

УДК 631.46

ОТНОШЕНИЕ $[^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА МИКРОБИОТЫ В ПОЧВЕ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ СЫРОЙ НЕФТЬЮ

© 2012 г. А. М. Зякун^{*,**}, А. М. Боронин^{*,**}, В. В. Кочетков^{*}, Б. П. Баскунов^{*}, К. С. Лауринавичюс^{*}, В. Н. Захарченко^{*}, В. П. Пешенко^{*}, Т. О. Анохина^{*}, Т. В. Сиунова^{*}

^{*}Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,

Пушино, Московская обл., 142290

^{**}Пушинский государственный университет,

Пушино, Московская обл., 142290

e-mail: zyakun@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 26.08.2011 г.

Исследован углеводородоокисляющий потенциал почвенной микробиоты и интродуцированных в почву углеводородоокисляющих микроорганизмов на основе количественных и изотопных характеристик углерода продуктов, образующихся при микробной деградации нефти. Из сравнения скоростей продукции CO_2 в нативной почве и почве, загрязненной сырой нефтью, обнаружено, что интенсивность микробной минерализации почвенного органического вещества (ПОВ) в присутствии нефти выше по сравнению с незагрязненной почвой, т.е., обнаруживается затравочное влияние (прайминг-эффект) углеводородов нефти. Показано, что количество углерода вновь синтезированных органических продуктов за счет потребленной нефти (биомасса клеток и экзометаболиты) значительно превосходит количество ПОВ, израсходованное на продукцию CO_2 . Обнаружено, что в результате микробиологических процессов в почве, загрязненной нефтью, наблюдается мощный поток углекислоты, поступающей в атмосферу.

Главным фактором, способствующим снижению нефтяных загрязнений в почвах, является потребление и минерализация углеводов почвенными микроорганизмами в качестве субстратов. К настоящему времени изучена роль микроорганизмов в биоремедиации загрязненных углеводородами почв, где ключевыми составляющими этого процесса являются биотрансформация, биодеструкция и биоминерализация антропогенных поллютантов.

В современной биотехнологии в случае углеводородного загрязнения почвы известны три типа биоремедиации: а) естественная убыль поллютанта в результате его потребления нативной почвенной микробиотой; б) биостимуляция микробных процессов в почве путем внесения дополнительных минеральных и органических добавок; в) внесение в загрязненные почвы специфических штаммов микроорганизмов, которые способны активно потреблять углеводородные поллютанты (биоаугментация) [1].

Самый простой метод биоремедиации заключается в использовании биодеградирующей активности природной микробиоты и предсказании возможного снижения загрязнения до безопасного уровня на основе наблюдений, подтверждающих необходимую интенсивность этих природных процессов.

При низких скоростях снижения нефтяных загрязнений в почвах проводят биостимуляцию углеводородоокисляющей почвенной микробиоты, т.е., дополнительно вносят минеральные и органические вещества, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов, обеспечивают оптимальную влажность почвы и аэрацию. При крайне малом количестве углеводородоокисляющих микроорганизмов или их отсутствии в загрязненных почвах проводят биоаугментацию почв, т.е. вносят специфические штаммы микроорганизмов, которые способны использовать в качестве субстрата углеводороды нефти и нефтепродукты.

Все эти факторы могут существенно влиять на физиолого-биохимические свойства почвенных популяций микроорганизмов, в частности на продукцию метаболической углекислоты, количественный и качественный состав почвенного органического вещества (ПОВ), а также на масштабы эмиссии CO_2 из почв в атмосферу. Адекватная оценка углеводородоокисляющего потенциала микробиоты в почве предусматривает использование экспрессных, высоко специфических и высокоточных методов для анализа скоростей снижения углеводородных загрязнений, а также выявление как благоприятных, так и потенциально

опасных для окружающей среды факторов, которые сопровождают процесс биоремедиации.

Цель исследования — разработка технологии экспресс-оценки эффективности микробной деградации углеводов в почве, изучение влияния сырой нефти на микробные процессы, определение метаболического потенциала нативных микроорганизмов и интродуцированных в почву лабораторных штаммов, обладающих повышенной способностью окислять углеводороды нефти, выявление факторов, способствующих эмиссии метаболической углекислоты в атмосферу в результате активации почвенной микробиоты.

МЕТОДИКА

Почва. Использовали образцы пахотной почвы из Краснодарского края после выращивания на них кукурузы (C₄-растение). Образцы почвы просеивали через сито с ячейками около 2 мм, удаляли растительные остатки, затем увлажняли до 60% максимальной влагоемкости. Исходное содержание органического вещества в почве составляло около 4.9% веса сухой почвы (СП), что соответствовало 19.6 г С/кг СП. Образцы почвы в количестве 100 г по сухой массе помещали в 750 мл стеклянные сосуды, которые герметично закрывали пластмассовыми крышками и предварительно перед внесением нефти выдерживали в течение 3 сут при 22°C. Для фиксации метаболической углекислоты, образующейся при микробной минерализации ПОВ и нефти, над поверхностью почвы располагали стеклянные чашки (10 мл), содержащие от 2 до 3 мл раствора 1М NaOH. Количество CO₂, зафиксированное в водном растворе NaOH, после добавления BaCl₂ осаждали в виде BaCO₃. Продукцию CO₂ в ходе экспериментов в каждом из сосудов определяли по количеству 0.1 М HCl водного раствора, расходуемого на титрование остаточной щелочи в чашках. Карбонат бария промывали водой, осаждали, высушивали и взвешивали полученные осадки. Затем их использовали для количественной оценки продукции метаболической CO₂ и изотопного анализа углерода.

Нефть — экзогенный тест-субстрат. В модельных опытах внесенное количество сырой нефти в почву составляло 3.2% от веса СП, что соответствовало 27.43 г С нефти на кг СП. Так как в образце сухой почвы содержание ПОВ было около 19.6 г С/кг СП, то доля внесенного в почву углерода нефти превышала в 1.4 раза количество углерода ПОВ. Полагая, что основная часть сырой нефти при разливе ее на почве будет содержаться в верхнем 10 см слое, находим, что предполагаемая степень загрязненной почвы составит около 32 т сырой нефти из расчета на 1 га площади.

Микроорганизмы. Модельные опыты по определению микробной минерализации внесенной в почву нефти проводили в 12 стеклянных сосудах в 4 вариантах (2 контроля и 2 опыта, по 3 повторности в каждом опыте и контроле). В опыте 1 в сосуды с почвой и содержащейся в ней нативной микробиотой вносили сырую нефть, в опыте 2 — в такую же почву с нефтью дополнительно вносили лабораторный штамм *Pseudomonas aureofaciens* BS1393(pBS216) [2]. В контроле 1 использовали почву без добавления нефти, а в контроле 2 в такую же почву дополнительно вносили бактерии *P. aureofaciens* BS1393(pBS216). Указанный лабораторный штамм с плазмидой pBS216, контролирующей биodeградацию нафталина и салицилата, был способен утилизировать ароматические углеводороды нефти и обладал антагонистическим эффектом по отношению к широкому кругу фитопатогенных грибов. Способность штамма к синтезу антибиотиков феназинового ряда, окрашивающих его колонии в ярко-оранжевый цвет на агаризованной среде LB [3], позволила использовать эту особенность в качестве маркера при количественном учете указанных микроорганизмов в почве в присутствии аборигенной микрофлоры.

Интродуцируемый штамм бактерий предварительно выращивали в жидкой среде LB до стационарной фазы при 28°C в течение 18 ч и затем равномерно вносили в почву до концентрации 10⁶ кл./г почвы. Усредненную (суммарную) почвенную пробу для анализа количества содержащихся в ней бактериальных клеток отбирали в трех независимых точках. Навеску (1 г) усредненной почвенной пробы суспендировали в 10 мл 0.85% NaCl, осаждали почвенные частицы и из 1 мл надосадочной жидкости делали разведения (10×–10000×). Соответствующие разведения по 0.1 мл высевали на чашки Петри с LB средой. Затем проводили подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) на чашках и рассчитывали средние значения в контроле и опытах.

Микробная активность. В контролях и опытах оценку проводили по количеству продукции CO₂, образующейся в результате минерализации ПОВ и внесенной в почву нефти. В контроле 1 определяли микробную минерализацию ПОВ с участием аборигенных микроорганизмов, присутствующих в этом типе почв. В контроле 2 определяли микробную минерализацию ПОВ с участием аборигенных микроорганизмов и интродуцированного штамма BS1393(pBS216), количество которого составляло около 10⁶ кл./г почвы. В опыте 1 определяли микробную минерализацию ПОВ и внесенной в почву нефти (около 3.2% от веса СП) с участием только аборигенных микроорганизмов. В опыте 2 определяли микробную минерализацию ПОВ и внесенной в почву нефти (3.2% от

веса СП) с участием как аборигенных, так и интродуцированных микроорганизмов.

Кинетика субстрат-индуцируемого дыхания (СИД). Микробный метаболизм тест-субстрата (сырая нефть) характеризовался несколькими стадиями по скорости образования CO_2 : адаптация микробиоты к тест-субстрату (лаг-период), экспоненциальный рост скорости эмиссии CO_2 , достижение максимума этой скорости и последующее постепенное ее снижение до постоянного значения.

Удельные скорости эмиссии метаболической CO_2 (μ) в опытах 1 и 2 после внесения сырой нефти в почву определялись из кинетических характеристик субстрат-индуцируемого дыхания ($\text{CO}_2(t)$), получаемых из соответствующего аппроксимирующего уравнения $\text{CO}_2(t)$ (1):

$$\text{CO}_2(t) = K + r_{\text{эксп}}(\mu t), \quad (1)$$

где параметр K представляет начальную скорость эмиссии CO_2 , отражающую катаболические процессы почвенной микробиоты, не сопровождающие рост клеток и не связанные с продукцией АТФ, r отражает начальную скорость образования CO_2 растущей части почвенной микробиоты, которая связана с увеличением количества микробных клеток и, соответственно, с генерацией АТФ, t — время наблюдения [4–6]. Продолжительность лаг-периода роста микробных клеток ($t_{\text{лаг}}$) определяли по интервалу между временем внесением субстрата в почву и моментом, когда увеличение скорости эмиссии CO_2 , обусловленное экспоненциальным ростом микроорганизмов (т.е., количественное значение $r_{\text{эксп}}(\mu t)$ в выражении (1)), превышало скорость углекислотного дыхания, не связанную с продукцией АТФ. Согласно кинетической теории микробного роста [7, 8], лаг-период можно рассчитать, используя параметры кривой (1), представляющей микробную эмиссию CO_2 , с использованием выражения (2):

$$t_{\text{лаг}} = \ln(K/r)/\mu, \quad (2)$$

где $t_{\text{лаг}}$ — лаг-период образования CO_2 микробиотой в почве.

Анализ изотопного состава углерода. Отношения распространенности изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в ПОВ, сырой нефти и метаболической CO_2 (в виде BaCO_3) были измерены с использованием изотопного масс-спектрометра Breath MAT (“Thermo Finnigan”, Германия), соединенного с газовым хроматографом через специальное устройство ConFlow. Для изотопного анализа метаболической CO_2 использовали около 3–4 мг полученного BaCO_3 [М.М.197.34], который затем разлагали до CO_2 с помощью ортофосфорной кислоты в 10 мл контейнере в присутствии воздуха. В

случае анализа изотопного состава углерода ПОВ и сырой нефти образцы сжигали до CO_2 в ампулах при температуре 560°C в присутствии оксида меди (CuO).

Отношения интенсивностей пиков в масс-спектре CO_2 с m/z 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$) и 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$) использовали для количественной характеристики содержания изотопов ^{13}C и ^{12}C в анализируемых образцах. Согласно общепринятому выражению (3), величина $\delta^{13}\text{C}$, определенная в относительных единицах в промилях (‰), характеризовала количество изотопа ^{13}C в анализируемых образцах:

$$\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{обр}}/R_{\text{ст}} - 1) \times 1000\text{‰}, \quad (3)$$

где $R_{\text{обр}} = ([^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}])_{\text{обр}}$ представляет отношения распространенностей изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в образце, а $R_{\text{ст}} = ([^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}])_{\text{ст}}$ — отношения этих изотопов в международном стандарте PDB (Pee Dee Belemnite). Из выражения (3) следует, что в случае положительного или отрицательного значения $\delta^{13}\text{C}$ в анализируемом образце содержится больше или меньше изотопа ^{13}C по сравнению со стандартом, а при $\delta^{13}\text{C} = 0$, анализируемый образец наследует изотопный состав углерода стандарта. Каждый образец CO_2 анализировали в трех повторах, стандартная ошибка была около $\pm 0.2\text{‰}$.

Изотопный баланс. Средневзвешенный изотопный состав углерода метаболической CO_2 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{ср}}$), которую получали на отдельных временных i -интервалах, определяли используя выражение (4):

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{ср}} = (\sum q_i \cdot \delta^{13}\text{C}_i) / \sum q_i \text{‰}, \quad (4)$$

где q_i и $\delta^{13}\text{C}_i$ — скорость микробного образования CO_2 и характеристика ее изотопного состава углерода на i -интервалах соответственно.

В качестве специфических количественных показателей микробного метаболизма в тестируемых почвах были использованы: а) изотопные характеристики углерода суммарной CO_2 , образующейся при микробной минерализации ПОВ и нефти ($\delta^{13}\text{C}_{\text{сум}}$) (опыты 1 и 2), б) характеристика CO_2 , наблюдаемой при минерализации только ПОВ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{ПОВ}}$) (контроль 1 и 2), в) характеристика CO_2 , продуцируемой при минерализации нефти, которая с точностью до изотопного эффекта, сопровождается окислением углеводородов (около $-(1-3)\text{‰}$ [9], наследует изотопный состав нефти ($\delta^{13}\text{C}_{\text{нефть}}$). С учетом сформулированных положений (а, б и в) и используя выражение (5), вычисляли долю CO_2 , которая образовалась при минерализации ПОВ ($F_{\text{ПОВ}}$) и нефти ($F_{\text{нефть}} = 1 - F_{\text{ПОВ}}$) соответственно.

$$F_{\text{ПОВ}} = (\delta^{13}\text{C}_{\text{сум}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{нефть}}) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{ПОВ}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{нефть}}). \quad (5)$$

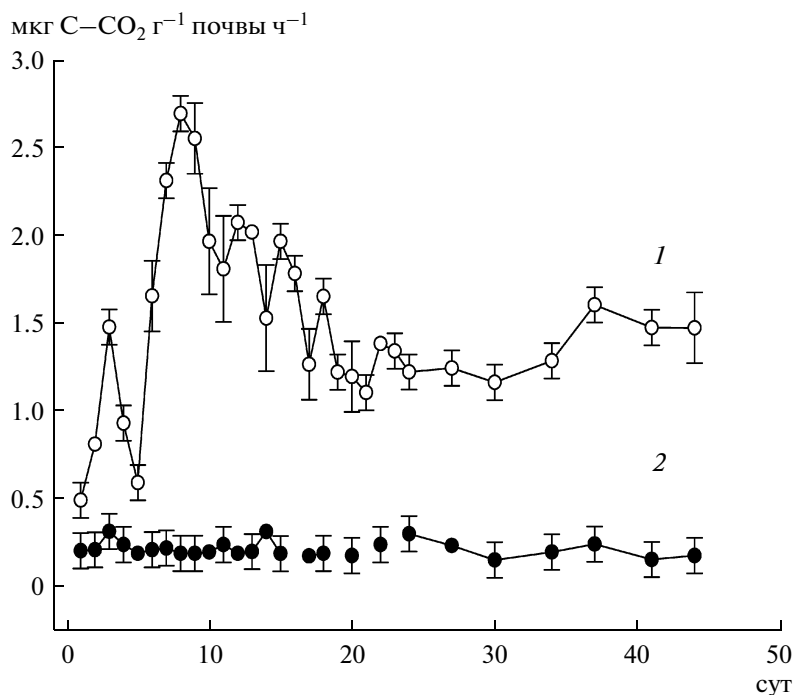


Рис. 1. Скорость эмиссии CO_2 ($\text{мкг С-CO}_2 \text{ г}^{-1} \text{ СП}$) при микробной минерализации органических продуктов в экспериментах, моделирующих микробное потребление углеводов нефти. Образование CO_2 почвенной микробиотой и интродуцированными бактериями *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) после внесения 3.2% сырой нефти в почву (1) и то же без внесения сырой нефти в почву (2).

Затравочный (прайминг) эффект нефти. При внесении экзогенных органических продуктов в почву в ряде случаев наблюдаются активация или ингибирование микробной минерализации ПОВ по сравнению с существующими до этого процессами. В литературе это рассматривают как положительное или отрицательное затравочное влияние этих продуктов на микробную минерализацию ПОВ и представляют как прайминг-эффект (ПЭ) соответствующих продуктов [10, 11]. В нашем случае внесение углеводов нефти в почву также может ускорять или замедлять скорость микробной минерализации нативного органического вещества, т.е. проявлять их ПЭ. Для оценки величины ПЭ количество CO_2 , образующееся в результате минерализации ПОВ в присутствии нефти, сравнивали с количеством CO_2 при минерализации ПОВ в нативной почве. На основе изотопного баланса (выражение 5) рассчитывали долю CO_2 ($F_{\text{ПОВ}}$) в суммарном ее количестве, образующемся при микробной минерализации ПОВ и нефтепродуктов (опыты 1 и 2). Величину ПЭ нефти, как экзогенного субстрата, вычисляли путем сравнения количества CO_2 из ПОВ в опытах с количеством CO_2 в контроле, образовавшихся за соответствующие периоды наблюдения (выражение 6):

$$\text{ПЭ} = 100 \cdot (Q_{\text{сум}} F_{\text{ПОВ}} - Q_{\text{ПОВ}}) / Q_{\text{ПОВ}}, \% \quad (6)$$

где $Q_{\text{сум}}$ — суммарное количество CO_2 при минерализации ПОВ и нефти (опыты 1 и 2), а $Q_{\text{ПОВ}}$ — количество CO_2 при минерализации только ПОВ (контроль).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эмиссия CO_2 из почвы. Активности микробной минерализации ПОВ и нефти в почве представлены суммарными скоростями эмиссии CO_2 из почвы в модельных экспериментах (рис. 1, 1 и рис. 2, 1). В контролях 1 и 2 скорости минерализации ПОВ как почвенными микроорганизмами, так и смесью этих микроорганизмов с интродуцированным штаммом находились в диапазоне $0.2 \pm 0.02 \text{ мкг С-CO}_2 \text{ г}^{-1} \text{ СП ч}^{-1}$ и, практически, не изменялись в течение 47-суточного наблюдения (рис. 1, 2 и рис. 2, 2). В почвах, в которые была внесена нефть (опыты 1 и 2), скорость минерализации суммарного органического вещества (ПОВ + нефть) существенно увеличивалась и на 7–9 сут после начала экспозиции достигала максимальной величины около $3.2 \text{ мкг С-CO}_2 \text{ г}^{-1} \text{ СП ч}^{-1}$ (рис. 1, 1 и рис. 2, 1). Следует отметить, что в случае интродукции в почву бактерий *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) (опыт 2) увеличение скорости эмиссии CO_2 отмечено сразу после начала эксперимента, а в опыте 1 (только аборигенная почвенная микробиота)

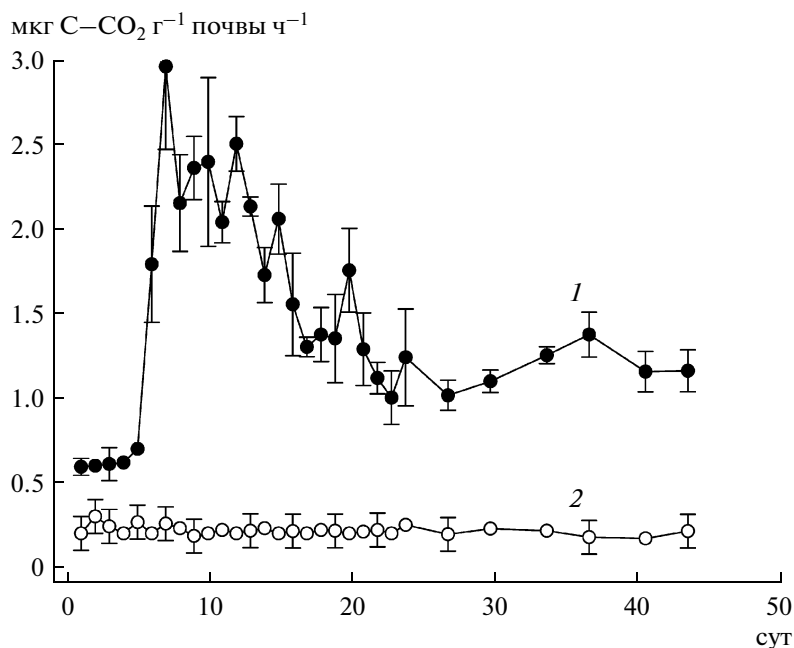


Рис. 2. Скорость эмиссии CO_2 ($\text{мкг С-CO}_2 \text{ г}^{-1} \text{ СП}$) при микробной минерализации органических продуктов в экспериментах, моделирующих микробное потребление углеводов нефти: 1 – образование CO_2 аборигенными почвенными микроорганизмами после внесения 3.2% сырой нефти в почву (опыт 1); 2 – то же без внесения сырой нефти (контроль 1).

продукция CO_2 практически не увеличивалась в течение 6 сут (лаг-период). Это наблюдение согласуется с результатами количественных измерений (число КОЕ), интродуцированных в почву бактерий *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) с нефтью и без нефти в почве. Как видно из рис. 3, сразу после интродукции в почву штамма *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) как в опыте 2 (почва с нефтью), так и в контроле 2 (почва без нефти) наблюда-

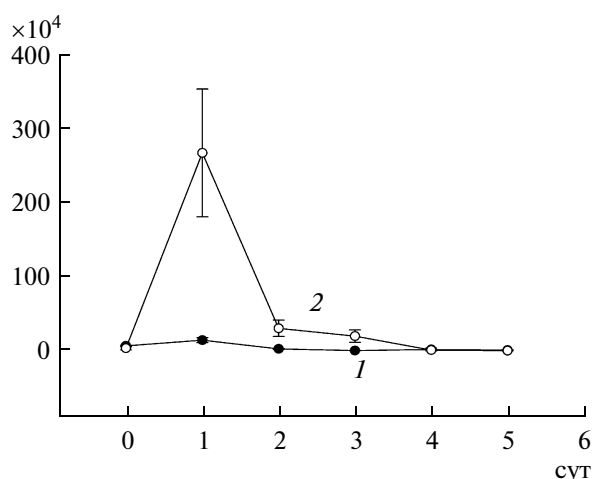


Рис. 3. Количество клеток ($\times 10^4$ КОЕ/г почвы) бактерий *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) в процессе их роста: 1 – в образцах почвы без внесения сырой нефти (контроль 2); 2 – то же +3.2% сырой нефти (опыт 2).

лось снижение количества клеток этого штамма до 10^4 кл./г почвы (стресс-эффект смены среды). Однако через 1 сут после начала эксперимента, число КОЕ интродуцированных бактерий в опыте 2 составило около 2.5×10^6 кл./г, что более чем в 17 раз превышало величину КОЕ этих же бактерий в контрольной почве, не содержащей нефти.

Убедительным подтверждением результатов, демонстрирующих рост бактерий *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) в почве, содержащей углеводороды нефти, является изменение скорости эмиссии CO_2 в опыте 2 по сравнению с контролем (рис. 1). На кривой (рис. 1, 1) отмечены два максимума скорости эмиссии CO_2 : первый максимум наблюдается через 3 сут и второй – через 7 сут после внесения нефти. Предполагалось, что первый максимум обусловлен углеводородокисляющей активностью интродуцированных в почву бактерий *P. aureofaciens* BS1393(pBS216), а второй связан с проявлением углеводородокисляющей активности аборигенной (нативной) почвенной микробиоты. Подтверждением высказанного предположения явились результаты, полученные в опыте 1 (рис. 2), где в почву была внесена сырая нефть, а ее минерализация осуществлялась только нативной почвенной микробиотой. Как следует из рис. 2, 1, максимум скорости эмиссии CO_2 в опыте 1 достигал через 7 сут после внесения нефти в почву и был близким по времени с появлением второго максимума эмиссии CO_2 в предыду-

Таблица 1. Кинетическая характеристика начальной скорости эмиссии микробной CO₂ в почвах, загрязненных сырой нефтью

Условия	<i>K</i> , мкг С–CO ₂ г ⁻¹ СП ч ⁻¹	<i>r</i> , мкг С–CO ₂ г ⁻¹ СП ч ⁻¹	<i>μ</i> , мкг С–CO ₂ г ⁻¹ СП ч ⁻¹	<i>t</i> _{лаг} , сут
Опыт 1	0.61 ± 0.014	(9 ± 4) × 10 ⁻⁶	1.78 ± 0.15	6.2 ± 0.7
Опыт 2	0.49 ± 0.024	(7.4 ± 3.6) × 10 ⁻³	1.69 ± 0.15	2.4 ± 0.6

Примечание: Опыт 1 – нативная почвенная микробиота; опыт 2 – нативная почвенная микробиота + интродуцированные бактерии *P. aureofaciens* BS1393(pBS216).

щем опыте (рис. 1, 1). Таким образом, анализ кинетики эмиссии CO₂ как в опыте 1, так и в опыте 2 показал, что спустя определенный период (около 6 сут) после внесения нефти в почву наблюдалось проявление активности аборигенных углеводородокисляющих микроорганизмов, которые широко распространены в почвенных и водных экосистемах [12–14].

Ранее на примере образцов почв, не загрязненных нефтью, которые различались географическим расположением на территории США, было показано, что внесение сырой нефти в такие почвы способствовало преимущественному росту микроорганизмов, имеющих сходство с *Rhodococcus erythropolis* [15]. В дополнение к этому на основе данных анализа гена 16S рРНК авторами работы [15] не было обнаружено микроорганизмов, относящихся к роду *Pseudomonas*, что рассматривается как свидетельство низкой конкурентной способности потребления углеводов нефти указанными микроорганизмами по сравнению с другими углеводородокисляющими представителями, как например родококками и нокардиями. Следовательно, в нашем случае отмеченное снижение количества клеток *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) в почве (рис. 3) и уменьшение скорости эмиссии CO₂ через 4–5 сут после внесения этих бактерий в почву, содержащую углеводороды нефти (опыт 2, рис. 1), можно рассматривать, как свидетельство низкой конкурентной способности интродуцированного штамма *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) в сравнении с аборигенной углеводородокисляющей микробиотой относительно потребления субстрата (нефть).

Лаг-период микробной минерализации нефти.

После внесения сырой нефти в почву удельные скорости эмиссии метаболической CO₂ (*μ*) в опытах 1 и 2 определяли из анализа начальных кинетических характеристик субстрат-индуцируемого дыхания, получаемых с помощью аппроксимирующего уравнения CO₂(*t*) (1), а лаг-период (*t*_{лаг}) был рассчитан согласно выражению (2).

На начальных стадиях микробной минерализации нефти в опытах 1 и 2 были рассчитаны значения параметра *K* как показателя катаболического микробного метаболизма покоящихся клеток, указывающие на близкие скорости эмиссии

CO₂ в этих опытах (табл. 1). В то же время параметр *r*, свидетельствующий о наличии в почве растущих микроорганизмов, на три порядка был выше в опыте 2 с интродуцированными бактериями по сравнению с опытом 1, в почве которого находились аборигенные микроорганизмы. Параметр *μ*, отражающий удельные скорости эмиссии CO₂, в опытах 1 и 2 имел близкие значения в пределах ошибки измерения. Как и следовало ожидать, лаг-период потребления тест-субстрата и эмиссия CO₂ в опыте 2 с интродуцированными в почву бактериями *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) составлял 2.4 ± 0.6 сут и был значительно меньше по сравнению с опытом 1, где в почве содержалась только нативная микробиота (лаг-период 6.2 ± 0.7 сут). По истечении 6-суточного периода скорость эмиссии метаболической углекислоты в результате деятельности почвенных микроорганизмов в опытах 1 и 2 начала резко возрастать (рис. 1, рис. 2). Таким образом, различие в скоростях эмиссии CO₂ на начальных стадиях экспериментов в этих опытах, очевидно, связано с наличием углеводородокисляющих бактерий *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) и их ускоренным ростом в присутствии углеводов нефти (опыт 2) (рис. 3).

После достижения максимальных скоростей эмиссии CO₂ в опытах 1 и 2 отмечено их постепенное снижение. Однако, начиная с 25 по 47 сут, скорости эмиссии CO₂ в опытах стабилизировались на уровне 1.25 ± 0.25 мкг С–CO₂ г⁻¹ СП ч⁻¹ (рис. 1, рис. 2), в то время как в контрольных экспериментах (контроли 1 и 2) скорости эмиссии CO₂ практически не изменялись и составляли 0.2 ± 0.02 мкг С–CO₂ г⁻¹ СП ч⁻¹. За 47-суточный период наблюдения общее количество CO₂ в контрольных измерениях (контроли 1 и 2) составляло 24.8 ± 0.2 мг С–CO₂ (табл. 2). Отсутствие значимой разницы в количествах CO₂ в контролях 1 и 2 рассматривалось, как свидетельство о незначительной дополнительной минерализации ПОВ за счет внесенной в почву культуры *P. aureofaciens* BS1393(pBS216). Количества метаболической CO₂ в опытах 1 и 2, почвы которых содержали нефть, в 6.8 раза превышали количества CO₂ в контролях 1 и 2 и составляли 167.0 мг С–CO₂ (опыт 1) и 174.0 мг С–CO₂, (опыт 2) соответственно (табл. 2). Как следует из полученных данных,

Таблица 2. Средние скорости эмиссии углекислоты ($\text{мкг С-CO}_2 \text{ г}^{-1} \text{СП ч}^{-1}$) и общее количество С-CO_2 за время 47-суточного эксперимента (мг С-CO_2 на 100 г СП)

Условия	Скорость эмиссии CO_2 , $\text{мкг С-CO}_2 \text{ г}^{-1} \text{СП ч}^{-1}$	Общее количество CO_2 , мг С-CO_2
Контроль 1	0.228 (0.013)*	25.72 (0.6)
Контроль 2	0.213 (0.0126)	24.03 (0.59)
Опыт 1	1.480 (0.122)	166.94 (5.7)
Опыт 2	1.546 (0.100)	174.4 (4.7)

*В скобках приведены стандартные ошибки трех параллельных определений.

дополнительное внесение углеводородокисляющего штамма *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) в почву, содержащую нефть (опыт 2), способствовало увеличению количества метаболической CO_2 лишь в начальной стадии экспозиции и в незначительной степени (на 4%) отразилось на суммарной минерализации углеводородов нефти в сравнении с образованием CO_2 аборигенными почвенными микроорганизмами.

Анализ происхождения CO_2 с использованием $\delta^{13}\text{C}$. Общее количество CO_2 , образующейся в опытах 1 и 2, обусловлено микробной минерализацией как ПОВ, так и углеводородов нефти. Для определения доли CO_2 , образующейся при минерализации каждого из указанных субстратов, были проведены измерения изотопных характеристик ($\delta^{13}\text{C}$) субстратов (ПОВ и нефтепродукты) и образующейся при этом метаболической углекислоты. Известно, что в случае субстрат-индуцируемого дыхания для разделения потоков метаболической CO_2 используют изотопно-меченные по углероду ^{14}C или ^{13}C экзогенные субстраты, которые по этим показателям отличаются от углерода ПОВ. При определении вероятности включения ^{14}C -изотопа в метаболическую CO_2 , несмотря на сравнительную простоту измерений, существуют известные сложности, связанные с рандомизацией субстрата в почве, и обусловленные этим сомнения в достоверности полученных результатов [16, 17]. Более удобным как в техническом решении, так и с точки зрения экологической безопасности оказалось использование субстратов, обогащенных стабильным изотопом ^{13}C . При значимом различии в естественных содержаниях ^{13}C -изотопа в субстрате (например, использование глюкозы как продукта C_4 -растений) и ПОВ (почвы после длительного культивирования C_3 -растений) была продемонстрирована возможность количественного определения скорости образования CO_2 при микробной минерализации этих продуктов в почве [18].

В наших экспериментах изотопный состав углерода ПОВ характеризовался величиной $\delta^{13}\text{C}$, равной $-23.01 \pm 0.2\text{‰}$, что рассматривалось как свидетельство вегетации C_4 -растений на анализи-

руемой почве. Согласно предварительным измерениям, изотопный состав углерода используемой нефти из Краснодарских месторождений характеризовался величиной $\delta^{13}\text{C}$, равной $-28.4 \pm 0.2\text{‰}$, при этом легкая и тяжелая фракции нефти имели $\delta^{13}\text{C}$, равные -28.9‰ и -27.2‰ соответственно. Следует отметить, что характеристика изотопного состава углерода ($\delta^{13}\text{C}$) нефти, используемой в опытах, была близкой к образцам легкой нефти из месторождений Арабского региона, где величина $\delta^{13}\text{C}$ нефти составляла $-27.5 \pm 0.5\text{‰}$, алкановой фракции $-28 \pm 0.5\text{‰}$, а фракции, содержащей преимущественно ароматические углеводороды, соответственно $-26.5 \pm 1.5\text{‰}$ [19].

Принимая во внимание тот факт, что изотопный состав углерода углеводородов нефти существенно отличался от изотопной характеристики углерода ПОВ, появилась возможность использовать эти различия как специфические изотопные маркеры и оценить отдельно скорости микробной минерализации ПОВ и экзогенных углеводородов нефти.

На рис. 4 приведены значения $\delta^{13}\text{C}$ углерода CO_2 , образующейся в опыте 1 (минерализация ПОВ и нефти только почвенной микробиотой) и в опыте 2 (минерализация ПОВ и нефти почвенной микробиотой и бактериями *P. aureofaciens* BS1393(pBS216)). В качестве контроля служила величина $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ – характеристика изотопного состава углерода CO_2 , образующейся при микробной минерализации ПОВ только почвенной микробиотой (контроль 1) и смесью почвенной микробиоты и интродуцированных бактерий *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) (контроль 2). Величины $\delta^{13}\text{C}$ в случае CO_2 , продуцируемой при микробной минерализации ПОВ (контроль 1 и 2), находились в пределах $-23.5 \pm 0.5\text{‰}$ в течение 47-суточного эксперимента и практически наследовали изотопный состав углерода ПОВ (рис. 4). Существенные изменения величины $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ от -23.5 до $-28.5 \pm 0.5\text{‰}$ отмечены в опытах 1 и 2 в течение 7–9 сут после внесения нефти в почву. Принимая во внимание тот факт, что изотопные характеристики углерода алифатической фракции нефти характеризовались величиной $\delta^{13}\text{C} = -28.9\text{‰}$, то

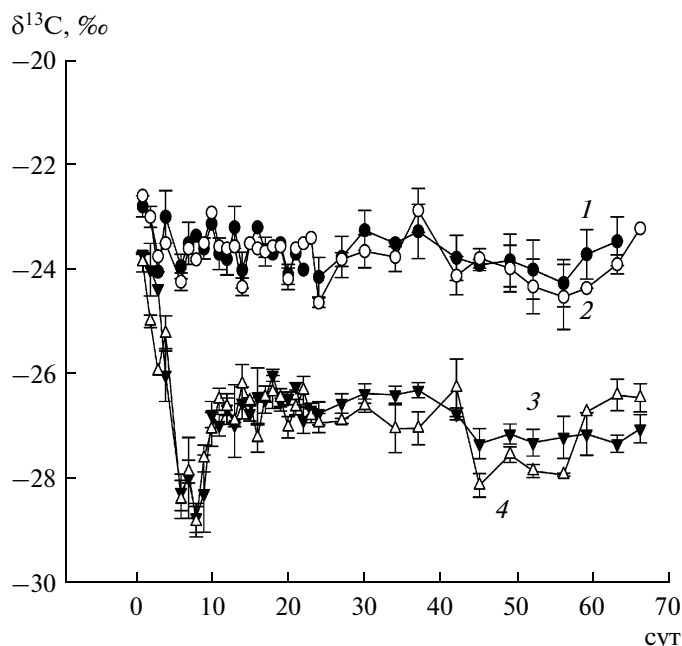


Рис. 4. Изотопная характеристика углерода ($\delta^{13}\text{C}$ (‰)) CO_2 , образующегося в модельных экспериментах при микробной минерализации ПОВ и углеводов нефти, внесенных в почву: 1 – почвенная микрофлора без нефти (контроль 1); 2 – то же + бактерии *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) (контроль 2); 3 – почвенная микрофлора + 3.2% сырой нефти (опыт 1); 4 – то же + бактерии *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) (опыт 2).

регистрируемые значения $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$ в опытах 1 и 2 на начальной стадии минерализации нефти, достигающие -29‰ , рассматривались, как свидетельство преимущественной микробной минерализации алифатических углеводов. В последующий период после 10 и 47 сут наблюдения изотопные характеристики метаболической CO_2 стабилизировались на уровне $\delta^{13}\text{C} = -26.8 \pm 0.5\text{‰}$ и находились между изотопными характеристиками углерода ПОВ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{ПОВ}} = -23.01 \pm 0.2\text{‰}$) и нефти ($\delta^{13}\text{C}_{\text{нефть}} = -28.4 \pm 0.2\text{‰}$). Наблюдаемое значение $\delta^{13}\text{C} = -26.8\text{‰}$ в случае метаболической CO_2 может быть обусловлено как в результате окисления более тяжелых по сравне-

нию с н-алканами углеводородных фракций, так и с увеличением окисления доли ПОВ. Независимо от этого, различие в величинах $\delta^{13}\text{C}$, характеризующих изотопный состав углерода CO_2 в опытах и контроле в период от 10 до 47 сут, свидетельствует о продолжающейся микробной деградации углеводородов нефти и ПОВ в течение указанного периода.

Величину $\delta^{13}\text{C}$, характеризующую изотопный состав углерода CO_2 , которая образовалась в опытах в течение всего 47-суточного эксперимента, находили как средневзвешенное значение $\delta^{13}\text{C}$ согласно выражению (4). Полученное значение $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ для обоих опытов составляло около $-26.6 \pm 0.1\text{‰}$.

При определении доли углерода CO_2 , образующейся в результате минерализации ПОВ и углеводов нефти на основе изотопного баланса (выражение 4), исходили из следующих допущений: а) изотопные характеристики углерода CO_2 , образующейся при минерализации ПОВ, являются одинаковыми как в нативной почве, так и в почве, содержащей углеводороды нефти; б) средневзвешенные изотопные характеристики углерода CO_2 , образующейся при минерализации углеводов нефти, наследуют характеристики нефти с точностью до изотопного эффекта (не более 1–3‰).

С использованием выражения (5) была определена часть углерода ПОВ ($F_{\text{ПОВ}}$), которая минерализована микроорганизмами в опытах 1 и 2 за время 47-суточных экспериментов (табл. 3). Из суммарного количества метаболической углекислоты в опытах 1 и 2 обнаружено, что около 38% всей CO_2 образовалось в результате микробной минерализации ПОВ, а около 62% обусловлено минерализацией углеводов внесенной нефти.

Затравочный (прайминг) эффект углеводов нефти. Проблема затравочного влияния (ПЭ) легко метаболизируемых органических субстратов (свежие продукты растительного фотосинтеза, углеводы, аминокислоты, органические кислоты и др.) на минерализации ПОВ с участием почвенных микроорганизмов является предметом дис-

Таблица 3. Средневзвешенный изотопный состав углерода и доля CO_2 , которая образовалась за счет минерализации ПОВ и затравочные эффекты в опытах 1 и 2 в течение 47-суточного эксперимента

Условия	* $\delta^{13}\text{C}_{\text{ср}}$, ‰	** $F_{\text{ПОВ}}$, %	$[\text{CO}_2](\text{ПОВ})$, мг С- CO_2	ПЭ, %
Контроль 1	-23.70 (0.1)	100	25.72 (0.6)	0
Контроль 2	-23.77 (0.1)	100	24.03 (0.59)	0
Опыт 1	-26.59 (0.2)	38.5 (1.7)	64.3 (3)	150 (13)
Опыт 2	-26.63 (0.2)	38.2 (1.6)	66.6 (3)	177 (15)

* $\delta^{13}\text{C}_{\text{ср}}$ – средневзвешенный изотопный состав углерода CO_2 .

** F – доля метаболической CO_2 , образующейся при микробной минерализации ПОВ, рассчитанная согласно (5).

Таблица 4. Балансовые расчеты минерализации ПОВ и сырой нефти микроорганизмами в почве за время 47-суточного эксперимента (мг С–СО₂ на 100 г СП)

Условия	Исходное С _{орг} , мг		Количество С–СО ₂ , мг		Минерализация нефти, %
	ПОВ	нефть	ПОВ	нефть	
Контроль 1	1960	0	25.72 (0.6)*	0	–
Контроль 2	1960	0	24.03 (0.6)	0	–
Опыт 1	1960	2743 (5)	64.3 (3)	103 (9)	3.8
Опыт 2	1960	2743 (5)	66.6 (3)	108 (8)	3.9

* В скобках приведены отклонения 3 параллельных определений.

куссий в ряде научных публикаций [11, 19–21]. Однако влияние экзогенных нефтепродуктов на степень минерализации ПОВ почвенными микроорганизмами, как затравочный (прайминг) эффект нефти, до настоящего времени не рассматривалось.

Для количественной оценки величины и направленности затравочного влияния углеводов нефти на минерализацию ПОВ, как экзогенного субстрата (ПЭ нефти), нами было проведено сравнение скоростей эмиссии СО₂ при микробной минерализации ПОВ до и после внесения в почву этого субстрата. С учетом суммарных количественных и изотопных характеристик СО₂ в опытах 1 и 2, было рассчитано количество углекислоты, образовавшейся в результате минерализации ПОВ в присутствии углеводов нефти (табл. 3). Как следует из табл. 3, количество СО₂, образовавшееся за счет потребления ПОВ, активируемое одновременной утилизацией нефтепродуктов, возросло в 1.5 раза по сравнению с процессами, наблюдаемыми в контрольных экспериментах. Таким образом, средняя величина дополнительной минерализации ПОВ (затравочный эффект), которая обусловлена микробным потреблением углеводов нефти в течение 47-суточной экспозиции, достигла более 150% от нативной скорости минерализации ПОВ.

Микробное потребление нефти и трансформация ПОВ. Как следует из табл. 4, в опытах 1 и 2 в течение 47-суточной экспозиции около 4% нефти, внесенной в почву, было минерализовано до СО₂. Ранее [9] было показано, что при росте микробных клеток на углеводородах количества биомассы и СО₂ по углероду относились как 1 : 1. С учетом этого полагаем, что за 47 сут экспозиции количество углеводов нефти, потребленных на биомассу клеток и образование органических экзометаболитов в почве, будет близким к количеству метаболической СО₂ и составит не менее 4% от внесенной нефти. В сумме микробное потребление нефти за указанный период на образование СО₂, биомассы клеток и экзометаболитов оценивается величиной, не менее 8% от внесен-

ной в почву нефти. Экстраполируя полученные данные на 7-месячный сезон, когда температурные условия в Краснодарском крае обеспечивают жизнедеятельность почвенной микробиоты, потребление углеводов сырой нефти нативной почвенной микробиотой может достигать 36% от общего количества нефти в почве. Это означает, что в течение двух сезонов с положительными температурами углеводородокисляющий потенциал почвенной микробиоты может обеспечить снижение содержания сырой нефти в почве на 70% от ее количества, попавшего в почву. В нашем случае нефтяное загрязнение, составляющее около 32 т нефти на 1 га площади (или 3.2% от веса СП), снизится до уровня 9.6 т нефти на 1 га площади (или 0.96% от веса СП).

При положительной величине ПЭ нефти в почве происходит более интенсивная микробная деградация ПОВ по сравнению с процессами в нативной почве. С другой стороны, углеводороды нефти, потребленные микроорганизмами, расходуются как на образование СО₂, так и на синтез биомассы и органических экзометаболитов, которые затем включаются в ПОВ и трансформируют их структуру. Вновь синтезированные метаболиты и компоненты микробной биомассы могут быть использованы другими биологическими системами, не способными непосредственно утилизировать углеводороды нефти (растения, макро- и микроорганизмы). На основе количественных и изотопных данных, полученных в опытах, была проведена оценка степени замещения части ПОВ, минерализованного до СО₂, на вновь синтезированные продукты при микробном потреблении углеводов нефти.

В табл. 5 приведены скорости микробной деградации ПОВ, т.е., убыль С_{орг}(ПОВ) и продукции биомассы клеток и органических экзометаболитов в модельных опытах при микробном потреблении нефти в качестве субстрата, т.е., увеличение С_{орг} за счет трансформации нефти. Как в случае потребления нефти нативной почвенной микробиотой (опыт 1), так и смесью почвенной микробиоты и интродуцированных бак-

Таблица 5. Суммарная скорость образования метаболической CO₂ в почве, загрязненной нефтью, скорости убыли C_{орг} при микробной минерализации ПОВ и увеличения C_{орг} в почве за счет микробной минерализации углеводородов нефти

Условия	Суммарная скорость образования CO ₂ , мкг С г ⁻¹ СП ч ⁻¹	Скорость убыли C _{орг} (ПОВ)*, мкг С г ⁻¹ СП ч ⁻¹	Скорость увеличения C _{орг} (нефть)**, мкг С г ⁻¹ СП ч ⁻¹	γ***
Опыт 1	1.480 (0.122)	0.574 (0.046)	0.910 (0.076)	1.59 (0.13)
Опыт 2	1.546 (0.100)	0.591 (0.038)	0.955 (0.062)	1.62 (0.10)

* Убыль C_{орг} (ПОВ) приравнена количеству CO₂, образовавшемуся при микробной минерализации ПОВ, и составляла 38% от суммарного количества CO₂;

** Скорость увеличения C_{орг} (нефть) равнялась скорости эмиссии CO₂ при микробной минерализации нефти;

*** γ – скорость увеличения C_{орг} (нефть)/скорость убыли C_{орг} (ПОВ).

терий *P. aureofaciens* BS1393(pBS216) (опыт 2) количество углерода вновь синтезированных органических продуктов за счет потребленной нефти (биомасса клеток и экзометаболиты) почти в 1.6 раза превосходит количество углерода ПОВ, израсходованное на образование CO₂. Это означает, что микробная трансформация углеводородов нефти в продукты, доступные в качестве субстратов для других живых систем, может быть своеобразным источником органических удобрений. Кстати, при биоремедиации почв, загрязненных нефтепродуктами, отмечено стимулирование роста растений.

На основе количественных и изотопных характеристик продуктов, образующихся при микробной деградации углеводородов сырой нефти в почве, предложена модель оценки углеводородокисляющего метаболического потенциала почвенной микробиоты и интродуцированных в почву углеводородокисляющих микроорганизмов. На примере пахотных почв Краснодарского края показана возможность обнаружения почвенной микробиоты, которая при попадании в почву углеводородов нефти может переходить в активное состояние, используя их в качестве субстрата. Скорость эмиссии метаболической CO₂ является основным показателем активности почвенной микробиоты. На основе изотопных характеристик углерода нефтепродуктов и почвенного органического вещества (ПОВ) установлено, что источниками углерода метаболической CO₂ являются углеводороды нефти и ПОВ. Из сравнения скоростей микробного образования CO₂ в нативной почве и почве, загрязненной нефтью, обнаружено, что интенсивность минерализации ПОВ в присутствии нефти выше по сравнению с незагрязненной почвой, т.е., обнаруживается затравочный (прайминг) эффект углеводородов нефти. Показано, что количество углерода вновь синтезированных органических продуктов за счет потребленной нефти (биомасса клеток и экземе-

таболиты) значительно превосходит количество углерода ПОВ, израсходованное на образование CO₂. В проведенных опытах показано, что микробная деградация углеводородов нефти в почве до продуктов, доступных в качестве субстратов для других живых организмов, является своеобразным источником органических удобрений, которые могут стимулировать рост растений. Часть недеградируемых углеводородов нефти включается в пул биологически устойчивых органических почвенных продуктов. Наряду с этим обнаружено, что результатом микробиологических процессов в почве, загрязненной нефтью, является мощный поток углекислоты, поступающей в атмосферу.

Работа поддержана Программой “Развитие научного потенциала высшей школы” (№ 2.1.1/11932), Госконтрактом № 02.740.11.0682 и Китайско-Российским соглашением № 2008DFR90550.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaplan C.W., Kitts C.I. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 3. P. 1777–1786.
2. Кочетков В.В., Балакшина В.В., Мордухова Е.А., Боронин А.М. // Микробиология. 1997. Т. 66. № 2. С. 211–216.
3. Сиунова Т.В., Кочетков В.В., Валидов Ш.З., Сузина Н.Е., Боронин А.М. // Микробиология. 2002. Т. 71. № 6. С. 778–785.
4. Panikov N.S., Sizova M.V. // J. Microbiol. Methods. 1996. V. 24. № 3. P. 219–230.
5. Stenström J., Stedberg B., Johanson M. // Ambio. 1998. V. 27. № 1. P. 35–39.
6. Blagodatsky S.A., Heinemeier O., Richter J. // Biol. Fert. Soils. 2000. V. 32. № 1. P. 73–81.
7. Panikov N.S. Microbial Growth Kinetics. L. Glasgow: Chapman and Hall, 1995. 378 pp.
8. Blagodatskaya E.V., Blagodatsky S.A., Anderson T.-H., Kuzuyakov Y. // Eur. J. Soil Sci. 2009. V. 60. № 2. P. 186–197.
9. Зякун А.М., Кошелева И.А., Захарченко В.Н., Кудрявцева А.И., Пешенко В.П., Филонов А.Е., Боронин А.М. // Микробиология. 2003. Т. 72. № 3. С. 592–596.

10. *Shen J., Bartha R.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. № 4. P. 1428–1430.
11. *Kuzyakov Y., Friedel J.K., Stahr K.* // *Soil Biol. Biochem.* 2000. V. 32. № 11–12. P. 1485–1498.
12. *Belhaj A., Desnoues N., Elmerich C.* // *Res. Microbiol.* 2002. V. 153. № 6. P. 339–344.
13. *Bhattacharya D., Sarma P.M., Krishnan S., Mishra S., Lal B.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. № 3. P. 1435–1441.
14. *Röling W.M.M., Milner M.G., Jones D.M., Lee K., Duniel F., Swanneli R.J.P., Head I.M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. № 5. P. 2603–2613.
15. *Hamamura N., Olson S.H., Ward D.M., Inskip W.P.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 9. P. 6316–6324.
16. *Dalenberg J.W., Jager G.* // *Soil Biol. Biochem.* 1989. V. 21. № 3. P. 443–448.
17. *Harabi N.E.-D., Bartha R.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. V. 59. № 4. P. 1201–1205.
18. *Зякун А.М., Дилли О.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. V. 41. № 5. P. 512–520.
19. *Mazeas L., Budzinski H., Raymond N.* // *Org. Geochem.* 2002. V. 33. № 11. P. 1259–1272.
20. *Hamer U., Marschner B.* // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2002. V. 165. № 3. P. 261–268.
21. *Fontaine S., Bardoux G., Mariotti A.* // *Ecol. Lett.* 2004. V. 7. № 4. P. 314–320.

Ratio [¹³C]/[¹²C] as an Index for Express Estimation of Hydrocarbon-Oxidizing Potential of Microbiota in Soil Polluted with Crude Oil

A. M. Zyakun^{a, b}, A. M. Boronin^{a, b}, V. V. Kochetkov^a, B. P. Baskunov^a, K. S. Laurinavichus^a, V. N. Zakharchenko^a, V. P. Peshenko^a, T. O. Anokhina^a, and T. V. Siunova^a

^a *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

^b *Pushchino State University, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

e-mail: zyakun@ibpm.pushchino.ru

Received August 26, 2011

Abstract—The hydrocarbon-oxidizing potential of soil microbiota and hydrocarbon-oxidizing microorganisms introduced into soil was studied based on the quantitative and isotopic characteristics of carbon in products formed in microbial degradation of oil hydrocarbons. Comparison of CO₂ production rates in native soil and that polluted with crude oil showed the intensity of microbial mineralization of soil organic matter (SOM) in the presence of oil hydrocarbons to be higher as compared with non-polluted soil, that is, revealed a priming effect of oil. The amount of carbon of newly synthesized organic products (cell biomass and exometabolites) due to consumed petroleum was shown to significantly exceed that of SOM consumed for production of CO₂. The result of microbial processes in oil-polluted soil was found to be a potent release of carbon dioxide to the atmosphere.