjemno zapletenih mikrobnih prehranjevalnih mrež. Dodajanje spojin, kot sta format in acetat iz radiolize, pa biosfero le razširi in naredi bolj raznoliko. Z drugimi besedami - radioliza je prisotna tudi pri ciklu ogljika. Nastajanje in vsebnost ogljika pa sta tesno povezana z nastankom in obstojem življenja na Zemlji.

V delu so opisani še nadaljni sklepi, da bi karbonatna radioliza lahko bila vir karboksilatnih vrst na Marsu. Podobnih študij je še več ([10], [11]) in prav tako podpirajo teorijo o nastanku darovalcev in akceptorjev elektronov, ki bi lahko vzdrževali mikrobnno življenje v podzemlju Marsa, ki je izolirano in zaščiteno pred mrzlim, negostoljubnim in obsevanim površjem. Identificirane so bile regije, kjer bi bila koncentracija mikrobov lahko največja, kar zoži območja, na katera bi bile poslani misije.

8. Zaključek

Globoko pod kontinenti in oceanskim dnem se nahaja ogromen habitat mikroorganizmov. Ti preživijo s pomočjo anaerobnega dihanja in zanj nujno potrebujejo vodik, ki nastane zaradi vpliva radioaktivnega sevanja na vodo. Proces se imenuje radioliza in njen na novo ugotovljeni znanstveni pomen je mnogo večji in obširnejši, kot je sprva veljalo.

Za študije mikrobnega življenja globoko pod Zemeljskim površjem je nujna fizika delcev, saj smo z razumevanjem, kako ionizirajoče sevanje povzroča radiolizo in kaj se v nadaljevanju zgodi z njenimi produkti, korak bližje k razumevanju življenja globoke biosfere tako na Zemlji, kot na drugih planetih in naravnih satelitih.

LITERATURA

- [1] Cepelewicz, J. and Quanta Magazine, (2022), Radioactivity may fuel life deep underground and Inside other worlds, Quanta Magazine. Available at: <https://www.quantamagazine.org/radioactivity-may-fuel-life-deep-underground-and-inside-other-worlds-20210524/>.
- [2] Li-Hung Lin and Pei-Ling Wang and Douglas Rumble and Johanna Lippmann-Pipke and Erik Boice and Lisa M. Pratt and Barbara Sherwood Lollar and Eoin L. Brodie and Terry C. Hazen and Gary L. Andersen and Todd Z. DeSantis and Duane P. Moser and Dave Kershaw and T. C. Onstott, *Long-Term Sustainability of a High-Energy, Low-Diversity Crustal Biome*, Science, **314** (2006), 479-482.
- [3] Moreira, David López-García, Purificación”, *Phylotype*, Encyclopedia of Astrobiology, (2011), 1254–1254.
- [4] Garnet S. Lollar and Oliver Warr and Jon Telling and Magdalena R. Osburn and Barbara Sherwood Lollar, ‘Follow the Water’: *Hydrogeochemical Constraints on Microbial Investigations 2.4km Below Surface at the Kidd Creek Deep Fluid and Deep Life Observatory*, Geomicrobiology Journal, **36**(2019), 859-872.
- [5] Robert J. Woods, Alexei K. Pikaev, *Applied Radiation Chemistry: Radiation Processing*
- [6] Sauvage, J.F., Flinders, A., Spivack, A.J. et al. The contribution of water radiolysis to marine sedimentary life. Nat Commun 12, 1297 (2021).
- [7] Lollar et al. “The contribution of the Precambrian continental lithosphere to global H₂ production”. In: Nature 516 (2014)
- [8] Lollar et al. “The contribution of the Precambrian continental lithosphere to global H₂ production”. In: Nature 516 (2014), pp. 379–382
- [9] Johan Vandenborre et al. “Carboxylate anion generation in aqueous solution from carbonate radiolysis, a potential route for abiotic organic acid synthesis on Earth and beyond”. In: Earth and Planetary Science Letters 564 (2021), p. 116892. issn: 0012-821X.
- [10] Maggie C. Y. Lau et al. “An oligotrophic deep-subsurface community dependent on syntrophy is dominated by sulfur-driven autotrophic denitrifiers”. In: Proceedings of the National Academy of Sciences 113.49 (2016)
- [11] J.D. Tarnas, J.F. Mustard, B. Sherwood Lollar, V. Stamenković, K.M. Cannon, J.-P. Lorand, T.C. Onstott, J.R. Michalski, O. Warr, A.M. Palumbo, and A.-C. Plesa. Earth-like Habitable Environments in the Subsurface of Mars. Astrobiology. Jun 2021.741-756.