

УТВЕРЖДАЮ:

Директор Центра по проблемам экологии
и продуктивности лесов РАН,
доктор биологических наук, профессор
член-корреспондент РАН



Лукина Наталья Васильевна
«05» июня 2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию
КОНДАКОВОЙ ОКСАНЫ ЭРИКОВНЫ

**«Использование микроорганизмов для выращивания хвойных и
улучшения биогенности почв в лесных питомниках Сибири»,
представленную на соискание степени кандидата биологических наук
в диссертационный совет Д 212.267.10
по специальности 03.02.08 – Экология (биология)**

Актуальность исследования. Обеспечение рационального, непрерывного и неистощительного лесопользования является стратегической государственной задачей, достижение которой невозможно без выращивания качественного лесопосадочного материала. Для этого необходимо решить вопрос восстановления продуктивности почв лесных питомников. Применение минеральных удобрений, пестицидов, обработка машинами и механизмами влияет не только на физико-химические свойства почв, но и на количественный и качественный состав почвенного микробиома. В результате агротехнической деятельности уменьшается активность почвенных ферментов, участвующих в трансформации углерода и азота, происходит накопление фототоксичных форм бактерий и грибов, ослабевает конкуренция и антагонистическая активность сапротрофной микрофлоры в отношении фитопатогенов. Поэтому разрабатываемые технологии должны одновременно обеспечивать восстановление плодородия почвы и ее оптимального фитосанитарного состояния. В этой связи особенно актуально использование методов биоаугментации, которые в настоящее время не прошли широкой экспериментальной проверки.

Данная работа нацелена на оценку состояния и структуры прокариотного микробиома темно-серой почвы в период ее эксплуатации; изучение влияния аборигенных микроорганизмов-антагонистов на биогенность (продуктивность) почвы и сохранность семян хвойных в лесопитомнике Красноярского края.

Для достижения поставленной цели решались **следующие задачи:**

1. Сравнить состояние микробиома темно-серой почвы опытного питомника до и после экспериментов с выращиванием монокультур хвойных без применения пестицидов. Определить качественное соотношение основных доминантных и минорных типов и классов прокариот;
2. Изучить биологическую активность аборигенных штаммов микроорганизмов по отношению к фитопатогенам в лабораторных условиях;
3. Исследовать и сравнить влияние предпосевной обработки семян хвойных микробами-антагонистами, микроэлементами и фитопрепаратами на рост, развитие и сохранность семян в лабораторных и полевых условиях;
4. Исследовать влияние, внесенных в почву лесного питомника, микробов-антагонистов, микроэлементов и фитопрепаратов на общую микробную численность (ОМЧ), соотношение эколого-трофических групп микроорганизмов (ЭКТГМ), ферментативную активность и экофизиологические показатели (МБ, БД, $q\text{CO}_2$) под посевами хвойных на протяжении периода наблюдений;
5. Оценить эффективность различных вариантов мульчирования почвы (вермикулит и опилки) и добавочного субстрата (микокомпоста) в защите и сохранности семян хвойных, на состояние почвенного микробоценоза;
6. Дать практические рекомендации по предпосевной обработке семян хвойных биопрепаратами микробов-антагонистов для лесных питомников.

Основное содержание работы

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения, списка сокращений, списка использованной литературы и приложения. Работа изложена на 257 страницах машинописного текста, содержит 38 таблиц, 61 рисунок. Список использованной литературы включает 280 источников, в том числе 86 на иностранных языках.

В первой главе диссертации проведен анализ причин гибели лесопосадочного материала в лесных питомниках Сибири, в том числе истощение и загрязнение почв, использование пестицидов, минеральных и химических препаратов, грибные и бактериальные заболевания. Рассмотрены подходы к восстановлению экофизиологического статуса почв лесных питомников. Особое внимание уделено методам биоремедиации и использованию микробиологических методов в защите растений. Дан анализ механизмов действия наиболее изученного и перспективного гриба-антагониста р. *Trichoderma*. Отдельный раздел посвящен анализу понятия «биологическая активность почв» и определяющих её показателей с привлечением работ российских и зарубежных авторов.

Вторая глава посвящена описанию объектов и методов исследования. Объектами исследования являлись (1) эколого-трофические, физиологические и таксономические микробные группы, функционирующие в темно-серой лесной почве искусственно созданной (нарушенной) лесной экосистемы и прилегающего к ней леса; (2) воздействие биологически активных штаммов микроорганизмов на семена и сеянцы сосны

обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), лиственницы сибирской (*Larix sibirica* L.) в лабораторных и полевых условиях.

Дано детальное описание традиционных методов исследования микроорганизмов: метод посева почвенной суспензии на плотных питательных средах для определения эколого-трофических групп микробных сообществ; NGS – метагеномный секвенс и ПЦР метод с последующим секвенированием фрагментов для определения качественного состава почвенных бактерий и грибов соответственно. Дано также описание методов определения ферментативной активности штаммов грибов–антагонистов и дыхательной активности почвенных микроорганизмов методом СИД.

Специальный раздел посвящен методу определения ферментативной активности почв. Проведено определение шести почвенных ферментов (полифенолоксидазы, пероксидазы, фосфатазы, протеазы, уреазы и инвертазы) и подсчитан коэффициент гумификации, позволяющий оценивать интенсивность процесса минерализации гумуса.

Программа исследований включала проведение лабораторных и полевых экспериментов. В лабораторных условиях проведено исследование влияния микроорганизмов-антагонистов (*Trichoderma harzianum*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.) на прорастание семян сосны обыкновенной, обусловленного действием фитопатогена (р. *Fusarium*). В полевых условиях проведена оценка влияния штаммов-антагонистов на рост и развитие семян хвойных и на функционирование почвенного микробиома. Охарактеризованы почвенно-климатические условия опытно-экспериментального хозяйства Погорельский бор ИЛ СО РАН, где проводились полевые эксперименты.

Применяются современные методы математической статистики

Третья глава посвящена оценке влияния систематических агротехнических нагрузок на почву лесного питомника. Показано повышение средней температуры почвы с 17.5 до 19.2°C, понижение влажности с 14 до 11.9%, подкисление почвы. К концу эксперимента снизилось содержание $N_{вал}$ и $C_{орг}$ на 15 и 32%, соответственно, что свидетельствовало о постепенном израсходовании органического вещества почвы. Возделывание почвы отразилось и на состоянии почвенного микробиоценоза. На контрольных участках ОМЧ уменьшилось, при этом снизилась доля гидролитико-копиотрофных (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, высшие *Actinobacteria*) и увеличилась доля олиготрофных (низшие *Actinobacteria*, *Verrucomycrobia*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*) и ксерофитных (*Gemmatimonadetes*) типов бактериального сообщества, что является индикатором антропогенно-нарушенных почв и указывает на снижение ее продуктивности. МБ постепенно уменьшилась в 2 раза; qCO_2 увеличился в 1.5 раза. При внесении в почву микробов-антагонистов с семенами хвойных растений изменения исследуемых показателей были незначительны или позитивными (увеличение МБ, снижении qCO_2).

Сделан вывод, что периодическое возделывание почв питомника приводит к ее деградации, тогда как внесение в почву микробов-антагонистов обладает положительным эффектом на поддержание ее физико-химических и микробиологических свойств.

В четвертой главе представлены результаты оценки биологической активности и фитопатогенных свойств у музейных культур микроорганизмов (*T. longibrachiatum*, *T. lignorum*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme var annullatum*, *F. oxysporum* ВЗ и *B. amyloliquefaciens*) в лабораторных условиях. Результаты показали, что микромицеты р. *Trichoderma* воздействуют на фитопатоген р. *Fusarium* двумя путями: сдерживание роста патогена (антагонизм) и использование патогена в качестве субстрата (гиперпаразитизм), а бактерии *B. amyloliquefaciens* только через сдерживание роста патогена – антагонизм. Дана оценка способности микроорганизмов выделять литические ферменты – хитиназу, липазу, протеиназу. Показано, что *T. lignorum* обладает средней липазной и хитиназной активностью, но высокой протеиназной активностью; *T. harzianum* – высокой липазной, хитиназной и протеиназной активностью; *T. longibrachiatum* – высокой хитиназной, но слабой протеиназной активностью; *B. amyloliquefaciens*, наоборот, обладает сильной протеиназной, но слабой хитиназной активностью.

Проведена оценка ростостимулирующей активности микроорганизмов-антагонистов в присутствии патогенов и без них. Результаты показали, что всхожесть семян и сохранность проростков сосны зависели от: 1) состояния почвы: в стерилизованной почве всхожесть семян и сохранность проростков были в 1.3 и 5 раз выше, чем в нестерилизованной почве; 2) варианта микробной обработки семян: обработка *T. lignorum* показала максимальную всхожесть семян и сохранность проростков (58 и 36%); 3) добавления в почву фитопатогенов р. *Fusarium*: всхожесть семян и сохранность проростков были в 2 раза ниже в вариантах с добавлением фитопатогена, чем в вариантах без фитопатогена. В нестерилизованной почве наибольший ростстимулирующий эффект на проростки сосны без добавления фитопатогена оказывали варианты с *T. harzianum* и *T. lignorum*; при добавлении фитопатогена – в варианте *T. lignorum*. В стерилизованной почве без фитопатогена лучшие биометрические показатели отмечены в варианте с *T. longibrachiatum*, с фитопатогеном в варианте с *T. harzianum*. Отмечено, что обработка семян сосны антагонистами приводила к увеличению численности всех эколого-трофических групп микроорганизмов.

Сделан вывод, что тестируемые музейные штаммы микроорганизмов обладали антагонистической, миколитической, ферментативной и ростстимулирующей активностью, что свидетельствует об их высокой полифункциональности.

Пятая глава посвящена анализу результатов полевого эксперимента. В ней обсуждается влияние предпосевной обработки семян бактериями – антагонистами на состояние почвенного микробоценоза и сохранность

сеянцев сосны и лиственницы. Обработка семян микроорганизмами в целом оказала положительное влияние на исследуемые показатели. Выявлены наиболее перспективными вариантами обработки семян, при которых наблюдались повышенные значения морфометрических параметров сеянцев, активности ферментов (инвертазы, фосфатазы, уреазы, протеазы). Дана оценка влияния обработки семян на показатели дыхательной активности почвы: БД, значения МБ и qCO_2 . Факторный анализ показал, что наиболее важными факторами, влияющими на ферментативную активность почвы, оказались влажность и рН почвы, на общую микробную численность и МБ – температура почвы, а на изменение значений qCO_2 – кислотность среды.

Проведен анализ влияния добавочных субстратов (микокомпоста, опилок) для пролонгации действия микроорганизмов-антагонистов на функционирование почвенного микробоценоза. Внесение субстратов способствовало увеличению влажности почвы, снижению рН, повышению ОМЧ в почве более чем в 1.2 раза, МБ более чем в 1.5 раза. Внесение микокомпоста увеличило степень минерализации на 30%. В целом внесение добавочных субстратов не ухудшило микробиологическую ситуацию в почве: на фоне возросших численности и биомассы микроорганизмов поддерживался баланс между минерализацией и синтезом органики.

Показано влияние химического ($CuSO_4 \cdot 5(H_2O)$) и биологического (микробами-антагонистами) способов обработки семян сосны на состояние почвенного микробоценоза и сохранность сеянцев при добавлении микокомпоста. Предпосевная обработка семян способствовала увеличению грунтовой всхожести семян. Наибольший стимулирующий эффект на всхожесть оказала обработка *T. longibrachiatum* (более 3.2%). Морфометрические показатели сеянцев увеличились в варианте с *T. harzianum* на 14–32%, с *T. lignorum* – на 31% и *T. longibrachiatum* – на 22%. Увеличилась ОМЧ, особенно гидролитико-копитрофного комплекса, и МБ. При обработке семян микромицетами МБ была выше на 20%, чем при обработке $CuSO_4$. Наибольшее влияние на активность гидролаз оказала обработка *T. harzianum* и *T. longibrachiatum*, а на активность оксидоредуктаз – *T. harzianum*, *T. lignorum* и $CuSO_4$.

Дана сравнительная оценка влияния предпосевной обработки семян сосны микроорганизмами-антагонистами (*T. harzianum*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum*, *B. amiloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Pseudomonas* sp.) и фитопрепаратами (шелуха гречихи, риса, веточки облепихи, зелень пихты, бурый уголь, зеленый чай) на биогенность почвы и сохранность сеянцев. Результаты эксперимента показали увеличение грунтовой всхожести семян при обработке их микроорганизмами в 1.2–1.6 раз по сравнению с обработкой фитопрепаратами. Также увеличились морфометрические показатели сеянцев при обработке семян *T. harzianum* и *B. amiloliquefaciens*, ОМЧ – при обработке смесью бактерий, шелухой риса + зеленым чаем. Обработка семян положительно повлияла на активность всех ферментов. Снизился показатель qCO_2 более чем в 2 раза.

Научная новизна заключается в том, что автором впервые проведена оценка влияния систематической агротехнической обработки почвы лесного питомника на качественные изменения прокариотного микробиома почвы. Впервые испытана интродукция микроорганизмов-антагонистов для восстановления биогенности почвы лесопитомника. Показаны изменения в микробоценозе почвы в зависимости от использования микробов-антагонистов и фитопрепаратов. Предложены способы увеличения биогенности нарушаемых почв с помощью микроорганизмов. Впервые проведено сравнение влияния химических, микробных и фитопрепаратов на сохранность и качество семян хвойных. Предложены варианты пролонгирования активности 5 микроорганизмов-антагонистов в течение вегетационного сезона, что создает дополнительную защиту семян от фитопатогенов.

Практическая значимость результатов. Результаты исследований могут найти применение в разработке методов улучшения состояния нарушенных почв лесных питомников, повышении их биогенности. Микроорганизмы-антагонисты могут быть использованы в качестве биологических агентов для улучшения роста и защиты семян хвойных древесных растений. Разработаны рекомендации по улучшению качества посадочного материала с помощью экологически безопасных микробиологических методов при выращивании семян хвойных в лесных питомниках.

Апробация работы.

Основные положения диссертационной работы изложены в 24 публикациях, из них 5 статей в изданиях из перечня ВАК.

Результаты представлены на восемнадцати международных, всероссийских и региональных научных и научно-практических конференциях.

Личный вклад автора заключается в закладке экспериментов в лабораторных и полевых условиях, отборе почвенных образцов для исследований, культивировании и наращивании биомассы микроорганизмов, статистической обработке и анализе полученных данных и интерпретации результатов. Определение видовой принадлежности штаммов грибов р. *Trichoderma* молекулярно-генетическими методами произведены автором при участии научного руководителя и сотрудников лаборатории лесной генетики Центра защиты леса Красноярского края.

Вопросы, пожелания:

1. Вызывает вопрос подбора контроля в экспериментальных исследованиях:

1.1 При оценке влияния агротехнических мероприятий на почвы питомника больший научный интереснее вызывает сравнение динамики состояния почв питомника с необрабатываемой или лесной почвой (с. 95) с тем, чтобы учесть влияние внешних факторов, например, погодные условия.

1.2 В опыте по оценке влияния обработки семян на состояние почвенного микробоценоза и сохранность сеянцев при добавлении микокомпоста (с.168) в качестве контроля указан посев семян, обработанных водой, в почву, перемешенную с опилом. Остальные же варианты опыта заключались в посеве семян, обработанных суспензией микроорганизмов-антагонистов, в почву, перемешанную с микокомпостом. При такой схеме эксперимента контроль должен был заключаться в посеве семян, обработанных водой, в почву с микокомпостом или в посеве семян, обработанных микроорганизмами, в почву с опилом.

1.3 В опыте по оценке влияния обработки семян бактериями-антагонистами на состояние почвенного микробоценоза и сохранность сеянцев (с. 128) обозначен дополнительный контроль (контроль 2) – использование семян, обработанных водой, + мульчирование вермикулитом. Этот контроль возможно сравнивать только с контролем 1 - обработка семян водой + мульчирование опилом. Остальные варианты отличаются от него и вариантом обработки семян и мульчированием, поэтому их сравнение некорректно. Считаем, что введение контроля 2 является избыточным, т.к. влияние обработки семян можно показать и при сравнении остальных вариантов опыта.

2. Отдельная глава посвящена оценке влияния агротехнических нагрузок на почвы лесного питомника, при этом автор не указывает, какие именно агротехнические операции проводились на опытном участке.

3. При классификации почв лесного питомника использована последняя российская классификация (Классификация и диагностика почв..., 2004) (вторая глава). Рекомендуются также привести международную классификацию по WRB, 2015.

4. В тексте наблюдается путаница с названием формаций леса, в которых заложен эксперимент по влиянию добавочных субстратов на функционирование почвенных микробных сообществ. Соискатель использует разные названия одной и той же формации: березово-сосновый (с. 67), сосняк разнотравный с примесью березы (с. 88).

5. В практике лесного хозяйства при выращивании сеянцев в открытом грунте для заделки семян традиционно используют поверхностное внесение верхового торфа. Соискатель в эксперименте использовал вермикулит. Необходимо дать обоснование использования другого субстрата.

6. Рядом авторов (Федорец, Медведева, 2009; Казеев, Колесников, 2012; Пархоменко, 2018) для оценки уровня биологической активности почв используют интегральный показатель биологического состояния почвы (ИПБС), который позволяет объединить совокупность измерений большого количества параметров биома почвы для оценки антропогенного воздействия. Существуют и другие показатели: интегральный показатель эколого-биологического состояния почвы (ИПЭБСП), интегральный показатель биогенности (ИПБ), интегральный показатель биологической активности (ИПБА). Считает ли соискатель целесообразным использование данные

показатели для оценки влияния агротехнических мероприятий на почвы лесного питомника?

7. При оценке морфометрических характеристик сеянцев (с. 198) соискатель делает выводы о разветвленности корневой системы, хотя измерения количества и длины боковых корней в работе не проводились. Каким образом оценивалась разветвленность корневой системы?

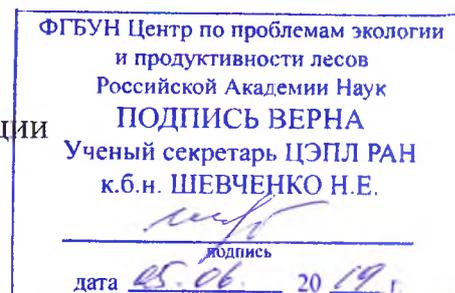
8. При характеристике почвенного профиля смешанного леса Погорельского бора соискатель описывает почвенные горизонты и приводит значение их мощностей, пропуская между ними пяти- и десяти-сантиметровые интервалы (с. 67). С какой целью это сделано?

Заключение. Диссертационная работа **КОНДАКОВОЙ ОКСАНЫ ЭРИКОВНЫ** «Использование микроорганизмов для выращивания хвойных и улучшения биогенности почв в лесных питомниках Сибири» является итогом целенаправленных исследований актуальной научной задачи. Результаты работы достоверны, выводы и заключения обоснованны, они успешно обсуждены в печати и на научных совещаниях.

По своей актуальности, новизне полученных результатов и их практической значимости диссертационная работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции от 01 октября 2018 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Кондакова Оксана Эриковна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология (биология).

Отзыв обсужден на заседании лаборатории структурно-функциональной организации и устойчивости лесных экосистем (протокол № 3 от 03 июня 2019 г.), утвержден на заседании ученого совета ЦЭПЛ РАН (протокол № 3 от 04 июня 2019 г.)

Старший научный сотрудник
лаборатории структурно-функциональной организации
и устойчивости лесных экосистем ЦЭПЛ РАН,
кандидат биологических наук по специальности
03.02.08 – Экология (биологические науки)



Н. Шевченко

Тебенькова Дарья Николаевна

05 июня 2019 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр по проблемам экологии и продуктивности лесов РАН
117997, Российская Федерация, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 84/32,
стр. 14; (499) 743-00-16; cepfras@cepl.rssi.ru; http://cepl.rssi.ru/