

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр Сибирского отделения
Российской академии наук»

На правах рукописи



Кондакова Оксана Эриковна

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКООРГАНИЗМОВ
ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ХВОЙНЫХ И УЛУЧШЕНИЯ БИОГЕННОСТИ ПОЧВ
В ЛЕСНЫХ ПИТОМНИКАХ СИБИРИ

03.02.08 – Экология (биология)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук, доцент
Гродницкая Ирина Дмитриевна

Красноярск – 2019

Оглавление

Введение	6
Глава 1. Обоснование использования микроорганизмов при выращивании лесопосадочного материала в лесных питомниках	15
1.1. Причины гибели лесопосадочного материала в лесных питомниках	15
1.1.1. Истощение и загрязнение почв в лесопитомниках	16
1.1.2. Использование пестицидов, минеральных и химических препаратов в лесных питомниках.....	18
1.1.3. Причины возникновения и распространения заболеваний хвойных в лесопитомниках	20
1.2. Восстановление экофизиологического статуса почв лесных питомников	21
1.2.1. Интегрированная защита растений при выращивании сеянцев хвойных в питомниках	27
1.2.2. Микробиологические методы в защите растений и улучшении фитосанитарного состояния почв лесных питомников	29
1.2.3. Наиболее часто используемые микроорганизмы-антагонисты в практике лесного и сельского хозяйства.....	34
1.3. Понятие о биологической активности почв	49
1.3.1. Роль эколого-трофических групп микроорганизмов (ЭКТГМ) в почвенных процессах	49
1.3.2. Анализ почвенных микробиомов с помощью метагеномных исследований.....	52
1.3.3. Респираторная активность почвы. Микробное дыхание и биомасса	57
1.3.4. Экологическое значение ферментативной активности почв.....	59
Глава 2. Объекты и методы исследований	64
2.1. Объекты исследований	64
2.2. Экологические условия экспериментальных участков Погорельского бора (Красноярская лесостепь).....	65
2.3. Методы исследования микроорганизмов	68

2.4. Определение ферментативной активности почвы.....	78
2.5. Условия проведения лабораторных экспериментов.....	82
2.6. Особенности проведения полевых (натурных) экспериментов <i>in situ</i>	87
2.7. Статистическая обработка результатов	92
Глава 3. Влияние систематических агротехнических нагрузок на почву лесного питомника	94
3.1. Изменение почвенных параметров и состояния микробоценоза опытного питомника на протяжении исследований (2012-2016 гг.)	94
3.2. Состояние прокариотного микробиома почвы опытного питомника в начале и после завершения экспериментов (2012–2016 гг.)	98
Глава 4. Определение биологической активности и фитопатогенных свойств у музейных культур микроорганизмов в лабораторных условиях (<i>in vitro</i>)....	105
4.1. Антагонистическая активность исследуемых штаммов	106
4.2. Ферментативная активность микроорганизмов-антагонистов	112
4.3. Влияние микроорганизмов-антагонистов на проращивание семян сосны обыкновенной (<i>Pinus sylvestris</i> L.) в присутствии патогенов и без них	114
4.4. Влияние на всхожесть семян сосны обыкновенной микробов–антагонистов и фитопрепаратов.....	124
Глава 5. Влияние предпосевной микробиологической обработки семян хвойных на состояние почвенного микробоценоза и сохранность сеянцев..	128
5.1. Влияние обработки семян бактериями-антагонистами на состояние почвенного микробоценоза и сохранность сеянцев хвойных	128
5.1.1. Влияние предпосевной обработки семян на рост и развитие однолетних сеянцев	129
5.1.2. Влияние предпосевной обработки семян на рост и развитие 2-х летних сеянцев	133
5.1.3. Морфометрические характеристики сеянцев	139
5.1.4. Влияние предпосевной обработки семян на численность эколого- трофических групп микроорганизмов.....	142
5.1.5. Ферментативная активность темно-серой почвы питомника	147

5.1.7. Дыхательная активность микробного сообщества почвы под посевами хвойных.....	151
5.2. Влияние внесения добавочных субстратов на пролонгирование активности микроорганизмов-антагонистов.....	158
5.2.1. Функционирование микробных сообществ почвы березово-соснового леса при внесении добавочных субстратов (микокомпоста и опилок).....	159
5.2.2. Основные почвенные и микробиологические показатели темно-серой почвы березово-соснового леса и опытного питомника....	166
5.3. Влияние химического и биологического способов обработки семян сосны обыкновенной на состояние почвенного микробоценоза и сохранность сеянцев при добавлении микокомпоста	168
5.3.1. Влияние предпосевной обработки семян на грунтовую всхожесть, рост и развитие сеянцев	169
5.3.2. Влияние предпосевной обработки семян на рост и развитие сеянцев второго года жизни	171
5.3.3. Морфометрические характеристики сеянцев	174
5.3.4. Влияние предпосевной обработки семян на численность экологотрофических групп микроорганизмов	176
5.3.5. Ферментативная активность темно-серой почвы под посевами сосны	180
5.3.6. Дыхательная активность микробоценозов экспериментальных участков темно-серой почвы питомника под посевами сосны....	185
5.4. Сравнение влияния предпосевной обработки семян сосны обыкновенной микроорганизмами-антагонистами и фитопрепаратами на биогенность почвы и сохранность сеянцев	192
5.4.1. Влияние предпосевной обработки семян на грунтовую всхожесть, рост и развитие сеянцев	193
5.4.2. Морфометрические характеристики сеянцев	198

5.4.3. Влияние предпосевной обработки семян на численность эколого-трофических групп микроорганизмов	200
5.4.4. Дыхательная активность микробоценозов экспериментальных участков темно-серой почвы питомника под посевами сосны	203
5.4.5. Ферментативная активность темно-серой почвы питомника под посевами сосны обыкновенной в зависимости от вариантов обработки.....	205
Заключение	215
Список сокращений	218
Список использованной литературы	219
Приложение А Коэффициенты корреляции между некоторыми параметрами почвы и морфометрические характеристики сеянцев хвойных	249

Введение

В последние десятилетия все больший негативный характер приобретают изменения климата. Так, в 1995 году межправительственная Мадридская конференция ООН, официально признавшая наличие глобального потепления, подтвердила, что потепление с высокой долей вероятности приводит к возрастанию частоты и интенсивности экстремальных погодных и климатических явлений на территории бореальных лесов Урала и Сибири (Пасько, 2011; Степаненко, Савенкова, 2013; Акимов и др., 2016; Киселев, Король, 2017). Это означает, что происходит изменение средней многолетней температуры воздуха в сторону повышения: в северном полушарии на 5–10 % повышается количество осадков (по данным Межправительственной группы экспертов по изменению климата (МГЭИК)), что приводит к возрастанию сильных осадков (ливней, снегопадов, ветровалов) и межгодовых изменений количества осадков (Ведомственная программа ... , 2010; Гео-Сибирь-2010, 2010; Пасько, 2011; Современное состояние ... , 2013). Ежегодно в лесах Сибири увеличиваются очаги вредных насекомых и болезней, площадь которых в среднем насчитывает 2.5–3 млн га, из них площадь погибших – 60 тыс га. Все эти причины влияют на продукцию экосистем, приводят к сдвигу границ роста формаций, деградации вечной мерзлоты, что закономерно вызывает негативные изменения в лесном хозяйстве (пожары, вспышки болезней и вредителей) (Ведомственная программа ... , 2010).

В связи с происходящими масштабными сокращениями площади лесов Сибири, Российской Федерации и мира в целом под действием факторов различной природы (биотической, антропогенной) и падением естественного лесовосстановительного потенциала, на первое место выходит вопрос своевременного качественного искусственного воспроизводства лесов для рационального и непрерывного лесопользования, сохранения равновесия в природе и биосфере в целом (Дудка и др., 1982; Брюханов, 2009; Ведомственная программа ... , 2010; Пасько, 2011).

Искусственное лесовосстановление сконцентрировано на территориях лесных питомников и состоит из нескольких этапов, на первом из которых происходит получение качественного лесопосадочного материала (сеянцев), что зачастую затруднено в связи с истощением почв и распространением болезнетворной микрофлоры. Очень часто сеянцы питомников болеют различными инфекционными болезнями. По данным Якименко Е. Е. и Гродницкой И. Д. (2000) отмечено, что в почвах лесных питомников разнообразие микроорганизмов снижено из-за недостатка травянистой растительности и химических обработок, из-за чего уничтожается большая часть чувствительных видов микробов. Кроме того, из-за недостатка субстрата для сапротрофов, в почвах питомников преобладают патогенные микроорганизмы, например, грибы рода *Fusarium* (*F. sporotrichiella* Var, *F. sporotrichiodes*, *F. heterosporum*, *F. moniliforme* и др.) (Якименко, Гродницкая, 2000). Поэтому актуальным направлением экологических исследований становятся методы, оперирующие биологическими агентами, которые, во-первых, способны повышать биогенность почв питомников, во-вторых, являются экологически безопасными для сапротрофной (полезной) микрофлоры и эффективными для борьбы с патогенной, и, в-третьих, ускоряющие рост и развитие лесопосадочного материала.

В последнее время в качестве биологической (микробиологической) защиты сеянцев на питомниках предлагается интродукция биологически активных микроорганизмов-антагонистов, которые способны выделять в окружающую среду различные гормоны, ферменты и антибиотические вещества, а выделяемые ростстимулирующие вещества позволяют использовать их как высокоэффективных биоагентов для сохранения и улучшения качества посадочного материала (Боронин, 2000; Бузыкин, Пшеничникова, 2008; Benzohra et al., 2011; Zimmermann et al, 2016). Кроме того, отмечено, наличие у них комплексной активности – фунгицидной, бактерицидной, нематоцидной (Романенко, Попов, 2008; Suprpta, 2012). Сегодня интродукция микроорганизмов используется как эффективный подход для восстановления почвы и увеличения ее продуктивности. Еще одним важным аспектом, улучшающим выход качественных

сеянцев, является способность микробов-антагонистов улучшать фитосанитарное состояние почв и растений путем регулирования численности и состава фитопатогенов в искусственных фитоценозах (Соколов, 1990; Сорокин и др., 2000; Якименко, Гродницкая, 2000).

Актуальность темы исследования. Почвы лесных питомников, отвечающие за искусственное лесовосстановление, как правило, подвержены истощению и загрязнению поллютантами вследствие применения большого количества химикатов, выращивания монокультуры и систематического изъятия растительности. Комплексным методом решения этой проблемы может стать применение микроорганизмов, способных улучшить основные параметры биогенности почвы и, следовательно, повысить качество и сохранность посадочного материала. Отмечено, что наиболее эффективными агентами восстановления биогенности почвы в Сибири являются аборигенные микроорганизмы-антагонисты, приспособленные к существованию и развитию в конкретных условиях, способные улучшать лесорастительное состояние нарушаемых почв, подавлять развитие патогенной и повышать активность сапротрофной микробиоты, а также защищать и стимулировать рост и развитие лесопосадочного материала. Наиболее распространенными агентами биологического контроля и защиты растений являются бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, а также микромицеты рода *Trichoderma*.

Цель работы – оценка состояния и структуры прокариотного микробиома темно-серой почвы в период ее эксплуатации; изучение влияния аборигенных микроорганизмов-антагонистов на биогенность (продуктивность) почвы и сохранность сеянцев хвойных в лесопитомнике Красноярского края.

В рамках этой цели были поставлены 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 сеянцев 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 сеянцев хвойных, на состояние почвенного микробоценоза.

6. Дать практические рекомендации по предпосевной обработке семян хвойных биопрепаратами микробов-антагонистов для лесных питомников.

Научная новизна. Оценено влияние систематической агротехнической обработки почвы питомника на изменения, происходящие в метагеноме почвы. Проведен анализ прокариотного микробиома почвы опытного питомника с оценкой качественных изменений при систематическом возделывании.

Проведена оценка степени нарушения/восстановления эколого-физиологического статуса микробного сообщества с помощью микробных индикаторов ($q\text{CO}_2$ и МБ).

Впервые проведены комплексные длительные исследования по изучению влияния интродуцированных микроорганизмов-антагонистов на биогенность систематически возделываемой почвы опытного лесопитомника. Показаны изменения в микробоценозе почвы, отразившиеся на численности и состоянии эколого-трофических групп микроорганизмов, содержании микробной биомассы, ферментативной активности, в зависимости от влияния 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 сеянцев хвойных.

Найдены варианты пролонгирования активности микроорганизмов-антагонистов (с помощью добавочного субстрата микокомпоста) в течение вегетационного сезона, что создает дополнительную защиту сеянцев от фитопатогенов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные закономерности изменения качественного и количественного состава микробиома в темно-серой лесной почве питомника позволят оценивать степень деградированности, регулировать нагрузки и определять время для восстановления. Показано, что внесение аборигенных штаммов микроорганизмов, обладающих повышенной биологической активностью, может быть использовано в улучшении состояния нарушенных почв, повышении их биогенности. Микроорганизмы-антагонисты могут быть использованы в качестве биологических агентов для защиты сеянцев хвойных и восстановления антропогенно-нарушенных почв. На примере опытного Погорельского лесного питомника определен и проверен экологичный способ предпосевной обработки семян хвойных микроорганизмами и фитопрепаратами для повышения сохранности сеянцев и получения качественного посадочного материала без использования пестицидов. Полученные материалы исследований могут быть использованы в учебном процессе при подготовке специалистов экологов и биотехнологов. Предложены рекомендации по улучшению качества посадочного материала с помощью экологически безопасных микробиологических методов при выращивании хвойных в лесных питомниках.

Степень разработанности темы исследования. Достаточно большое количество исследований посвящено изучению деградации и истощению почв лесных питомников, распространению заболеваний в них, подробно изучены причины загрязнения почв поллютантами различной природы и возможности интегрированной защиты растений с помощью микроорганизмов. Однако исследований, посвященных использованию аборигенных антагонистов в качестве биоагентов, способных повышать лесорастительное состояние почв, за счет восстановления их экофизиологического статуса, увеличения содержания микробной биомассы, изменения состава почвенного микробиома, повышения

численности сапротрофных микроорганизмов, и снижения численности патогенных форм, в литературе представлено мало.

Методология и методы исследования. В работе использованы классические микробиологические методы исследований: наращивание биомассы микроорганизмов (Егоров, 1965), определение таксономического положения грибов по морфологическим (Билай, Элланская, 1975; Литвинов, 1967; Егорова, 1986; Билай, Коваль, 1989; Watanabe, 2002), и бактерий – по культуральным и биохимическим признакам (Практикум по..., 1976), антагонистической и ферментативной активности микроорганизмов и почв (Егоров, 1979; Montealegre, 2003; Асатурова, Дубяга, 2012 Лысак, 2003; Асатурова, Дубяга, 2012; Хазиев, 1990; 2005; Козлова, Макарова, 2013). Были использованы и современные методы: молекулярно-генетическое определение таксономического положения грибов и бактерий (по 16 и 18S ДНК) (Падутов и др., 2007; Баранов и др., 2012), качественного состава почвенных бактерий – молекулярными методами нового поколения (MGS – метагеномный сиквенс), респирометрическую активность – методом субстрат-индуцированного дыхания (СИД) (Anderson, 1978; Звягинцев, 1991; Ананьева, 2003). Физико-химические параметры исследуемых почв определяли классическими почвенными методами (Аринушкина, 1970).

Положения, выносимые на защиту:

1. Систематические агротехнические нагрузки на почвы питомников приводят к изменению качественного состава микробиомов на таксономическом уровне. Уменьшение представителей фил бактерий гидролитического комплекса (*Proteobacteria*, *Firmicutes*), увеличение олиготрофов (низшие *Actinobacteria*, *Verrucomycrobia*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*), и ксерофитов (*Gemmatimonadetes*) свидетельствуют об экологической нестабильности почв, являются показателями снижения их продуктивности.

2. Предпосевная обработка семян хвойных аборигенными штаммами микроорганизмов (pp. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*), обладающих высокой биологической (антагонистической, ростстимулирующей) активностью, способствует повышению сохранности и улучшению качества лесопосадочного

материала в лесных питомниках.

3. Для восстановления биогенности нарушаемых/истощенных почв лесных питомников целесообразно использовать аборигенные штаммы микробов-антагонистов, которые экологически безопасны, приспособлены к региональным условиям и эффективны даже в небольших концентрациях. Внесение добавочных органических субстратов (биоудобрений) увеличивает время активности антагонистов.

Апробация работы. Материалы и основные положения диссертации представлялись и обсуждались в виде устных, постерных и заочных докладов на конференциях разного уровня: международных научных и научно-практических – «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий» (Абакан, 2012), «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2013–2014), «CarboPerm PhD Meeting» (Гюльп Германия, 2015), «Перспектив свободный – 2016» (Красноярск, 2016), «Конференция по биологии и биотехнологии растений» (Казахстан, 2014), «Дендробионтные беспозвоночные животные и грибы и их роль в лесных экосистемах» IX Чтения памяти О. А. Катаева (Санкт-Петербург, 2016), XX Докучаевские молодежные чтения (Санкт-Петербург, 2017), «Проблемы рекультивации отходов быта, промышленного и сельскохозяйственного производства» (Краснодар, 2017); Симпозиум имени Б.Н. Уголева (Красноярск, 2018); всероссийских научных и научно-практических – «Вредители и болезни древесных растений России» (Санкт-Петербург, 2013), «Методы контроля вредителей и патогенов древесных растений: от теории к практике» (Москва, 2016), «Интенсификация лесного хозяйства России: проблемы и инновационные пути решения» (Красноярск, 2016); всероссийских с международным участием – «Лесные биогеоценозы бореальной зоны: география, структура, функции, динамика» (Красноярск, 2014), VII Съезд почвоведов им. В.В. Докучаева (Белгород, 2016); «Перспективы развития и проблемы современной ботаники» (Новосибирск, 2018); межрегиональных – «Экологическое образование и природопользование в инновационном развитии региона» (Красноярск, 2014); межинститутских – XIV-XVII конференция Молодых ученых ИЛ СО РАН

«Исследования компонентов лесных экосистем Сибири» (Красноярск, 2013–2016, 2018), конференция на английском языке «Attended the XIX Conference of the Young Scientists and made a successful paper presentation» (Красноярск, 2014).

Степень достоверности результатов исследования. Приведенные автором результаты обоснованы и обеспечены большим объемом лабораторных и полевых экспериментов с применением современных математических методов обработки, анализа и оценки полученных результатов. Все алгоритмы, результаты и выводы получены на основе методов анализа и синтеза. Результаты и выводы не противоречат результатам исследований других авторов. Весь основной материал диссертации опубликован.

Публикации по теме диссертации. По результатам исследования опубликовано 24 печатные работы, из них 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ. Результаты исследований были представлены в виде устных докладов на 14 конференциях.

Личный вклад автора. Автор лично принимал участие во всех этапах подготовки и проведения работы: в закладке экспериментов в лабораторных и полевых условиях, отборе почвенных образцов для исследований, культивировании и наращивании биомассы микроорганизмов, статистической обработке, анализе полученных данных и интерпретации результатов. Автор ежемесячно в течение 6 вегетационных периодов (лет) посещал ОЭХ Погорельский Бор (стационар ИЛ СО РАН) с целью закладки экспериментов, посева семян хвойных, отбора образцов почвы и сеянцев на морфометрические анализы. Совместно с сотрудниками лаборатории лесной генетики Центра защиты леса Красноярского края (г. Красноярск) автор принимал участие в определении видовой принадлежности штаммов грибов р. *Trichoderma* молекулярно-генетическими методами.

Соответствие диссертации паспорту научных специальностей. В соответствии с формулой специальности 03.02.08 – Экология (биология).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, списка сокращений, списка литературы и приложения. Список

литературы включает в себя 280 работ, из них 86 на иностранном языке. Текст изложен на 257 страницах. Диссертация включает 61 рисунок, 38 таблиц и 1 приложение.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю доктору биологических наук Гродницкой И. Д., коллегам и соавторам: кандидату биологических наук Антонову Г. И., кандидату биологических наук Пашеновой Н. В., кандидату биологических наук Сенашовой В. А., кандидату биологических наук Трусовой М. Ю. (Институт Биохимии СО РАН), доктору биологических наук, профессору Терещенко Н. Н. (Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и торфа и Томский Государственный Университет) – за всестороннюю поддержку и помощь в проведении целого ряда исследований по теме диссертации. Автор также благодарен доктору биологических наук, профессору Сорокину Н. Д. за моральную поддержку и ценные советы.

Глава 1. Обоснование использования микоорганизмов при выращивании лесопосадочного материала в лесных питомниках

1.1. Причины гибели лесопосадочного материала в лесных питомниках

В связи с глобальными масштабами деградации хвойных лесов, вызванными рядом причин, большое значение приобретает искусственное восстановление лесов, состоящее из нескольких основных этапов: посев семян в почвы лесных питомников, получение посадочного материала (сеянцев в возрасте до 2–3-х лет) и пересадка посадочного материала на постоянное место. Однако частым явлением в питомниках является гибель большей части посадочного материала, еще до того, как сеянцы будут готовы к пересадке. Например, в питомниках среднего Поволжья из 0.5 млрд. сеянцев, почти пятая часть ежегодно погибает от болезней (Алимова, 2006). Зачастую это связано с тем, что сеянцы, являясь наиболее чувствительными в ювенильной фазе развития, подвергаются различного рода неблагоприятным воздействиям (болезни, вредители, неблагоприятные условия окружающей среды), приводящим их к гибели. Кроме того, семена часто имеют низкие показатели всхожести и выживаемости (Зинякова, Семенова, 2013).

В питомниках защита растений связана с комплексом мер: агротехнических, лесохозяйственных, механических, химических и биологических (Учет и прогноз очагов..., 1988). Хорошая агротехника предупреждает те или иные заболевания сеянцев и способна сдержать ухудшение состояния уже больных растений, но зачастую этого недостаточно (Учет и прогноз очагов..., 1988). Наиболее частыми причинами ухудшения состояния растений на питомниках являются: низкий уровень агротехники; – истощение почв (ухудшение физиологического состояния); неправильное внесение минеральных удобрений; нарушение применения химических препаратов; распространение болезней и инфекций.

При больших потерях посадочного материала из перечисленных причин наиболее важными являются: истощение почв, неправильное применение минеральных и химических препаратов и распространение заболеваний (Учет и

прогноз очагов..., 1988; Алимова, 2006).

1.1.1. Истощение и загрязнение почв в лесопитомниках

Почва является самым важным значимым доступным ресурсом для повышения растительной продукции. Плодородие почвы зависит от различных физико-химических и микробиологических свойств. Почва должна сохранять разнообразие популяций биологически активных микроорганизмов, которые выполняют широкий диапазон функций: деградацию различных сложных соединений, таких как органическое вещество (ткани животных и растений) и остатки инсектицидов, гумусообразование, ингибирование или ускорение различных почвенных реакций, синтез биологически активных веществ, ферментов, антибиотиков (Bailey, 2005; Rokade, Mane, 2013).

Однако почвы лесных питомников, обладают более слабыми свойствами агрохимическими (уплотнение пахотного и подпахотного слоев), физическими (засоление, переход элементов в труднодоступные формы) и биологическими, они обеднены элементами питания, в особенности микроэлементами, кроме того в них отмечено меньшее видовое разнообразие всех групп микроорганизмов (Якименко, Гродницкая, 2000; Гродницкая, Сорокин, 2006; Зинякова, Семенова, 2013; Веремеенко, Фурманец, 2014). Именно поэтому мониторинг экологического состояния почв лесопитомников очень важен (Фомина, 2015).

При длительном агротехническом влиянии на почву происходят изменения морфологических признаков, гидролитической и обменной кислотности, показателей реакции почвенной среды, снижение степени насыщенности основаниями, дегумификация, также изменяется количество запасенного органического углерода, снижается содержание различных органических веществ, при подкислении почвы изменяются структура и свойства микробоценозов (Веремеенко, Фурманец, 2014).

Важным фактором качества почвы в лесных питомниках так же является низкое разнообразие микроорганизмов, обладающих антагонистической

активностью, особенно грибов рода *Trichoderma*, чья численность в таких почвах в 2–3 раза меньше, по сравнению с целинными (Якименко, Гродницкая, 2000; Берсенева, Саловарова и др., 2008). Как уже было отмечено, одной из проблем почв питомников является не только их истощение, но также и их загрязнение. В результате длительного использования почв происходит их деградация (уменьшение содержания гумуса), в связи с чем, широкое распространение получило применение различных видов минеральных, химических и органических удобрений. С одной стороны, применение удобрений приводит к повышению урожайности, а с другой – к усиленному выносу питательных элементов из почвы вместе с урожаем, что является причиной отрицательного баланса в севообороте (Веремеенко, Фурманец, 2014).

Также, большое влияние на почву оказывает антропогенная нагрузка (техногенная и энергетическая), в результате которой формируются агро- и урбо-экосистемы, которые называют антропогенно-преобразованными (Веремеенко, Фурманец, 2014; Иващенко и др., 2014). В результате такого антропогенного воздействия в почве накапливается большое количество химических веществ, отравляющих ее и делающих непригодной не только для роста и развития растений, но и для некоторых аборигенных групп микроорганизмов (Цыганова, и др., 2013). Антропогенное воздействие приводит к изменениям физических, химических, морфологических и агрохимических свойств, причем на всех уровнях организации почвенного профиля (Веремеенко, Фурманец, 2014). В результате роста антропогенной нагрузки, оказываемой на экосистемы, происходит загрязнение окружающей среды поллютантами, в том числе и ксенобиотиками – веществами антропогенного происхождения, синтезированными человеком, и не встречающиеся в естественной природной среде (Миренков, 2008).

Таким образом, истощение почв, вследствие нерационального их использования в сельском и лесном хозяйстве, а также развитие ряда отраслей (нефтяной и химической) промышленности приводит к неизбежному загрязнению почвы, и всей окружающей среды в целом (Цыганова и др., 2013; Козлова, Степанов, 2014).

1.1.2. Использование пестицидов, минеральных и химических препаратов в лесных питомниках

В связи с истощением почв и развитием болезней растений в сельском и лесном хозяйстве часто и в больших масштабах применяют различные химические и минеральные препараты (Cawoy, Bettiol, 2011; Mishra, Mishra, 2011). В результате этого возникает проблема загрязнения почвы пестицидами, которые прямо воздействуют на почвенные организмы и способствуют через почву загрязнению водных источников. В основном применяют самые распространенные пестициды — фунгициды, гербициды, инсектициды (Миренков, 2008; Ступин, 2009; Mishra, Mishra 2011). Помимо пестицидов к органическим загрязнителям также относят нефть, масла, смолы, хлорированные углеводороды, ПХБ (полихлорированные бифенилы), диоксины, ПАУ (полициклические ароматические углеводороды). Кроме того, в состав некоторых пестицидов входят тяжелые металлы (цинк, марганец, медь), которые накапливаются в растениях при многолетнем применении (Миренков, 2008; Ступин, 2009).

Таким образом, несмотря на высокую эффективность и легкую утилизацию, использование химических препаратов и пестицидов, их систематическое употребление и чрезмерное использование, часто имеет неблагоприятное влияние на окружающую среду и создает много проблем:

1) гибель части почвенной микробиоты (микро и мезофауны), что приводит к физическим и химическим неблагоприятным последствиям; наносится вред людям и животным (Higa, Paat, 1994; Кадырова и др., 2002; Гродницкая, Сорокин, 2007; Миренков, 2008; Ступин, 2009; Cawoy, Bettiol, 2011; Демиденко, Фомина, 2013; Rokade, Mane, 2013). При использовании химикатов часто погибают микроорганизмы, участвующие в трансформации N и C, гибнет сапротрофная микрофлора и микоризообразующие грибы, происходит нарастание олиготрофных условий, что в свою очередь приводит к разрушению гумуса, исчезновению аборигенных видов микроорганизмов и появлению вакантных ниш для фитопатогенов (Якименко, Гродницкая, 2000; Гродницкая, Сорокин, 2006; Гришко,

Сыщиков, 2009). А излишнее количество минеральных удобрений ингибирует развитие актиномицетов и аммонификаторов (Зинякова, Семенова, 2013; Зинякова, 2014);

2) существенные изменения доступного органического вещества почвы (часто очень сильное при воздействии гербицидов), затруднение минерализации и нитрификации, эрозия почвы (Гродницкая, Сорокин, 2007; Ступин, 2009);

3) заметное снижение урожая культур, ослабление иммунитета семян, приводящее к распространению инфекций, происходят вследствие сохранения оставшихся пестицидов (Гродницкая, Сорокин, 2007; Миренков, 2008; Ступин, 2009; Rokade, Mane, 2013; Новиков, Бойкова и др., 2013);

4) аккумуляция нежелательных химических остатков в пищевой цепи;

5) возникновение фунгицидной резистентности патогенных микроорганизмов (Сахнов, 2007; Миренков, 2008; Sawoy, Bettiol, 2011; Веремеенко, Фурманец, 2014);

6) возможно вымывание пестицидов в грунтовые воды, что может быть опасно для источников питьевой воды (Higa, Parr, 1994; Sawoy, Bettiol, 2011; Ступин, 2009);

7) нарушение экосистемного баланса, циркуляция их продуктов в биосфере и увеличение токсичности почвы (Рыбалко, Гукасян, 1986; Гродницкая, Сорокин, 2006; Миренков, 2008; Ступин, 2009; Sawoy, Bettiol, 2011; Suprpta, 2012);

8) негативное влияние пестицидов на посадочный материал путем замедления роста и нарушения морфогенеза и загрязнения почв (Сахнов, 2007).

Загрязнения поллютантами / ксенобиотиками приводят к глобальным нарушениям экологической обстановки. Удобрения, таким образом, сегодня стали одновременно и методом улучшения плодородия почвы, и негативным фактором антропогенного воздействия.

1.1.3. Причины возникновения и распространения заболеваний хвойных в лесопитомниках

В связи с ухудшением состояния почв происходит интенсивное развитие патогенных организмов, несущих угрозу посадочному материалу питомников. Важной проблемой лесовосстановления в Сибири является выращивание здорового посадочного материала хвойных, в связи с чем, возникает необходимость обращения должного внимания к мерам борьбы с инфекциями грибного и бактериального происхождения (Рыбалко, Гукасян, 1986; Якименко, Гродницкая, 2000). Известно, что чаще всего в питомниках происходит загнивание семян, проростков и корней, полегание всходов хвойных вследствие развития грибных инфекций, однако иногда причиной некоторых заболеваний являются бактерии, вирусы и черви (Рыбалко, Гукасян, 1986; Якименко, Гродницкая, 2000; Sawoy, Bettiol, 2011). Поражения сеянцев, вызванные атаками фитопатогенов, приводят к сокращению энергии роста сеянцев или, в худшем случае, – к гибели (Bailey, 2005; Sawoy, Bettiol, 2011).

Наиболее часто причиной заболевания сеянцев хвойных в питомниках являются фитопатогенные грибы рода *Fusarium*. Особой вредоносностью отличаются виды *Fusarium sporotrichiella*, *F. sporotrichiodes*, *F. heterosporum*, *F. moniliforme* (Якименко, Гродницкая, 2000). Кроме фузариев известно еще более 10 000 видов грибов, способных вызывать различные болезни растений (pp. *Alternaria*, *Cladosporium*, *Verticillium* и др.) (Suprpta, 2012). Такое разнообразие патогенных форм ухудшает состояние почвы, способствует появлению у грибов разнообразных механизмов воздействия на растения – от выделения широкого спектра токсинов до приобретения множественной резистентности (Рыбалко, Гукасян, 1986; Duffy et al., 2003; Степанов, 2009; Кузин и др., 2013).

Отмечено также, что среди патогенов, от которых страдают сеянцы хвойных в условиях питомников, присутствуют разнообразные бактерии, например, *Bacterium pini* Voil (опухолевидный бактериоз), *Erwinia amylovora* (бактериальная

водянка), а также *Pseudomonas solanacearum* (Smith), *Pseudomonas syringae* van Hall и многие другие (Рыбалко, Гукасян, 1986).

Важную роль в инфекционных процессах также играет эпифитная микрофлора семян, представленная бактериями из родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Pseudobacterium*, *Chromobacterium*, *Bacterium*; грибами родов: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Trichotecium*, *Spicaria*; дрожжами родов *Cryptococcus*, *Aureobasidium*. У больных растений преобладают *Pseudomonas*, *Bacterium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Alternaria* (Рыбалко, Гукасян, 1986).

Таким образом, на посадочный материал лесных питомников оказывают сильное влияние не только качество и структура почвы, степень ее истощения, нарушения правил использования химических удобрений, но и инфекционное поражение проростков и семян патогенами разнообразной природы.

Поэтому вследствие повышения санитарно-гигиенических и экологических требований для выращивания лесов важной стратегией является лесовосстановление в рамках интегрированной защиты растений, основанная на биологическом методе и отвечающая нормам экологической безопасности (Рыбалко, Гукасян, 1986; Бондарь, Садыкова, 2007; Донецкий, Литовка, 2007; Sawoy, Bettiol, 2011; Сурина, Сеньков, 2011; Старшов, 2013).

1.2. Восстановление экофизиологического статуса почв лесных питомников

В природных условиях естественные процессы очищения почвы происходят сами собой, благодаря активному функционированию аборигенной микрофлоры, такое естественное восстановление эффективно даже в очищении от хлористых растворителей, полиароматичных гидрокарбонатов, пестицидов, гербицидов, и даже тяжелых металлов (Bollag, 1994; Solevic et al., 2011). Однако в сильно истощенных почвах процесс естественного очищения затруднен. Одной из главных причин загрязнения почв является применение в сельском и лесном хозяйстве химикатов (пестицидов, гербицидов), что приводит к нарушению экосистемного

баланса и увеличению токсичности почв (Гродницкая, Сорокин, 2006).

Причин низкой деградации поллютантов естественным путем, когда они сбрасываются в окружающую среду, много: высокая концентрация поллютантов, ограниченное количество акцепторов электронов, ненадлежащий запас питательных веществ, неблагоприятные условия окружающей среды, такие как влажность, температура, pH, Eh (Bollag, 1994). Различные отходы, произведенные человеком, складываются на отведенных территориях, в результате чего большие площади загрязняются смесями поллютантов, включая нефтяные продукты, органические растворители, металлы, кислоты, щелочи и радионуклиды (Bollag, 1994). Кроме того, серьезному загрязнению подвергаются территории вокруг промышленных сооружений, пастбища и сельскохозяйственные угодья.

Подобная ситуация зачастую отмечается в искусственных фитоценозах, например, в лесных питомниках, в почве которых происходит ухудшение физических, агрохимических и биологических свойств, например, разрушение гумуса, уменьшение общей биологической и ферментативной активности и нарастания олиготрофных условий. В результате этих изменений наиболее сильно страдают микроорганизмы, в особенности те, которые участвуют в трансформации азота и углерода (Гродницкая, Сорокин, 2006). Гибель аборигенной полезной микробиоты приводит к ослаблению антагонистической активности почвы, возрастанию численности фитопатогенов, вакантные ниши занимают микроорганизмами, способными приспособиться к новым условиям, вследствие чего ряд сапротрофных видов переходят к вынужденному паразитизму (Гродницкая, Сорокин, 2006; 2007).

Поэтому в настоящее время восстановление деградированных или загрязненных почв биологическими способами (биоремедиация) становится актуальным. Биоремедиация почв – их восстановление, приобретает все большее и большее значение в связи с загрязнениями разнообразной природы, которые не только ухудшают условия окружающей среды, но и способны негативно сказаться на здоровье человека. Существует несколько подходов в биоремедиации: а) применение иммобилизованных ферментов; б) использование растений, которые

сдерживают или трансформируют поллютанты (фиторемедиация); в) инокуляция территорий микроорганизмами, обладающими специальными биотрансформационными технологиями (Bollag, 1994). Часто в качестве агентов биоремедиации используют растения, способные поглощать и накапливать в себе поллютанты, например, тяжелые металлы, позволяя таким образом извлечь их из почвы (Орлова, Степанова, 2012; Коротченко и др., 2015). Фиторемедиация выгодна и доступна, она способна предотвратить загрязнения всех компонентов окружающей среды, как воздуха и воды, так и почвы (Коротченко и др., 2015), при этом ее применение не ограничено только извлечением неорганических веществ (тяжелых металлов, радиоинуклидов), эффективно она при очистке от органических (углеводородные загрязнения, пестициды) токсикантов (Янкевич и др., 2015). Различают четыре вида фиторемедиации: фитоэкстракция – когда происходит поглощение, транслокация и аккумуляция поллютанта в растениях, ризофильтрация – когда сорбция загрязнителя происходит на корнях или других частях растений, фитодеградация (органических поллютантов) еще находятся в стадии интенсивного исследования, ризодеградация – деструкция загрязнений в корневой зоне растения под действием корневых экссудатов и активности ризосферной микрофлоры (Янкевич др., 2015). Одним из примеров фиторемедиации (ризодеградация) является использование смесей порошков растительного сырья, полученных после применения механохимической обработки, которая приводит к увеличению реакционной способности субстрата, в качестве источника биологически активных веществ для полезной микрофлоры почвы (Рожанская и др., 2003; Подгорбунских и др., 2016).

Существенным недостатком фиторемедиации являются: сезонность климата Сибири, сложности подбора необходимого вида агента-растения и, кроме того, растения имеют предел концентрации загрязняющего вещества, при котором они могут существовать (Орлова, Степанова, 2012).

Микробиологическая биоремедиация – это дополнительное внесение аборигенной микрофлоры, которая через свои естественные жизненные функции, способствует или ускоряет процессы деградации или детоксикации опасных

субстратов до безопасных, для почвенной биоты, форм (Solevic et al., 2011). Отмечено, что биоремедиацию микроорганизмами можно и следует использовать не только для очищения почвы от поллютантов, таких как нефть и гидрокарбонаты, но и для улучшения ее экофизиологического статуса, восстановления ее биогенности (Solevic et al., 2011). В процессе биоремедиации усиливается роль естественных микробных сообществ в трансформации, минерализации и комплексообразовании, посредством прямого разрушения органических и неорганических загрязнителей окружающей среды. Биоремедиационные методики почвы дают существенные преимущества и минимизацию вреда, такие новые технологии стимулируют активность естественных микроорганизмов, доставляют питательные вещества, регулируют редокс условия и оптимизируют уровень pH (Bollag, 1994).

Микроорганизмы присутствуют и функционируют в различных (даже жестких) условиях окружающей среды, они способны трансформировать и деградировать всевозможные формы органических веществ (естественные и синтетические), что делает их привлекательными агентами биоремедиации (Bollag, 1994). Использование иммобилизованных микроорганизмов в биоремедиации почв – актуальное направление, но для отбора целевых микроорганизмов в качестве кандидатов для биоремедиации необходимо понимание биологии и экологии этих микроорганизмов, для чего требуется эффективный менеджмент (Jasper, 1994). Кроме того, успешное внедрение почвенной биоремедиации требует междисциплинарного взаимодействия между биологией, почвенной химией и инженерией (Bollag, 1994).

В почве круговорот органической материи осуществляется разнообразными путями почвенной микробиотой, включая бактерии, актиномицеты, грибы, простейших, червей и членистоногих, где микроорганизмы ответственны за минерализацию органических веществ до углекислого газа. Остатки органики, которые не готовы минерализоваться могут быть сохранены в гумусе. Эти естественные системы и используют в повышении биогенности почвы, и очищении окружающей среды от поллютантов (Bollag, 1994).

Эффективным вариантом биоремедиации является биоаугментация, основанная на внесении в почву в больших количествах популяций специализированных микроорганизмов, которые способны улучшить фитосанитарное состояние почвы, изменяя состав и численность почвенной микробиоты (Гродницкая, Сорокин, 2006). К микроорганизмам, используемым в биоремедиации относят бактерии, в том числе клубеньковые и почвенные актиномицеты (например, род *Frenkia*), микоризные и эктомикоризные грибы (Jasper, 1994).

В природе большая часть органики минерализуется с использованием кислорода, как конечного акцептора электронов. Этот процесс (окисление) осуществляется аэробными микроорганизмами, которые способны успешно минерализовывать большое количество ксенобиотиков. В контрасте с оксигензависимым метаболизмом аэробной части почвы, другие электронные акцепторы вовлекаются в микробную деградацию в анаэробных условиях, при которых осуществляются процессы нитрификации (нитрификаторами), метаногенез и сульфатредукция (метаногенами и сульфатредукторами). Например, такие компоненты как бензин и его производные могут быть полностью минерализованы до углекислого газа или трансформированы в клеточных стенках при анаэробных условиях (Bollag, 1994).

В большинстве случаев биоремедиационные технологии применяют бактериальную активность, однако все больше появляется сведений об использовании грибов и их метаболитов (Atagana et al., 2006). Отмечено, что эти микроорганизмы способны разрушать высокомолекулярные полициклические ароматические гидрокарбонаты и другие устойчивые органические компоненты в лабораторных условиях. Благодаря использованию внеклеточных и других ферментных систем, присутствующих у грибов в естественных условиях, становится возможным применение грибов, например, в ремедиации почв, загрязненных креазотом, который содержит высокомолекулярные вещества резистентные к бактериальной деградации (Atagana et al., 2006).

Известно, что грибы обладают большим разнообразием и поразительной

способностью разрушать различные сложные комплексы, и стойкие природные полимеры, такие как легнин, хитин, и микрокристаллы целлюлозы. Еще одним преимуществом грибов в сравнении с бактериями является наличие у них гифального роста, позволяющего с высокой скоростью занять большие территории (Atagana et al., 2006). Грибы способны расти в природе даже в условиях стрессов, таких как, низкая доступность питательных веществ, низкая водная активность и уровни pH, где рост бактерий может быть ограничен. Кроме того, у мицелиальных грибов отмечена способность проникать в нерастворимые субстраты, такие как масляные (нефтяные) сгустки, иницируя смену другими микроорганизмами и повышая тем самым скорость деградации нефти (Atagana et al., 2006).

Иногда поллютанты не могут быть напрямую ассимилированы определенными микроорганизмами, но вместо этого поддаются трансформации со стороны других популяций. Эти комменсальные взаимоотношения могут значительно повысить минерализацию устойчивых загрязнителей и предотвратить аккумуляцию токсических побочных веществ (Bollag, 1994). Поэтому еще одним вариантом для микробиологической биоремедиации являются микробные консорциумы, они могут обеспечить большую ферментативную эффективность и создать больше метаболических цепей, чем при применении одного вида (Atagana et al., 2006). Отмечено, что смесь сообществ микроорганизмов может быть наиболее эффективной в минерализации некоторых поллютантов, таких как хлористые гидрокарбонаты и алкилбензол сульфанола, чем отдельные виды бактерий. Микробные консорциумы также уже были успешно применены в ремедиации почв, загрязненных одновременно тяжелыми металлами и дизельным топливом (Chen et al., 2011).

В связи с развитием молекулярной биологии для получения более эффективных в биоремедиации микроорганизмов стало возможным использование генетических методов, например, через мутации ультрафиолетом, этот метод может ускорить процесс «одомашнивания», наблюдаемый у позитивных мутантов (Chen et al., 2011). Способность микроорганизмов минерализовывать поллютанты может также быть повышена через генетические вариации – новые бактериальные

образования за счет конъюгации, трансдукции, и трансформации (Bollag, 1994).

Отбор и приручение высоко эффективных штаммов – важная работа, которая приведет к повышению экофизиологического статуса почвы и ее очищению от поллютантов (Chen et al., 2011). Применение микроорганизмов в биоремедиации способствует более полному и ускоренному очищению бедных и загрязненных почв, что одновременно способствует повышению роста растительной продукции (Jasper, 1994).

Таким образом, для решения одной из самых главных проблем плохого фитосанитарного состояния почв лесопитомников необходимо внедрение методов биоремедиации, что позволит улучшить лесорастительное состояние почвы – основу получения здорового посадочного материала для эффективного лесовосстановления.

1.2.1. Интегрированная защита растений при выращивании сеянцев хвойных в питомниках

При выращивании растений в искусственных условиях часто возникают различные заболевания, вызываемые бактериями и грибами. Известно, что предотвратить заболевание легче, чем потом бороться с ним, особенно с бактериозами, где индивидуальный подход затруднен и практически невозможен. Для рациональных профилактических мероприятий необходимо знать биоэкологию возбудителя, пути миграции и проникновения в растение, его природные резервативы, а также структуру и состояние почвы.

Следовательно, для того чтобы достичь устранения болезни и ее причин необходимо воздействие на растение, возбудителя болезни и на те условия, в которых развивается растение, путем использования взаимосвязей системы «растение – возбудитель болезни – среда» (Рыбалко, Гукасян, 1986; Foth, 1990). В связи с чем, важную роль при проведении лесоохранных мероприятий играет комплексный, интегрированный подход к защите леса от инфекционных заболеваний.

Решением проблем, возникающих при выращивании сеянцев хвойных в питомниках, является интегрированная защита растений (ИЗР). Основой ИЗР является: применение методов агротехнической профилактики; использование приемов, которые сохраняют и способствуют развитию энтомофагов; посев устойчивых сортов сельскохозяйственных / лесоводческих культур; применение методов активного подавления вредоносности возбудителей (автоцидный метод, биологические и химические средства защиты растений) (Миренков, 2008; Пак, Бобринев, 2013; Острошенко др., 2015).

Традиционно для предотвращения поражения и развития заболеваний сеянцев и получения здоровых растений при искусственном лесовозобновлении применяют различные химические препараты, такие как пестициды, гербициды, фунгициды и т.д. (Дурынина, Великанов, 1984; Рыбалко, Гукасян, 1986; Холодов, 2003). Часто для контроля болезней и борьбы с патогенными грибами применяют фунгициды (в том числе и синтетические), которые подразделяют на защитные и лечащие (Дурынина, Великанов, 1984; Suprapta, 2012). Защитные (профилактические) фунгициды предупреждают заболевания, они создают барьер для новых патогенов, лечащие – уничтожают уже проникших паразитов (Дурынина, Великанов, 1984). Кроме того, фунгициды подразделяют на системные и контактные, первые проникают внутрь растений и делают их непригодными для нормального развития грибов, вторые не проникают в растения, а остаются на поверхности. Доказано, что обработка фунгицидами способствует сокращению грибных инфекций, которые могут конкурировать за влагу и питательные вещества с семенами, предотвращают рост грибов, продуцирующих токсины (например, афлотоксины) (Дурынина, Великанов, 1984; Suprapta, 2012).

Конечным результатом применения пестицидов является их хозяйственная и экономическая эффективность, однако биологическую эффективность определить невозможно, поскольку биота (как вредная, так и полезная для роста растений) подвержена влиянию различных факторов, ядохимикаты часто снижают ее активность и численность, что приводит к образованию большого количества резистентных форм и фитопатогенов (Миренков, 2008).

К сожалению, этот способ защиты растений имеет и негативную сторону, сегодня из 70 000 видов пестицидов, находящихся на рынке, 10 % являются особо опасными (Тимофеева, Актуганов, 2011; Suprapta, 2012). Согласно Стокгольмской конвенции об устойчивых органических загрязнителях 10 из 12 наиболее опасных и устойчивых органических химикатов являются пестицидами (Cawoy, Bettiol, 2011). Это значит, что их применение ведет к серьезным экологическим проблемам (Рыбалко, Гукасян, 1986; Suprapta, 2012).

На конец прошлого века самая большая пестицидная нагрузка была в Бельгии (11.89 кг/га) и Голландии (10.97 кг/га), меньшая — в Швеции, Польше (по 0.60 кг/га) и Финляндии (0.54 кг/га), в России — 0.287 кг/га, а на начало XXI века (в России на 2002 г.) — 0.264 кг/га (Миренков, 2008). Сегодня в России существует гигиеническая классификация пестицидов, учитывающая токсичность при введении в желудок, при поступлении через кожу, степень летучести, свойство кумуляции и степень стойкости. Также существует и более объективная шкала Соколова, Стрекозова (1970 г.), она выражается суммой оценочных баллов по ряду показателей: 1) количество баллов от 0 до 13 — малоопасные; 2) 14–21 среднеопасные; 3) более 21 — опасные. Пестициды должны отвечать требованиям биологической, экономической эффективности, достаточной селективностью, персистентностью, экологичностью (Миренков, 2008).

Таким образом, сегодня для наиболее качественного восстановления нарушенных и истощенных почв эффективна интегрированная защита растений, которая, во-первых, нацелена на биоремедиацию почвы, во-вторых, способствует лучшему росту и развитию растений, при этом являясь экологически безвредной и экономически выгодной.

1.2.2. Микробиологические методы в защите растений и улучшении фитосанитарного состояния почв лесных питомников

В связи с повышением резистентности патогенов растений к фунгицидам, истощением почв, внедрением законодательно запрещенных пестицидов и

попыток решения ряда глобальных проблем, связанных с человеческим здоровьем и защитой окружающей среды, в начале двадцатого века была разработана концепция биологического контроля, как альтернатива механического и химического метода (Bailey, 2005; Алимова, 2006). Биологический метод (БМ) основан на использовании растений, животных и микроорганизмов, знаний о взаимоотношениях между организмами (Higa, Parr, 1994; Миренков, 2008; Сурина, Сеньков, 2011; Cawoy, Bettiol, 2011).

Наибольший интерес сегодня прикован к биологическому методу, оперирующему непосредственно микроорганизмами или продуктами их жизнедеятельности, поэтому также его называют микробиологический метод (ММ) или микробиометод. Основой, благодаря которой возможно применение микроорганизмов, как агентов биологической защиты, является тесная взаимосвязь между компонентами системы «растение-почва-микроорганизм» (Duffy et al., 2003; Миренков, 2008). Между растениями и микроорганизмами, сапротрофами и патогенами, складывается большое количество отношений разного характера (хищничество, паразитизм, гиперпаразитизм, симбиоз, мутуализм, комменсализм, антибиоз) (Егоров, 1979; Биологическая защита ... , 2004; Миренков, 2008; Экология растений, 2009; Кирилова, 2013). Немаловажное значение из них для биозащиты имеют механизмы, способствующие подавлению возбудителей болезней растений – это применение гиперпаразитов (например, грибов, вирусов) и использование микроорганизмов-антагонистов по отношению к возбудителям болезней (антибиоз) (Биологическая защита ... , 2004).

Гиперпаразитизм (сверхпаразитизм) часто встречается в природе. Некоторые микромицеты способны паразитировать на патогенных для растений грибах (явление микофильности), то есть используют их как субстрат. К антибиозу способны многие бактерии (особенно актиномицеты) и грибы. Основа этого явления заключается в том, что антагонисты могут ингибировать частично или полностью рост другого организма в пределах зоны их влияния, (Биологическая защита ... , 2004; Luna-Romero, Carvajal, 2007; Экология растений, 2009).

Следовательно, сущность ММ заключается в уничтожении или торможении

развития возбудителя с помощью действия прямого антагонизма (или других механизмов) других микроорганизмов или продуктов их метаболизма (Рыбалко, Гукасян, 1986). И так как биологический контроль – многообещающий инструмент поддержки текущего уровня продукции растений, позволяющий сократить выбросы загрязняющих химических пестицидов в окружающую среду, ММ является альтернативой химическому методу защиты (Higa, Parr, 1994; Mansour, Hussein, 2006; Бондарь, Садыкова, 2007; Mishra, Mishra, 2011; Кирилова, 2013). Кроме того, ММ основан на сохранении и насыщении биоценозов активными микроорганизмами, этот метод защиты растений от болезней не ставит задачу полного уничтожения вредных организмов, а ориентирован на регулирование численности популяции патогена на уровне ниже экологического порога вредоносности (Бондарь, Садыкова, 2007; Кирилова, 2013). В данном методе используются различные микроорганизмы (грибы, актиномицеты, бактерии), биопрепараты, антибиотики и другие средства, воздействующие на возбудителей инфекционных болезней растений, сегодня в мире используют около 2 тысяч наименований биологических агентов (Рыбалко, Гукасян, 1986; Сурина, Сеньков, 2011). Преимущество ММ в том, что бактерии (в том числе актиномицеты), грибы и дрожжи – широко распространены в окружающей среде и обнаружены на растениях и в почве (Bailey, 2005).

Именно поэтому микроорганизмы, отобранные для биологического контроля, должны быть активные и стабильные ризосферные штаммы, конкурентоспособные при попадании в новые уже сложившиеся условия, способные к быстрой адаптации. При их использовании необходимо учитывать свойства и состав микрофлоры почвы, ее структуру и тип, а также физиологию выращиваемых растений (Дурынина, Великанов, 1984; Sawoy, Bettiol, 2011). Кроме того, такие микроорганизмы должны благоприятно воздействовать на растения и быть физиологически и экологически совместимы друг с другом (возможно в виде смешанных культур), способны стимулировать рост растений путем синтеза различных метаболитов гормональной и сигнальной природы (ауксины, цитокинины, гибберелины, абсцизовая, салициловая и жасминовая кислоты и т.д.)

(Дурынина, Великанов, 1984; Higa, Part 1994; Чеботарь и др., 2015). Эти вещества помогают растениям сформировать лучшую корневую систему, активировать метаболические функции клеток, повысить коэффициент поглощения воды и питательных веществ с большей площади, способствуют устойчивости к болезням, позволяют растениям ускоренно проходить наиболее чувствительные к патогенам стадии своего раннего развития. Кроме того, выработка микроорганизмами гормонов, способствует экзогенному регулированию процессов роста и развития растений и формирует у них устойчивость к ряду абиотических и биотических факторов внешней среды (Чеботарь и др., 2015).

Поэтому в настоящее время активно проводится поиск штаммов бактерий и грибов, которые будут являться экологичными и энергосберегающими благодаря их комплексной фунгицидной, бактерицидной и нематоцидной активности (Higa, Part, 1994; Романенко, Попов, 2008). В связи с чем, наиболее перспективными микроорганизмами для биоконтроля являются те, которые обладают антагонистическими свойствами (Новикова, 2003; Старшов, 2013).

Микроорганизмы-антагонисты являются идеальными кандидатами для биологической защиты по ряду признаков:

1) образуют и выделяют в окружающую среду антибиотические вещества, которые угнетают или полностью подавляют развитие других видов организмов (Егоров, 1979; Шлегель, 1987; Cawoy, Bettiol, 2011). Наиболее изучены антагонистические механизмы, которые связаны с выработкой сидерофоров и синтезом антибиотиков (Голованова и др., 2008). Сидерофоров – это производимые микроорганизмами низкомолекулярные компоненты, обладающие высокой близостью к железу, они растворяют конкурентно приобретенный ион железа и делают его недоступным для патогенных организмов (Cawoy, Bettiol, 2011; Swiontek et al., 2012);

2) способны к синтезу экзометаболических, в том числе ферментов (Шлегель, 1987; Голованова и др., 2008; Swiontek et al., 2012);

3) способны к активной конкуренции за пищевые ресурсы, следовые элементы или экологическую нишу (Егоров, 1979; Cawoy, Bettiol, 2011). При

совместном освоении субстрата различными организмами, которым требуются одинаковые питательные вещества, преимущество в развитии получает микроорганизм, скорость роста которого выше скорости роста других организмов (пассивный антагонизм) (Егоров, 1979);

4) могут изменять физико-химические свойства окружающей среды (уровень pH, фиксация атмосферного азота) (Swiontek et al., 2012);

5) способны к производству и выделению токсических веществ. Образование и выделение микробами органических и минеральных кислот, спиртов, фенолов или других продуктов обмена, происходящее в результате использования отдельных компонентов субстрата, губительно воздействует на другие микроорганизмы (Шлегель, 1987);

6) способны к гиперпаразитизму (насилованный антагонизм) – т.е. попадая в условия с недостатком в среде питательных веществ, могут использовать для своего питания клетки других бактерий или грибов (Егоров, 1979);

7) способны к стимуляции роста и развития растений, т.к. выделяют в процессе жизнедеятельности витамины и гормоноподобные вещества (ауксино- и гиббереллиноподобные), которые способствуют увеличению обмена веществ и всхожести семян, повышению накопления питательных веществ, влияют на характер биохимических процессов, повышая биогенность почвы (Ибрагимова, 1964; Иванчина, Файзуллина, 2007; Голованова и др., 2008; Swiontek et al., 2012; Чеботарь и др., 2015);

8) способны к индукции системной резистентности растений – опосредованно защищают растения за счет фиторегуляторной активности и повышают их болезнеустойчивость (Новикова, Литвиненко, 2011; Cawoy, Bettiol, 2011).

Ни одно из этих свойств не является взаимоисключающим, обычно один микроорганизм (биологический агент) обладает, как правило, несколькими свойствами (Higa, Parr, 1994; Duffy et al., 2003; Cawoy, Bettiol, 2011; Suprpta, 2012). Наличие этих свойств у микроорганизмов-антагонистов определяет их эффективность в борьбе с фитопатогенами, защите от болезней и инфекций.

Микробные агенты эффективны даже в малых концентрациях, поэтому их достаточно в небольших количествах (Duffy et al., 2003; Mansour, Hussein, 2006; Luna-Romero, Carvajal, 2007; Голованова и др., 2008; Романенко, Попов, 2008; Suprpta, 2012).

Таким образом, идеальными кандидатами для улучшения фитосанитарного состояния почвы и защиты растений от патогенов являются микроорганизмы-антагонисты, способные посредством выделения разнообразного количества веществ улучшать биологические показатели почв, а также стимулировать рост и развитие растений.

1.2.3. Наиболее часто используемые микроорганизмы-антагонисты в практике лесного и сельского хозяйства

Попытки использования явления микробного антагонизма в борьбе с болезнями растений относятся еще к началу 1930-х годов (Рыбалко, Гукасян, 1986; Ильяшенко, 2014). Антагонистические свойства изучали различные авторы и пришли к выводу, что наиболее сильным антагонизмом обладают спорообразующие бактерии (р. *Bacillus*) (Егоров, 1979). Со времени их открытия было обнаружено, что численность микроорганизмов зависит от типа почвы, и большая их часть сосредоточена в верхних слоях почвы и в ризосфере (Егоров, 1979; Иванчина, Файзуллина, 2007; Luna-Romero, Carvajal, 2007; Микробиология ... , 2011; Suprpta, 2012; Курамшина и др., 2014). В связи с чем, наиболее важное значение имеют микроорганизмы ризосферы (область вблизи корней различных растений в разных условиях) (Johri et al., 2003; Бондарь, Садыкова, 2007; Ковалева, Лиханова, 2013), так как они используют для питания корневые выделения – экссудаты (жидкости, просачивающиеся из живых тканей корня в почву), секреты (активно выделяемые вещества), лизаты (вещества, высвобождаемые при автолизе клеток корня) и экскреты (конечные продукты обмена) разной природы (сахара, аминокислоты, пептиды, ферменты, витамины, органические кислоты, нуклеотиды) и, в свою очередь, защищают растения от фитопатогенных атак

(Никитина, 1979; Johri et al., 2003; Бондарь, Садыкова, 2007; Иванчина, Файзуллина, 2007; Cawoy, Bettiol, 2011). Фитопатогенные микроорганизмы, являющиеся причиной наиболее серьезных болезней растений, также обитают в большом количестве в ризосфере, создавая фитопатогенный фон (Дурынина, Великанов, 1984; Mansour, Hussein, 2006). Наиболее часто встречаемые фитопатогенные грибы рода *Fusarium* подавляются бактериями родов *Bacillus*, *Kluyvera*, *Lysobacter*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, дрожжами *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* (Cawoy, Bettiol, 2011; Старшов, 2013). Кроме явных и сильных патогенов присутствуют и микроорганизмы, обладающие высокой сапротрофностью (факультативные или облигатные паразиты), «минорные» патогены, обладающие несильной вредоносностью, либо их повреждения не опасны для растений (Дурынина, Великанов, 1984). К таковым относятся роды *Calonectria*, *Cylindrocarpon*, *Polymyxa*, *Henderonia*, *Lagenocystis*, *Nitrospora*, *Acremonium*, *Olpidium*, однако отмечено, что при определенных условиях «минорные» патогены могут вызывать различные заболевания, они могут усилить действие других корневых паразитов, либо самостоятельно поражать проростки (Дурынина, Великанов, 1984).

В ризосфере содержится много антагонистических микроорганизмов, продуцирующих обильное количество антибиотиков (Cawoy, Bettiol, 2011). Поэтому именно из этой области чаще всего выделяют микроорганизмы-антагонисты, являющиеся идеальными претендентами на роль биоконтрольных агентов (Luna-Romero, Carvajal, 2007; Suprpta, 2012), и на их основе производят коммерческие продукты, активность которых направлена именно на ризосферных патогенов (Иванчина, Файзуллина, 2007; Luna-Romero, Carvajal, 2007). В связи с этим успех того или иного микроорганизма, как биоконтрольного агента, зависит от его способности конкурировать *in situ* с растительной прикорневой микрофлорой против патогенных атак (Luna-Romero, Carvajal, 2007). Литературные данные свидетельствуют, что такие интродуценты в ризосфере и ризоплане растений проявляют более выраженное антигрибное действие, чем в почве без растений (Новикова, Литвиненко, 2011).

Среди биологически активных видов микроорганизмов, выделяемых из ризосферы, много как бактерий, так и грибов, все они обладают комплексной активностью – фунгицидной, бактерицидной и нематоцидной.

Наибольшая группа микроорганизмов из них относится к споровым бактериям рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. mesentericus*, *B. brevis*, *B. polymyxa*), которые представлены большим генетическим разнообразием, присутствуют в различных условиях окружающей среды – в воде, почве и даже в горячих источниках (Егоров, 1965; Новикова, 2003; Биологическая защита ... , 2004; Романенко, Попов, 2008; Sawoy, Bettiol, 2011; Swiontek et al., 2012; Добровольская и др., 2016). Этот род включает гетерогенную группу грамположительных аэробных или факультативно анаэробных, эндоспороформирующих бактерий (Теппер, 1979; Monteiro, Mariano, 2005), термотолерантных структур, резистентных к засухе, ультрафиолету и условиям pH (Monteiro, Mariano, 2005; Ondena, Jacques, 2007). Бактерии из р. *Bacillus* являются одними из главных кандидатов в качестве потенциальных микробных биопестицидов, так как обладают следующими ценными характеристиками (Monteiro, Mariano, 2005; Павлюшин и др., 2010; Новикова, Литвиненко, 2011; Новикова и др., 2013):

- 1) хорошо изучены и используются как удобрения;
- 2) имеют статус «допущены как безопасные» по рекомендациям управления по санитарному надзору за качественными пищевыми продуктами и лекарствами;
- 3) споры р. *Bacillus* обладают повышенной резистентностью в состоянии покоя, они устойчивы при высоких температурах, неблагоприятных pH, в отсутствии питательных веществ и воды, что помогает этим микроорганизмам длительно выживать в фитосфере;
- 4) обладают различными механизмами действия (образование комплекса ферментов, синтеза антибиотических веществ, конкуренцией за экологическую нишу/субстрат в ризосфере и индукцией системной резистентности у растения хозяина) и эффективны в различных условиях окружающей среды, то есть они полифункциональны (Monteiro, Mariano, 2005; Кузин и др., 2013);

5) производят различные биологически активные вещества, например, первые, наиболее изученные липиды – сурфактины, миурины и фенгицины, обуславливающие антагонистическую активность против широкого диапазона потенциальных фитопатогенов, включая бактерии, грибы (Yilmaz et al., 2006; Ondena, Jacques, 2007; Janarthanam, Georg, 2012). Они также производят ряд антибиотиков (субтилин), цвиттермицин (*Bacillus cereus*), тиротрицин, грамицидин С, полимиксин (Егоров, 1965), молекулы-ингибиторы роста патогенов (канозмин или звитермицин А) (Ondena, Jacques, 2007), способны подавлять рост ряда патогенов – pp. *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Alternaria* (Павлюшин и др., 2010);

6) некоторые виды способны к стимуляции роста растений за счет колонизации поверхности корня и выделения вторичных метаболитов (Тимофеева, Актуганов, 2011).

Разнообразное количество штаммов рода *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides* и *B. pumilus*) известны, как эффективные производители антибиотических молекул (Cawoy, Bettiol, 2011).

В настоящее время уделяют большое внимание таким бактериям-антагонистам как *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, которые обладают способностью производить различные биологически активные вещества (антибиотики, ферменты) (Новикова, 2013; Курамшина и др., 2014).

Bacillus subtilis – аэробная спорообразующая бактерия (сенная палочка), на питательной среде образует выпуклые колонии ризоидной формы (Теппер, 1979; Биологическая защита ... , 2004), обладает разнообразными механизмами действия (конкуренцией за экологическую нишу, антибиозом, повышенной индуцированной системной резистентностью растений) (Yilmaz et al., 2006; Ondena, Jacques, 2007). Известно, что штаммы вида *B. subtilis* проявляют антагонистическое, бактериолитическое и противогрибное действие к различным фитопатогенным бактериям и грибам, способны регулировать динамику численности грибов (*F. oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *Rhizoctonia solani*), лизируя их клеточную стенку, тем самым влияя на видовой

состав фитопатогенных грибов в биоценозах (Актуганов и др., 2001; Биологическая защита ... , 2004; Новикова, Литвиненко, 2011; Cawoy, Bettiol, 2011; Курамшина и др., 2014).

У *B. subtilis* обнаружена способность к синтезу 26 структурно разнообразных по составу антибиотиков (за это отвечает 4–5 % генома), например, антибиотики бацитрацин, грамицидин S, субтимин, полимиксин, тиротрицидин (Биологическая защита ... , 2004; Yilmaz et al., 2006; Cawoy, Bettiol, 2011). В это же время они способны к синтезу циклических липопептидов (итурин, микосубтилин, миенизин и фенгицин), антибиотиков и ферментов (хитиназа и глюконаза) (Ondena, Jacques, 2007; Cawoy, Bettiol, 2011; Чеботарь и др., 2015). На основе штаммов *B. subtilis* производят большое количество препаратов, например, алирин-Б и гамаир, *Bacillus subtilis* М-22 и *Bacillus subtilis* Н5-(2)23 (Новикова и др., 2013; Потехина и др., 2013).

Менее известным претендентом на роль в ММ является вид *Bacillus amyloliquefaciens*, способный производить миенизин и фенгицин, которые в настоящее время не полностью изучены (Ondena, Jacques, 2007).

Как регуляторы фитопатогенов также известны неспоровые сапротрофные ризосферные бактерии, обладающие способностью выделять во внешнюю среду антибиотики, к таким микроорганизмам относят бактерии р. *Pseudomonas* (производят пептидные антибиотики), р. *Streptococcus*, р. *Staphylococcus*, некоторые представители р. *Burkholderia*. Среди псевдомонад интересны *Pseudomonas putilda*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aureofaciens* Kluyver, флюоресцирующее формы – *Pseudomonas pyocyanea*, *Pseudomonas fluorescens* (флюоресцирующие зеленым и красным пигментом) (Егоров, 1965; Егоров, 1979; Рыбалко, Гукасян, 1986; Новикова, 2003; Биологическая защита ... , 2004; Luna-Romero, Carvajal, 2007; Романенко, Попов, 2008; Шабаев, 2010; Swiontek et al., 2012; Добровольская и др., 2016). Псевдомонады важны для повышения экологического состояния почв, так как они способны фиксировать молекулярный азот, высвобождать фосфаты из нерастворимого минерального сырья (Пат. 2451069, 2010; Шабаев, 2010), а также принимать активное участие в процессах

минерализации (Романенко, Попов, 2008). Способность высвобождать фосфаты особенно важна, поскольку только 5–25 % вносимого с удобрениями фосфора ассимилируется растениями, остальной – быстро связывается в почве.

Механизм подавления патогенов псевдомонадами – антибиоз и конкуренция, виды р. *Pseudomonas* способны подавлять патогенные формы микроорганизмов за счет производства антибиотиков и других биологически активных метаболитов, которые способны лизировать хитин (то есть проявляют миколитические и антибиотические свойства). Еще одним их важным свойством является способность стимулировать рост растений, вырабатывая гормоноподобные вещества (стимуляторы роста), а также повышать индуцированную системную резистентность. Псевдомонады вырабатывают сидерофоры, образующие стабильный комплекс с трехвалентным железом, тем самым делая его недоступным для фитопатогенных микроорганизмов. К таким сидерафорам относят псевдобактерин (пиовердин) – желто-зеленый флюоресцирующий пигмент, и нефлюоресцирующий сидерофор – псевдобактерин А (Рыбалко, Гукасян, 1986; Luna-Romero, Carvajal, 2007; Романенко, Попов, 2008).

Кроме того, представители рода *Pseudomonas* продуцируют антибиотики – 2,4-диацетилфлороглюцинол, пиоцианазу, пиоцианин, пирролнитрин, β -лактоны, обофлюорин, а также феназин-1-углекислоту, феназин-1-карбоновую кислоту – эффективные против грибов и актиномицетов (*Cochliobolus satious*, *Pythium heterothallicum*, *Pythium volutum*) (Kaszubiak, 1998; Duffy et al., 2003; Биологическая защита, 2004; Романенко, Попов, 2008; Suprpta, 2012). Таким образом, изоляты из р. *Pseudomonas* эффективны против патогенов родов *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. lini*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*), *Alternaria* (*Al. alternate*), *Erysiphe* (*E. cruciferarum*), *Ophiobolus*, и болезней, вызванных грибами pp. *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Botrytis* (*Botrytis elliptica*), *Sclerotinia*, *Penicillium*, *Pyricularia* и *Gaeumannomyces* (Рыбалко, Гукасян, 1986; Luna-Romero, Carvajal, 2007; Романенко, Попов, 2008; Пат. 2451069, 2010; Suprpta, 2012). Так, на основе видов рода *Pseudomonas* существует большое количество биопрепаратов, например, нитрагин, Агат +25-К (на основе инактивированных

псевдоманад и продуктов их жизнедеятельности), ризобин, эковитал, бактофосфорин, экофосфорин и др. (Звягинцев, 2011).

Среди актинобактерий найдено достаточно большое количество антагонистов. Еще в конце прошлого века многие исследователи выделяли роды *Streptomyces* и *Micromonospora*, как наиболее эффективные производители антибиотиков среди других актиномицетов (актинобактерий) (Егоров, 1979; Зенова и др., 2011; Suprapta, 2012).

Актинобактерии – нитчатые грамположительные бактерии, встречаются во всех почвах и широко распространены в наземных и водных экосистемах (Dhanasekaran, Thajuddin, 2008). Чаще всего большое количество актиномицетов встречаются в хорошо унавоженных почвах, которые содержат много перегноя (парники, оранжереи, огороды) (Егоров, 1965). Актиномицеты-антагонисты распределены в почве неравномерно, их количество зависит от условий (тип почвы, рельеф, pH и др.), причем их содержание в большей мере зависит от типа почвы, чем от вида растительности (Егоров, 1965; Болормаа и др., 2013).

Среди грибов также отмечено большое количество антагонистов (около 30 000 видов), при этом они играют важную роль, как агенты биологического регулирования фитопатогенов, так как они обладают широким спектром антагонистических свойств (гиперпаразитизм, конкуренция) (Егоров, 1965; Егоров, 1979; Биологическая защита ... , 2004). Основные представители грибов-антагонистов – роды *Trichoderma* и *Aspergillus*, которые также обладают способностью к синтезу антибиотиков: гризеофульвина, касумина, полиоксина, трихотецина (Егоров, 1979; Рыбалко, Гукасян, 1986; Романенко, Попов, 2008; Sawoy, Bettiol, 2011; Swiontek et al., 2012; Добровольская и др., 2016).

К наиболее изученным и перспективным грибам-антагонистам, эффективным в восстановлении лесорастительного состояния почвы и, являющимися агентами биологической защиты растений, относят грибы рода *Trichoderma*. Штаммы р. *Trichoderma* обладают антигрибной, антибактериальной и нематоцидной активностью (Cortes, Gutierrez, 1998; Кабрера Фуентес, Мухаметшина, 2002; Биологическая защита ... , 2004; Ozbay, Newman, 2004;

Гарибова, Лекомцева, 2005; Алимова, 2006; Бондарь, Садыкова, 2007; Голованова и др., 2008; Миренков, 2008; Степанов, 2009; Suprapta, 2012; Старшов, 2013; Mukherjee, Horwitz, 2013).

Представители рода *Trichoderma* – нитевидные грибы, присутствующие почти во всех почвах и других разнообразных средах обитания, обнаружены на различных континентах, их немного в северных почвах, а при снижении широты численность заметно увеличивается. Их видовое разнообразие выше в целинных почвах, меньше – в антропогенных (Биологическая защита ... , 2004; Бондарь, Садыкова, 2007; Mishra, Mishra, 2011; Старшов, 2013; Садыкова и др., 2015). Большинство видов почти не требовательны к условиям окружающей среды, но оптимальные условия температуры и влажности для своего развития, и нормальной жизнедеятельности им все же необходимы. Так сибирские штаммы имеют температурный диапазон от 10 до 35°C, по большей части виды рода *Trichoderma* являются мезофилами (оптимум от 20 до 25°C), некоторые хорошо растут при 10°C (Садыкова и др, 2013).

Наличие видовой приуроченности триходермы к определенному типу почв до сих пор с точностью не выявлено (Громовых и др., 2001). Грибы рода *Trichoderma* распределены в почве довольно неравномерно, хотя единого мнения по этому вопросу нет. Однако отмечено, что более обильно они развиваются в богатых органическими остатками почвах (Берсенева, 2008). В связи с тем, что *T. harzianum* обладают антагонистической, антибиотической и микопаразитической активностью, многие исследователи считают, что эти механизмы обеспечивают возможность развиваться в самых разнообразных почвах (Берсенева, 2008; Mishra, Mishra, 2011; Садыкова и др., 2015). Согласно исследованиям А. В. Александровой (2000), видовое обилие грибов рода *Trichoderma* распределяется в почве следующим образом: 1) *T. viride* (наиболее широко распространен, особенно на Дальнем Востоке и центральной России); 2) *T. citrinoviride* Bissett (в центральной части России); 3) *T. hamatum*, *T. polysporum* – на территории средней Сибири; 4) *T. asperellum* широко представлен в Южной части России, а *T. virens* распространен на Дальнем востоке (Берсенева, 2008).

С момента описания этого рода число видов существенно возросло (Садыкова, 2012). Так, благодаря развитию молекулярно-генетического анализа старую систематику р. *Trichoderma*, основанную на морфологических критериях, пересмотрели. Благодаря мультигенному филогенетическому анализу число новых видов систематически увеличивается и с каждым днем продолжает расти, так в 2002 г. число видов *Trichoderma* было 46, к 2005 г. – 88, к 2006 г. – 110 видов (Raich, Schlesinger, 1992; Caron et al., 2002; Садыкова, 2012). Чаще всего выделяется вид *T. asperellum* – 37.9 %, при этом, он в основном является почвенным (Громовых и др., 2001; Садыкова, 2012). Следом, по частоте встречаемости, идет вид *T. harzianum* – 26.1 %, выделяемый обычно из целинных и антропогенных почв, а также из подстилки, но не найденный на семенах, листьях и шишках злаковых и хвойных растений. На долю вида *T. viride* приходится 10.5 % (подстилка, лесной опад, ризосфера корней). На четвертом и пятом месте находятся виды *T. citrinoviride* (8.5 %) и *T. longibrachiatum* (5.2 %), соответственно. Их выделяют из почв богатых органикой (подстилки, верхние горизонты почв). В гниющей древесине, хвое, шишках, корневой системе деревьев и верхнем горизонте целиной почвы обнаруживается вид, занимающий шестое место – *T. koningii* (4.2 %), а самыми редкими и малочисленными являются виды *T. hamatum* (3.8 %) и *T. atroviride* (3.7 %), выделяемые из глубоких почвенных горизонтов (Садыкова, 2012), при этом виды *Trichoderma koningii*, *T. viride*, *T. polysporum* встречаются чаще в целинных почвах, чем в питомниках (Якименко, Гродницкая, 2000).

Таким образом, грибы рода *Trichoderma* являются единственным родом, у которого все виды представлены в генетическом банке данных (по крайней мере 1 геном) (Алимова, 2006; Mukherjee, Horwitz, 2013). Кроме вышеперечисленных видов рода *Trichoderma*, еще 9 других цитируются в литературе (система PubMed) чаще, чем *T. reesei* и *T. harzianum*. В литературе отмечено, что по исследованию ДНК представителей р. *Trichoderma*, выявленные 16 последовательностей из 1319 относятся к внутренним транскрибируемым последовательностям ITS (Алимова, 2006). Также, есть данные о 64 последовательностях гена *chit42* и 32 последовательности гена *tefl*, которые определены и используются в

таксономических исследованиях. Уже определены несколько генов кодирующих внеклеточные гидролазы, которые придают грибам р. *Trichoderma* литическую и антагонистическую активности. Например, к таким ферментам относят эндохитиназы, β -N-ацетилгексоаминиазы, протеазы, липазы, ксиланазы, пектиназы, амилазы, РНКазы, ДНКазы и др. (Алимова, 2006). Геном микопаразитических видов имеет богатый генетический код для подавления других грибов, это гены ответственные за синтез антибиотиков, ферментов деградирующих клеточную стенку, и отвечающие за самозащиту вещества (Mukherjee, Horwitz, 2013).

Как уже было отмечено, основными механизмами действия грибов р. *Trichoderma* являются антагонизм, микопаразитизм (гиперпаразитизм) и конкуренция за источники питания (Биологическая защита ... , 2004; Старшов, 2013; Mukherjee, Horwitz, 2013). Наиболее важным для биозащиты растений от фитопатогенов является микопаразитизм микромицета *Trichoderma*, происходящий следующим образом:

1) взаимодействие и узнавание хозяина; микопаразитизм начинается с узнаванием добычи благодаря использованию диффузных сигналов, таких как олигохитины (Mukherjee, Horwitz, 2013). Гриб-гиперпаразит (триходерма) растет в направлении к гифам гриба-хозяина (фитопатогена), при этом клетки гиперпаразита выделяют экзоферменты (например, хитинолитические и глюколилитические), которые разрушают клетки фитопатогена, а метаболиты триходермы стимулируют направленный рост ее мицелия (Алимова, 2006; Миренков, 2008; Sawoy, Bettiol, 2011);

2) после взаимодействия триходермы и фитопатогена наступает их физическое и молекулярное взаимодействие. Триходерма выделяет антигрибные вещества (ферменты, антибиотики), оплетает гифы фитопатогена (гриба-хозяина), формируя структуру схожую с апрессориями, после чего происходит перфорация клеточной стенки фитоптогена. При контакте микопаразит прикрепляется к хозяину (вероятно благодаря гидрофобным белкам), сопровождаемый формированием папилл (бугорков) или апрессорийподобных структур и

микопаразитических витков. Витки гиф могут быть частью более сложного ответа на волокнистый субстрат (Миренков, 2008; Mukherjee, Horwitz, 2013);

3) заключительным этапом становится полная колонизация хозяина. Гриб триходерма проникает в мицелий хозяина, усиливает свой рост и развитие внутри клеток фитопатогена, что и приводит его (патоген) к гибели. Выделяемые при этом ферменты гиперпаразита разрушают клеточную стенку хозяина, полностью его колонизируя (Миренков, 2008). Производство хитиназ, глюконаз, и протеаз помогает облегчить поток питательных веществ в «тело» микопаразита и проникновение в тело хозяина. Таким образом, *Trichoderma* парализует ток не только в активные гифы, но также и в покоящиеся структуры (пропагулы) (Mukherjee, Horwitz, 2013). Гены, связанные с микопаразитизмом транскрипционально отвечают на добычу – экспрессируют в течении взаимодействия видов *Trichoderma* с растительным патогеном. Микопаразитизм является наследственной чертой триходермы, есть его разновидность при котором хозяин погибает, а есть биотрофический микопаразитизм, при котором хозяин не погибает (Mukherjee, Horwitz, 2013).

Все эти механизмы помогают эффективно воздействовать на фитопатогены: подавлять рост (путем инактивации ферментов патогенов), быстро вытеснять их из микрофлоры почвы. Благодаря наличию таких механизмов р. *Trichoderma* подавляет развитие возбудителей разнообразных инфекций (Raich, Schlesinger, 1992; Duffy et al., 2003; Биологическая защита ... , 2004; Алимова, 2006; Голованова и др., 2008; Sawoy, Bettiol, 2011; Бондарь, 2011; Старшов, 2013).

Еще одной важной чертой грибов рода *Trichoderma* является способность положительно влиять на рост и развитие растений за счет: производства ряда физиологически активных веществ (фитогормонов, витаминов), повышения системно-индуцированной резистентности растений, и устойчивости к стрессам посредством развития корневой системы, за счет растворения и разложения субстратов до доступных питательных веществ (Тулемисова, 1990; Raich, Schlesinger, 1992; Новикова, 2003; Duffy et al., 2003; Биологическая защита ... , 2004; Гродницкая, Сорокин, 2006; Голованова и др., 2008; Миренков, 2008;

Бондарь, 2011; Sawoy, Bettiol, 2011; Старшов, 2013; Mukherjee, Horwitz, 2013). Стимуляция роста растений этим микромицетом, как было отмечено, происходит также за счет повышения содержания хлорофилла в растениях, что было отмечено Т. И. Головановой (2008). Показано, что род *Trichoderma* также способен взаимодействовать с тканями растений, выделяя экзометаболиты, которые проникая в растения, включаются в их метаболизм, что вероятно стимулирует ростовые процессы. Также отмечена способность грибов повышать фунгицидную активность клеточного сока растений, повышая тем самым его иммунитет (Голованова и др., 2008; Миренков, 2008; Бондарь, 2011). Известно, что грибы рода *Trichoderma* обладают еще одним важным качеством для растений, они способствуют увеличению поглощения ряда питательных веществ (меди, фосфора, железа, марганца и натрия) в корнях гидропонной культуры и в аксеничных условиях, а также они стимулируют активность инвертазы, каталазы, амилазы, уреазы растений, повышая интенсивность окислительно-восстановительных процессов фотосинтеза (Голованова и др., 2008; Старшов, 2013).

Грибы р. *Trichoderma* являются типичными сапротрофами, они оказывают большое влияние на почвообразовательные процессы, улучшают структуру и плодородие почвы, участвуют в создании гумуса, благодаря биоконверсии и минерализации различных органических остатков. Они выполняют разнообразные функции первичной и вторичной продуктивности, разложения растительных, животных остатков, переводя элементы из геологического круговорота в биологический (Биологическая защита ... , 2004; Гродницкая, Сорокин, 2007; Берсенева и др., 2008; Бондарь, 2011; Садыкова, 2012). Виды рода *Trichoderma* не только активно участвуют в разложении органических соединений, но и в процессах аммонификации и усилении мобилизации фосфора и калия, обогащая почву подвижными формами питательных веществ (Старшов, 2013). Являясь неотъемлемой частью почвенной микрофлоры, микромицеты изменяют видовой состав почвенных грибов, уменьшая плотность различных патогенов (pp. *Fusarium*, *Pythium*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Bipolaris*), и стимулируя рост бактерий рода *Azotobacter* и клубеньковых бактерий, увеличивая численность

сапротрофных микроорганизмов за счет повышения разнообразия микромицетов, тем самым в целом улучшая экологическое (агрохимическое и фитосанитарное) состояние почв искусственных фитоценозов (сельхозугодий, лесных питомников) (Якименко, Гродницкая, 2000; Алимова, 2006; Гродницкая, Сорокин, 2006; Гродницкая, Сорокин, 2007; Берсенева и др., 2008; Бондарь, 2011).

Благодаря активности микромицета р. *Trichoderma* создание эффективных препаратов возможно не только на основе живых грибов, но и на основе их метаболитов (более 100 различных веществ) – антибиотиков, токсинов (триходермин), ферментов, стимуляторов роста, пептиболов (биологически активные пептиды, содержащиеся между 7 и 20 частями аминокислоты), эпиполитриодиоксопиперазины, легкие и непостоянные терпены, пироны, поликетиды и сидерафоры (Алимова, 2006; Mukherjee, Horwitz, 2013). Однако необходимо отметить, что использование препаратов на основе грибов-антагонистов рода *Trichoderma* зависит от ряда факторов (тип почвы, гидротермические условия, состав и структура микробоценоза и т.д.). В связи с этим, при выборе способа защиты растений стоит выбирать препараты, содержащие аборигенные штаммы микроорганизмов, которые будут более приспособлены к конкретным почвенно-климатическим условиям, поэтому в условиях Сибири особый интерес представляют местные штаммы рода *Trichoderma* (Гродницкая, Сорокин, 2007; Бондарь, 2011).

Наиболее часто используемыми антагонистами р. *Trichoderma* являются: *T. reesei*, *T. virens*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride*, *T. lignorum* (Алимова, 2006; Mukherjee, Horwitz, 2013). В условиях Сибири частыми претендентами на роль в биологической защите являются виды *T. harzianum*, *T. lignorum* и *T. longibrachiatum*.

Trichoderma harzianum – наиболее распространенный агент, основными механизмами действия которого являются гиперпаразитизм и симбиоз с корнями растений (Mukherjee, Horwitz, 2013). Штаммы вида *T. harzianum* активны против ряда патогенов: pp. *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythinm*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Batritys* и других. Установлено, что они способны лизировать мицелий

Sclerotium rolfsii и *Rhizoctonia solani*, и понижать случаи инфицирования ими растений (Raich, Schlesinger, 1992; Кабрепа Фуентес, Мухаметшина, 2002; Ozbay, Newman, 2004; Алимова, 2006; Suprapta, 2012).

Trichoderma lignorum и *T. viride* являются доминантными видами во многих почвах, а также встречаются на поверхности растений, обладают белой грибницей с зеленовато-желтыми участками, конидиеносцы разветвленные, септированные. Биологическая активность грибов связана с их местом обитания, поэтому для биоконтроля более эффективны аборигенные штаммы. *Trichoderma lignorum* и *T. viride* способны ингибировать рост фитопатогенных микроорганизмов (многие виды pp. *Fusarium*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria alternaria* и *Colletotrichum capsici*, и другие виды из родов *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Sclerotium*) за счет микофильности. Механизм действия грибов – конкуренция за питательный субстрат, выделение антибиотиков (виридин, глиотоксин) и угнетение жизнедеятельности фитопатогенов (микопаразитизм) (Raich, Schlesinger, 1992; Якименко, Гродницкая, 2000; Миренков, 2008; Mishra, Mishra, 2011; Cawoy, Bettiol, 2011; Старшов, 2013).

T. longibrachiatum – типичный мезофилл с оптимумом роста 25°C. Быстрорастущие колонии этого гриба образуют большей частью субстратный мицелий, иногда по краю колоний образуется воздушный, белый хлопьевидный. Во время спороношения цвет варьирует от серовато-зеленого до темно-зеленого (Громовых и др., 2001). Показано, что вид *T. longibrachiatum* очень чувствителен к недостатку кислорода, при росте в условиях с ограниченным доступом кислорода он формирует нетипичный тонкий паутинистый воздушный мицелий, обладает узким диапазоном усваиваемых субстратов (не усваивает спирты и аминокислоты) (Raich, Schlesinger, 1992; Садыкова, 2012). Некоторые штаммы микромицета *Trichoderma longibrachiatum* запатентованы в качестве агентов в биоремедиации и защиты сельскохозяйственных и древесных культур (Захарченко и др., 2010).

Богатое видовое разнообразие микроорганизмов-антагонистов, высокая биологическая активность, как самих штаммов, так и их метаболитов, наличие у них разнообразных механизмов действия, и эффективность в малых

концентрациях, позволило создавать на их основе широкий спектр биопрепаратов различной направленности (Кузьмина и др., 2002; Новикова, 2003). Таким образом, положительными чертами препаратов на основе микробов-антагонистов являются: экологичность; специфичность действия; способность стимулировать рост и развитие растений, восстанавливать почвенные процессы, вызывать увеличение содержания витаминов и белков, и снижать концентрацию токсичных соединений, решение проблем резистентности фитопатогенов к пестицидам (Новикова, 2003; Киролова, 2013).

В то же время, применяемые препараты должны соответствовать ряду параметров:

- численность микроорганизмов, внесенных в почву, должна быть на определенном критическом уровне, чтобы их было достаточно для производства определенного количества биологически активных веществ (Higa, Parr, 1994; Новикова, Литвиненко, 2011);

- для достижения положительного эффекта сапрофитных микроорганизмов против фитопатогенов нужна предварительная минерализация растительных тканей, так как эффективность антагонистов может быть снижена за счет сохранения патогенных форм в растительных остатках, а не нахождение их в свободном состоянии (Рыбалко, Гукасян, 1986);

- для длительного сохранения интродуцированных микробов в почве необходим дополнительный субстрат, так как их численность быстро уменьшается после введения в почву (Старшов, 2013). Биологические факторы, определяющие выживание интродуцированных микробов, включают конкуренцию за субстрат, антагонизм, рост корней, обеспечивающих микробов субстратом и др. Абиотические факторы включают: состав и структуру почвы, ее pH, температуру, содержание влаги и доступность субстрата в ней (Гродницкая, Сорокин, 2006; Гродницкая, Сорокин, 2007; Бондарь, 2011; Новикова, 2011; Старшов, 2013).

Таким образом, среди микроорганизмов-антагонистов (бактерий и грибов) много видов для успешного применения в качестве биоконтрольных и фитосанитарных агентов для улучшения состояния лесных и

сельскохозяйственных биоценозов. Наибольшее внимание среди них получили грибы рода *Trichoderma*, бактерии *Bacillus* и *Pseudomonas*.

1.3. Понятие о биологической активности почв

Деятельность микроорганизмов в почве в первую очередь отражается на ее биологической активности, так как почва — это комплекс элементов окружающей среды, колонизируемый значительным разнообразием микроорганизмов и других организмов. Почвенная биота формируется под зеленой системой, основанной на энергии и питательном веществе, которые они получают от разложения растений и животных тканей (Soil microbiology ..., 2001). Поэтому к показателям биологической активности почвы относят численность и биомассу разных групп почвенной биоты, их продуктивность и активность основных процессов, связанных с круговоротом элементов, ферментативной активностью и скоростью накопления некоторых продуктов жизнедеятельности почвенных организмов (Бачурина и др., 2013).

Благодаря активной деятельности, в первую очередь, микроорганизмов поддерживается гомеостаз почвы (Shah, Ahmed, 2013). Поэтому почвенное микробиологическое сообщество дает возможность охарактеризовать почвенные условия. В связи с чем, его анализ позволяет оценить качество почвы, статус микробоценоза и подобрать метод восстановления деградирующих почв, в особенности искусственных фитоценозов (лесопитомников) (Soil microbiology ... , 2001; Сорокин и др., 2009).

1.3.1. Роль эколого-трофических групп микроорганизмов (ЭКТГМ) в почвенных процессах

Несмотря на то, что численность, соотношение и видовой состав микробоценоза зависят от ряда факторов, таких как тип почвы, физические (водный потенциал, температура, структура) и химические (влажность,

температура, pH, соленость) свойства почвы, они являются одним из наиболее важных параметров, характеризующих биологическую активность почв (Soil microbiology ... , 2001; Горовцов, 2013; Чирак и др, 2013; Ковалева, Лиханова, 2013; Фомина, 2016). Микроорганизмы оказывают влияние на такие почвенные факторы, как содержание органической материи, круговорот питательных веществ, питательная и водная доступность. Структура микробных групп и способы их функционирования выполняют ведущую роль в элементарных почвенных процессах, связанных с почвообразованием (Сорокин, 1980; Глебов, 1986; Soil microbiology ... , 2001). Поэтому соотношение эколого-трофических групп микроорганизмов (ЭКТГМ) является важным индикатором состояния всех типов почв, в том числе и агропочв (лесопитомников), свидетельствует о скорости протекающих в них биохимических процессов (в основном в ризосфере), связанных с превращением основных биогенных элементов (Ковалева, Лиханова, 2013; Фомина, 2016).

Благодаря микроорганизмам в почве происходит синтез биомассы и аккумуляция энергии, биофиксация азота, гниение, нитрификация и денитрификация (Сорокин, 1980; Soil microbiology ... , 2001; Микробиология ... , 2011; Смирнов, Сорокин, 2012). Кроме того, они не только участвуют в разложении органического вещества почвы, но также играют большую роль в самоочищении, так как обладают разнообразным мощным ферментативным аппаратом (Глебов, 1986; Смирнов, Сорокин, 2012; Перфильев и др., 2015). В результате всех этих процессов органическое вещество превращается в гумус, который определяет плодородие почвы (Микробиология ... , 2011). Микроорганизмы также играют важную роль в жизни растений, они способны образовывать более простые минеральные соединения, которые ассимилируются растениями для их роста и развития (Смирнов, Сорокин, 2012). Кроме того, на поверхности растений (листьях, стебле и корнях) интенсивно развиваются все группы микроорганизмов (сапротрофы и паразиты, патогены и антагонисты), занимающие определенный трофический уровень, постоянно находящиеся в биоценоотическом процессе, который формирует фитосанитарное состояние экосистемы. При отдалении от

корня происходит понижение численности микроорганизмов, так как уменьшается количество питательных веществ (Ковалева, Лиханова, 2013; Новикова и др., 2013).

Вследствие этого, наиболее важным для поддержания гомеостаза почвы является наличие и численность микроорганизмов, относящихся к разным экологическим группам, различающимся по отношению к типу и концентрации субстрата – это копиотрофы, гидролитики и олиготрофы (по Заварзину, Колотиловой) (Казеев, 2003). Гидролитики (зимогенная группа) – микроорганизмы способные к растворению твердых полимерных органических веществ и разложению органического азота, благодаря способности к выделению экзоферментов – гидролаз (Сорокин, 1980; Глебов, 1986, Казеев, 2003; Перфильев и др., 2015). К этой группе относят сахаролитиков, липолитиков, пептолитиков и бактериолитиков, они способны резко увеличить свою численность при поступлении органического вещества (Казеев, 2003; Титова, Козлов, 2012).

К копиотрофам относят микроорганизмы, потребляющие минеральный азот, они доминируют в обильных субстратах (Сорокин, 1980; Глебов, 1986, Казеев, 2003; Перфильев и др., 2015).

Олиготрофы (обычно неспоровые формы бактерий) – это микроорганизмы, приспособленные к ассимиляции большого количества углерода при небольшой потребности в азотистых веществах (низким концентрациям субстрата), так как обладают высоким сродством к нему, а также имеют соответствующие транспортные системы (Казеев, 2003; Фомина, 2016). Группа олиготрофов подразделяется в свою очередь на политрофов (используют сложные труднодоступные органические вещества (например, гумус) и диссипотрофов (питаются рассеянными в среде низкомолекулярными продуктами гидролиза полимеров (например, целлюлоза) (Сорокин, 1980; Глебов, 1986; Казеев, 2003). Это по обыкновению самая большая по численности группа почвенного микробоценоза, усваивающая питательные вещества из растворов с низкой концентрацией. Олиготрофная группа, как правило, завершает разложение остатков свежего органического вещества после зимогенной группы (Титова, Козлов, 2011; 2012).

Соотношение копиотрофных и гидролитических микроорганизмов говорит о плодородии почвы и выражается коэффициентом микробиологической минерализации ($K_{\text{мин}}$). Чем выше его значение ($K_{\text{мин}}$), тем выше интенсивность разложения органического вещества, а значит и плодородия почвы (Перфильев и др., 2015). Также высокие значения $K_{\text{мин}}$ свидетельствуют о сбалансированности процессов синтеза в почве (Смирнов, Сорокин, 2012). Высокие значения коэффициентов олиготрофности ($K_{\text{олиг}}$) – отношение олиготрофов к гидролитикам – свидетельствуют о недостатке элементов питания. По соотношению $K_{\text{мин}}$ и коэффициенту гумусообразования ($K_{\text{г}}$), судят об обогащенности почвы органическим N для растений, если процесс минерализации $K_{\text{мин}}$ преобладает над процессом гумусообразования ($K_{\text{г}}$), то почва бедна доступным для растений органическим N (Перфильев и др., 2015).

Все эколого-трофические группы микроорганизмов (как бактерии, так и грибы) участвуют в разных стадиях разложения органических соединений, следовательно, они имеют особое значение в почвообразовании и круговороте минеральных и органических веществ в экосистеме (Казеев, 2003; Зенова и др., 2011; Муртазин и др., 2009; Фомина, 2016).

1.3.2. Анализ почвенных микробиомов с помощью метагеномных исследований

Еще несколько десятилетий назад идентификация микроорганизмов проходила с помощью анализа культуральных и морфологических характеристик, химических и биохимических реакций (Daniel, 2005; Raes et al., 2007; Ботбаева и др., 2011; Першина и др., 2016). Данные исследования трудновыполнимы, так как требуют немало временных и материальных затрат, в результате чего и сильно сокращают число выделяемых видов и количество исследуемых местообитаний. Еще одним отрицательным моментом классических методов является то, что в почве всегда присутствуют некультивируемые микроорганизмы, которые

невозможно обнаружить немолекулярными методами (Soil microbiology ... , 2001; Першина и др, 2012; Першина и др., 2016).

Для того чтобы исключить отрицательные моменты методов культивирования и наиболее полно исследовать весь пул ДНК, содержащийся в почвенных образцах, используют методы молекулярной биологии и активно внедряют их в практику (Daniel, 2005; Raes et al., 2007; Ботбаева и др., 2011; Neelakanta, Sultana, 2013; Першина и др., 2016). Новые молекулярные методы позволяют расширить масштаб исследований таких сложных многокомпонентных экосистем, как почва. При этом становится возможным определение не только основных, но и минорных групп микроорганизмов (Андронов и др., 2012; Shah, Ahmed, 2013). Они становятся более востребованными благодаря: отсутствию трудоемких процедур посева, облегчению процессов культивирования и выделения чистых культур микроорганизмов, возможности выделения более разнообразного числа бактерий, учету как «культивируемых», так и «некультивируемых форм», возможностью выделения новых линий (Казеев, 2003; Петрова и др., 2010; Першина и др., 2012; Shah, Ahmed, 2013).

Поскольку молекулярные методы позволяют извлечь из почвенных образцов микробную ДНК, представленную совокупностью ДНК всех исходных почвенных микроорганизмов – почвенный метагеном, эти методы называют метагеномными (Daniel, 2005; Neelakanta, Sultana, 2013). Термин метагеномика был предложен Handelsman (1998) и коллегами, когда они изучали естественные продукты почвенных микроорганизмов. Метагеномные исследования группируют по скрининговым методам (Neelakanta, 2013):

- А) «shotgun» анализ, использующий сиквенс больших геномов;
- Б) genomic activity – driven метод – метод геномно-управляемой активности для исследования специфических микробных популяций;
- В) метод геномного сиквенса, использующий филогенетический или функциональный ген (экспрессионный анализ);
- Г) технология сиквенса нового поколения, определяющая целый геномный массив в образцах из окружающей среды.

Эти методы также группируют на неселективные (А и Г) и целевые (Б и В) методы метагеномики (Neelakanta, Sultana, 2013).

Основными методами метагеномного анализа нового поколения являются:

1. Метод реассоциации или дифференцированного центрифугирования в градиенте CsCl (экстракция ДНК из почвы) (Harris, 1994; Torsvik et al., 1996).

Метод реассоциации основан на связи гетерогенности препарата бактериальной ДНК (общая длина различных ДНК последовательностей) и скорости ее реассорции (Лысак и др., 2003; Казеев, 2003). В основе описания разнообразия сообщества по этому методу лежит использование количества определяемых пар оснований в негомологичной ДНК, которое равно размеру генома в целом (Казеев, 2003). Этот метод имеет ряд недостатков: слабая экстракция ДНК из почвы, около 20 %, сложность очистки от гумусовых веществ, а также длительность реассоциации (около 2х недель), недостаточная чувствительность к изменениям, происходящим в бактериальном сообществе (Казеев, 2003).

2. Наиболее часто применяемый в современных исследованиях метод - экстракция из почвы нуклеиновых кислот, как ДНК, так и РНК, с последующей амплификацией фрагментов гена 16S рРНК с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) (Ботбаева и др., 2011; Добровольская, 2016). Детальное изучение амплифицированных фрагментов проводится разнообразными молекулярными и генетическими методами (Казеев, 2003). Идентификация по 16S рРНК природных популяций сегодня более приоритетна, чем выделение чистых культур, так как они дают возможность получить данные об организмах с ранее неизвестными последовательностями генов. Этот метод дает данные о присутствии (или отсутствии) в образцах фрагментов последовательностей определенных таксонов, но к сожалению, не дает количественного анализа. Кроме того, метод сложен, многоступенчат и на каждом этапе могут быть ошибки, искажающие результаты анализа. Например, метод идентификации по 16S рРНК показывает, что в почве доминируют грамотрицательные формы, а традиционный посев показывает на доминирование грамположительных (Казеев, 2003).

3. Метод ПЦР (полимеразно-цепной реакции) позволяет идентифицировать почвенные штаммы с высокой достоверностью (Казеев, 2003; Ботбаева, 2011). Основными этапами метода являются: экстракция ДНК, амплификация фрагментов, получение и клонирование амплификантов, изучение амплифицированных последовательностей «почвенных клонов», анализ полученной информации о последовательностях клонов.

4. Метод *in situ* изучения популяций почвы гибридизацией с олигонуклеотидными маркерами (ДНК и РНК-зондами), меченными флуоресцентными красителями. Этот метод позволяет получить количественную информацию о метаболически активных или численно доминирующих популяциях в почве на основании специфического связывания последовательностей 16S (реже 23S) рРНК со специально подобранными олигонуклеотидными маркерами (зондами) (Казеев, 2003). При этом флуоресцентный краситель (акридин оранжевый или ДАФИ – 4,6-диамидино-2-фенилиндол), присоединенный к олигонуклеотидному маркеру, легко диагностирует искомые клетки при просмотре препарата под микроскопом при специальной подсветке. Недостатки метода состоят в том, что есть ограничения, которые связаны с разной проницаемостью клеточных покровов по отношению к маркерам, и высоким требованиям к содержанию клеток в препарате (не менее 1 млн/г почвы) (Казеев, 2003).

Такие значительные продвижения в молекулярно-генетических методах позволяют наиболее полно описать гетеротрофное микробное сообщество по составу его местообитания (Коростик и др., 2006). Так, анализ почвенной ДНК подтвердил наличие в почве большого числа некультивируемых микроорганизмов, доля которых может составлять до 90 % от состава сообщества (Handelsman, 2004; Першина и др., 2016). Оказалось, что почвенный метагеном содержит в себе огромный объем генетической информации, так в 1 г почвы может содержаться до 10^{15} – 10^{16} пар нуклеотидов ДНК, что примерно соответствует 10^9 – 10^{10} бактериальным геномам. Качественный анализ таксономического состава почвенного сообщества, проведенный на основе изучения полиморфизма гена 16S рРНК, показал, что число видов микроорганизмов, формирующих микробоценоз,

исчисляется тысячами (Vogel et al., 2009; Першина и др., 2016).

В последние годы появилось множество молекулярно-генетических и микробиологических методов исследования микробных популяций - использование альтернативных праймеров к функциональным генам (отличных от 16S рРНК), например, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей функциональных генов метанотрофов (*pmoA* – мембрансвязанная метанмонооксигеназа), метаногенов (*mcrA* – метил-коэнзим М редуктаза) и сульфатредукторов (*dsrA* – сульфитредуктаза) (Daniel, 2005; Ковалевская, 2002; 2007). Сегодня многие филогенетические исследования могут быть проведены ПЦР амплификацией 16S рРНК, используя универсальные праймеры для бактерий и архей. Кроме того, существуют другие маркерные гены, которые используют даже для минорных микроорганизмов – *dnaK* (HSP – 70 – type molecular chaperone) и *amoA* (ammonia моноoxygenase) (Daniel, 2005).

Еще одним преимуществом метагеномных анализов является создание почвенных ДНК библиотек. Системы библиотек из почвенных образцов создают теми же методами, что и клонирование геномного ДНК индивидуальных микроорганизмов, то есть фрагментация почвенной ДНК рестрикционными энзимами или механическим расщеплением, введением ДНК фрагментов в соответствующую векторную систему, трансформацией рекомбинантных векторов в нужного хозяина. Хотя создание почвенных библиотек концептуально выглядит просто, размеры почвенного генома и большое количество клонов, которые требуется охватить полностью, создают большие проблемы (Daniel, 2005).

После того как библиотеки почвенной ДНК будут сконструированы их скрининг проводят функциональными и сиквенс-основанными подходами. Эти методы позволяют раскрыть функции почвенных сообществ, включая функции тех микроорганизмов, которые не культивируются (Daniel, 2005).

Большая часть новых целевых генов, которые кодируют выработку полезных ферментов и антибиотиков открыты прямым клонированием почвенной ДНК в плазмиду, космиду или ВАС векторы и скринингом общих библиотек (bacterial artificial chromosome). Создание библиотек ДНК начинается с выделения

почвенной ДНК из образцов экстракционными методами (механическими или химическими), при которых, вследствие лизиса клеток, происходит высвобождение ДНК и дальнейшее ее изучение (Daniel, 2005).

Создание метагеномных библиотек упрощает идентификацию микробов, а также способствует увеличению не только выделяемых видов, но и исследуемых местообитаний, позволяет найти новые микроорганизмы (в том числе и вирусы), включающиеся в важные пути биodeградации токсических веществ, например, нефтяных загрязнений, а также являющиеся полезными агентами в биоремедиации (Edwards et al., 2005; Чирак и др, 2013; Shah, Ahmed, 2013).

1.3.3. Респираторная активность почвы. Микробное дыхание и биомасса

Важными показателями биологической активности почв, характеризующими ее биогенность и являющийся одним из ключевых компонентов цикла углерода наземных экосистем, являются – микробное «дыхание почвы» (выделение углекислого газа и поглощение кислорода почвой) и микробная биомасса (МБ) (углерод микробной биомассы $C_{\text{мик}}$) (Anderson, Domsch, 1978; Ананьева, 2003; Казеев, 2003; Пунегов, Груздев, 2010).

Источниками CO_2 в почве являются жизнедеятельность микроорганизмов и почвенной фауны, дыхание корней, ферментативная активность почв, физико-химические и химические процессы (Казеев, 2003). Показатели углекислого газа, выделяемого почвой, отражают интенсивность жизнедеятельности микробиоты, а также скорость минерализации опада и подстилки. За производство CO_2 в почве отвечают в основном гетеротрофные микроорганизмы, активность которых зависит от температуры, pH и влажности почвы (Ананьева, 2011). Соответственно микробное дыхание подходящий параметр для оценки продуктивности экосистем и для описания активности почвенного микробоценоза (Сморкалов, Воробейчик, 2011).

Интенсивность дыхания – четкий и выразительный показатель изменения скоростей процессов, проходящих в течении всего сезона, при изменении погодных

условий и загрязнении почв. В почвах коэффициент дыхания (КД) рассчитывается по соотношению выделенного углекислого газа к кислороду (Казеев, 2003).

Живая часть органического углерода почвы – микробная биомасса (МБ) наиболее чувствительная к воздействиям и нарушениям, поэтому это наиболее важный показатель при проведении экологических исследований, так как показывает, как функционирует сообщество (Ананьева, 2003; 2011). Общая микробная биомасса почвы представлена в основном микроскопическими грибами и бактериями и включает в себя ее активную, потенциально активную, пассивную и мертвую (некромассу) части (Иващенко, 2017). Отмечено, что именно активная и потенциально активная биомасса микроорганизмов почвы выполняет важные функции в наземной экосистеме и биосфере в целом. Количество и качество микробной биомассы также зависит от типа почвы, степени ее окультуренности, интенсивности эксплуатации, климатических факторов и землепользования (вспашка, внесение минеральных и органических веществ, севооборот) (Ананьева, 2003; 2009; Фрунзе, 2013).

Микробное дыхание почвы характеризуется скоростью базального дыхания (БД) и отражает интенсивность минерализации органических веществ в почве (Susyan, et. al., 2005; Вершинин и др., 2011; Иващенко и др., 2014). Почвенное дыхание является интегральной функциональной характеристикой интенсивности продукции и деструкционных процессов в экосистеме (Сморкалов, Воробейчик, 2011).

Изменение первоначального максимального выделения CO_2 из почвы определяют методом субстрат-индуцированного дыхания (СИД), основанного на регистрации дополнительного отклика CO_2 (начальное максимальное) на внесение легкодоступного субстрата – глюкозы (Мирчик Т. Г., Паниов Н. С.) (Мирчик и др., 1985; Ананьева, 2003; 2011; Иващенко и др., 2014). Метод СИД основан на одном фундаментальном положении биологической кинетики, говорящем о том, что есть зависимость между метаболическим превращением любого субстрата от его концентрации и содержания микробной биомассы. Для любого типа почвы можно экспериментально определить концентрацию глюкозы, которая обеспечивает

наибольший первоначальный отклик микробного сообщества в форме образовавшегося CO_2 , в основном этот показатель составляет от 1 до 20 мг глюкозы на г почвы (Ананьева, 2011).

Показателем устойчивости микробного сообщества почвы служит отношение базального дыхания к микробной биомассе ($C_{\text{мик}}$) ($\text{мкг CO}_2\text{-C/мг } C_{\text{мик}}/\text{ч}$) (микробный метаболический коэффициент ($q\text{CO}_2$)), чем ниже это значение, тем устойчивее данная экосистема (Ананьева, 2003). Микробный метаболический коэффициент – индикатор эффективности использования субстрата, его высокие значения говорят о микробном стрессе, который может быть вызван различными факторами, например, подкислением среды. Микробный метаболический коэффициент – показатель физиологического статуса микробного сообщества, чувствителен к нарушениям в почве. Отмечено, что в сукцессии экосистем отмечается уменьшение величины $q\text{CO}_2$, что свидетельствует о большей «развитости» почвы (Ананьева и др., 2009).

Таким образом, самыми востребованными и экспрессивными показателями функционирования микробного сообщества почвы, а значит и его экологического состояния являются: микробная биомасса, микробное (базальное) дыхание и микробный метаболический коэффициент (удельное дыхание микробной биомассы) (Иващенко, 2017). Эти показатели являются полезными и информативными индикаторами качества и здоровья почвы, так как чувствительны к изменениям, происходящим при землепользовании и антропогенных нагрузках, играют важные роли в биогеоценотических функциях почвы и полезны для объяснения экосистемных процессов.

1.3.4. Экологическое значение ферментативной активности почв

Одним из важных показателей биологической активности почв является ферментативная активность (Казеев, 2003; Сорокин, Гродницкая, 2009). От богатства и разнообразия ферментов в почве зависит осуществление последовательных биохимических превращений поступивших в почву

органических остатков, кроме того, ферменты реализуют в почве ряд реакций невозможных при средних ее температурах (Galstlan, 1974; Казеев, 2003).

Ферментативная активность почв – элементарная почвенная характеристика, складывающаяся из суммы процессов поступления, иммобилизации и действия ферментов в почве. Растения, микроорганизмы, животные и грибы служат источником ферментов, которые вдобавок к уже имеющимся, задействованы в превращении органических веществ в гумусовые (Казеев, 2003). Считается, что между ферментативной активностью и интенсивностью гумификации имеется прямая связь, также как между активностью ферментов и содержанием органического вещества в почве. Некоторые исследователи полагают, что активность почвенных ферментов – это дополнительный диагностический показатель плодородия почвы, который отражает и антропогенную нагрузку (Казеев, 2003; Хазиев, 2005).

Для почвообразовательных процессов наибольшее значение имеют гидролазы и оксидоредуктазы. Наиболее важные ферменты класса гидролаз – инвертаза, фосфатаза, протеаза и уреаза, выполняют важную роль в обогащении почв подвижными и доступными для растений и микроорганизмов питательными веществами, участвуя в гидролитическом распаде высокомолекулярных органических соединений (Казеев, 2003; Сорокин, Гродницкая, 2009).

Инвертаза – фермент, распространенный почти во всех типах почв, действует на фруктофуранозидазную связь, (например, в сахарозе, раффинозе и др.). Этот фермент и его активность коррелируют с содержанием гумуса и почвенным плодородием. По активности инвертазы судят о способности к преобразованию углеводов растительных остатков (Казеев, 2003; Титова, Козлов, 2012).

Протеаза катализирует гидролитическое расщепление белковых веществ до пептидов и гидролиз этих продуктов до аминокислот. Протеазы подразделяют на две группы: протеиназы и пептидазы. Первые расщепляют настоящие белки, вторые катализируют распад полипептидов и дипептидов до аминокислот (Казеев, 2003; Хазиев, 2005).

Уреаза гидролизует карбамид (мочевину), образующийся в процессе

превращения азотистых органических соединений — белков и нуклеиновых кислот, до аммиака и углекислого газа. В значительном количестве карбамид вносится с навозом и в форме концентрированного азотного удобрения. Образовавшийся в результате уреазной реакции аммиак служит непосредственным источником азотного питания растений (Казеев, 2003). Поэтому активность уреазы является одним из важнейших показателей биологической активности почв.

Содержание в почве фосфатазы имеет также немаловажное значение. Фосфат, мобилизованный в воде, просачивается в почву и преобразуется в органический фосфор, или в растворимые формы неорганического и органического фосфора. А неустойчивые пиррофосфаты и полифосфаты с длинной цепью, слабо адсорбированные на поверхности окисей, гидроокиси и глиняных частиц преобразуются во вторичные метаболиты (Backnas, 2012). Растение поглощает фосфор корнями из растворов диффузионно, но, как правило, растворимость фосфора в почве низкая, вследствие чего для растений поглощение фосфора затруднено, поэтому микроорганизмы, переводящие соединения фосфора, посредством выделения фосфатазы в легкодоступную форму, имеют большое значение (Foth, 1990). По В.И. Нетрусову (2012) понижение фосфатазы – результат реакции организмов на содержание доступных форм фосфора в окружающей среде и признак экономии ресурсов при выработке фосфатазы (Пилецкая, 2015).

Из класса оксидоредуктаз наибольшее значение в почвенных процессах принадлежит каталазам, полифенолоксидазам и пероксидазам (Казеев, 2003; Хазиев, 2005).

Каталаза – внутриклеточный фермент, найденный у всех аэробных бактерий и большинства факультативных анаэробов, но отсутствующий у строгих анаэробов, фермент катализирует распад перекиси водорода, которая ядовита для организмов, т.к. может повредить их клетки (Guwy et al, 1999; Казеев, 2003; Stepniewska, 2008; Fedotov et al., 2011). Источниками перекиси водорода в почве являются процессы дыхания живых организмов и биохимического окисления органического вещества. Именно каталаза превращает перекись водорода в молекулярный кислород и воду и, таким образом, предотвращает повреждение

клеток (Stepniewska, 2008; Fedotov et al., 2011). Каталаза очень стабильный фермент и показывает значительную корреляцию содержания органического углерода, уменьшающегося с глубиной почвы (Stepniewska, 2008).

Пероксидаза – фермент, производящий окисление органических веществ в почве (фенолы, амины и некоторые гетероциклические соединения), за счет кислорода перекиси водорода и других органических перекисей, которые накапливаются и образуются в почве, как результат жизнедеятельности живых организмов, а также в результате деятельности некоторых оксидаз (Казеев, 2003; Сорокин, Гродницкая, 2009). Полифенолоксидаза участвует в процессе превращения органических соединений ароматического ряда в компоненты гумуса, катализируя окисление фенолов (моно-, ди-, три-) до хинонов в присутствии кислорода воздуха. В свою очередь хиноны в соответствующих условиях при конденсации с аминокислотами и пептидами образуют первичные молекулы гуминовой кислоты (Карягина, Михайловская, 1986; Казеев, 2003).

Таким образом, еще одним наиболее важным компонентом, характеризующим функционирование микробного сообщества, а также качество и скорость окислительно-восстановительных процессов является ферментативная активность почв. От их содержания и активности в почве зависит полнота разложения органического вещества, обогащение почвы легкодоступными веществами доступными для растений, а также здоровье почвы.

Анализ многочисленных исследований отечественных и зарубежных ученых показал, что использование микробиологического метода в рамках интегрированной защиты растений в условиях лесных питомников является актуальной задачей. Достаточно большое количество исследований посвящено проблемам деградации и истощения почв лесных питомников, и распространению заболеваний в них, подробно изучены причины загрязнения почв поллютантами различной природы (ксенобиотики, пестициды и др.). В связи с увеличивающимся интересом к экологическим проблемам много публикаций посвящено интегрированной защите растений, отдающим предпочтение микробиологическим методам, которые позволяют защищать растения в питомниках от фитопатогенных

атак, и отвечают нормам экологичности и экономичности.

Однако исследований, посвященных использованию микроорганизмов-антагонистов в качестве биоагентов, способных повышать лесорастительное состояние почв, за счет восстановления их экофизиологического статуса, увеличения содержания микробной биомассы и общей микробной численности сапротрофных микроорганизмов, повышения численности эколого-трофических групп микроорганизмов, и в то же время снижения численности патогенных форм, в литературе встречается мало.

В наших исследованиях мы впервые сосредоточили свое внимание на комплексном изучении состояния почвенных микробоценозов при влиянии микробных агентов на продуктивность и биогенность серой лесной почвы опытного питомника, сравнении эффективности применения микроорганизмов (бактерий и грибов), микроэлементов и порошковых препаратов на основе растительного сырья, при добавлении и без дополнительных субстратов (опилок, вермикулита и микокомпоста), качественной оценке микробиома почвы до посевов хвойных и после экспериментов. Попутно исследовали влияние микробов-антагонистов (микробных агентов) на рост, развитие и сохранность семян и сеянцев хвойных, с поиском путей их эффективной защиты и увеличению выхода качественного лесопосадочного материала, с учетом климатических особенностей Сибирского региона.

Глава 2. Объекты и методы исследований

2.1. Объекты исследований

Объектами исследований являлись эколого-трофические, физиологические и таксономические микробные группы, функционирующие в темно-серой лесной почве искусственно созданной (нарушенной) лесной экосистемы и прилегающего к нему леса; воздействие биологически активных штаммов микроорганизмов на семена и сеянцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), лиственницы сибирской (*Larix sibirica* L.) в лабораторных и полевых условиях.

Микробоценоз почвы нарушенной экосистемы изучали в лесостепной зоне Красноярского края – на опытном питомнике, расположенном на территории ОЭХ Погорельский Бор (стационар ИЛ СО РАН) (Емельяновский район) на темно-серых среднесуглинистых почвах.

Микроорганизмы, используемые в исследованиях, были в разное время выделены из почв лесных питомников и находятся в коллекции Института леса им. В.Н. Сукачева (лаборатория микробиологии и экологической биотехнологии), а также были любезно предоставлены коллегами из различных организаций: *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. д.б.н. Н. Н. Терещенко (Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и торфа, г. Томск), *Trichoderma harzianum* в виде препарата «триходермин» (Сибирский федеральный университет (бывший КГУ). Растительные препараты, полученные механохимическим способом, были предоставлены заведующим лаборатории химии твердого тела, д.х.н. О.И. Ломовским (Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского Отделения Российской академии наук, г. Новосибирск).

Исследования по биоремедиации нарушенных почв питомника с помощью микробных агентов (микробов-антагонистов), их влиянию на рост и развитие семян и сеянцев хвойных (*Pinus sylvestris* L. и *Larix sibirica* L.), проведены на территории опытного питомника Погорельского стационара ИЛ СО РАН.

2.2. Экологические условия экспериментальных участков Погорельского бора (Красноярская лесостепь)

По природному районированию Сибири территорию Погорельского Бора и г. Красноярска относят к Красноярской лесостепной равнине, которая, в свою очередь, принадлежит Канско-Красноярско-Бирюсинской лесорастительной провинции (ЛП) (Коротков, 1994). Она занимает в основном левобережную часть Енисея, ограничена с юга отрогами Восточного Саяна, а на севере переходит в Западно-Сибирскую равнину. Рельеф территории равнинный и холмисто-увалистый, климат континентальный, умеренно засушливый (годовая сумма осадков 300 мм).

Климат Красноярского края резко континентальный, характерны сильные колебания температур воздуха в течение года. Для центральных и южных районов края характерен континентальный климат с продолжительной зимой и коротким жарким летом. Осень часто сухая с ранними заморозками. В среднем в год выпадает 316 мм осадков, основная часть – летом. Снежный покров устанавливается в начале ноября и сходит в конце марта. Средняя температура января -36 и -18 (на севере и юге соответственно), в июле +10 и +20°C.

В северной части Красноярской лесостепи, относящейся к суббореальному (умеренному) поясу, преобладают парковые леса на серых лесных почвах, а южной — черноземные луговые и типичные степи (ковыльно-разнотравные и разнотравно-луговые – почти распаханые).

Опытный питомник разбит на территории опытно-экспериментального хозяйства (ОЭХ) Погорельский бор ИЛ СО РАН (56°22' с. ш., 92°57' в. д.) и окружен естественным ненарушаемым сосновым фитоценозом (сосняк зеленомошный осочково-разнотравным), переходящим в смешанный сосново-березовый лес (50–55 лет).

Экологические условия произрастания фитоценозов Погорельского бора (данные геоморфологов и геоботаников Института леса) довольно благоприятные (последние 40 лет нет систематического загрязнения), с невысокими

рекреационными нагрузками.

Согласно данным проф. Сорокиной О. А., н.с. Антонова Г. И., н.с. Барченкова А. П. (Антонов и др., 2018) смешанный лес Погорельского бора имеет следующую характеристику: сосна, береза, богатое разнотравье с высоким проективным покрытием; травы представлены семействами бобовых, мятликовых, сложноцветных, зонтичных.

Почва: темно-серая слабо-оподзоленная оглееная тяжелосуглинистая на древнеаллювиальных отложениях (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Почвенный профиль на Погорельском стационаре

Минеральный профиль имеет гранулометрический состав с преобладанием фракции мелкого песка. Лесная подстилка (О, 0–1(2) см) характеризуется слабо-кислой реакцией среды ($pH_{\text{водн}} 5.1$). Значения pH среды немного сдвигаются в щелочную сторону к горизонту AEL и BEL ($pH = 5.91$ и 6.00) и возвращаются вновь к слабо-кислым значениям в горизонте BT ($pH = 5.88$) (Таблица 1).

Содержание гумуса в слое 5–20 см высокое – 7.54 %, с глубиной резко снижается и уже в слое – 50–60 см равно нулю (Таблица 1). Содержание $C_{\text{орг}}$ снижается с глубиной, так в горизонте AU – 5–15 см $C_{\text{орг}}$ составило 4.4 % (среднее значение), а в AU – 20–30 см – 3.05 % (ниже среднего), и затем резко снижается в нижележащих горизонтах (Орлов и др., 1991; Зинякова, Семенова, 2013).

Таблица 1 – Химические показатели серой лесной почвы смешанного леса (Погорельский бор)

Горизонт, глубина, см	Гумус, %	C _{орг.} , %	pH	N _{Вал.}	N _{лг}	N _{тг}	N _{нг}	C:N	Подвижные, мг/100 г	
									N- NH ₄	P ₂ O ₅
AU – 5-15	7.54	4.37	5.66	76.4	9.4/12.4 *	2.8/3.6	64.2/84.0	57	2.54	81.08
AU – 20-30	5.26	3.05	5.85	73.9	5.6/7.5	0/0	68.3/92.5	41	1.23	72.03
AEL – 35-45	0.69	0.40	5.91	66.3	2.2/3.3	0.5/0.8	63.6/95.8	6	0.51	60.04
BEL – 50-60	0.13	0.07	6.00	70.4	1.9/2.7	0.4/0.6	68.1/96.6	1	0.44	58.84
BT – 60-70	0	0	5.88	65.1	0/0	1.4/2.1	63.7/97.9	0	0.49	58.18
BC _г – 80-90	0	0	5.92	63.8	0/0	1.1/1.7	62.7/98.3	0	0.34	61.37
C _г – 100-110	0	0	5.89	64.5	0/0	0.5/0.9	63.9/99.1	0	0.29	70.56
*в знаменателе процент от валового азота										

Отношение C:N в слое 5–20 см равно 57, в слое 20–30 см – 41, также резко снижается до 6 к уровню AEL – 35–45 см. Содержание подвижных форм фосфора по всему профилю очень высокое (по Кирсанову).

Основные параметры почвы с участка березово-соснового леса Погорельского бора опыта по функционированию микробных сообществ при внесении в нее добавочных субстратов (микокомпоста и опилок)

Почва березово-соснового леса (58–60 лет) Погорельского бора – темно-серая слабо-оподзоленная оглееная тяжелосуглинистая на древнеаллювиальных отложениях. Мощность серогумусового горизонта AU – 32 см. Исследуемый биологически-активный слой почвы (5–15 см) характеризуется слабо-кислой реакцией среды (pH_{H2O} – 5.66), содержание гумуса – 7.5 %, N_{вал} – 76.4 мг /100 г (гидролизруемая форма – 16 %); отношение C:N – 57 говорит о сбалансированности циклов углерода и азота и относительной эффективности процесса аммонификации. Содержание аммонийного азота (2.54 мг/100 г) и подвижного фосфора (81 мг/100 г), а также активность ферментов (каталаза – 0.27; протеаза – 0.761; уреазы – 2.12, инвертазы – 82.3 ед.ф.) отражают высокое природное плодородие данной почвы, указывает на активное участие почвенных

микроорганизмов в переработке полуразложившихся остатков на границе с подгоризонтом ферментации.

2.3. Методы исследования микроорганизмов

Образцы почвы для химических, микробиологических и биохимических анализов отбирали из верхнего органогенного минерального слоя (0-5 и 0-10 см) темно-серой пахотной почвы Погорельского стационара (ОЭХ ИЛ СО РАН).

Отбор почвенных образцов сопровождался определением температуры воздуха и почвы на каждом участке (в момент взятия) с использованием портативного термометра «Hanna Checktemp 1». В лабораторных условиях традиционным методом определяли влажность почвы (10 г почвенного образца помещали в сушильный шкаф и высушивали при температуре 105°C до стабильной массы).

Влажность высчитывали по следующей формуле: $(a-b/10 \text{ г}) * 100 \%$, (1)

где а – масса образца перед началом сушки; b – масса образца после сушки.

Значения pH определяли после доставки в лабораторию при помощи портативного потенциометра «Аквилон-410». Для этого 1 г почвенной навески растворяли в 10 мл дистиллированной воды, настаивали в течение 1 часа и отфильтровывали. Фильтрат измеряли погруженным электродом pH-метра.

В образцах почвы определяли $C_{\text{орг}}$, содержание гумуса по методике И. В. Тюрина в модификации В. М. Никитина колориметрическим методом. Принцип метода основан на окислении органического вещества почвы хромовой кислотой до образования углекислоты. Содержание гумуса высчитывали из содержания $C_{\text{орг}}$ с использованием коэффициента 1.724. Общий азот в почве определяли сжиганием в смеси серной и хлорной кислот с последующей отгонкой. Фракционный состав азота определяли титриметрическим методом с помощью

ступенчатого щелочного гидролиза по Корнфильду: в чашках Конвея из почвы последовательно извлекались трудногидролизуемые соединения азота с помощью 6Н NaOH, а затем с помощью 1Н NaOH – легкогидролизуемые соединения (Лысак, 2003). Исследованные почвы диагностировали в соответствии с классификацией 2004 г. (Классификация и диагностика почв ... , 2004) и на основе морфологии почвенного профиля (разрезов) и результатов аналитических исследований. Показателем плодородия служили свойства почвы (гумус, содержание азота, значение кислотности).

При работе с семенами хвойных - сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и лиственницы сибирской (*Larix sibirica* L.) перед началом экспериментов определяли их лабораторную всхожесть: Для этого в чашки Петри помещали смоченную стерильной водой фильтровальную бумагу, и на нее раскладывали по 50 семян в трехкратной повторности. За прорастанием семян следили в течение 14 дней. Затем определяли процент проросших и наклюнувшихся семян (ГОСТ 13056.6-97; Соколов, 1990).

Определение эколого-трофических групп микроорганизмов

Численность, и структуру микробных сообществ изучали в свежих почвенных образцах методом посева почвенной суспензии на плотные питательные среды. Почвенную суспензию высевали (0.1 мл, разведение 10^3) в чашки Петри на агаризованную среду разного состава в трех повторностях. Чашки с посевами инкубировали в термостате (25–27°C) в течении 3–7 суток. Численность сапрофных аэробных бактерий, использующих азот органических соединений (гидролитики), определяли на мясо-пептонном агаре (МПА); бактерии, потребляющие минеральные формы азота (копиотрофы) – на крахмало-аммиачном агаре (КАА); олиготрофных бактерий (олиготрофы) определяли на почвенном агаре (ПА), олигонитрофильных – на среде Эшби (ЭА). Численность микроскопических грибов учитывали на сусло-агаре (СА) с добавлением молочной кислоты для угнетения бактериальной флоры (Теппер, 1979; Дудка и др., 1982; Звягинцев, 1991; Нетрусов, 2005). Для оптимального роста штаммов микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью, использовали

картофельный агар (КА) и картофельно-сахарозный агар (КСА) (Higa, Parr, 1994; Нетрусов, 2005).

Коэффициент микробиологической минерализации – $K_{\text{мин}}$ (показатель напряженности минерализации) рассчитывали, как отношение численности микроорганизмов, ассимилирующих минеральный азот – прототрофов, к таковой, использующих органический азот – аммонификаторов ($K_{\text{мин}} = \text{КАА} / \text{МПА}$) (Никитина, 1991). Значения данного коэффициента меньше 1 свидетельствуют о незавершенности или низких темпах процесса разложения органического вещества (Титова, Козлов, 2012; Перфильев и др., 2015). Коэффициенты олиготрофности ($K_{\text{олиг}}$) определяли, как отношение количества микроорганизмов с олиготрофным типом питания к аммонификаторам ($K_{\text{олиг}} = \text{ПА} / \text{МПА}$) (Аристовская, 1965; Мишустин, 1972; Никитина, 1991). Коэффициент гумификации ($K_{\text{гум}}$) рассчитывали, как отношение активности полифенолоксидазы (ПФО) к активности пероксидазы (ПО), что позволяет судить о преобладании катализируемых процессов ($K_{\text{гум}} = \text{ПФО} / \text{ПО}$) (Родин, Базилевич, 1965; Тхюи, 2012).

Динамику численности микроорганизмов на плотных питательных средах оценивали подсчетом общего числа выросших колоний, где дифференцировали колонии разных морфологических типов. Вероятное количество клеток, колониеобразующих единиц – КОЕ, в 1 г субстрата рассчитывали по формуле (Егоров, 1976; Higa, Parr, 1994):

$$\text{КОЕ} = (x \pm 2\sigma_x) K^* I / V, \quad (2)$$

где: x – среднее число колоний, выросших при высеve данного разведения;

σ_x – среднее квадратичное отклонение;

2 – t-критерий при $P = 0.95$;

K – разведение, из которого произведен посев;

V – объем суспензии, взятой для посева в миллилитрах.

Выделение аборигенных штаммов грибов р. *Trichoderma*, обладающих антагонистическими свойствами по отношению к фитопатогенным

микроорганизмам, проводили методами скученных популяций и обогащения (Дудка и др., 1982).

Определение качественного состава почвенных микроорганизмов

Качественный состав почвенных бактерий (идентификацию) определяли молекулярно-генетическими методами (NGS – метагеномный сиквенс). Геномную ДНК выделяли из 250 мг почвы с помощью набора FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, США). Полученную общую ДНК амплифицировали с использованием специфических праймеров к последовательности 16S рРНК. Синтез специфических праймеров (модифицированных олигонуклеотидов) произведен в ЗАО «Синтол» (Москва): Forward primers (Primer A, Lib-L): 58-mer P609F и Reverse primer (Primer B, Lib-L): 45-mer Uni1392R. Длина амплифицированных (вместе с праймерами) фрагментов 691 пн. Полученные ПЦР-продукты очищали от ПЦР-смеси, определяли концентрацию и визуализировали в агарозном геле. 300 нг каждого образца брали на приготовление библиотеки ДНК.

Приготовление библиотек, эмульсионную ПЦР и секвенирование образцов проводили согласно протоколу производителя Roche/454. Пробоподготовку и секвенирование выполняли в центре коллективного пользования «Геном» Института молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта с использованием полногеномного секвенатора GS Junior (Roche/454). Анализ полученных прочтений проводили с помощью онлайн программы базы данных RDP (<https://rdp.cme.msu.edu/>). Детализация родового/видового состава основных представителей микробных сообществ почв проведена на основе секвенирования генов 16S рРНК, для выявления доминантных и минорных видов бактерий с качественной оценкой их соотношений. Количество определенных генетических копий выражали в операционных таксономических единицах (ОТЕ).

Качественный состав почвенных микромицетов определяли, как общепринятыми морфологическими, так и молекулярно-генетическими методами. Идентификацию культур микроскопических грибов проводили на основании изучения их органов и типов спороношения (метод микрокультуры), который позволяет получить типичное спороношение у большинства видов микромицетов

(через 24–72 ч) и проследить цикл их развития (Билай, Элланская, 1975). Виды грибов определяли согласно идентификационным таблицам (Милько, 1974) и определителям (Литвинов, 1967; Пидопличко, 1972; Билай, 1977; Кириленко, 1977; Егорова, 1986; Билай, Коваль, 1989; Watanabe, 2000), а также молекулярно-генетическими методами. Таксономическую принадлежность исследованных грибов сверяли с международной базой данных **Index Fungorum** (<http://www.indexfungorum.org/NAMES/NAMES.asp>).

Таксономическое положение грибов рода *Trichoderma* (*Trich.sp./longibrachiatum*, *Trich. spp. / lignorum*), *Bacillus* sp. (*Bacillus amyloliquefaciens*) и рода *Fusarium* (штаммы *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme var annullatum*, *F. oxysporum* B3) проводили методом молекулярного анализа совместно с отделом лесной генетики Центра защиты леса Красноярского края и в ЦКП "Геномика" СО РАН (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

Метод определения микромицетов р. *Trichoderma* основан на сочетании принципов полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием фрагментов. Полимеразная цепная реакция, проводимая на первом этапе, позволяет выявить полиморфизм в краевых областях локуса (местах посадки праймеров) (Учет ..., 1988; Баранов и др., 2012). Далее проводили прямой анализ нуклеотидной последовательности с помощью секвенирования. С целью установления видовой принадлежности штаммов был проведен анализ участка рДНК, включающего следующую последовательность локусов: 18S рРНК-BTC1-5, 8S-рРНК-BTC2-28SpРНК (Учет ..., 1988). Полученные при секвенировании участки нуклеотидной последовательности анализируемых образцов сравнивали с современными электронными генетическими базами данных, которые открыты для прямого доступа и содержат информацию по секвенированию искомого участка рДНК.

Таким образом, процедура молекулярно-фитопатологической диагностики состояла из следующих стадий:

1. Выделение суммарной ДНК из анализируемого материала;
2. Амплификация локусов грибной ДНК методом ПЦР;
3. Расшифровка структуры амплифицированных локусов (секвенирование);

4. Сравнительный анализ в базе данных (идентификация).

Подготовка образцов и выделение ДНК. Экстракцию ДНК проводили из свежей культуры гриба. Стерильным скальпелем соскабливали мицелиальную массу. ДНК выделяли модифицированным СТАВ-методом (Баранов и др., 2012).

Анализ ДНК. Для проведения полимеразной цепной реакции предварительно готовили реакционную смесь (премикс), включающую все компоненты, кроме ДНК: ПЦР-смесь-2 blue (7,5 мМ MgCl); деионизированная вода; dNTPs, 10 мкМ; ITS1 F (5-TCCGTAAGGTGAACCTGCGG-3) (10 мкМ); ITS4 R (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) (10 мкМ); Taq-полимераза (5 ед./мкл).

В каждую пробирку вносили ДНК – матрицу гриба и необходимое количество премикса. Для контроля использовали пробу, содержащую все компоненты реакционной смеси, кроме ДНК (отрицательный контроль). Процесс амплификации проводили в термоциклере «Thermal Cycler BioRad T100» (Сингапур).

Проведение электрофоретического анализа. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в агарозном геле (2 %). Гель помещался в электрофоретическую камеру («Helicon»). Загрузочный раствор каждой дорожки состоял из 5 мкл образца ДНК и 2 мкл загрузочного буфера (30 % глицерин, 0.5 % бромфеноловый синий). Электрофорез проводили при комнатной температуре в течение 2 ч. при следующих параметрах тока – 90 V/60 мА (Падутов и др., 2007).

Визуализация продуктов электрофореза достигалась окрашиванием гелевых пластин в растворе бромистого этидия. Гелевую пластину помещали в раствор бромистого этидия (0.5 мкг/мл) и выдерживали в красителе в течение 10 мин. Затем гель извлекали и промывали в дистиллированной воде для удаления остатков красителя. Для визуального наблюдения гель помещали в УФ-транслюминатор. Фотодокументирование продуктов электрофореза достигалось за счет видеосканирования в УФ-свете специальной системой Gel-Imager.

Изолирование фрагментов из геля. Для видовой идентификации патогенов производили иссечение фрагмента геля, содержащего ДНК-фрагмент патогена. Очистку фрагментов ДНК от геля проводили в соответствии с протоколом набора

реагентов Cleanup mini (Евроген).

Проведение секвенирования фрагментов и их анализа. Секвенирование фрагментов ДНК осуществляли с помощью генетического анализатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) по методике, предложенной фирмой производителем. Анализ нуклеотидных последовательностей образцов производили с помощью программ Sequencing Analysis v.6.

Таксономическое положение грибов рода *Fusarium* spp. проводили в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). ДНК выделяли набором DNK Isolation Kit (MO BIO) по протоколу производителя.

ПЦР проводили в следующих условиях: начальная денатурация 1 мин при 98°C, далее 33 цикла: 15 сек при 98°C; 15 сек при 60°C; элонгация – 15 сек при 72°C. Реакционная смесь объемом 40 мкл содержала 10–50 нг геномной ДНК, 0.4 мкМ олигонуклеотидных праймеров (прямой праймер ITS1-F_KYO2 и обратный праймер ITS4), 0.2 mM dNTP, 2.3 mM MgCl₂, 0.02 U/μl Phusion Hot Start II DNA (ThermoFisher) в однократном Phusion GC Buffer.

Продукты ПЦР анализировали после проведения электрофореза в 1.5 %-ном агарозном геле с последующей визуализацией ДНК в УФ-свете после окрашивания бромистым этидием. Полученные ампликоны очищали с помощью набора с Gel Extraction Kit (Monarch) согласно инструкции производителя.

Для секвенирования по Сэнгеру использовали те же праймеры, что и для ПЦР. Реакционная смесь объемом 40 мкл содержала 300–500 моль продукта ПЦР, 2 пмоль праймера и 1 мкл реактива BigDye, в однократном Sequencing Buffer. Очистку от избытка флуоресцентно меченных дидезоксинуклеотидтрифосфатов проводили, используя набор для гель-фильтрации Centri-Sep (Princeton Separations) согласно протоколу фирмы. Анализ продуктов реакции проводили на автоматическом анализаторе ДНК модели ABI3130xl (Applied Biosystems, США).

Определение антагонистической активности микроорганизмов

Антагонистические свойства микроорганизмов и их взаимоотношения с почвенной микрофлорой изучали на плотных питательных средах (КАА, МПА, КСА). Учет антибиотической активности почвенных микроорганизмов проводили

штриховыми методами и методом агаровых блочков (Егоров, 1979). Для дальнейших исследований отбирали штаммы бактерий с наибольшей зоной угнетения роста тестовых культур, и способностью сохранять свою антибиотическую активность при пересеве и длительном хранении.

Определение антагонистической активности штаммов методом двойных (встречных) культур (Montealegre, 2003; Асатунова, Дубяга, 2012) выполняли следующим образом: в центр чашки Петри, содержащей картофельно-сахарозный агар (КСА) помещали 18 мм агаризованный блок с патогеном. Вокруг блока петлей с суспензией антагониста рисовали круг диаметром 6 см и инкубировали в течение 72 часов (3 дня) при температуре 22°C. Контролем служила чашка Петри с КСА, в центр которой помещали агаризованный блок с патогеном (Montealegre, 2003).

На антагонистическую активность к пяти штаммам грибов р. *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme* var *annullatum*, *F. oxysporum* B3) были проверены *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Bacillus amyloliquefaciens*.

Степень ингибирования подсчитывали по следующей формуле (Montealegre, 2003; Асатунова, Дубяга, 2012):

$$\text{Степень ингибирования (СИ)} = (1 - (A/B)) * 100, \quad (3)$$

где: А – рост патогена в миллиметрах (диаметр патогена);

В – контрольный рост в миллиметрах (диаметр патогена в контроле).

Подсчет проводили на 5-е, 10-е сутки. Отмечали характер взаимоотношения антагониста и патогена, изменение цвета, плотности, толщины и направления роста патогена (Асатунова, Дубяга, 2012).

Экспресс метод определения ферментативной активности штаммов-антагонистов

Ферментативную активность исследуемых штаммов антагонистов определяли с помощью проведения экспресс-тестов (Лысак, 2003; Асатунова,

Дубяга, 2012).

Тест на липазу. Для определения липолитической активности использовали стерилизованный желточный агар, охлажденный до +60°C (Лысак, 2003; Асатунова, Дубяга, 2012).

Скорлупу яйца дезинфицировали спиртом, давали обсохнуть. Желток, отделенный от белка, с соблюдением правил асептики, переносили в расплавленный агар и перемешивали до получения однородной суспензии, которую затем разливали по чашкам Петри. На затвердевшую среду производили посев исследуемого микроорганизма и инкубировали (до 14 суток). После инкубации, снимали крышку и внимательно при косом освещении просматривали поверхность. Положительным результатом на липолитическую активность считали образование маслянистого блестящего с переливами или перламутрового слоя над колонией и вокруг нее на поверхности агара (Лысак, 2003; Асатунова, Дубяга, 2012).

Тест на гидролиз казеина. Стерильное (автоклавированное) обезжиренное молоко смешивали при +50°C с равным объемом 4 %-ного расплавленного водного агара. Чашки Петри инокулировали исследуемыми штаммами при помощи штриха и инкубировали до 14 суток (Лысак, 2003; Асатунова, Дубяга, 2012). Положительный результат на гидролиз казеина подтверждали, если присутствовали зоны просветления вокруг колонии.

Тест на хитиназу. Готовили синтетическую среду с хитином, которую разливали по чашкам Петри. После затвердевания методом штриха чашки засеивали тестируемыми штаммами и инкубировали 7–14 суток. Положительным результатом хитиназной активности считали присутствие зоны просветления вокруг колонии (Лысак, 2003; Асатунова, Дубяга, 2012).

Определение дыхательной активности почвенных микроорганизмов методом СИД

В образцах почвы дыхательную активность микроорганизмов определяли методом субстрат-индуцированного дыхания (СИД), предложенным в работах J. Anderson (1978) и K. Domch (1979) и Н.Д. Ананьевой (2003) (Anderson, 1978;

Звягинцев, 1991; Ананьева, 2003). Метод основан на измерении начальной скорости дыхания микроорганизмов после обогащения почвы глюкозой, дополнительным источником углерода и энергии (Нетрусов, 2005; Трофимов, 2013).

Глюкозу использовали как самый распространенный в природных полимерах мономер, превышающий количество других сахаров на два порядка. Основным источником глюкозы в почве является растительный опад, на 70–80 % состоящий из целлюлозы. Этот полисахарид в почве утилизируется микроорганизмами в виде глюкозы, образующейся в результате внеклеточной ферментативной деполимеризации целлюлозным комплексом. Поэтому потребление глюкозы рассматривается как модель минерализации органического опада почвенными микроорганизмами. К тому же потребление глюкозы микроорганизмами почвы *in situ* за время, в течение которого не происходит роста и размножения клеток (несколько часов), положено в основу определения содержания микробного углерода (биомассы) в почве.

Определение интенсивности дыхания микроорганизмов осуществляли следующим образом: в стеклянные флаконы (250 мл) помещали 2 г свежей почвы, согласно методике Д. Г. Звягинцева добавляли 0.1 мл глюкозо-минеральной смеси (ГМС), конечное количество вносимой глюкозы 10 мг/г почвы, увлажняли при необходимости до 60 % от полной влагоемкости, герметично закрывали пробками, фиксировали время и инкубировали при 25°C (Звягинцев, 1991). Через 2–3 ч инкубации из флакона шприцем отбирали пробу воздуха (1мл) и анализировали с использованием газового хроматографа Agilent Technologies 6890 N Network GC (USA), снабженным пламенно-ионизационным детектором и метанатором (Hewlett-Packard, США). В качестве газа-носителя использовался гелий, скорость потока газа 20 мл/мин. Колонка Supelco 10182004 из нержавеющей стали с внутренним диаметром 3.175 мм и длиной 1828.8 мм. Адсорбент – 80/100 Porapak Q. Температура печи и детектора 80 и 300°C, соответственно. Скорость потока водорода 30 мл/мин, потока воздуха 400 мл/мин. Время отбора газовой пробы также фиксировали. Скорость СИД выражали в мкг C-CO₂ г⁻¹ почвы час⁻¹

Микробную биомассу ($C_{\text{мик}}$) почвы определяли путем пересчета скорости субстрат-индуцированного дыхания по формуле (Ананьева, 2003; Нетрусов, 2005).

$$C_{\text{мик}} = \text{МБ (мкг} \cdot \text{г}^{-1} \text{ почвы)} = (\text{мкл CO}_2 \cdot \text{г}^{-1} \text{ почвы час}^{-1}) * 40.04 + 0.37 \quad (4)$$

Базальное (фоновое) дыхание (БД) почвы определяли по скорости выделения CO_2 почвой за 24 часа ее инкубации при 22°C также, как описано для определения СИД, только вместо ГМС в почву вносили воду, если почвенный образец был сухим. Скорость базального дыхания выражали в $\text{мкг C-CO}_2 \cdot \text{г}^{-1} \text{ почвы час}^{-1}$.

Микробный метаболический коэффициент ($q\text{CO}_2$) рассчитывали, как отношение скорости базального дыхания к микробной биомассе (Богомолова, Литовка, 2007):

$$\text{БД} / C_{\text{мик}} = q\text{CO}_2 (\text{мкг C-CO}_2 \cdot \text{мг}^{-1} C_{\text{мик}} \cdot \text{час}^{-1}) \quad (5)$$

2.4. Определение ферментативной активности почвы

Потенциальную ферментативную активность почвы определяли в высушенных образцах. Почвенные образцы освобождали от растительных остатков и других включений, растирали и просеивали через сито с диаметром отверстий 0.25 мм (Хазиев, 1990). Биохимическую (ферментативную) активность исследуемых почв оценивали по активности окислительно-восстановительных, протеолитических и гидролитических почвенных ферментов (каталазы, полифенолоксидазы, пероксидазы, фосфатазы, протеазы, уреазы и инвертазы) (Хазиев, 1990; 2005). Инактивацию микроорганизмов в сухих почвенных образцах осуществляли обработкой толуолом за 15 минут до внесения субстрата. Методы определения ферментативной активности выполняли согласно (Хазиев, 2005). Активность ферментов использовали как показатель потенциальной биохимической активности исследуемых почв. Колориметрирование растворов проводили при помощи фотоэлектроколориметра КФК-3.

Определение инвертазы. Для анализа брали 5 г почвы; добавляли 5 мл 20 % сахарозы и 5 мл ацетатного буфера. Помещали в термостат на 3 часа при температуре 37°C. Вынув из термостата, добавляли 40 мл воды при температуре 40°C, затем фильтровали (Хазиев, 2005; Козлова, Макарова, 2013).

Фильтрат (10 мл) помещали в мерную колбу на 50 мл и добавляли 4 мл медного реактива ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 25 мин кипятили на водяной бане. Быстро охлаждали (водопроводной водой), добавляли 2 мл 0.2 м Na_2HPO_4 и 5 мл молибденового раствора ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Энергично взбалтывали, через час доливали до 50 мл и колориметрировали в кювете на 1 см при 620 нм.

Показатель инвертазной активности (мг на г почвы за 3 часа) далее в работе называли единица фермента – ед. ф.

Определение фосфатазы. На аналитических весах взвешивали почву, 1 г навески переносили в колбу Эрленмейера на 50 см³. Для увлажнения почвы до 90 % приливали пипеткой 1 мл дистиллированной воды. Затем приливали 1 мл 1%-го раствора фенолфталеинфосфата натрия, 3 капли толуола, закрывали корковой пробкой и взбалтывали 5 мин. Ставили в термостат на 1 ч при температуре 30°C. Затем приливали 45 мл дистиллированной воды и взбалтывали 5 мин. Фильтровали через беззольный фильтр. 20 мл фильтрата пипеткой переносили в пробирку, добавляли 2 мл 10%-го аммиака, все перемешивали. Окрашенный раствор колориметрировали при зеленом светофильтре 480 нм в кюветах шириной 5 мм. Количество фенолфталеина, соответствующее взятому объему фильтрата, находили по калибровочному графику (Козлова, Макарова, 2013).

Активность фосфатазы (X) выражали в миллиграммах P_2O_5 , мл 1 V (a-b) –p-0.45-100 на 100 г почвы за 1 час, где, а – количество фенолфталеина по графику опытного образца, мг; b – количество фенолфталеина по графику контрольного образца, мг; p – разведение; 100 – пересчет на 100 г почвы; 0.45 – коэффициент перевода фенолфталеинфосфата натрия в P_2O_5 , так как в субстрате одна молекула фенолфталеина связана с двумя молекулами фосфорной кислоты. Растворяли 0.01 г фенолфталеина в 60 мл этилового спирта и объем доводили до 100 мл (1 мл этого раствора содержит 0.1 мг фенолфталеина). Далее отбирали аликвоты образцового

раствора, соответствующие 0.02; 0.04; 0.06; 0.08; 0.1 мг P_2O_5 в 50 см³, окрашивали, как и испытуемые растворы, колориметрировали и строили калибровочный график (Козлова, Макарова, 2013). Показатель фосфатазной активности (мг P_2O_5 / г почвы) далее в работе называли единица фермента – ед. ф.

Определение протеазы (по А.Ш. Галстяну, 1978). Принцип метода основан на учете количества аминокислот, образующихся при протеолизе внесенных в почву белков путем связывания их в окрашенные комплексы (Бондарь, Садыкова, 2007).

На технических весах взвешивали 1 г почвы и помещали в колбу Эрленмейера на 50 мл. Приливали 10 мл 1 % раствора желатина или казеина, приготовленного на фосфатном буфере (рН 7.4). Колбу закрывали корковой пробкой, взбалтывали на ротаторе 3 мин, и ставили в термостат на 24 ч при температуре 30°C. По истечении времени добавляли 5 мл дистиллированной воды и содержимое колбы фильтровали в стакан.

В стеклянную пробирку брали 5 мл аликвоты, добавляли пипеткой 0.5 мл 0.1 н раствора H_2SO_4 . Приливали 3 мл 20 %-го раствора Na_2SO_4 , который в слабокислой среде осаждает белки. Еще раз фильтровали раствор в пробирку, прибавляли пипеткой 1 мл 2 %-го раствора нингидрина, взбалтывали. Пробирку с раствором нагревали в кипящей водяной бане в течение 10 мин. Окрашенный раствор из пробирки переносили в мерную колбу на 50 см³, доводили объем дистиллированной водой до метки, перемешивали. Колориметрировали на ФЭКе в кюветах шириной 5 мм, используя зеленый светофильтр (длина волны 540 нм).

Активность протеазы (X) выражали в миллиграммах глицина на 100 г:

$$x = a \cdot p \cdot 100 / n$$

где, а – количество глицина по калибровочному графику, мг; р - разведение; n – навеска почвы, г; 100 – пересчет на 100 г почвы. Чистый глицин (0.1 г) растворяли в 100 см³ дистиллированной воды. 1 см³ этого раствора содержит 1 мг глицина. Из основного раствора брали в мерные колбы на 50 см³ 2, 4, 6, 8, 10 см³ раствора, добавляли все реактивы, как описано выше, окрашивали нингидрином. Показатель протеазной активности (мг глицина / г почвы) далее в

работе называли единица фермента – ед. ф.

Определение уреазы. Для приготовления фосфатного буфера смешивали два раствора а и б по 810 и 900 мл, соответственно. Раствор а приготавливали добавлением 11.876 г Na_2HPO_4 в 1 л воды, раствор б - 9.078 г KH_2PO_4 также в 1 л воды.

В колбы отобрали 5 г почвы, 10 мл 10 % мочевины и 15 мл фосфатного буфера, 24 часа компостировали при 38°C. После компостирования помещали 15 мл 1н.КCl в каждую колбу (1н.КCl-74.55 г KCl на 1л воды). Затем фильтровали в стакан. К оставшейся почве в колбах приливали 10 мл воды и завершали декантацией в те же стаканы. Из стаканов брали аликвоту (2 мл фильтрата) в мерные 50 мл колбы, добавляли сегнетовой соли на кончике ножа, прибавляли 15–20 мл воды и реактив Несслера (2 мл), доводили водой до метки. Колориметрировали в кювете на 1см при длине волны 440 нм.

Определение пероксидазы. Метод Л.А. Карягиной, Н.А. Михайловой (1986) (Хазиев, 2005). В качестве субстрата использовали гидрохинон, который окисляется под действием пероксидазы в присутствии кислорода в 1,4-п-бензохинон, имеющий желтую окраску (Хазиев, 2005).

В коническую колбу емкостью 50 мл помещали 1 г почвы, заливали 10 мл свежеприготовленного 1 %-ного раствора гидрохинона, 1 мл 0.05 %-ного раствора перекиси водорода, тщательно перемешивали и помещали в термостат на 30 мин при 30°C. В качестве контроля в термостат помещали смесь растворов гидрохинона и перекиси водорода без почвы. После инкубации в опытные и контрольные колбы добавляли по 10 мл этилового спирта, тщательно перемешивали, и смесь фильтровали или центрифугировали. Спиртовую вытяжку, имеющую желтую окраску, колориметрировали на фотоколориметре с синим светофильтром против контрольных растворов. Количество парабензохинона рассчитывали по стандартной кривой, составленной с использованием раствора чистого парабензохинона (Хазиев, 2005). Активность пероксидазы выражали в миллиграммах 1,4-бензохинона на 1 г почвы за 30 мин при 30°C, далее по тексту называли единица фермента – ед. ф. (Хазиев, 2005).

Определение полифенолоксидазы. Метод Л. А. Карягиной, Н. А. Михайловой (1986). В качестве субстрата использовали гидрохинон. Под действием почвенных полифенолоксидаз при участии кислорода воздуха гидрохинон окисляется в 1,4-п-бензохинон желтого цвета, который определяется колориметрически (Хазиев, 2005). Определение активности полифенолоксидазы проводили таким же способом, что и пероксидазы, за исключением того, что в реакционную среду не вносили перекись водорода, поэтому активность полифенолоксидазы также выражали в миллиграммах 1,4-бензохинона на 1 г почвы за 30 мин при 30°C (Хазиев, 2005), далее по тексту называли единица фермента – ед. ф.

Подсчет коэффициента гумификации. По соотношению активности полифенолоксидазы и пероксидазы высчитывали коэффициент гумификации, ($K_{\text{гум}}$), позволяющий судить об интенсивности процесса минерализации гумуса (Покаржецкий, 2003; Хазиев, 2005).

2.5. Условия проведения лабораторных экспериментов

Наращивание биомассы антагонистов в лабораторных условиях

Перед планированием модельных лабораторных или полевых экспериментов в лабораторных условиях в течение 1.5–2 недель наращивали биомассу микроорганизмов (бактерий и микромицетов) с высокой биологической активностью: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. (Рисунок 2).

Для этого в микробиологические матрасы, заполненные питательной средой (сусло-агар (СА) для грибов, МПА для бактерий р. *Bacillus*, *Pseudomonas*, вносили водную суспензию грибов и бактерий (титр 10^6 спор / мл). После появления обильного роста микроорганизмов делали смывы с плотной среды стерильной водой в отдельные емкости. Для обработки семян хвойных получали необходимые для опыта водные суспензии (10^6 – 10^7 спор / мл) (Егоров, 1965).

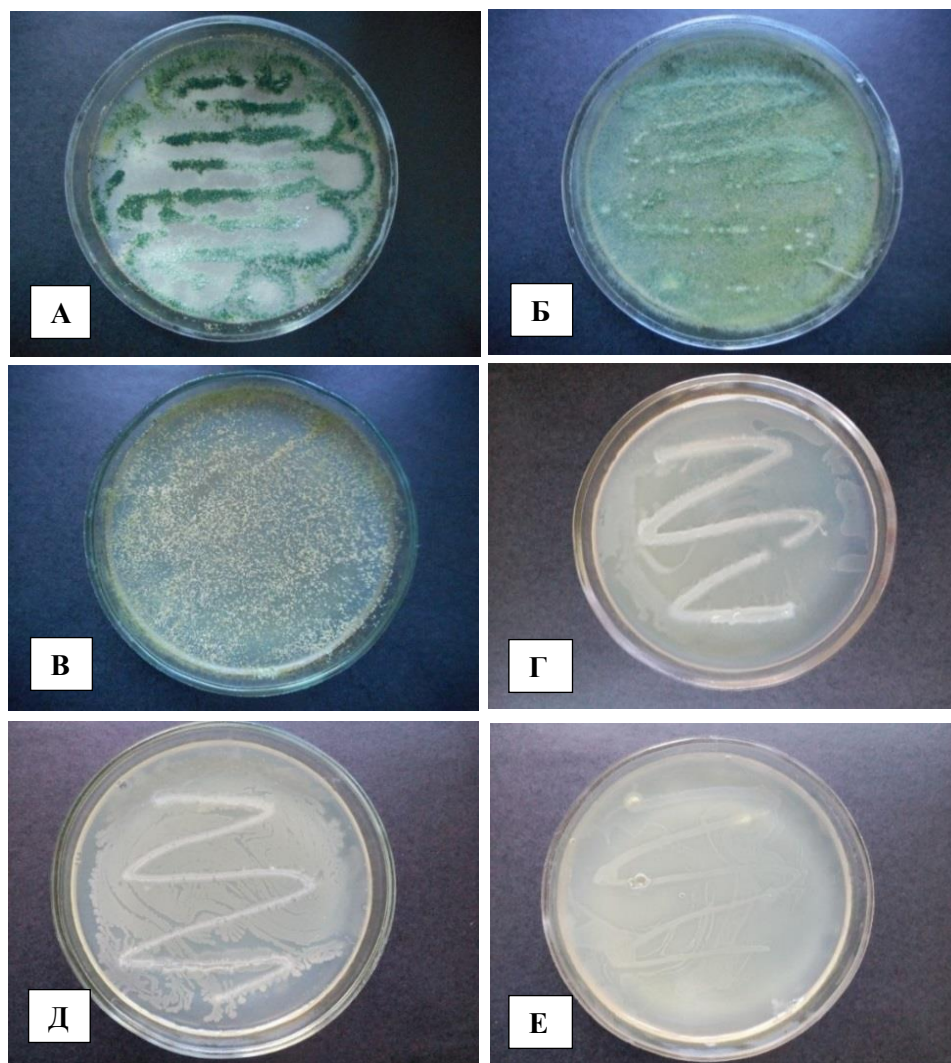


Рисунок 2 – Микроорганизмы-антагонисты: А) *Trichoderma harzianum*; Б) *Trichoderma lignorum*; В) *Trichoderma longibrachiatum*; Г) *Pseudomonas* sp.; Д) *Bacillus amyloliquefaciens*; Е) *Bacillus subtilis*

Ростстимулирующий эффект водных суспензий *T. harzianum*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum*, *B. amyloliquefaciens* (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 кл / мл) определяли по особенностям роста и развития семян сосны обыкновенной и лиственницы сибирской в чашках Петри. Отбирали наиболее благоприятную для роста семян концентрацию микроорганизма (10^7 кл / мл), которую, в дальнейшем, использовали в полевых опытах.

Наращивание биомассы фитопатогенов в лабораторных условиях

Перед планированием модельных лабораторных экспериментов с участием фитопатогенных грибов в лабораторных условиях в течение 1.5–2 недель наращивали биомассу фитопатогенов р. *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme* var *annullatum*, *F. oxysporum* B3). Для этого в чашки

Петри, заполненные питательной средой (сусло-агар (СА) вносили фитопатоген методом штриха. После появления обильного роста микроорганизмов делали смывы с плотной среды стерильной водой в отдельные емкости. Для добавления в почву методом полива в эксперименте *in vitro* получали необходимые для опыта водные суспензии (10^6 – 10^7 спор / мл) (Егоров, 1965).

Влияние микроорганизмов-антагонистов на прорастание семян сосны обыкновенной в лабораторном эксперименте (*in vitro*)

В лабораторных условиях в феврале 2014 г. был заложен опыт по изучению влияния микробиологической обработки на всхожесть и сохранность семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.).

Приготовление смеси почв для опыта in vitro. Почва для опыта была отобрана с двух участков леса, расположенных на Погорельском стационаре ИЛ СО РАН. Готовили стерилизованную и нестерилизованную почву. Стерилизованную почву готовили следующим образом: половину всей почвы просушивали в духовке в течение двух суток при температуре 250–300°C. Остальную половину (нестерильная почва) оставляли как есть. В двадцать пластиковых контейнеров (предварительно перфорированных по основанию, для выхода лишней воды) была распределена вся почва, в одну половину контейнеров – стерильная почва, в другую – нестерильная. Контейнеры со стерильной почвой поливали стерильной водой, контейнеры с нестерильной почвой – водопроводной, после этого вся почва оставлялась на одну ночь.

Подготовка семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). Семена сосны обыкновенной отсчитывали по 50 штук и засыпали в марлевые мешочки (всего 16 штук). Затем все мешочки с семенами замачивали в 0.05 % растворе KMnO_4 в течении 18 часов, после чего их высушивали при комнатной температуре в течении 18–20 часов. Высушенные после предобработки семена замачивали в суспензиях микроорганизмов-антагонистов (грибов), и выдерживали в течении трех часов. Контролем служили семена, замоченные на то же время в воде (H_2O). После замачивания мешочки с семенами высушивали при комнатной температуре. Посев

производили в контейнеры с приготовленной почвой в четырех вариантах по схеме, приведенной в Таблице 2.

Таблица 2 - Схема проведения эксперимента *in vitro*

	Почва			
	Нестерилизованная		Стерилизованная	
	I Без добавления фитопатогена	II С добавлением фитопатогена	III Без добавления фитопатогена	IV С добавлением фитопатогена
	Контроль (H ₂ O)	Контроль (H ₂ O)	Контроль (H ₂ O)	Контроль (H ₂ O)
Вариант обработки	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
	<i>Trichoderma lignorum</i>	<i>Trichoderma lignorum</i>	<i>Trichoderma lignorum</i>	<i>Trichoderma lignorum</i>
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>

В каждый контейнер высевали по 50 семян сосны обыкновенной в три посевные строки, всего было засеяно 16 контейнеров. После посева семян половина контейнеров со стерильной и нестерильной почвой были политы суспензией (смесью) из 5 штаммов фитопатогенных грибов рода *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme* var *annullatum*, *F. oxysporum* B3). На протяжении двух месяцев вели подсчет количества взошедших и сохранившихся семян и проростков. В конце эксперимента проростки отбирали на морфометрический анализ, а почву под ними – на микробиологический.

Влияние микробов-антагонистов и препаратов растительного происхождения на проращивание семян сосны обыкновенной в лабораторном эксперименте (*in vitro*)

Сравнивали стимулирующую активность биологических препаратов на основе микроорганизмов и растительного сырья, влияющие на рост и развитие сосны обыкновенной. Фитопрепараты, полученные механохимическим способом, были предоставлены заведующим лаборатории химии твердого тела, д.х.н. О. И. Ломовским (Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского Отделения Российской академии наук, г. Новосибирск).

В апреле 2016 г. был заложен опыт по изучению влияния микроорганизмов,

препаратов из растительного сырья и бурого угля на всхожесть семян сосны обыкновенной (Клинцаре, 1970).

Подготовка семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). В лабораторных условиях определяли всхожесть семян сосны обыкновенной (%), собранных в декабре 2013 г. в Аршанском лесничестве Тункинского национального парка. Семена сосны обыкновенной, предварительно замоченные в 0.05 % растворе KMnO_4 в течение 18 часов и высушенные при комнатной температуре, выдерживали в течение двух часов в суспензиях микроорганизмов-антагонистов (грибов, бактерий) и в водных растворах фитопрепаратов.

Суспензии микроорганизмов-антагонистов приготавливались по ранее описанной методике. Перед обработкой семян сосны порошковые растительные препараты были активированы следующим образом: 10 г препарата замачивали в 10 мл горячей (кипяченой) воды и оставляли настояться в течении 10 мин., затем доводили до объема в 1 л, и в этом растворе замачивали семена. Варианты обработки семян были следующими: 1) контроль (H_2O); 2) шелуха гречихи + 5 % NaOH (ШГ+5% NaOH); 3) веточки облепихи + рисовая шелуха (ВО+РШ); 4) шелуха риса + зеленый чай (ШР+ЗЧ); 5) веточки облепихи + зелень пихты (ВО+ЗЧ); 6) бурый уголь + NaOH (БУ+ NaOH); 7) шелуха риса + шелуха гречихи (ШР+ШГ); 8) *Trichoderma harzianum*; 9) *Trichoderma longibrachiatum*; 10) *Bacillus subtilis*; 11) *Bacillus amyloliquefaciens*.

В чашки Петри, дно которых было застелено стерильной ватой и двумя слоями стерильной фильтровальной бумаги, раскладывали по 25 семян, с соответствующим вариантом обработки. Каждый вариант опыта проведен в трехкратной повторности.

В течение 2х недель периодически смачивали стерильной водой каждую чашку, не допуская высыхания или переувлажнения, и отмечали количество проросших семян в каждом варианте обработки.

2.6. Особенности проведения полевых (натурных) экспериментов *in situ*

Влияние микробов-антагонистов на рост и развитие семян хвойных в условиях опытного питомника

С целью изучения влияния микробиологических агентов на прорастание семян и сохранность сеянцев сосны и лиственницы в искусственных фитоценозах совместно с коллегами из научно-исследовательского института сельского хозяйства и торфа (г. Томск), в течение двух вегетационных сезонов (2012–2013 гг.), выполняли исследования на опытном питомнике Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН на стационаре «Погорельский Бор».

Семена сосны обыкновенной и лиственницы сибирской, предварительно были замочены в течение двух часов в 0.05 % растворе KMnO_4 , а затем – на 2 часа в суспензиях (10^7 кл / мл) антагонистов: *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., *Trichoderma harzianum*.

Стимуляторы роста семян хвойных, обладающие антагонистической активностью *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp. были апробированы на сельскохозяйственных растениях (овес, пшеница, ячмень) и получены от д.б.н. Н.Н. Терещенко из научно-исследовательского института сельского хозяйства и торфа (ГНУ СибНИИСХиТ Россельхозакадемии, г. Томск).

В начале вегетационного сезона (май, 2012 г.) на опытном питомнике Погорельского стационара Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН для закладки опытов по стимулированию проращивания семян хвойных сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и лиственницы сибирской (*Larix sibirica* L.) были приготовлены две посевные гряды (по 4.5 м), на которых заложили опытные участки (50×50 см).

Посев семян хвойных при различных вариантах опыта. На модельных участках опытного лесопитомника 22 мая 2012 г. в трех повторностях высевали обработанные микроорганизмами семена хвойных в следующих вариантах: 1) контроль (H_2O) с мульчей из опилок; 2) *Bacillus* sp. (фосфатмобилизующие бациллы); 3) *Bacillus subtilis*; 4) *Pseudomonas* sp.; 5) *Trichoderma harzianum*; 6) контроль (H_2O) с мульчей из вермикулита. Высевали по 150 семян в три посевные

строки (450 семян на участок). После посева все участки, кроме шестого, засыпали слоем опилок (0.5–1.5 см). Учеты проводили с периода массовых всходов семян (через 30 дней), затем ежемесячно в течение всего периода вегетации (июнь–сентябрь).

Всего для проведения исследований было заложено 36 экспериментальных участков (50х50 см): 18 (6х3) под сосной обыкновенной, 18 (6х3) под лиственницей сибирской.

Обработка семян сосны обыкновенной штаммами-антагонистами с использованием добавочных субстратов (*in situ*)

Влияние добавочных органических субстратов на функционирование почвенных микробных сообществ. Исследования проводились на базе стационара ИЛ СО РАН. Эксперимент был заложен в июне 2011–2013 гг. в сосняке разнотравном с примесью березы, на темно-серых лесных почвах, в условиях ОЭХ «Погорельский бор», не подверженных антропогенному воздействию. В качестве объектов исследований были выбраны три участка площадью 1 кв. м каждый: 1) опытный с внесением микокомпоста, 2) опытный с добавлением опилок и 3) контрольный, без добавления опилок или микокомпоста.

После удаления верхнего подстилочного слоя почву разрыхляли на глубину 10 см и вносили опилки или микокомпост в количестве 1.1 кг, перемешивали для равномерного распределения. Затем почву уплотняли и снова накрывали подстилочным слоем. В контрольном варианте почву также разрыхляли, затем уплотняли и накрывали подстилочным слоем.

Микокомпост получали в лабораторных условиях путем твердофазного культивирования мицелия дереворазрушающего гриба *Trametes versicolor* (L.) Lloyd на увлажненных сосновых опилках. Культура гриба была изолирована из плодового тела в 1991 г. с.н.с. Пашеновой Н.В. и поддерживается в коллекции грибных культур лаборатории микробиологии и экологической биотехнологии ИЛ СО РАН. Увлажненные до 80 % сосновые опилки стерилизовали автоклавированием и после охлаждения засевали мицелием *T. versicolor*, выращенным на зерне пшеницы. Культивирование гриба на опилках длилось 2.5

месяца при 20–24°C, после чего мицелиально-опилочную массу измельчали и сушили. Ранее проведенный химический анализ микокомпоста показал, что в процессе культивирования базидиального гриба-ксилотрофа происходила частичная деградация лигно-целлюлозного комплекса опилок: по сравнению с исходными опилками содержание экстрагируемых веществ в микокомпосте увеличивалось в 2 раза (до 11.8 %), содержание лигнина снижалось на 3.5 % (до 24.55 %), целлюлозы – на 6.3 % (до 47.2 %) (Пашенова и др. 2009).

Отбор образцов и измерения параметров проводили ежемесячно. Выполняли стандартные анализы: измерение влажности и pH, определение субстрат-индуцированного и базального дыхания, посев на агаризованные питательные среды с целью выявления численности различных эколого-трофических групп микроорганизмов.

Методы по улучшению сохранности микробов-интродуцентов (антагонистов) в почве. Ранее, в течение ряда лет (2011–2013 гг.) на территории Погорельского стационара (ОЭХ ИЛ СО РАН) проводили экспериментальные опыты по приживаемости грибов-антагонистов рода *Trichoderma* на участках (30x30 см) темно-серой почвы сосняка Погорельского Бора. Суспензии конидий *T. harzianum* (штамм «Универсальный», получен в виде препарата «Триходермин» (Сибирский федеральный университет (КГУ) вносили в почву с древесными субстратами, предназначенными для улучшения условий обитания грибов-интродуцентов. В качестве таких субстратов использовали сосновые опилки и микокомпост, полученный с.н.с., к.б.н. Н. В. Пашеновой, в результате биоконверсии сосновых опилок культурой дереворазрушающего гриба *Trametes versicolor* (Пашенова и др., 2009). Учитывая химический состав древесины, субстраты обогащали азотсодержащей добавкой (мочевиной) (3.3 г / м²).

Стимулирующая активность химических и биологических препаратов. На опытном питомнике ИЛ СО РАН в условиях стационара «Погорельский бор» в 2014 г. проведены исследования по влиянию химических (микроэлементы) и биологических (микробы-антагонисты) обработок на рост и развитие семян сосны

обыкновенной на почве с добавочным субстратом. Исследовали и сравнивали влияние на семена и сеянцы сосны обыкновенной следующие штаммы: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma longibrachiatum*, а также – микроэлемента $\text{CuSO}_4 \cdot 5 (\text{H}_2\text{O})$. Предпосевную обработку семян проводили так же, как и в эксперименте 2012 г. Семена сосны обыкновенной предварительно замачивали на 18–20 часов в 0.05 % растворе KMnO_4 , а затем на 18–20 часов в суспензиях (10^9 кл / мл) антагонистов и 0.2 % растворе $\text{CuSO}_4 \cdot 5 (\text{H}_2\text{O})$. Кроме того, для большей сохранности и активности антагонистов в почву, в качестве добавочного субстрата, внесли микокомпост (185 г), а в контрольную почву – опилки (78 г).

В начале вегетационного сезона (май) 2014 г. на опытном питомнике Погорельского стационара Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН для закладки опытов по стимулированию проращивания семян хвойных сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L) была приготовлена посевная гряда (4.0 м), на которой заложили опытные участки (50×50 см).

Посев семян сосны обыкновенной при различных вариантах опыта. На модельных участках опытного лесопитомника в мае 2014 г. в трех повторностях высевали обработанные микроорганизмами и микроэлементом семена сосны обыкновенной в следующих вариантах:

1) контроль (семена, замоченные в H_2O) и почва перемешана с опилками; 2) семена, обработанные микромицетом *T. harzianum*, вносили в почву, перемешанную с микокомпостом; 3) семена, обработанные микромицетом *Trichoderma lignorum*, вносили в почву, перемешанную с микокомпостом; 4) семена, обработанные микромицетом *Trichoderma longibrachiatum*, вносили в почву, перемешанную с микокомпостом; 5) семена, замоченные в $\text{CuSO}_4 \cdot 5 (\text{H}_2\text{O})$, вносили в почву, перемешанную с микокомпостом. Высевали по 50 семян в три посевные строки (150 семян на участок). После посева все участки мульчировали опилками (слой 0.5–1.5 см). Грунтовую всхожесть учитывали через 30 дней после посева, учеты количества и состояния проростков и сеянцев проводили ежемесячно

(с периода массовых всходов семян) в течение всего периода вегетации (июнь-сентябрь).

Всего для проведения исследований было заложено 6 экспериментальных участков (50х50 см) с сосной обыкновенной.

Обработка семян сосны обыкновенной микробами-антагонистами и фитопрепаратами (*in situ*)

Стимулирующая активность биологических препаратов на основе микроорганизмов и растительного сырья. На опытном питомнике Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН в условиях стационара «Погорельский бор» в 2016 г. проведены полевые исследования по влиянию предпосевной обработки семян сосны обыкновенной микроорганизмами-антагонистами и фитопрепаратами на рост и развитие семян сосны обыкновенной. Исследовали и сравнивали влияние на семена и сеянцы следующих штаммов: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, смеси грибов рода *Trichoderma*, смеси бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, препаратов на основе извлечения активных компонентов из растительного сырья и бурого угля механохимической переработкой (фитопрепараты). Предпосевную обработку семян проводили так же, как и в эксперименте 2012 г. Семена сосны обыкновенной, предварительно замачивали на 6 часов в 0.05 % растворе KMnO_4 , а затем на 3 часа в суспензиях (10^7 кл / мл) микробов-антагонистов и фитопрепаратах.

В начале вегетационного сезона (май, 2016 г.) на опытном питомнике Погорельского стационара Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН для закладки опытов по стимулированию проращивания семян (хвойных) сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) была приготовлена посевная гряда (4.0 м), на которой заложили 10 опытных участков (50×50 см).

Посев семян сосны обыкновенной при различных вариантах опыта. На модельных участках опытного лесопитомника в трех повторностях высевали обработанные микроорганизмами и препаратами семена сосны обыкновенной в следующих вариантах:

- 1) контроль (H_2O); 2) Шелуха гречихи и 5 %NaOH (ШГ+5 % NaOH); 3)

Шелуха риса + зеленый чай (ШР+ЗЧ); 4) Бурый уголь + NaOH (БУ+NaOH); 5) Шелуха риса + шелуха гречихи (ШР+ШГ); 6) *Trichoderma harzianum*; 7) *Trichoderma longibrachiatum*; 8) смесь грибов р. *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum*); 9) *Bacillus amyloliquefaciens*; 10) смесь бактерий (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp.). На опытный участок высевали по 150 семян в три посевные строки (всего 450 семян). После посева все участки мульчировали опилками (слой 0.5–1.5 см). Грунтовую всхожесть учитывали через 30 дней после посева, учеты количества и состояния проростков и сеянцев проводили ежемесячно (с периода массовых всходов семян) в течение всего периода вегетации (июнь-сентябрь).

2.7. Статистическая обработка результатов

Математическая обработка экспериментальных данных проведена с использованием пакета программ *Microsoft Excel* 2007, 2013 и русифицированной версии интегрированного пакета анализа статистических данных *Stat Soft Statistika* 12.0 на уровне значимости 0.05-0.01. Выбор статистических анализов обусловлен результатом предварительных процедур: проверка гипотезы нормальности распределения экспериментальных данных (критерий Шапиро-Уилка) и однородности дисперсий выборок (критерий Левена). Установление количественных связей между эколого-трофическими группами микроорганизмов и влиянием температуры, pH и влажности почвы проводили с помощью корреляционного анализа Пирсона для данных с нормальным распределением и Спирмена – для распределения, отличающегося от нормального (Гельман, 2003; Мястицкий, 2009). Коэффициенты корреляции (r) значимы при доверительной вероятности 95 и 99 %.

Коэффициент пространственной вариации (CV, %) экспериментальных данных рассчитывали отношением стандартного среднего отклонения и среднего ($\times 100\%$).

Обработку данных проводили методами статистического анализа -

описательная статистика – одномерный анализ для нахождения средней, квадратичной ошибки среднего, t-критерий Стьюдента и уровни достоверности; пошаговый дискриминантный анализ (Discriminant Function Analysis, DCA); одномерный дисперсионный анализ (Analysis of Variance, ANOVA); аналог одномерного (однофакторного) дисперсионного анализа – метод Краскала-Уоллиса (напараметрический метод) (Пузаченко, 2004). Факторный анализ методом главных компонент выполнен в программе *Stat Soft Statistika 12.0*.

Глава 3. Влияние систематических агротехнических нагрузок на почву лесного питомника

Поскольку выращивание лесопосадочного материала для искусственного лесовосстановления требует периодической агротехнической обработки почв (вспашка, использование пестицидов, изъятие сорной растительности), то такие явления как падение основных показателей биогенности и истощение почвы, неизбежны. На примере опытного лесного питомника (ОЭХ «Погорельский бор» ИЛ СО РАН), который ранее не эксплуатировался, с целью исследования состояния микробиома почвы под воздействием систематических агротехнических нагрузок в течение 5 лет (2012–2016 гг.) проводили ряд экспериментов с посевами семян хвойных. Для улучшения биогенности почвы питомника, качества и сохранности сеянцев хвойных использовали разные варианты предпосевной обработки семян, вместе с семенами (во время посевов) вносили микробных антагонистов, микроэлементы ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) и фитопрепараты.

3.1. Изменение почвенных параметров и состояния микробиоценоза опытного питомника на протяжении исследований (2012-2016 гг.)

Известно, что при ежегодном возделывании почв питомников и изъятии из них питательных веществ, несмотря на внесение минеральных и органических удобрений, происходит их деградация и ухудшение лесорастительных свойств (Васильченко, 2014).

В почве опытного лесопитомника результаты биохимического и микробиологического анализов в начале (2012 г) и в конце (2016 г) полевых экспериментов показали некоторые изменения физико-химических и биологических показателей, происходящие при периодическом возделывании.

За пятилетний период исследований (2012–2016 гг.) особенности среднемесячных температур воздуха и количество осадков привели к повышению средней температуры почвы с 17.5 до 19.2°C, и понижению влажности почвы с 14.2

до 11.9 %. Значения pH среды в контроле изменились в сторону подкисления (с 7.1 до 6.8), в то время как в почве с внесенными микроорганизмами существенных достоверных изменений pH не отмечено (Таблица 3).

Таблица 3 – Изменение некоторых параметров темно-серой почвы питомника за время исследований (2012–2016 гг.)

Вариант почвы	pH почвы	Влажность почвы, %	Nвал, мг/100г	Температура почвы, °С	Сорг, %	Микробная биомасса, мкг С / г почвы	Микробный метаболический коэффициент, мкг С-СО ₂ / мг С _{мик} / ч	Общее микробное число, млн КОЕ / г почвы
2012	7.1	14.2	60.1	17.5	4.1	251	37	4.7
2014	7.3	19.4	81.5	16.4	3.8	239	33	4.2
2016	6.8	11.9	76.4	19.2	3.1	154	55	4.1

В сложившихся гидротермических условиях почвы и наличии постоянного выноса питательных веществ, при низком их поступлении, отмечено изменение содержания общего азота и углерода. В почве питомника содержание азота увеличивалось (с 60.1 до 81.5 мг/100г) при повышении температуры, и уменьшалось (с 81.5 до 76.4 мг/100г) при ее понижении ($r=0.44$). В целом же, к концу экспериментов отмечалось снижение содержания валового азота в почве. Одновременно с этим в почве отмечено и снижение содержания углерода, что свидетельствует о постепенном уменьшении органического вещества в исследуемой почве (Таблица 3).

Постоянный вынос питательных веществ из почвы отразился на состоянии микробоценоза. Значения общей численности микроорганизмов в почве за 2012- 2016 гг. (в контроле и при обработке микроорганизмами) изменялись в соответствии с сезонной динамикой (Таблица 3, Рисунок 3 (1А, 1Б)). В контроле 2016 г. ОМЧ уменьшилось на 0.6 млн КОЕ / г почвы по сравнению с 2012 г., в то время как при обработке микроорганизмами значительно не изменилось. При этом изменялось соотношение основных ЭКТГМ. Так, в контрольной почве численность гидролитико-копиотрофного комплекса снижалась, а олиготрофного – повышалась

(в 1.3 раза).

В почве под посевами хвойных отмечены изменения и в динамике микробной биомассы (МБ). Содержание МБ контрольного варианта постепенно снижалось, и к концу экспериментов (2016 г) стало в 2 раза меньше начальных значений, о чем свидетельствует $R^2=0.78$ (Рисунок 3 (2А), Таблица 3).

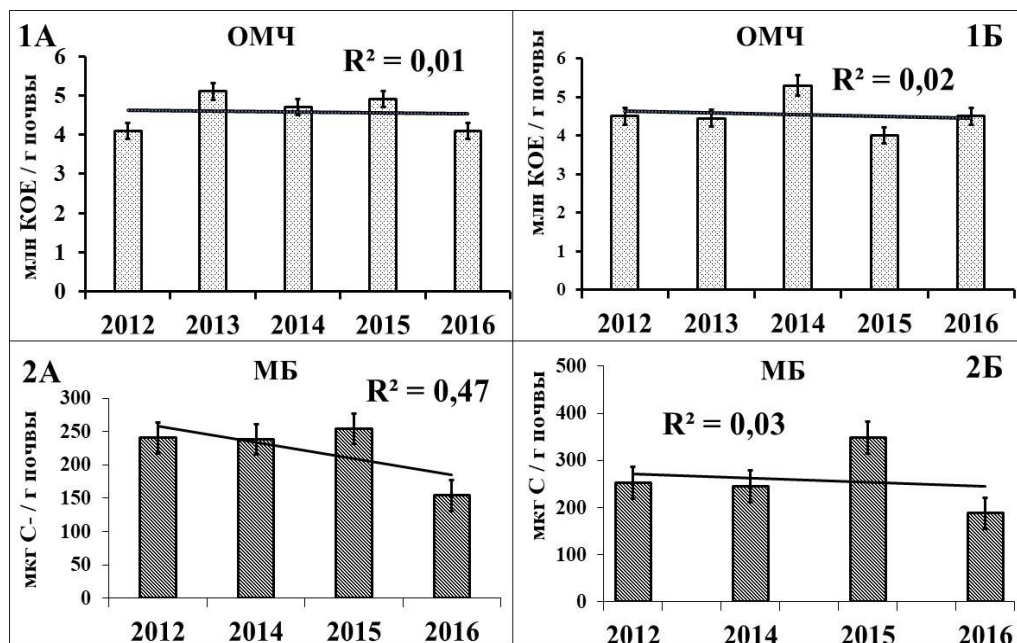


Рисунок 3 – Средние значения общей микробной численности (ОМЧ) (1) и микробной биомассы (МБ) (2) на протяжении исследований (2012–2016 гг.): А – контроль; Б – обработка микроорганизмами; R^2 – коэффициент детерминации

Другая ситуация отмечена в почвах с внесением микроорганизмов, содержание микробной биомассы в опытных вариантах постоянно изменялось в течении четырех вегетационных сезонов, однако достоверного ее снижения отмечено не было, что подтверждает линия тренда $R^2=0.03$ (Рисунок 3 (2Б), Таблица 4).

Таблица 4 – Изменение некоторых параметров темно-серой почвы питомника при обработке семян хвойных микроорганизмами за время исследований (2012–2016 гг.)

Вариант почвы	рН почвы	Влажность почвы, %	Температура почвы, °С	Микробная биомасса, мкг С / г почвы	Микробный метаболический коэффициент, мкг С-СО ₂ / мг С _{мик} / ч	Общее микробное число, млн КОЕ / г почвы
2012	7.0	16.5	17.4	252	35	4.5
2014	7.2	18.9	16.3	245	38	4.1
2016	6.8	16.7	19.1	188	30	4.5

Периодическая вспашка почв, отток органики, понижение ОМЧ, МБ и сложившиеся гидротермические условия отразились в повышении значений микробного метаболического коэффициента с 2012 к 2016 году (с 37.5 до 55.4 мкг С-СО₂ / мг С_{МИК} / ч) в почве контроля, что говорит о нарастании стрессового состояния микробоценоза в результате антропогенной нагрузки (Рисунок 4А, Таблица 3, 4).

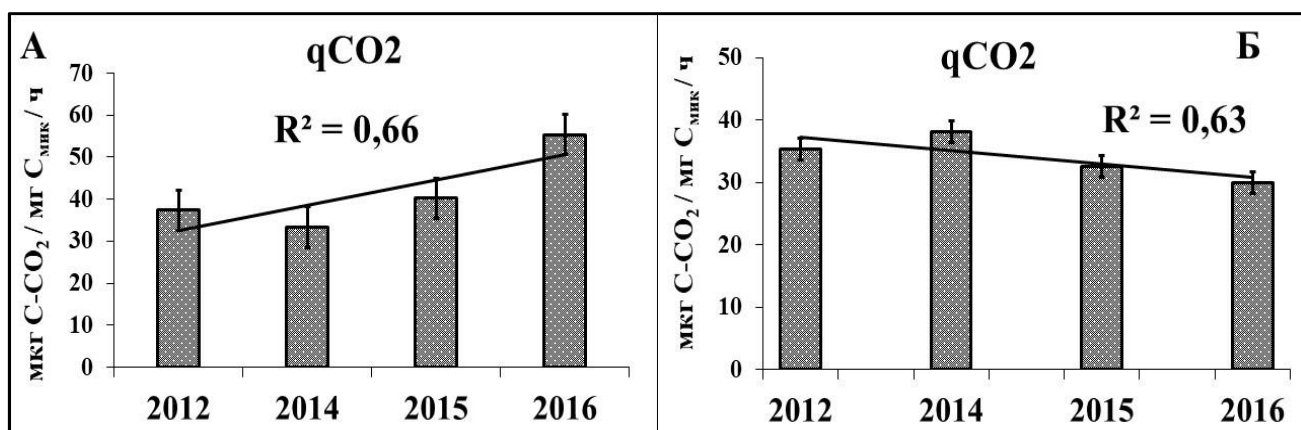


Рисунок 4 – Средние значения микробного метаболического коэффициента (qCO_2) на протяжении исследований (2012–2016 гг.): А) – контроль; Б) – обработка микроорганизмами; R^2 – коэффициент детерминации

Установившаяся тенденция повышения значений qCO_2 в контроле отчетливо прослеживается на Рисунке 4А, где линия тренда имеет острый угол, и $R^2=0.67$. В то время как в вариантах с микроорганизмами значения qCO_2 достоверно снижаются ($R^2=0.63$) (Рисунок 4Б, Таблица 4). Следовательно, при внесении в почву вместе с семенами хвойных микроорганизмов-антагонистов значения микробного метаболического коэффициента постепенно снижаются (с 2012 по 2016 гг.), отмечается тенденция к постепенному улучшению состояния почвы, к ее восстановлению.

Таким образом, в период с 2012 по 2016 гг. в периодически возделываемой почве опытного лесопитомника в контрольном варианте была отмечена достоверная тенденция к снижению содержания валового азота, углерода, МБ, повышению микробного метаболического коэффициента, указывающего на начало процессов деградации почвы. При внесении в почву микроорганизмов-антагонистов с семенами хвойных отмечали увеличение содержания МБ и

снижение значений $q\text{CO}_2$.

3.2. Состояние прокариотного микробиома почвы опытного питомника в начале и после завершения экспериментов (2012–2016 гг.)

В настоящее время важная роль отводится изучению почвенного микробиома с помощью методов молекулярной биологии – метагеномных исследований. Анализ почвенной ДНК подтвердил наличие в почве большого числа некультивируемых микроорганизмов, доля которых может составлять до 90 % от состава сообщества (Handelsman, 2004; Першина и др., 2016; Delgado-Baquerizo et al, 2018). Этими авторами показано, что почвенный метагеном содержит в себе огромный объем генетической информации (в 1 г почвы может содержаться 10^9 – 10^{10} бактериальных геномов). Количественный анализ таксономического состава почвенного сообщества показал, что число видов микроорганизмов, формирующих это сообщество, исчисляется тысячами. Исследование почвенных микробиомов с использованием современных методов секвенирования (на основе 16S рРНК) перспективно для оценки агроэкологического состояния почвы, особенно после воздействия антропогенных факторов. Следовательно, изучение и знание особенностей почвенного микробиома позволит использовать его как универсальный и чувствительный индикатор состояния почвы (Чирак и др., 2013; Першина и др., 2016).

Качественный анализ микробного сообщества почвы питомника (в начале и в конце экспериментов – 2012 и 2016 гг.) проведен на основе изучения полиморфизма гена 16S рРНК. В результате анализа почвенной ДНК домена Bacteria отмечено, что доля некультивируемых микроорганизмов в исследуемой почве составляет от 0.3 до 0.5 %. Выявлено 25 фил прокариотного сообщества микробиома почвы питомника, среди которых доминировали 11 фил (*Proteobacteria* – 39.2 %, *Actinobacteria* – 27.8 %, *Acidobacteria* – 11.6 %, *Verrucomicrobia* – 4.3 %, *Gemmatimonadetes* – 2.7 %, *Firmicutes* – 1.8 %, *Bacteroidetes* – 1.8 %, *Planctomycetes* – 1.8 %, *Chloroflexi* – 1.6 %, *Armatimonadetes* –

1.4 %, *Spirochaetes* – 1.3 %, *Candidatus Saccharibacteria* – 1.3 %, *Chlamydiae* – 0.3 %) (Таблица 5).

Таблица 5 – Наиболее многочисленные (по ОТЕ) филы домена *Bacteria* в слое 0–10 см темно–серой лесной почвы Погорельского опытного питомника (2012–2016 гг.)

Таксономическая группа	Доля филоспецифичных ОТЕ (%) от общего числа полученных последовательностей	
	2012 год	2016 год
Филы (типы)		
<i>Proteobacteria</i>	39.2	30.1
<i>Acidobacteria</i>	11.6	9.5
<i>Actinobacteria</i>	27.8	29.0
<i>Firmicutes</i>	1.8	0.9
<i>Chloroflexi</i>	1.6	1.4
<i>Verrucomicrobia</i>	4.3	5.4
<i>Bacteroidetes</i>	1.8	1.3
<i>Gemmatimonadetes</i>	2.7	1.8
<i>Spirochaetes</i>	1.3	1.1
<i>Candidatus Saccharibacteria</i>	1.3	1.8
<i>Cyanobacteria</i> / <i>Chloroplast</i>	0.7	0.3
<i>Planctomycetes</i>	1.8	2.0
<i>Nitrospirae</i>	0.099	0.055
<i>Crenarchaeota</i>	0.4	0.8
<i>Armatimonadetes</i>	1.4	1.0
<i>Chlamydiae</i>	0.3	0.9
WS3	1.2	0.3
Unclassified Bacteria	0.3	0.3
Классы		
<i>Alphaproteobacteria</i>	19.4	11.0
<i>Betaproteobacteria</i>	4.5	4.8
<i>Deltaproteobacteria</i>	2.4	4.0
<i>Gammaproteobacteria</i>	4.9	4.3
<i>Actinobacteria</i>	7.8	10.3
<i>Spartobacteria</i>	2.3	2.5
<i>Opitutae</i>	2.3	2.9
<i>Flavobacteria</i>	0.6	0.3
<i>Acidobacteria_Gp1.</i>	2.9	2.5
<i>Acidobacteria_Gp3</i>	1.8	1.9
<i>Acidobacteria_Gp6.</i>	4.4	4.0
<i>Gemmatimonadetes</i>	1.3	2.7
<i>Planctomycetacia</i>	1.8	2.0
<i>Bacillii</i>	1.3	0.1
<i>Clostridia</i>	0.6	0.003
<i>Chlamydiia</i>	1.1	0.8
<i>Nitrospira</i>	0.099	0.055
<i>Chlamydiae</i>	0.1	0.1
<i>Armatimonadia</i>	1.4	1.0

Окончание таблицы 5

Таксономическая группа	Доля филоспецифичных ОТЕ (%) от общего числа полученных последовательностей	
	2012 год	2016 год
Классы		
<i>Chloroplast</i>	0.6	0.3
<i>Thermoprotei</i>	0.4	0.8
<i>Bacteroidia</i>	1.7	0.5
<i>Spirochaetes</i>	1.3	1.0
<i>Anaerolineae</i>	0.6	0.5
<i>Chloroflexy</i>	0.7	0.5
<i>Caldinaeae</i>	0.05	0.04

Большая часть бактерий, как в начале экспериментов по выращиванию сеянцев хвойных, так и в конце, была представлена филой *Proteobacteria*, и насчитывала четыре класса. Наиболее обширным был класс *Alphaproteobacteria* (19.4 %), доля классов *Betaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria* составила 4.5 и 4.9 %, соответственно, *Deltaproteobacteria* – 2.4 %.

В почве 2016 года, по сравнению с почвой 2012 года, отмечали снижение доли *Alphaproteobacteria* с 19 до 11 % – большей части грамотрицательных бактерий, включающих симбионты растений, что мы связываем со снижением влажности почвы и изменением pH в кислую сторону (Таблица 5). Класс *Alphaproteobacteria* содержит морфологически, физиологически и метаболически разнообразные бактерии из родов *Rhizomicrobium*, *Mesorhizobium*, *Bauldia*, *Variibacter*, *Sphingomonas*, *Oligotropha*, являющихся важными участниками гидролитического микробного сообщества и активно участвующих в минерализации органических веществ почвы.

Доля представителей класса *Betaproteobacteria*, аэробных и факультативно анаэробных бактерий повысилась к 2016 году с 4.5 до 4.8 % в связи с изменением кислотности среды. Ранее отмечено, что доля *Betaproteobacteria* снижается и при уменьшении концентрации кислорода в почве (Taipale et al., 2009). В свою очередь, на представителей классов *Gammaaproteobacteria* и *Deltaproteobacteria* pH почвы не оказывало значимого влияния ($r \geq 0.4$). Содержание органического углерода в почве питомника в 2016 г. положительно сказалось на количестве бактерий класса

Deltaproteobacteria, их доля увеличилась с 2.3 до 4.0 % (Таблица 5). Бактерии класса *Deltaproteobacteria* являются хемолитотрофами или хемоорганотрофами, используют простые органические компоненты и тяготеют к олиготрофии (Environmental Microbiology ... , 2011). Снижение доли класса *Gamma**proteobacteria* к концу экспериментов может свидетельствовать о снижении естественной восстановительной способности почвы, так как этот класс включает в себя род *Pantoea* (порядок *Enterobacteriales*), ответственный за производство фермента фитазы, который разрушает в почве соли фетиновой кислоты, снижающей в почве биодоступность общего фосфора, кальция, магния, цинка и многих других минералов (Suleimanova et al., 2015).

Однако в почве питомника велика была доля актинобактерий (*Actinobacteria*), включающих в себя грамположительные бактерии с высоким содержанием Г-Ц пар в ДНК (Dhanasekaran, Jiang, 2016). Причем в данной почве увеличивается доля, относящихся к группе низших актинобактерий (роды *Mycobacterium*, *Actinomyces* и *Nocardia*, *Actinobacteria*), которые по типу метаболизма тяготеют к копиотрофии. В свою очередь, преобладание копиотрофных групп является характерной чертой нарушенных биоценозов (Nascke et al., 2011; Dhanasekaran, Jiang, 2016; Wu et al., 2017; Андронов и др., 2012). В почве 2016, как в почве 2012 года сложились благоприятные условия (уровень pH и влажность почвы) для представителей класса *Actinobacteria*. В результате этого доля актинобактерий увеличилась с начала эксперимента к концу с 7.8 до 10.3 %.

Разнообразие и общее количество выделенных ОТЕ филы *Firmicutes* – грамположительных бактерий, продуцирующих в большом количестве биологически активные вещества (антибиотики, органические кислоты, ацетоны, спирты и др.) (Gu et al., 2010), существенно снижено. В основном это представители только одного класса *Bacilli*, в 2012 г., их доля в почве питомника составила 1.3 %, а к 2016 г. существенно снизилось – до 0.9 %. В то время как в ненарушенных почвах отмечено присутствие представителей класса *Clostridia*, указывающее на наличие дополнительных анаэробных экологических ниш, что может являться

косвенным показателем развитости агрегатной структуры почвы (Першина и др., 2016).

Большое количество представителей филы *Gemmatimonadetes* свидетельствует об их адаптации к низким значениям почвенной влаги. Из литературных данных известно, что они являются типичными представителями засушливых почв, и их разнообразие снижается, если почва часто подвергается циклам понижения / повышения влажности (DeBruyn et al, 2011; Fawaz, 2013; Першина и др., 2016). Доля бактерий из филы *Gemmatimonadetes* в почве засушливого 2012 года составила 1.3 %, а к концу 2016 года, при еще большем иссушении почвы (увеличение влажности до 11.9%), их количество увеличилось до 2.7 % (Таблица 5).

Представители филы *Acidobacteria* активно разлагают органические вещества, такие как лигнин (Shahnavaz, Geremia, 2012). В почве исследуемых участков (2012 г.) их доля составила 11.6 %, фила была представлена в основном 6 классами (Gr 1, Gr 3, Gr 4, Gr 6, Gr 13, Gr 16). К концу экспериментов (2016 г.) доля филы *Acidobacteria* снизилась (до 9.5 %) и зависела от значений pH, что согласуется с данными (Bates et al., 2011).

Еще одна доминантная фила – *Verrucomicrobia*, чья культивируемая часть является свободноживущими факультативными или облигатно анаэробными, сахарорасщепляющими и олиготрофными бактериями, была представлена классами *Spartobacteria*, *Opitutae*, суммарная доля которых составила 4.3 % в почве 2012 г. и 5.4 % – в 2016 г. При этом в начале экспериментов доминировал класс *Spartobacteria* (2.3 %), а в конце – *Opitutae* (2.9 %) – грамотрицательные хемоорганотрофные аэробные бактерии, частые представители пахотных почв. Отмечено, что увеличение филы *Verrucomicrobia* происходит при низком уровне соли в почве (Bergmann et al., 2011; Першина и др., 2013).

Фила *Bacteroidetes* в почве питомника представлена классами *Bacteroidia* и *Flavobacteria*, их доля снизилась с 2012 к 2016 году с 1.8 до 1.3 %, при этом класс *Bacteroidia* был доминантным на протяжении всего периода (1.9 и 0.5 %, соответственно) (Таблица 5). Отмечено, что на долю представителей филы

Bacteroidetes заметное отрицательное влияние оказывало изменение pH почвы в кислую сторону. Снижение бактерий филы *Bacteroidetes* негативно сказывается на плодородии почвы, так как, например, к этой филе (класс *Bacteroidia*) принадлежат виды рода *Cytophaga*, обладающие целлюлолитической активностью (Lauber et al., 2009; Naegele et al., 2011; Гридасова и др., 2015).

Грамотрицательные фотосинтетические и нефотосинтетические бактерии филы *Chloroflexi* в начале эксперимента составляли 1.6 % (Bjornsson et al., 2002). В исследуемой почве преобладали классы *Anaerolineae* (0.6%) и *Chloroflexi* (0.6 %), представителей класса *Caldilineae* было существенно меньше (0.05 %). Распределение в почве питомника других доминантных групп было следующим: в 2012 г. представители фил *Planctomycetes*, *Candidatus Saccharibacteria* составили 1.8 и 1.3 %, но к 2016 году их доля повысилась до 2.0 и 1.8 %, соответственно. Доли фил *Spirochaetes* (класс *Spirochaetes*) (1.3 %), *Chlamydiae* (класс *Chlamydiae*) (1.2 %), *Armatimonadetes* (класс *Armatimonadia*) (1.4 %), близких к филе *Chloroflexi*, снизились к концу экспериментов до 1.1, 0.9 и 1.0 %, соответственно (Таблица 5).

В 2012 г. представители фил *Cyanobacteria / Chloroplast* (0.7 %), *Nitrospirae* (0.1 %), WS3 (0.3 %) и часть неидентифицируемых групп бактерий (0.3 %) являлись минорными группами (<1 %). В 2016 г. доля *Cyanobacteria / Chloroplast* снизилась с 0.7 до 0.3 %, а представителей филы *Nitrospirae* с 0.099 % до 0.055 %. Известно, что *Nitrospira* – аммоний окисляющие бактерии являются денитрификаторами, а бактерии *Cyanobacteria / Chloroplast* производят фермент нитрогеназу, вовлекаемую в процессы денитрификации, сокращение этих двух фил в почве приводит к уменьшению скорости накопления азота (Xu et al., 2017; Tamez-Guerra et al., 2017).

Фила *Crenarchaeota* домена Archaea, представленная классом *Thermoprotei*, в почве увеличилась в два раза с 2012 по 2016 год (с 0.4 до 0.8 %) (Таблица 5), что предположительно связано запасами азота в почве и постоянной ее вспашкой. Как правило, повышенная доля архей *Crenarchaeota* в почве свидетельствует о некотором экстремальном состоянии, ее экологической нестабильности (Bates, et al., 2011; Song et al., 2010; Першина и др., 2016).

Значение эдафических факторов в формировании микробных сообществ отмечено рядом исследований (Torsvik et al., 1996; Yao et al., 2000; Baath, Anderson, 2003; Edwards, Rohwer, 2005; Balci et al., 2010; Lauber et al., 2008; Першина и др., 2012; Ward et al., 2017). Распределение бактериальных фил зависит от физико-химических факторов среды и структуры почвы, где наиболее сильное влияние оказывают влажность и pH (Fierer et al., 2006; Lauber et al., 2009; Shange et al, 2012). Анализ микробиомов почвы питомника в 2012 и 2016 гг. показал влияние некоторых эдафических параметров на качественный состав прокариот. Кислотность почвы (pH) оказывала существенное влияние на развитие представителей фил *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*), *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*; влажность почвы – на *Gemmatimonadetes*, *Actinobacteria* и бактерий из класса *Alphaproteobacteria*; содержание C_{org} – на *Deltaproteobacteria*.

Изменения качественного состава микробоценоза исследуемой почвы демонстрирует анализ прокариотного микробиома. В течение 5 лет отмечено снижение доли фил гидролитико-копиотрофного комплекса (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, высших *Actinobacteria*), и повышение фил, тяготеющих к олиготрофии (низшие *Actinobacteria*, *Verrucomycrobia*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*) и ксерофитных форм (*Gemmatimonadetes*), что является индикатором антропогенно-нарушенных почв и указывает на снижение ее продуктивности.

Глава 4. Определение биологической активности и фитопатогенных свойств у музейных культур микроорганизмов в лабораторных условиях (*in vitro*)

Микроорганизмы-антагонисты, способные подавлять развитие патогенной и увеличивать численность сапротрофной микрофлоры, а также стимулировать рост и развитие растений, являются перспективными кандидатами в качестве биологической защиты сеянцев хвойных в условиях лесных питомников. Для качественного отбора таких микроорганизмов необходимо провести скрининг наиболее перспективных из них. Кроме того, микроорганизмы-антагонисты при длительном хранении или частых пересевах на богатые культуральные среды могут не только терять / снижать свою биологическую активность, но и прекращать синтез каких-либо метаболитов (Кузнецова и др., 2013; Заболотных, Якушкин, 2016). Поэтому первым этапом работы с аборигенными штаммами-антагонистами является тестирование их биологической активности в стационарных лабораторных условиях (*in vitro*).

Перед проведением лабораторных исследований изолированные нами из почв лесных питомников микромицеты р. *Trichoderma* (*T. sp.* и *T. spp.*) и р. *Fusarium* (*F.1 sp.*, *F.2 sp.*, *F.3 sp.*, *F.4 sp.*, *F.5 sp.*) были идентифицированы до родовой принадлежности на основании морфологических признаков (форма и размер микро- и макроконидий, наличие и форма конидиеносцев) (Рисунок 5), изоляты бактерий р. *Bacillus* – на основании культурально-физиологических свойств. Видовая принадлежность микроорганизмов проверена молекулярно-генетическими методами совместно с лабораторией лесной генетики Центра защиты леса Красноярского края (г. Красноярск) и ЦКП «Геномика» (г. Новосибирск).

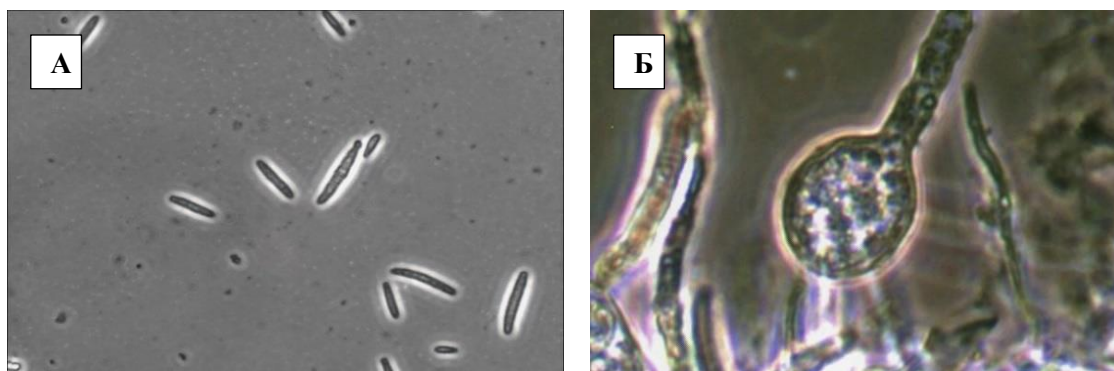


Рисунок 5 – А) Микроконидии гриба *Fusarium oxysporum* при увеличении 10x40; Б) Концевая хламидоспора гриба *Fusarium moniliforme* var *annullatum* при увеличении 10x100

В результате секвенирования и изучения видоспецифичных отрезков (18S) рДНК была подтверждена (уточнена) видовая принадлежность изолятов: *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma lignorum*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme* var *annullatum*, *F. oxysporum* ВЗ и *Bacillus amyloliquefaciens*, и на основе изучения полиморфизма гена 16S рРНК – бактерии *Bacillus amyloliquefaciens*.

4.1. Антагонистическая активность исследуемых штаммов

Важной задачей при отборе штаммов антагонистов в качестве биологических агентов является определение механизма, с помощью которого наиболее эффективно достигается антагонизм между полезным микроорганизмом и патогеном (Luna-Romero, Carvajal, 2007).

Для определения степени проявления антагонистической активности и механизмов действия антагонистов на патогены было исследовано влияние четырех штаммов-антагонистов (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma longibrachiatum* и *Bacillus amyloliquefaciens*) к пяти штаммам фитопатогенных грибов рода *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme* var *annullatum*, *F. oxysporum* ВЗ) *in vitro* методом встречных культур (Regalado, Pinheiro, 2000; Cullimore et al., 2001).

При анализе результатов было отмечено, что в контроле все пять штаммов патогена р. *Fusarium* интенсивно разрастались и занимали практически всю

площадь чашки Петри, диаметр их колоний в среднем составлял 6.4 см, при этом все штаммы образовывали хорошо развитый воздушный мицелий и вырабатывали яркие пигменты (*F. proliferatum*, *F. oxysporum* ВЗ) (Рисунок 6А, Б). Другую ситуацию отмечали в чашках Петри с антагонистами: в одних случаях фитопатогены не смогли образовать развитый воздушный мицелий, в других – не образовывали пигмент (Рисунок 6А).

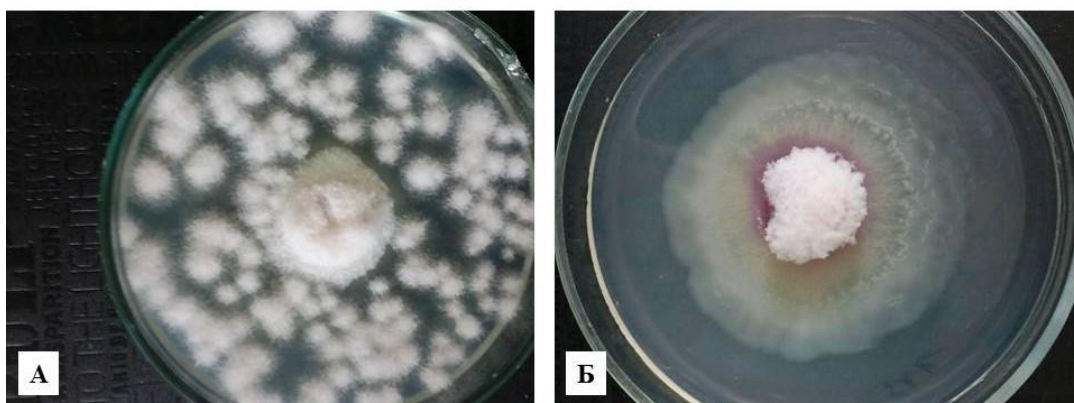


Рисунок 6 – Рост грибов р. *Fusarium* в контроле: штамм *F. moniliforme* (А), штамм *F. oxysporum* ВЗ (Б)

В результате исследования антагонистической активности исследуемых штаммов по отношению к грибам р. *Fusarium* было обнаружено два механизма воздействия антагонистов на патогены:

1) образование зоны антагонистического действия – зона сдерживания роста патогена (антагонизм);

2) микофильность (гиперпаразитизм) – использование антагонистом патогена в качестве субстрата, захват большой площади питательной среды и рост антагониста на самом патогене.

Отмечено, что все три микромицета р. *Trichoderma* способны к гиперпаразитизму, при этом *T. harzianum* и *T. longibrachiatum* проявляли микофильность по отношению к трем патогенам р. *Fusarium* из пяти, а *T. lignorum* – к двум. У *Bacillus amyloliquefaciens* отмечена антифунгальная (антагонистическая) активность, проявление которой зависело от вида патогена, что согласуется с литературными данными (Duffy et al., 2003; Звенигород и др., 2004; Курамшина и др., 2014).

Гриб *T. harzianum* проявлял максимальную степень подавления роста патогенов *F. oxysporum* (Рисунок 7Г) и *F. proliferatum* с эффектом микофильности на 10-е сутки, степень ингибирования патогена (СИ) составляла 100 %. Рост штамма *F. moniliforme*, также с эффектом микофильности, ингибировался меньше – на 7–22 % (на 5-е и 10-е сутки, соответственно) (Таблица 6, Рисунок 7В). По отношению к штаммам *F. moniliforme* var. *annullatum* и *F. oxysporum* ВЗ отмечали проявление антагонизма: на 5-е сутки (Рисунок 7Б), степень ингибирования составляла 59 и 53 %, на 10-е – 84 %. В присутствии антагониста грибы *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme* var. *annullatum* не образовывали плотного воздушного мицелия, подобно контрольному варианту (Рисунок 7Б, Г).

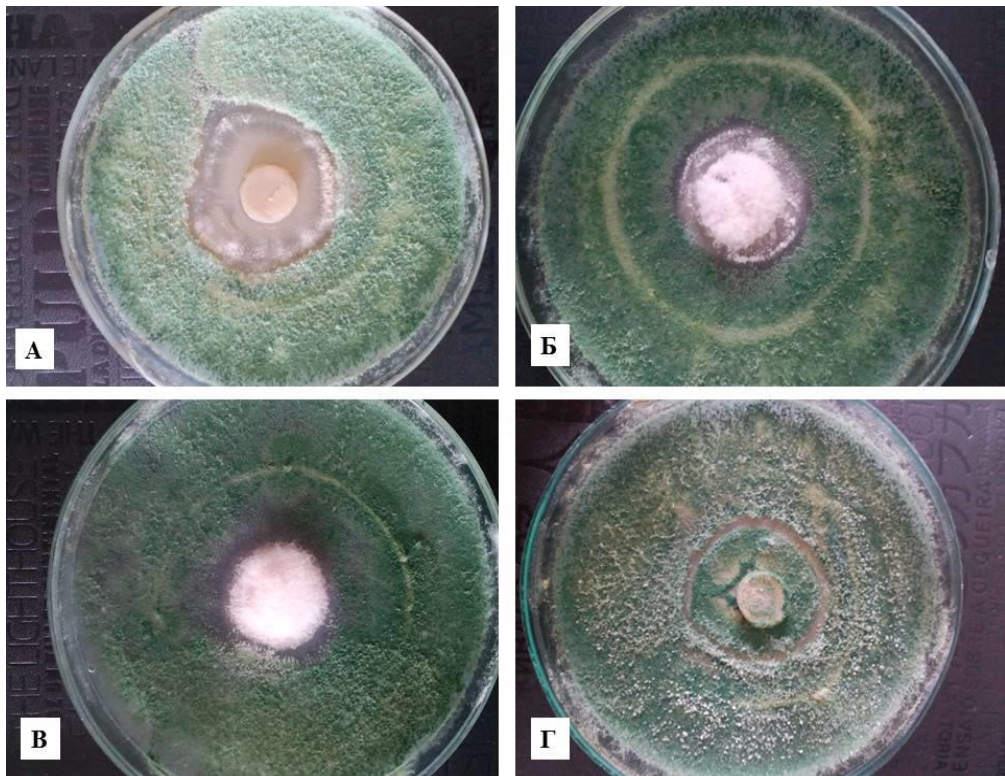


Рисунок 7 – Механизм действия гриба *Trichoderma harzianum*: антагонизм (сдерживание роста патогена) патогена *F. oxysporum* ВЗ на 5-е сутки (А); начало гиперпаразитизма (микофильность) к штамму *F. oxysporum* на 5-е сутки (Б) и к штамму *F. moniliforme* на 7-е сутки (В); гиперпаразитизм к штамму *F. oxysporum* (Г)

Микромицет *T. lignorum* проявлял микофильность к *F. moniliforme* на 5-е сутки (Рисунок 8В) и *F. proliferatum* – на 10-е сутки с максимальной степенью ингибирования (100 %) (Рисунок 8Г, Таблица 6). В вариантах с патогенами *F. oxysporum*, *F. moniliforme* var. *annullatum*, *F. oxysporum* ВЗ (Рисунок 8А и 8Б)

зафиксировано проявление антагонизма, гриб образовывал плотный валик из мицелия вокруг колоний патогенов, степень ингибирования роста которых составила 41, 56 и 67 %, соответственно.

Таблица 6 – Степень ингибирования (СИ) антагонистами фитопатогенных грибов р. *Fusarium* (%).

Штаммы-антагонисты	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. moniliforme</i>		<i>F. proliferatum</i>		<i>F. moniliforme</i> var <i>annullatum</i>		<i>F. oxysporum</i> ВЗ	
	сутки		сутки		сутки		сутки		сутки	
	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10
<i>Trichoderma harzianum</i>	30	100*	7	22*	47	100*	59	84	53	84
<i>Trichoderma lignorum</i>	21	41	19*	19	46	100*	62	56	49	67
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	39	41	29*	38	61	74	77*	100	61*	73
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	31	25	16	47	44	54	36	41	56	64
*Гиперпаразитизм										

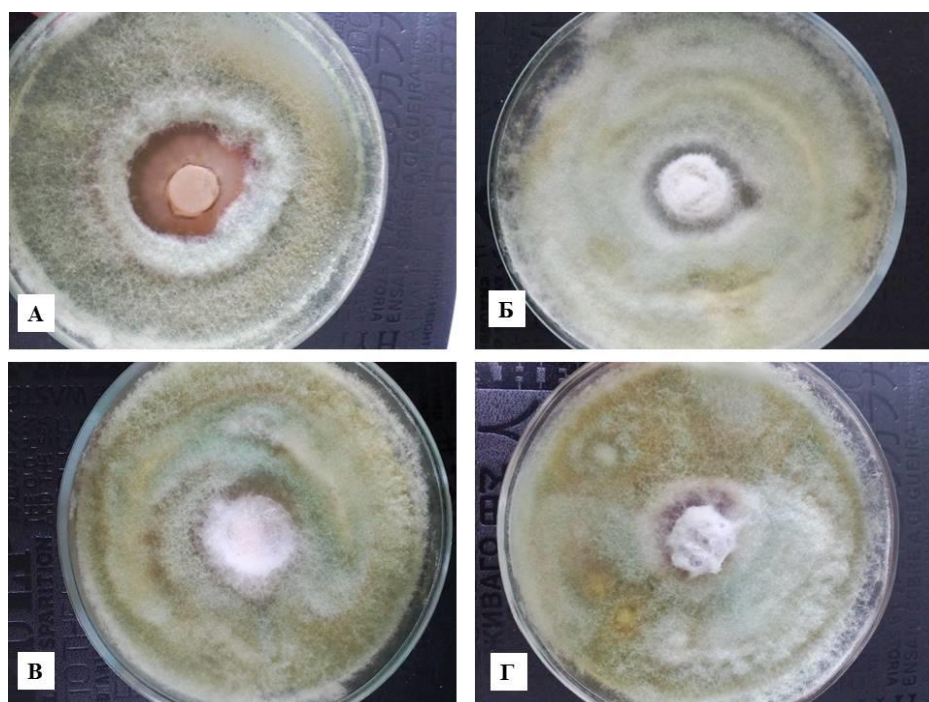


Рисунок 8 – Механизм воздействия гриба *Trichoderma lignorum*: антагонизм к *F. oxysporum* (А) на 5-е сутки и *F. moniliforme* var *annullatum* (Б) на 10-е сутки; микофильность по отношению к *F. moniliforme* (В) на 5-е сутки и к *F. proliferatum* (Г) – на 10-е сутки

Отмечено, что во всех вариантах опыта *T. lignorum* образовывал хорошо

развитый воздушный мицелий с окраской от белого до желто-зеленого цвета (Рисунок 8А-Г), при этом антагонист ингибировал рост воздушного мицелия у *F. oxysporum* и *F. moniliforme* var *annullatum*, а у *F. oxysporum* ВЗ и снижал пигментацию колонии по сравнению с контролем.

Микромицет *T. longibrachiatum* паразитировал на *F. moniliforme*, *F. moniliforme* var *annullatum* и *F. oxysporum* ВЗ (Рисунок 9Б и 9В), во всех трех случаях гиперпаразитизм проявлялся уже на 5-е сутки. В варианте с *F. moniliforme* var *annullatum* наблюдали максимальную степень ингибирования роста патогена (100 %) на 10-е сутки (Рисунок 9Г), с *F. proliferatum* – 74 % на 10-е сутки. Минимальная СИ, отмеченная на 10-е сутки, была у *F. moniliforme* (13 %) (Рисунок 9В). Кроме того, микромицет *Trichoderma longibrachiatum* проявлял антагонизм к *F. oxysporum* (Рисунок 9А) и *F. proliferatum*, и ингибировал их рост на 41 и 74 %, соответственно (Таблица 6).

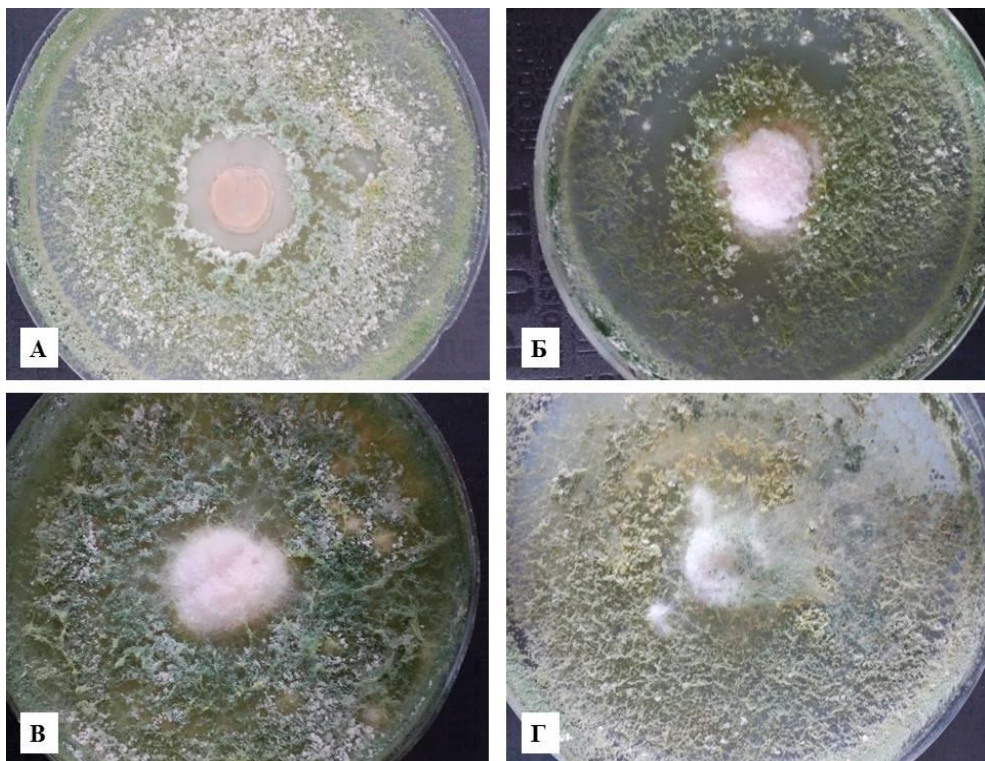


Рисунок 9 – Механизм действия гриба *Trichoderma longibrachiatum*: антагонизм к *F. oxysporum* на 10-е сутки (А); начало гиперпаразитизма на 5-е сутки к *F. oxysporum* ВЗ (Б) и к *F. moniliforme* (В); гиперпаразитизм к *F. moniliforme* var *annullatum* на 10-е сутки (Г)

При выращивании двойной культуры антагониста и фитопатогена *F. oxysporum*, отмечено, что у патогена регистрировали очень слабое развитие

мицелия, а при выращивании антагониста с *F. oxysporum* ВЗ последний терял свой яркий розово-фиолетовый пигмент (Рисунок 9Б).

Анализ результатов эксперимента с воздействием на патогенные грибы бактерии *Bacillus amyloliquefaciens* показал, что ее антагонистическая активность в лабораторных условиях была ниже, чем у грибов, бактерия не способна к гиперпаразитизму.

Бациллы *B. amyloliquefaciens* проявляли антагонизм ко всем патогенам р. *Fusarium*, однако степень ингибирования их роста была ниже, чем в вариантах с микромицетами р. *Trichoderma*. Так бактерии *B. amyloliquefaciens* подавляли рост *F. proliferatum* и *F. oxysporum* ВЗ на 10-е сутки на 54 и 64 %, соответственно (Таблица 6, Рисунок 10В, Г). Минимальная степень подавления роста патогенов отмечена с *F. moniliforme* (16 %) на 5-е сутки (Рисунок 10А), на 10-е – 47 % (Рисунок 10Б), ингибирование роста *F. oxysporum* отмечено только на 10-е сутки (31 %).

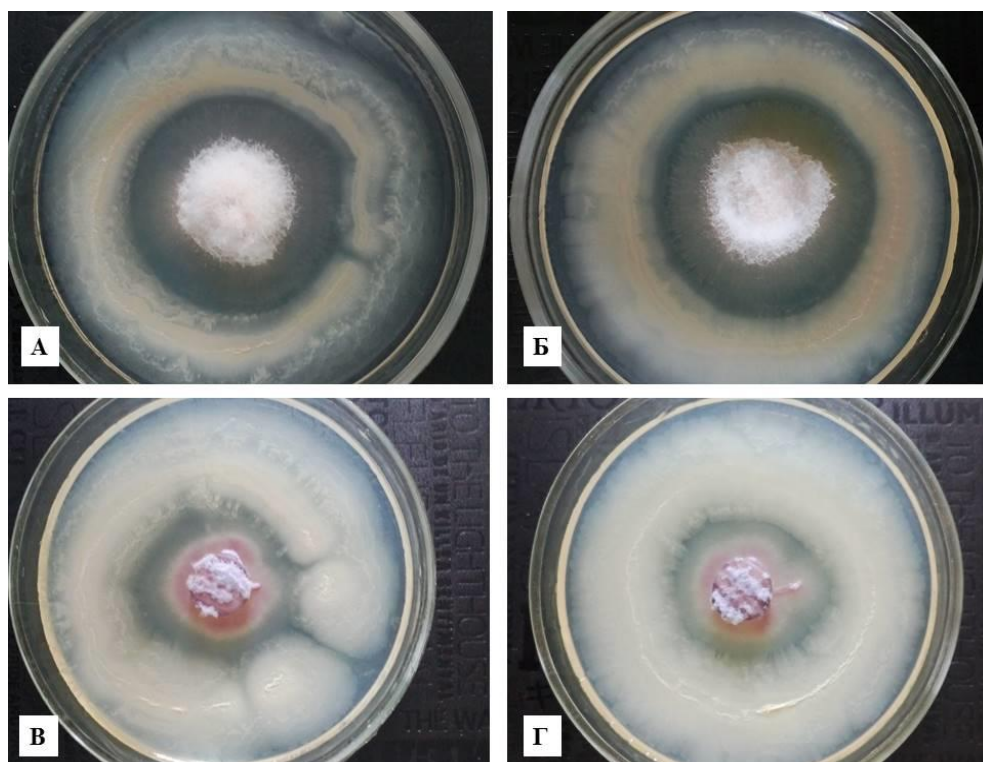


Рисунок 10 – Механизм действия *Bacillus amyloliquefaciens*: антагонизм к *F. moniliforme* на 5-е (А) и на 10-е сутки (Б); антагонизм к *F. proliferatum* на 5-е (В) и на 10-е сутки (Г)

При совместном выращивании бацилл и грибов-патогенов в двойной

культуре, как и в варианте с актинобактериями, патогенны *F. proliferatum* и *F. oxysporum* ВЗ были способны выделять пигменты, однако у *F. proliferatum* подавлялось развитие воздушного мицелия (Рисунок 10В, Г).

В результате исследований *in vitro* штаммы-антагонисты показали разную степень ингибирования в зависимости от времени инкубирования (5 или 10-е сутки) и вида тестируемого патогена.

Наличие у микромицетов р. *Trichoderma* не только способности к антагонизму, но и к гиперпаразитизму дает основание заключить, что выделенные нами грибы р. *Trichoderma* обладают полифункциональным механизмом действия на патогены, они способны не только сдерживать и подавлять их рост посредством выделения антагонистических веществ, но также способны использовать их (фитопатогены) в качестве субстрата.

Поскольку почти все исследуемые микроорганизмы-антагонисты проявили высокую степень ингибирования фитопатогенных грибов и у некоторых из них выявлена способность к гиперпаразитизму, возникла необходимость определения способности выделять литические ферменты у исследуемых антагонистов. Именно литические ферменты, как известно, ответственны за способность антагонистов не только гидролизовывать сложные органические соединения, что позволяет им быть конкурентоспособными, но также и гидролизовывать клеточные стенки патогенов, используя их как субстрат. Поэтому мы исследовали антагонистов на способность продуцировать трех основных литических ферментов – хитиназы, липазы и протеиназы (Sivan, Chat, 1989).

4.2. Ферментативная активность микроорганизмов-антагонистов

Среди множества ферментов, которыми, как отмечено разными авторами, обладают штаммы-антагонисты, наибольшее значение имеют ферменты группы гидролаз, а именно: хитиназа, липаза и протеиназа (Журавлева, Лукьянов, 2004; Раднагуруева, 2009).

Липаза – один из самых распространенных в живых организмах

термостабильный фермент, катализирующий расщепление сложноэфирных связей в липидах. Этот фермент необходим для гидролиза молекулы триацилглицеридов с образованием диглицеридов, моноглицеридов, жирных кислот и глицерина, также он катализирует реакцию этерификации и переэтерификации (Шаламова, Тырсин, 2012; Сорокина и др., 2013; Бардина и др., 2013; Чан, 2013; Максимов, Яруллина, 2015).

В результате лабораторных исследований четыре антагониста из шести показали наличие липазной активности. Самой сильной активностью обладал микромицет *T. harzianum*, немного слабее (средняя активность) – *T. lignorum* (Таблица 7).

Еще один важный фермент для антагонистов – хитиназа – широко распространен в живых организмах, отвечающий за деградацию хитина до мономеров и N-ацетилглюкозаминов. Благодаря хитинолитическим ферментам микроорганизмы способны деградировать хитин (распространенный в живых организмах), например, при помощи секретирования хитиназы, они размягчают клеточную стенку грибов (микофильность) и делают возможным использовать их как субстрат (Журавлева, Лукьянов, 2004; Максимов, Яруллина, 2015).

В литературе есть данные, что представители родов *Bacillus*, *Trichoderma* обладают хитинолитической активностью (Журавлева, Лукьянов, 2004). В результате нашего экспресс-исследования у микромицетов *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* отмечена сильная хитиназная активность, а у штамма *T. lignorum* – средняя. Такие результаты соответствуют как литературным данным (Sivan, Chat, 1989; Журавлева, Лукьянов, 2004; Садыкова и др., 2015), так и результатам нашего исследования, где микромицеты р. *Trichoderma* проявляли микофильность по отношению к патогенным грибам р. *Fusarium*. Самой слабой хитиназной активностью обладали бактерии *B. amyloliquefaciens* (Таблица 7).

Протеазы (протеиназы) – экзоферменты микроорганизмов и растений, играют важную роль в деструкции органического вещества, катализируя гидролитическое расщепление белков растительных и животных остатков и органического удобрения до полипептидов, а затем до аминокислот, действуя на

пептидную связь (Валуева, 2002; Раднагуруева, Лаврентьева, 2009; Титова, Козлов, 2012). Продуцирование протеаз (протеиназ) микроорганизмами выявляют по способности гидролиза казеина, сложного пищевого (молочного) белка, богатого аминокислотами (Мустафаева и др., 2012; Максимов, Яруллина, 2015).

Таблица 7 – Продуцирование гидролитических ферментов исследуемыми антагонистами

Штамм	ферменты		
	липаза	протеиназа	хитиназа
<i>Trichoderma harzianum</i>	++++	++	++++
<i>Trichoderma lignorum</i>	+++	-	+++
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	++++
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	-	+
- отсутствие активности; + очень слабая активность; ++ слабая активность; +++ средняя активность; ++++ сильная активность			

Проведение тестирования антагонистов на способность гидролизовать казеин показало, что слабую протеиназную активность проявляли *T. harzianum* и *B. amyloliquefaciens* (Таблица 7).

Таким образом, показано, что микромицеты *Trichoderma harzianum*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum* обладали очень сильной хитиназной активностью, *T. harzianum*, *T. lignorum* – сильной и средней липазной и протеиназной активностью. У бацилл *B. amyloliquefaciens* была самая слабая активность всех трех ферментов.

4.3. Влияние микроорганизмов-антагонистов на прорастание семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в присутствии патогенов и без них

В лабораторных условиях был заложен опыт по изучению влияния микробиологической обработки на всхожесть и сохранность семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.).

В эксперименте *in vitro* проверено влияние предпосевной обработки семян сосны обыкновенной на всхожесть семян, количество и качество проростков. Семена сосны, предварительно обработанные водными суспензиями антагонистов

(титр 10^7 кл / мл), были посеяны в кюветы со стерилизованной и нестерилизованной серой лесной почвой в следующих вариантах в четырехкратной повторности: (контроль (вода), *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma longibrachiatum*) (Рисунок 11).

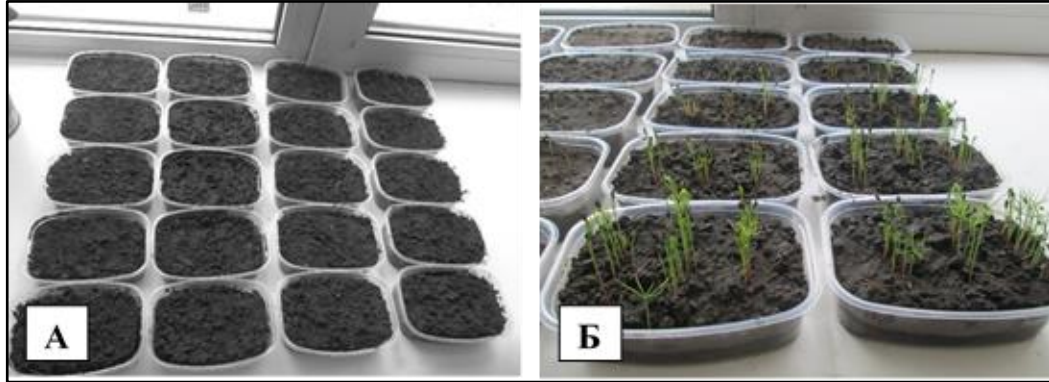


Рисунок 11 – Варианты лабораторного опыта А) кюветы с посевами семян сосны обыкновенной, Б) массовые всходы проростков через месяц после посева

После посева семян кюветы разделили на две части, в половину кювет были внесены водные суспензии смесей фитопатогенных грибов (5 грибов рода *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme* var *annullatum*, *F. oxysporum* ВЗ), методом полива. На протяжении двух месяцев наблюдали за количеством и состоянием всходов в зависимости от варианта опыта и обработки почвы.

Период массовой всхожести, прорастание и сохранность семян сосны обыкновенной. Анализ результатов показал, что время, за которое семена сосны достигали массовой всхожести зависело от варианта обработки семян и состояния почвы (стерилизованная/нестерилизованная), но практически не зависело от присутствия в почве популяций фитопатогенов. В нестерилизованной почве без добавления фитопатогенов (I) и с добавлением (II) в контроле семена достигали периода массовой всхожести на 34-е и 35-е сутки. В этих же вариантах (I, II) у семян сосны, обработанных грибами р. *Trichoderma*, период массовой всхожести приходился на 41 сутки (Таблица 8).

Таблица 8 – Количество проростков в зависимости от варианта обработки семян и типа почвы (на протяжении всего опыта), %

Тип почвы		Вариант обработки	Сутки													
			27	28	30	32	34	35	38	39	41	49	52	55	59	61
Нестерилизованная почва	(I) Без патогенов	Контроль (H ₂ O)	26	32	46	50	60	56	56	58	44	10	6	4	2	2
		<i>Trichoderma lignorum</i>	6	10	28	42	52	60	64	64	72	58	12	26	24	20
		<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	4	4	16	44	48	56	72	70	74	52	38	42	38	38
		<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	2	14	22	32	44	56	44	6	16	12	14
	(II) С патогенами	Контроль (H ₂ O)	32	56	62	70	78	54	68	68	12	0	0	0	0	0
		<i>Trichoderma lignorum</i>	2	4	16	24	48	52	56	58	44	50	4	6	4	4
		<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	2	2	2	4	8	10	16	34	32	22	24	8	4
		<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	2	4	14	28	38	42	62	52	28	22	12	8
Стерилизованная почва	(III) Без патогенов	Контроль (H ₂ O)	68	68	96	80	88	82	88	82	80	78	84	78	80	78
		<i>Trichoderma lignorum</i>	10	26	42	52	68	64	70	68	68	68	74	72	66	66
		<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	6	8	16	8	54	56	58	64	64	56	54	48	50	52
		<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	-	12	22	54	68	68	64	66	64	60	56
	(IV) С патогенами	Контроль (H ₂ O)	60	68	76	64	74	74	76	74	48	40	40	42	38	40
		<i>Trichoderma lignorum</i>	36	44	62	66	74	72	70	84	62	64	52	54	54	54
		<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	2	22	38	56	66	60	74	78	68	62	16	42	36	30
		<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	-	18	22	56	64	58	56	52	50	46	42

В стерилизованной почве, как без добавления фитопатогенов (III), так и с добавлением (IV), период массовых всходов семян совпадал: в контроле – на 30-е сутки, с обработкой грибами р. *Trichoderma* – на 39-е сутки, за исключением *T. lignorum* (IV) – на 52-е сутки (Таблица 8). Максимальная всхожесть семян сосны за весь период эксперимента в нестерилизованной почве отмечена в варианте без патогенов (I) при обработке *T. longibrachiatum* (74 %), с патогенами (II) – при обработке *T. lignorum* (58 %) и контроле (78 %). В стерилизованной почве (III) максимальная всхожесть была в контроле (96 %) и *T. longibrachiatum* (по 74 %), в варианте (IV) с патогенами – при обработке *T. longibrachiatum* (78 %) (Таблица 8).

В нестерилизованной почве (I и II) самый большой отпад семян и проростков был в вариантах *T. harzianum* и *T. longibrachiatum* (в среднем 36.2 %). В стерилизованной почве (III и IV) наибольший отпад наблюдали с *T. longibrachiatum* и *T. harzianum* (в среднем 23.8 %).

К концу эксперимента в нестерилизованной почве (I и II) наблюдали резкую гибель проростков (в течение 7 суток) в контроле, чего не было отмечено со стерилизованной почвой (III, IV). Так, в почве без патогенов (I) на 49-е сутки резко сократилось количество проростков в контроле (их осталось 10 %), а в почве с фитопатогенами (II) количество проростков сократилось до 12 % на 39-е сутки. При обработке грибами р. *Trichoderma* в почве I и II варианта снижение числа проростков происходило плавно, и в целом сохранность их была выше, чем в контроле. Так при обработке *T. lignorum* сохранность проростков (количество оставшихся проростков) составила 20 и 4 % в вариантах I и II, соответственно, при обработке *T. longibrachiatum* – 38 % (I) и 4 % (II), и *T. harzianum* – 14 % (I) и 8 % (II). В контроле без добавления патогенов (I) сохранность проростков была равна 2 %, но в контроле с добавлением патогенов (II) к концу эксперимента все проростки погибли (Таблица 8, Рисунок 12).

В опытах со стерилизованной почвой (III, IV) резкой гибели проростков не отмечалось, сохранность проростков была высокой и варьировала от 30 до 78 %. Так в почве без фитопатогена (III) сохранность в контроле составила 78 %, в варианте с *T. lignorum* – 66 %, минимальные значения были отмечены в вариантах

T. longibrachiatum (52 %) и *T. harzianum* (56 %) (Таблица 8, Рисунок 12).

В стерилизованной почве с добавлением фитопатогенов (IV) сохранность была ниже в среднем на 18.4 % и составила в контроле 40 %, при обработках *T. harzianum* – 42 %, *T. longibrachiatum* – 30 %, *T. lignorum* – 54 %.

Таким образом, в лабораторных условиях семена сосны обыкновенной быстрее всходили в контроле (как с добавлением суспензии патогенов, так и без добавления), но к концу эксперимента именно в этом варианте опыта количество проростков резко снизилось и к концу опыта все проростки погибли (II).

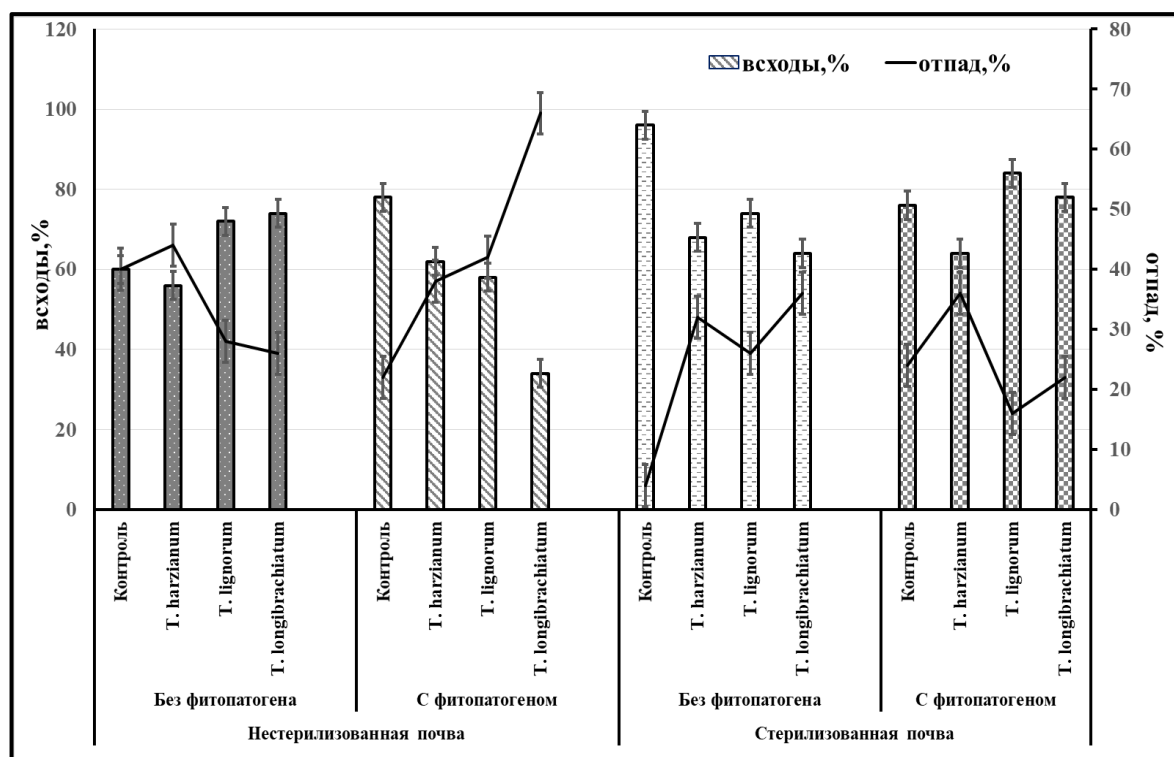


Рисунок 12 – Соотношение всходов и отпада семян (%) в зависимости от варианта обработки и состояния почвы

В результате исследования было отмечено, что в контроле период массовой всхожести наступал на 5 суток раньше, чем при обработке семян грибами рода *Trichoderma*, как в стерилизованной, так и в нестерилизованной почве. Сохранность проростков была выше в стерилизованной почве, а также при обработке семян микромицетами как в нестерилизованной, так и в стерилизованной почве. При внесении суспензии фитопатогенов лучшая сохранность проростков отмечалась в стерилизованной почве при обработке семян *Trichoderma lignorum*, в нестерилизованной – в варианте *Trichoderma harzianum*.

Морфометрические показатели проростков сосны обыкновенной. Анализ морфометрических показателей проростков сосны обыкновенной: длина всего проростка и его частей (мутовки, стебелька, корня), диаметр корневой шейки и вес проростка показал неоднозначное влияние на них вариантов обработки. В нестерилизованной почве без добавления фитопатогенов (I) все варианты обработки семян сосны микроорганизмами способствовали увеличению морфометрических параметров проростков по сравнению с контролем. Лучший результат показал штамм *T. lignorum*, средние значения всех морфометрических параметров (длина всего проростка, корня, стебелька, мутовки, диаметр корневой шейки и сухой вес) были выше чем в контроле, длина проростка в среднем на 24 %, диаметр корневой шейки – на 42 %, а вес проростка – на 40 % (Таблица 9).

В почве (I) отмечено также положительное влияние обработок *T. harzianum* и *T. longibrachiatum*: так *T. harzianum* увеличивал длину мутовки и корня на 35.3 %, а диаметр корневой шейки на 65 %, по сравнению с контролем. Обработка семян сосны *T. longibrachiatum* увеличивала длину мутовки, корня, диаметр корневой шейки и вес всего проростка на 30.2, 8.5, 90.9 и 36.4 %, по сравнению с контрольными значениями.

В почве с добавлением фитопатогенов (II) все проростки в контроле погибли. Максимальные значения морфометрических параметров были в варианте с *T. lignorum*. В стерилизованной почве (III) обработка семян *T. longibrachiatum* увеличивала у проростков длину корня (на 2 %), диаметр корневой шейки (15.8 %) и вес (на 54.4 %), а *T. harzianum* увеличивала диаметр корневой шейки и вес проростка на 42.8 и 25 %, по сравнению с контролем (Таблица 9). В почве (IV) с добавлением фитопатогенов самые высокие значения морфометрических показателей были при обработке *T. harzianum*: длина проростков были выше, чем в контроле на 8 %, длина мутовки – на 12.8 %, длина стебелька – на 9 %, длина корня – на 4.4 %, а диаметр корневой шейки и вес проростка на 21.4 и 8.7 %. Кроме того, *T. lignorum* и *T. longibrachiatum* повышали диаметр корневой шейки и длину стебелька на 13.3 и 4.3 %, соответственно, по сравнению с контролем (Таблица 9).

Таблица 9 – Морфометрические показатели сеянцев в зависимости от варианта обработки семян и типа почв.

Вариант почвы		Вариант обработки	Морфометрические показатели					
			Длина всего проростка	Длина мутовки	Длина стебелька	Длина корня	Диаметр корневой шейки	Вес всего проростка, г
Нестерильная почва	Без патогенов	Контроль	5.10±0.8	2.20±0.4	1.25±0.5	1.50±0.4	0.15±0.1	0.012±0.002
		<i>Trichoderma lignorum</i>	6.14±0.28	2.90±0.15	1.28±0.19	1.88±0.13	0.26±0.06	0.020±0.005
		<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	5.73±0.14	3.15±0.08	0.86±0.11	1.64±0.06	0.21±0.03	0.019±0.005
		<i>Trichoderma harzianum</i>	6.25±0.41	3.38±0.25	0.93±0.31	2.32±0.16	0.43±0.11	0.025±0.003
	С патогенами	Контроль	-	-	-	-	-	-
		<i>Trichoderma lignorum</i>	7.95±0.28	4.22±0.14	1.69±0.21	2.04±0.13	0.27±0.05	0.026±0.005
		<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	5.87±0.80	3.23±0.42	0.97±0.15	1.60±0.33	0.12±0.03	0.019±0.002
		<i>Trichoderma harzianum</i>	6.68±0.65	3.60±0.32	1.30±0.47	1.63±0.28	0.21±0.12	0.018±0.007
Стерилизованная почва	Без патогенов	Контроль	7.25±0.08	3.46±0.04	2.05±0.06	1.83±0.04	0.16±0.01	0.021±0.004
		<i>Trichoderma lignorum</i>	5.74±0.11	2.65±0.06	1.77±0.08	1.37±0.06	0.25±0.02	0.017±0.006
		<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	7.03±0.15	3.38±0.08	1.84±0.10	1.87±0.08	0.19±0.02	0.046±0.008
		<i>Trichoderma harzianum</i>	6.18±0.09	3.06±0.05	1.51±0.07	1.63±0.05	0.28±0.02	0.028±0.006
	С патогенами	Контроль	6.88±0.11	3.44±0.06	1.69±0.08	1.74±0.06	0.22±0.02	0.021±0.006
		<i>Trichoderma lignorum</i>	6.50±0.09	3.12±0.05	1.73±0.07	1.62±0.05	0.25±0.02	0.021±0.005
		<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	6.42±0.42	3.20±0.19	1.75±0.29	1.42±0.22	0.22±0.08	0.018±0.008
		<i>Trichoderma harzianum</i>	7.48±0.16	3.93±0.08	1.86±0.12	1.80±0.08	0.28±0.03	0.023±0.004

Таким образом установлено, что наибольший ростстимулирующий эффект на проростки сосны обыкновенной *in vitro* в нестерилизованной почве без фитопатогенов (I) оказывали варианты обработки *T. harzianum* и *T. lignorum*, где средние значения всех морфометрических показателей (длины: всего проростка, мутовки, корня, диаметр корневой шейки и сухой вес проростка) существенно

превышали контроль. В почве с добавлением фитопатогенов (II) максимальные значения всех показателей проростков отмечены при обработке семян *T. lignorum*.

В стерилизованной почве с фитопатогенами (IV) лучшие морфометрические показатели отмечены в варианте с *T. harzianum*; без фитопатогенов (III) максимальные показатели были в контроле (длина: всего проростка, мутовки и стебля) и при обработке *T. longibrachiatum* (длина: всего проростка, мутовки и стебля, корня и сухой вес проростка).

Состояние почвенного микробоценоза до и после посева семян сосны обыкновенной. *Почвенные условия в начале эксперимента.* До посева семян сосны обыкновенной были определены значения pH и микробиологические характеристики серой лесной почвы, взятой для опытов в Погорельском ОЭХ ИЛ СО РАН. Значения pH нестерилизованной и стерилизованной почвы были 6.96 и 7.17, соответственно. Микробиологический анализ стерильной почвы не выявил роста каких-либо групп микроорганизмов. В нестерильной почве эколого-трофические группы микроорганизмов были распределены следующим образом: по численности доминировали олиготрофы (1.5 млн КОЕ / г почвы) и превышали в 5 раз численность гидролитиков (0.3 млн КОЕ / г почвы), и на 20 % копиотрофов (Рисунок 13).

В свою очередь, численность копиотрофов превышала гидролитиков в три раза. При этом значения pH существенного влияния на какую-либо из ЭКТГМ не оказывали ($t < 0.5$). В почве преобладали бактерии (98 %), грибов было существенно меньше (0.16 %).

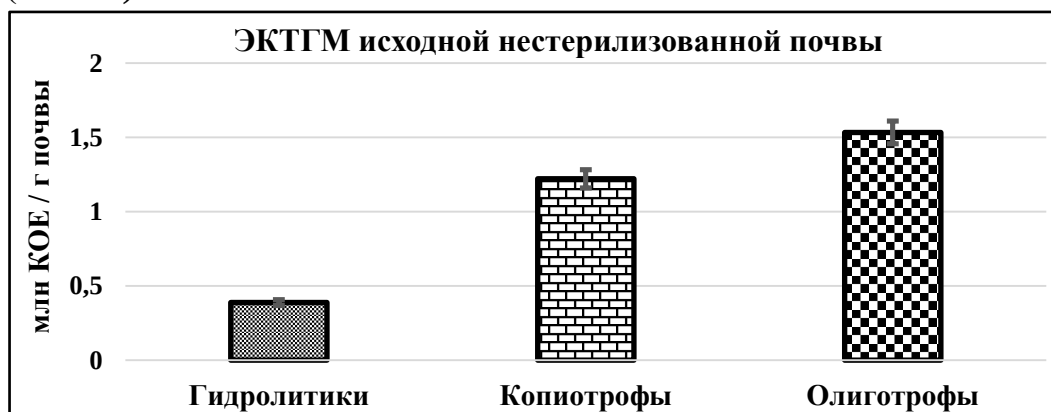


Рисунок 13 – Эколого-трофические группы микроорганизмов в исходной нестерилизованной почве

Посев семян, обработанных микроорганизмами-антагонистами, изменил рН и соотношение ЭКТГМ в почве под посевами. Практически во всех контейнерах с посевами, по окончании эксперимента почва подщелачивалась, за некоторым исключением.

В нестерилизованной почве в варианте обработки *T. harzianum* значения рН уменьшились на 0.46 ед. по сравнению с изначальными условиями (с 6.96 на 6.85). В стерилизованной почве при обработке *T. harzianum* и *T. lignorum* значения рН не изменились (рН 6.97). Соотношение эколого-трофических групп в почве после посева семян распределилось следующим образом: доминировала олиготрофная группа микроорганизмов (2.5 млн КОЕ / г почвы), самыми малочисленными были копиотрофы (1.4 млн КОЕ / г почвы) (Рисунок 14).

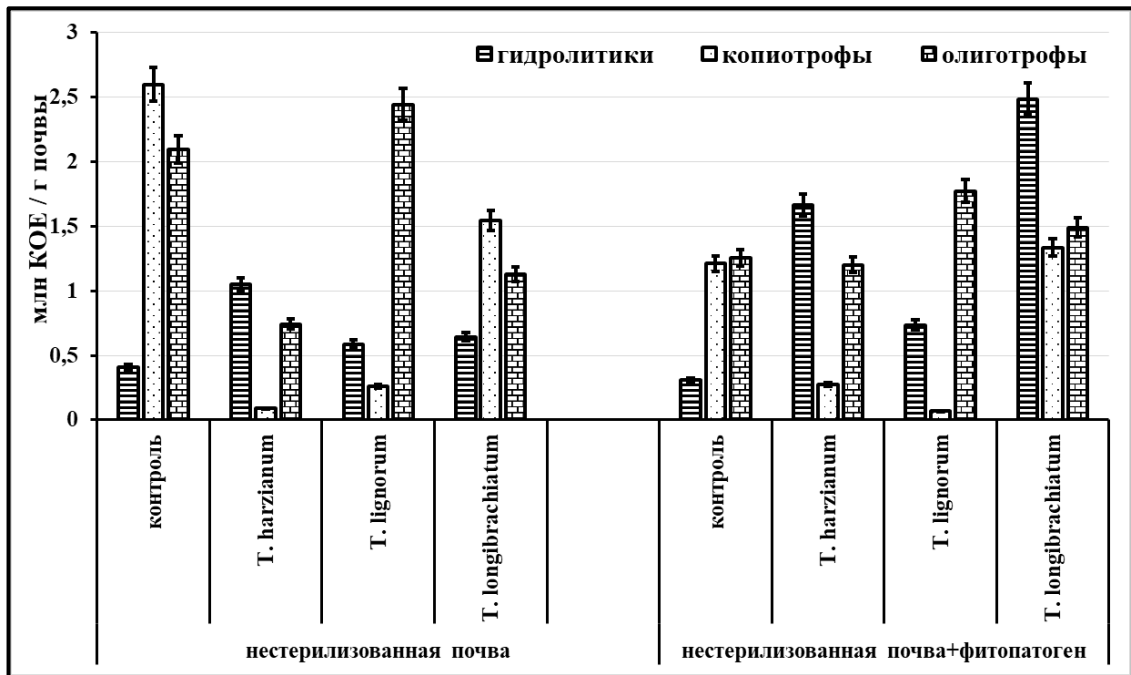


Рисунок 14 – Численность эколого-трофических групп микроорганизмов в зависимости от варианта обработки в нестерилизованной почве без и с добавлением фитопатогенов

Кроме того, в почве (I) от общей микробной численности на грибы приходилось 5 % и на актиномицеты – 5.4 %.

В нестерилизованной почве, при добавлении в нее суспензии фитопатогенов (II), численность гидролитической группы увеличилась по сравнению с контролем во всех вариантах обработки. При этом в вариантах с *T. longibrachiatum* и *T. harzianum* численность увеличилась в 8 и 6 раз (1.7 млн, 8.3 млн, соответственно;

в контроле – 0.3 млн КОЕ / г почвы), а при обработке *T. lignorum* – в среднем в 2–3 раза (1.0 и 0.7 млн КОЕ / г почвы) (Рисунок 14). Численность копиотрофов, уменьшилось во всех вариантах опыта, в 4–17 раз по сравнению с контролем, за исключением обработки семян *T. longibrachiatum* (увеличение на 0.1–0.4 млн КОЕ / г почвы). Численность олиготрофов при сравнении с контролем (1.3 млн КОЕ / г почвы) практически не изменилась, варьировала на уровне контрольных значений (± 0.2 млн КОЕ / г почвы). В посевах почвы в основном преобладали бактерии (97 %), грибов высевалось значительно меньше (1 %).

В стерилизованной почве без добавления фитопатогенов (III) преобладали гидролитики, самой малочисленной была группа копиотрофов. Численность гидролитиков в зависимости от вариантов обработки существенно не различалась (в среднем 1.3 млн КОЕ / г почвы), однако в варианте с *T. harzianum* их было немного больше (1.4 млн КОЕ / г почвы, соответственно) (Рисунок 15). Численность копиотрофов была очень низкой. Максимальное их количество было отмечено в варианте с *T. longibrachiatum* (2 млн КОЕ / г почвы), в то время как в контроле всего 800 тыс КОЕ / г почвы. В остальных вариантах обработки (*T. harzianum*, *T. lignorum*) численность копиотрофов варьировала от 2 до 200 тыс КОЕ / г почвы. Численность олиготрофов при обработке *T. lignorum* была равна их численности в контроле, что составило 0.6 млн КОЕ / г почвы. Однако количество олиготрофов в почве под семенами, обработанными *T. harzianum* и *T. longibrachiatum* было в 1.5 и 4 раза больше, чем в контроле. В почве под проростками преобладали бактерии (97 %), актиномицетов (1 %) и грибов было мало (2 %) (Рисунок 15).

Результаты анализа ЭКТГМ в стерилизованной почве под посевами сосны с добавлением фитопатогенов и без них, показали, что преобладающей группой являлись гидролитики (Рисунок 15). В варианте обработки *T. longibrachiatum* численность гидролитиков была в 3 раза, а при обработках *T. harzianum* и *T. lignorum* – в 1.3 раза (от 1.2 до 1.6 млн КОЕ / г почвы) больше чем в контроле. Во всех вариантах обработки копиотрофов было в среднем в 15 раз меньше, чем в контрольной почве (0.1 млн КОЕ / г почвы), а численность олиготрофов в 3 раза

ниже. Под проростками сосны в стерилизованной почве с фитопатогенами также преобладали бактерии (97 %), грибов было 3 %, актиномицеты отсутствовали.

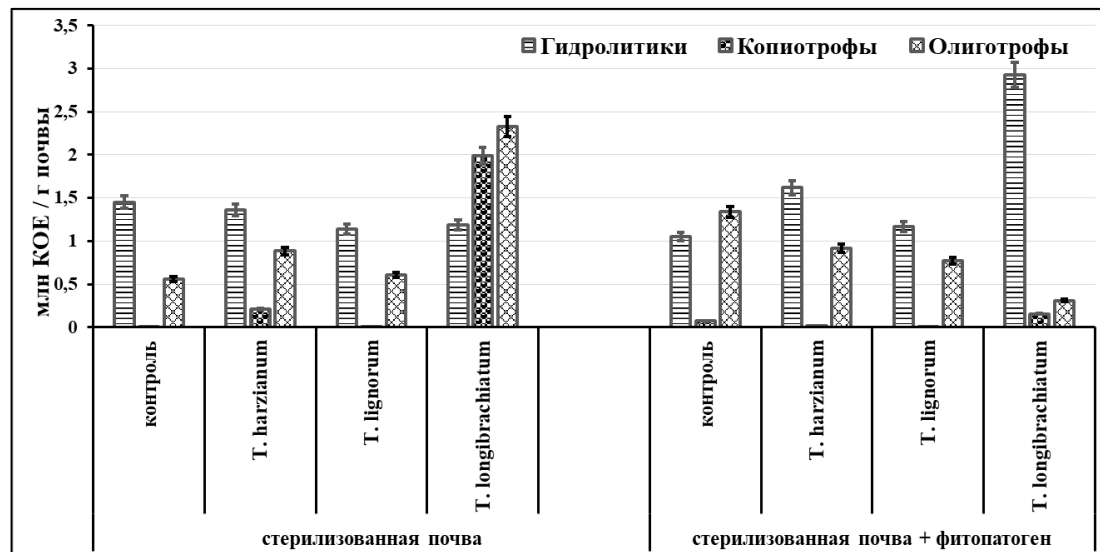


Рисунок 15 – Численность эколого-трофических групп микроорганизмов в зависимости от варианта обработки в стерилизованной почве с патогенами и без

Таким образом, отмечено, что обработка семян сосны обыкновенной микроорганизмами-антагонистами увеличивает численность всех ЭКТГМ, меняя изначально преобладающую олиготрофную группу микроорганизмов на гидролитико-копиотрофную. Также отмечено, что в стерилизованной почве (III, IV) добавление с семенами сосны *T. longibrachiatum* способствовало повышению численности копиотрофов, в то время как во всех остальных вариантах их численность была очень низкой.

4.4. Влияние на всхожесть семян сосны обыкновенной микробов–антагонистов и фитопрепаратов

Для исследований были взяты семена сосны обыкновенной с III класс всхожести (20 % лаб. всхожесть). Для сравнения эффективности предпосевной обработки семян хвойных микробами-антагонистами и фитопрепаратами, обрабатывали семена сосны обыкновенной водными суспензиями антагонистов: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *B. amyloliquefaciens* и растворенными в воде фитопрепаратами на основе: шелухи риса + зеленого чая (ШР+ЗЧ), шелухи риса +

шелухи гречихи (ШР+ШГ), веточек облепихи + шелухи риса (ВО+РШ), шелухи гречихи + 5 %NaOH (ШГ+5 %NaOH), а также бурый уголь + NaOH (БУ+NaOH).

Результаты опытов по влиянию микроорганизмов на рост и развитие семян сосны показали стимулирование прорастания семян сосны, по сравнению с контролем. Максимальная всхожесть семян сосны обыкновенной, обработанных микробами-антагонистами, была в вариантах с *B. amyloliquefaciens* – 32 % и *T. longibrachiatum* – 30 %, что на 50–60 % превышало контроль. Обработка семян *T. harzianum* стимулировала всхожесть семян сосны (26 %), что превышало контроль на 6 %, в варианте с *B. subtilis* (22 %) – на 2 % (Таблица 10).

Таблица 10 – Всхожесть семян сосны обыкновенной при различных вариантах обработки семян, в %.

Вариант обработки	Всхожесть семян сосны обыкновенной, %
Контроль (H ₂ O)	20
Шелуха гречихи + 5 %NaOH (ШГ+5 %NaOH)	18
Веточки облепихи + рисовая шелуха (ВО+ШР)	20
Шелуха риса + зеленый чай (ШР+ЗЧ)	54
Веточки облепихи + зелень пихты (ВО+ЗП)	20
Бурый уголь + NaOH (БУ+NaOH)	26
Шелуха риса + шелуха гречихи (ШР+ШГ)	32
<i>Trichoderma harzianum</i>	26
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	30
<i>Bacillus subtilis</i>	22
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	32

При обработке семян сосны обыкновенной фитопрепаратами, наибольшая всхожесть семян была в варианте на основе шелухи риса и зеленого чая (ШР+ЗЧ) – 54 %, что было в 2.7 раз больше чем в контроле. В варианте с шелухой риса и шелухой гречихи (ШР+ШГ) всхожесть была 32 %, в варианте с бурым углем + NaOH (БУ+NaOH) – 26 %. В двух вариантах обработки – веточки облепихи + шелуха риса (ВО+ШР), веточки облепихи + зелень пихты (ВО+ЗП) всхожесть была одинаковой с контролем (20 %), а в варианте с шелухой гречихи и NaOH (ШГ+5 %NaOH) – меньше, чем в контроле – 18 % (Таблица 10).

На всхожесть семян сосны наиболее эффективно повлияла обработка (ШР+ЗЧ). В этом варианте всхожесть семян сосны обыкновенной была в 1.6 раз

больше, чем всхожесть семян при обработке *B. amyloliquefaciens*, где была отмечена максимальная всхожесть семян среди микроорганизмов (32 %). Обработка препаратами БУ+NaOH, ШР+ШГ значительно не отличалась по эффективности от обработки микроорганизмами, так как всхожесть семян в этих вариантах в среднем составила по 27 %. Варианты обработок ШГ+5 %NaOH, ВО+РШ, ВО+ЗП были менее эффективны, чем обработки микроорганизмами, где всхожесть семян составила в среднем 19.3 %, что было в 1.4 раза меньше, чем при микробных обработках.

Исследование взаимоотношений между разными грибами в лабораторных условиях дает возможность изучать влияние отдельных факторов окружающей среды на микопаразитизм в почве (Inbar et al, 1996). Поскольку изучение влияния всех природных факторов на взаимоотношения между грибами представляется маловероятным, в наших экспериментах проведены количественные учеты грибов р. *Fusarium* в ризосферной зоне проростков с учетом воздействия на них антагониста *T. harzianum*. Отмечали одновременное снижение численности фитопатогенов (р. *Fusarium*) и триходермы, что регистрировали ее убыванием на чашках с питательной средой (Чапека) в результате высева почвенных суспензий. К концу опыта, численность популяций фузариев уменьшилась в 2.7–3.3 раза, что уже не превышало порога вредоносности патогенов и не влияло на поражаемость проростков сосны обыкновенной. В то же время снизилась и численность *T. harzianum* в 1.6 раза (Рисунок 16).

Лабораторными исследованиями подтверждено, что тестируемые нами микроорганизмы, относящиеся к разным таксономическим группам, обладают антагонистической активностью и способны воздействовать на патогены за счет наличия у них таких механизмов как антагонизм и микофильность (у триходермы). Наличие ферментов группы гидролаз (хитиназа, липаза, протаеза) и ростстимулирующей активности по отношению к семенам сосны обыкновенной, отмеченной в повышении всхожести семян, увеличении значений морфометрических показателей проростков по сравнению с контролем или воздействием фитопрепаратов, все это свидетельствует о полиморфизме

изученных антагонистов, а также их высокой биологической активности.

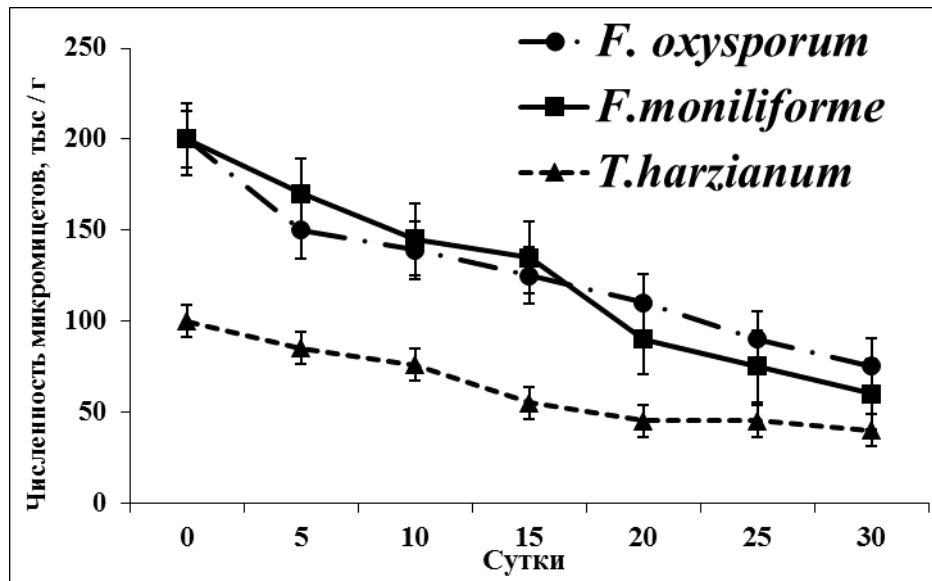


Рисунок 16 – Изменение численности фитопатогенных микромицетов р. *Fusarium* под воздействием антагониста *Trichoderma harzianum*

Внесенные в почву с семенами сосны микробы-антагонисты способствовали увеличению численности и перегруппировке ЭКТГМ с олиготрофной на гидролитико-копиотрофную группу.

Обработка семян сосны обыкновенной микроорганизмами и фитопрепаратами способствовала стимулированию прорастания семян сосны обыкновенной в условиях *in vitro*. Лучшую всхожесть семян сосны обыкновенной демонстрировали обработки микроорганизмами *B. amyloliquefaciens* и *Trichoderma longibrachiatum*, из фитопрепаратов – ШР+ЗЧ, БУ+NaOH и ШР+ШГ.

Положительные результаты испытаний музейных культур микроорганизмов-антагонистов, полученные в опытах *in vitro*, дают основание полагать, что внесение этих антагонистов вместе с семенами хвойных в почвы лесных питомников позволит увеличить выход и улучшить качество посадочного материала.

Глава 5. Влияние предпосевной микробиологической обработки семян хвойных на состояние почвенного микробиоценоза и сохранность семян

В качестве возможных перспективных вариантов поддержания биогенности почв лесных питомников и одновременной защиты семян хвойных в условиях ОЭХ «Погорельский бор» ИЛ СО РАН закладывали ряд экспериментов в 2012, 2014 и 2016 гг. по предпосевной обработке семян хвойных микроорганизмами-антагонистами, микроэлементами и фитопрепаратами.

5.1. Влияние обработки семян бактериями-антагонистами на состояние почвенного микробиоценоза и сохранность семян хвойных

С 2012 по 2013 гг. проводили совместные с институтом торфа (научно-исследовательский институт сельского хозяйства и торфа (ГНУ СибНИИСХиТ Россельхозакадемии, г. Томск) опыты по влиянию предпосевной обработки семян хвойных бактериями-антагонистами (*Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Pseudomonas* sp.), проявившими положительный эффект на сельскохозяйственных растениях. В то же время исследовали возможности музейного штамма гриба *Trichoderma harzianum*.

Таким образом, получили шесть вариантов опыта: 1) Контроль-1 (вода); 2) *Bacillus* sp.; 3) *Bacillus subtilis*; 4) *Pseudomonas* sp.; 5) *Trichoderma harzianum*; 6) Контроль-2 (вермикулит).

В мае 2012 г. на Погорельском стационаре ИЛ СО РАН были подготовлены (вспаханы) два участка (№1 и №2), каждый участок состоял из 18 делянок 50×50 см, посев семян хвойных производили по следующей схеме:

	Вариант обработки		Вариант обработки
сосна	1. Контроль – 1 (вода)	лиственница	1. Контроль – 1 (вода)
	2. <i>Bacillus</i> sp.		2. <i>Bacillus</i> sp.
	3. <i>Bacillus subtilis</i>		3. <i>Bacillus subtilis</i>
	4. <i>Pseudomonas</i> sp.		4. <i>Pseudomonas</i> sp.
	5. <i>Trichoderma harzianum</i>		5. <i>Trichoderma harzianum</i>
	6. Контроль-2 (вермикулит)		6. Контроль-2 (вермикулит)

Посев семян сосны обыкновенной (лаб. всх. 48 %) и лиственницы сибирской (лаб. всх. 50 %), обработанных микробами-антагонистами, проводили в конце мая (22.05.2012 г.) при температуре почвы 11.2°C, воздуха – 19.3°C, влажности почвы – 15.25 % (Рисунок 17). Массовую всхожесть семян хвойных наблюдали через месяц после посева (июнь).



Рисунок 17 – Экспериментальные участки на опытном питомнике Погорельского стационара А) вид участков после посева семян хвойных (май); Б) сеянцы сосны обыкновенной в конце вегетации (сентябрь 2012 г.); В) учет всходов и отбор почвенных образцов

5.1.1. Влияние предпосевной обработки семян на рост и развитие однолетних сеянцев

В зависимости от варианта обработки грунтовая всхожесть семян сосны составляла от 31 до 53 %, лиственницы – от 4 до 31 % (Рисунок 18). Максимальное количество всходов сосны было отмечено в вариантах с обработкой *T. harzianum* (52.6 %), *Pseudomonas* sp. (51.3 %) и К-2 (47 %), что превышало контроль (К-1) в

1.7, 1.6 и 1.5 раз, соответственно. Обработка семян сосны *Bacillus* sp. превышала значения К-1 в 1.4 раза. У лиственницы наибольшая всхожесть отмечена также при обработках микромицетом *T. harzianum* (30.6 %) и *Pseudomonas* sp. (16.0 %), что в 5.8 и 3.0 раза превышало таковую в варианте К-1. Обработка семян лиственницы *Bacillus* sp. превышала контрольные значения (К-1 и К-2) в 1.3 раза. Всхожесть в обоих контрольных вариантах (К-1 и К-2) была одинаковой (Рисунок 18, Таблица 11), разница количества сеянцев при обработке микроорганизмами достоверно различалась, $p < 0.05$.

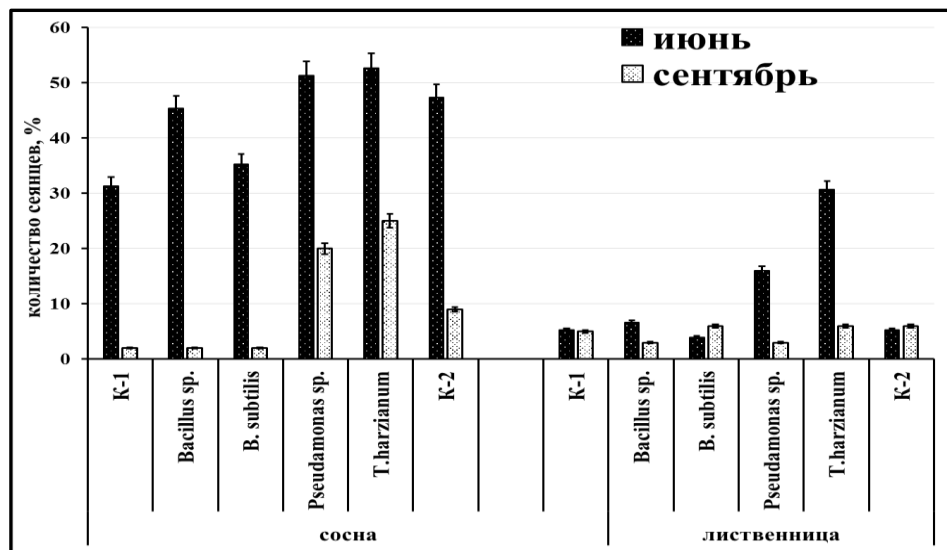


Рисунок 18 – Грунтовая всхожесть семян и сохранность сеянцев сосны обыкновенной и лиственницы сибирской в зависимости от варианта обработки (июнь, сентябрь, 2012 г.)

Значительный дефицит влаги почвы в вегетационный период 2012 г. привел, практически, к полной гибели сеянцев (Таблица 11). Однако, несмотря на это, в конце сезона (сентябрь), количество сеянцев сосны обыкновенной в вариантах с *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. и *T. harzianum* превысило контроль (К-1) в 1.2, 1.4 и 1.3 раза, соответственно. У лиственницы наибольшее количество сеянцев к концу вегетации, по сравнению с К-1, отмечено в вариантах обработки *T. harzianum* (в 2.1 раза) и *B. subtilis* (в 1.9 раз) (Рисунок 18). Максимальное количество сеянцев сосны в сентябре, таким образом, наблюдали при обработках *T. harzianum* – 16.6 %, *Pseudomonas* sp. – 20 %, лиственницы – при обработке *B. subtilis*, *T. harzianum* и К-2 – 4 % (Таблица 11).

Таблица 11 – Гидротермические, микробиологические показатели темно-серой почвы и количество семян на участках Погорельского питомника при различных вариантах опыта вегетационного периода 2012 г.

Вариант опыта		рН	Т почвы, °С	Влажно сть, %	численность микроорганизмов, млн КОЕ / г почвы				К _{мин}	Колиг	БМ, мкг С / г почвы	БД, мкг С- СО ₂ /ч /г почвы	qCO ₂ , мкг С/г мкгС- СО ₂ /ч /г почвы	Сеянцы, %
					Гидроли тики	Копио трофы	Олиго трофы	Гри бы						
Контроль №1		6.5	11.8	11.0	2.18	2.40	1.50	0.19	0.1	0.7	152	8.5	56	0
Контроль №2		6.5	18.7	11.4	2.20	6.30	2.10	0.11	2.8	0.9	108	3.5	32	0
Сосна (июнь)	Контроль-1	6.8	21.9	5.3	1.05	1.19	3.46	0.79	1.2	3.3	319	14.6	46	31.1
	<i>Bacillus</i> sp.	7.1	20.6	5.7	0.67	1.83	3.34	0.51	2.5	5.0	311	8.9	29	45.3
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.1	20.5	6.2	1.17	2.31	6.42	0.03	1.7	6.8	282	13.9	50	35.3
	<i>Pseudomonas</i> sp.	6.6	21.5	5.5	1.85	1.62	2.60	0.05	1.1	1.7	199	9.2	48	51.3
	<i>Trichoderma harzianum</i>	6.9	21.6	6.5	0.62	1.64	0.82	0.05	3.3	1.7	271	10.4	40	52.6
	Контроль-2	6.9	22.1	5.6	1.03	1.28	1.02	0.01	1.3	1.0	198	9.1	46	47.3
Лиственница (июнь)	Контроль-1	7.3	21.0	5.2	1.19	1.34	1.09	0.09	1.3	1.0	262	10.4	44	5.3
	<i>Bacillus</i> sp.	7.1	21.7	4.4	2.60	1.58	3.55	0.15	1.0	1.9	354	13.2	38	6.6
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.4	21.5	4.7	1.49	2.41	2.81	0.01	2.0	2.0	311	16.0	52	4.0
	<i>Pseudomonas</i> sp.	6.9	22.2	4.8	1.07	1.70	3.07	0.11	1.7	3.2	269	12.9	55	16.0
	<i>Trichoderma harzianum</i>	7.1	21.1	4.8	1.08	1.27	2.42	0.08	1.3	2.0	262	11.3	41	30.6
	Контроль-2	7.0	22.7	4.5	1.29	0.85	2.28	0.004	0.7	1.7	187	8.6	51	5.3
Сосна (июль)	Контроль-1	7.3	22.1	12.5	0.15	1.71	2.04	0.02	15.1	17.6	247	4.4	20	1.3
	<i>Bacillus</i> sp.	7.4	22.6	12.0	0.39	1.58	2.78	0.01	4.6	7.0	235	5.4	27	1.3
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.2	22.9	13.7	0.93	2.64	2.78	0.02	3.3	3.5	170	5.3	32	0.6
	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.0	22.6	13.8	0.44	1.09	1.76	0.01	4.7	6.3	312	7.2	23	12.6
	<i>Trichoderma harzianum</i>	7.2	22.7	15.5	0.94	2.12	2.27	0.05	2.5	2.5	324	8.0	25	16.6
	Контроль-2	7.0	22.3	14.0	0.45	1.22	2.05	0.09	3.0	4.9	232	6.6	29	8.0
Лиственница (июль)	Контроль-1	6.9	22.2	14.7	0.67	1.74	1.67	0.002	3.3	3.7	243	4.1	17	2.0
	<i>Bacillus</i> sp.	7.1	22.3	15.4	0.58	2.76	2.16	0.02	5.0	3.8	349	3.7	11	0.0
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.2	22.8	15.2	0.31	1.91	1.64	0.01	8.8	7.3	275	4.1	15	1.3
	<i>Pseudomonas</i> sp.	6.9	22.3	10.3	0.37	1.11	2.10	0.02	4.6	7.6	339	9.3	28	0.6
	<i>Trichoderma harzianum</i>	7.4	22.7	11.8	0.52	2.31	3.33	0.02	9.9	15.5	406	9.0	23	3.3
	Контроль-2	7.2	23.1	12.3	0.33	0.67	1.41	0.03	1.7	7.6	239	7.1	31	2.0

Окончание таблицы 11

Вариант опыта		рН	Т почвы, °С	Влажно сть, %	численность микроорганизмов, млн КОЕ / г почвы				К _{мин}	Колиг	БМ, мкг С / г почвы	БД, мкг С- СО ₂ /ч /г почвы	qCO ₂ , мкг С / г мкг С-СО ₂ /ч /г почвы	Сеянцы, %
					гидроли тики	копио трофы	олиго трофы	грибы						
Сосна (август)	Контроль-1	7.1	17.0	14.2	0.63	1.28	1.99	0.01	2.3	4.0	157	6.6	47	0.6
	<i>Bacillus</i> sp.	7.2	16.7	20.9	0.95	1.18	1.50	0.02	2.6	3.0	157	8.1	52	2.0
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.4	16.6	21.3	0.42	1.15	1.51	0.003	3.1	4.0	243	6.7	30	1.3
	<i>Pseudomonas</i> sp.	6.7	17.0	21.0	1.20	2.68	1.61	0.03	2.5	1.7	228	10.2	44	12.6
	<i>Trichoderma harzianum</i>	6.7	16.5	20.7	0.86	2.12	1.08	0.03	2.5	1.4	237	8.0	34	15.3
	Контроль-2	6.8	16.7	20.5	0.97	2.29	1.08	0.01	2.7	1.2	205	5.3	26	6.6
Лиственница (август)	Контроль-1	7.4	16.7	21.6	0.58	1.37	2.66	0.01	2.4	4.6	224	7.6	42	2.6
	<i>Bacillus</i> sp.	7.0	16.7	21.2	0.69	1.86	3.28	0.01	2.8	5.1	144	6.9	49	2.0
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.0	16.9	21.8	1.15	2.05	3.45	0.01	2.4	3.7	195	7.6	32	0.6
	<i>Pseudomonas</i> sp.	6.8	17.0	21.5	1.07	1.66	1.34	0.02	1.6	1.3	267	6.6	38	0.6
	<i>Trichoderma harzianum</i>	6.8	16.6	22.0	1.36	2.29	1.92	0.01	1.6	1.4	240	6.5	25	2.6
	Контроль-2	6.9	16.5	20.9	1.06	2.25	1.87	0.01	3.0	2.4	204	5.7	24	2.6
Сосна (сентябрь)	Контроль-1	7.2	8.8	18.5	0.69	1.28	1.24	0.01	2.2	1.9	240	8.7	37	1.3
	<i>Bacillus</i> sp.	6.7	8.9	18.8	0.81	1.71	1.27	0.01	2.1	1.6	318	8.7	27	1.3
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.2	8.9	19.5	0.49	1.80	0.83	0.01	4.0	1.3	368	9.5	26	1.3
	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.0	9.0	18.8	0.75	0.51	2.07	0.01	1.1	2.2	197	5.5	29	13.3
	<i>Trichoderma harzianum</i>	7.1	9.0	19.6	0.44	1.39	2.08	0.01	3.1	4.6	179	7.8	45	16.6
	Контроль-2	7.1	8.8	19.6	0.64	2.24	2.14	0.01	3.8	3.2	197	6.8	36	6.0
Лиственница (сентябрь)	Контроль-1	7.0	8.9	18.0	0.99	0.99	0.24	0.06	1.1	0.4	281	7.3	26	3.3
	<i>Bacillus</i> sp.	7.1	8.8	19.9	1.12	1.25	0.05	0.01	1.3	0.1	372	10.0	27	2.0
	<i>Bacillus subtilis</i>	6.8	8.8	19.9	1.31	0.84	2.21	0.02	0.9	2.2	330	9.8	31	4.0
	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.1	9.0	18.3	1.09	1.69	2.17	0.13	2.0	2.5	174	7.4	48	2.0
	<i>Trichoderma harzianum</i>	7.3	8.9	19.5	0.46	1.17	2.27	0.07	2.5	5.3	149	8.3	55	4.0
	Контроль-2	7.2	8.8	19.2	0.63	1.13	2.05	0.03	2.2	3.9	125	6.8	58	4.0

В сентябре, как и на протяжении всего вегетационного сезона, отмечали влияние на рост и развитие сеянцев сосны и лиственницы температуры почвы, при этом для сеянцев сосны влияние было положительным ($r = 0.69$), для лиственницы – отрицательным ($r = -0.59$). Вследствие отпада проростков и сеянцев на протяжении периода наблюдения отмечена активизация экологотрофических групп микроорганизмов (для утилизации мертвой органики). В связи с чем, выявлена отрицательная корреляционная зависимость между количеством сеянцев сосны и копиотрофами ($r = -0.54$), сеянцев лиственницы и гидролитиками ($r = -0.5$), и копиотрофами ($r = -0.81$), а также положительная зависимость между олиготрофами и количеством сеянцев сосны и лиственницы ($r = 0.8$ и 0.5 , соответственно), $p < 0.05$ (Прил. Таблица 1).

Таким образом, наилучшую грунтовую всхожесть семян и сохранность сеянцев хвойных в конце вегетации (сентябрь) наблюдали в вариантах *Pseudomonas* sp., *T. harzianum* и в К-2 (при добавлении вермикулита).

5.1.2. Влияние предпосевной обработки семян на рост и развитие 2-х летних сеянцев

В начале второго вегетационного сезона (май) благоприятные для семян хвойных влажность (22–23 %) и температура (7–8°C) почвы способствовали прорастанию прошлогодних семян, которые из-за стресса находились в почве. Поэтому было отмечено увеличение количества сеянцев по сравнению с сентябрем 2012 г., общее количество сеянцев сосны возросло на 58 % (в 2.5 раза), а количество сеянцев лиственницы на 83.5 % (в 6 раз) (Рисунок 19). В вариантах обработки *Pseudomonas* sp. и К-2 отмечено прорастание наибольшего количества сеянцев, по сравнению с сентябрем 2012 г., как для сосны (увеличение на 11 и 9 %), так и для лиственницы (на 23 и 33 %), $p < 0.05$ (Таблица 11). Таким образом, максимальное количество сеянцев сосны в мае 2013 г. зарегистрировано в вариантах обработки *Pseudomonas* sp. и *T. harzianum* (Таблица 12, Рисунок 19).

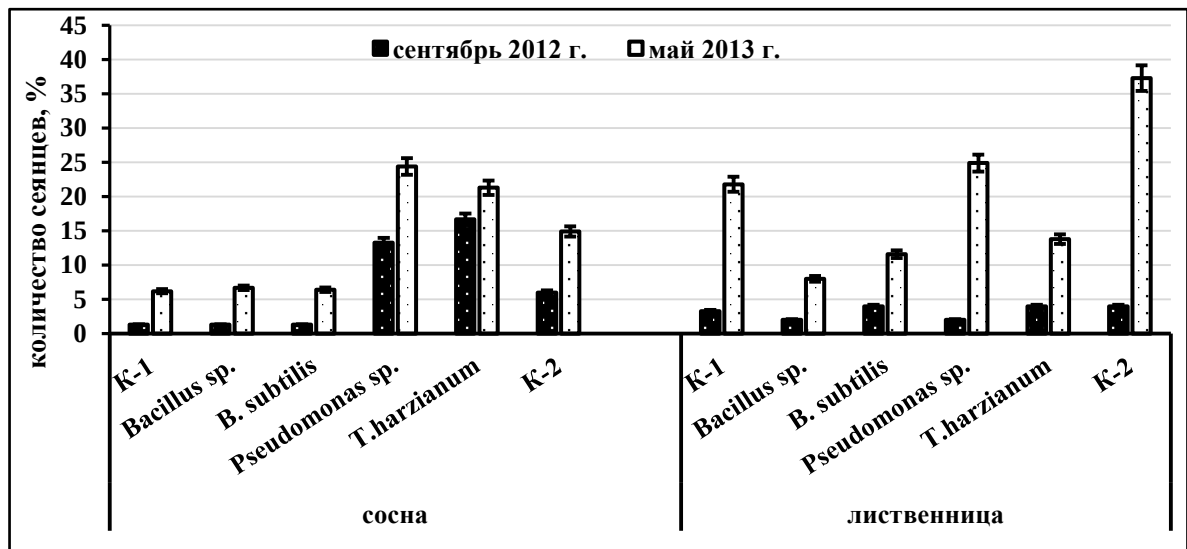


Рисунок 19 – Количество сеянцев сосны обыкновенной и лиственницы сибирской в зависимости от вариантов обработки на участках Погорельского опытного питомника (сентябрь, 2012 г. и май, 2013 г.)

Сеянцев лиственницы стало больше как при обработке *Pseudomonas* sp. – на 22.8%, так и в контрольных вариантах (K-1 – на 18.5 % и K-2 – на 33.3 %). Минимальный прирост количества сеянцев хвойных в мае 2013 г., по сравнению с сентябрем 2012 г., был отмечен для сосны в контроле K-1 на 3.9 %, для лиственницы – при обработке *Bacillus* sp. на 6 % (Рисунок 19, Таблица 12).

В связи с повышенными температурами воздуха и почвы, а также низкой почвенной влажностью в июле количество сеянцев хвойных резко снизилось по сравнению с маем, что нашло отражение в отрицательных значениях коэффициентов корреляции между количеством сеянцев хвойных и температурой почвы, и влажностью ($r = -0.5$ и $r = 0.53$, соответственно) (Прил. Таблица 1). Максимальное количество сеянцев сосны отмечено в вариантах с *Pseudomonas* sp. и *T. harzianum* (12.4 и 14.2 %, соответственно), сеянцев лиственницы – в вариантах с *Pseudomonas* sp. (13.6 %) и с вермикулитом (K-2) – 20.2 % (Таблица 12). Минимальное количество сеянцев сосны было отмечено в контроле – 2.6 % и лиственницы – при обработке *Bacillus* sp. – 2.8 % (Рисунок 20). Также отмечено, что на отпад сеянцев более всего повлияла активность микробиоты, о чем свидетельствует корреляционная

зависимость между грибами и сеянцами лиственницы ($r = -0.6$), и сосны ($r = -0.8$), $p < 0.05$.

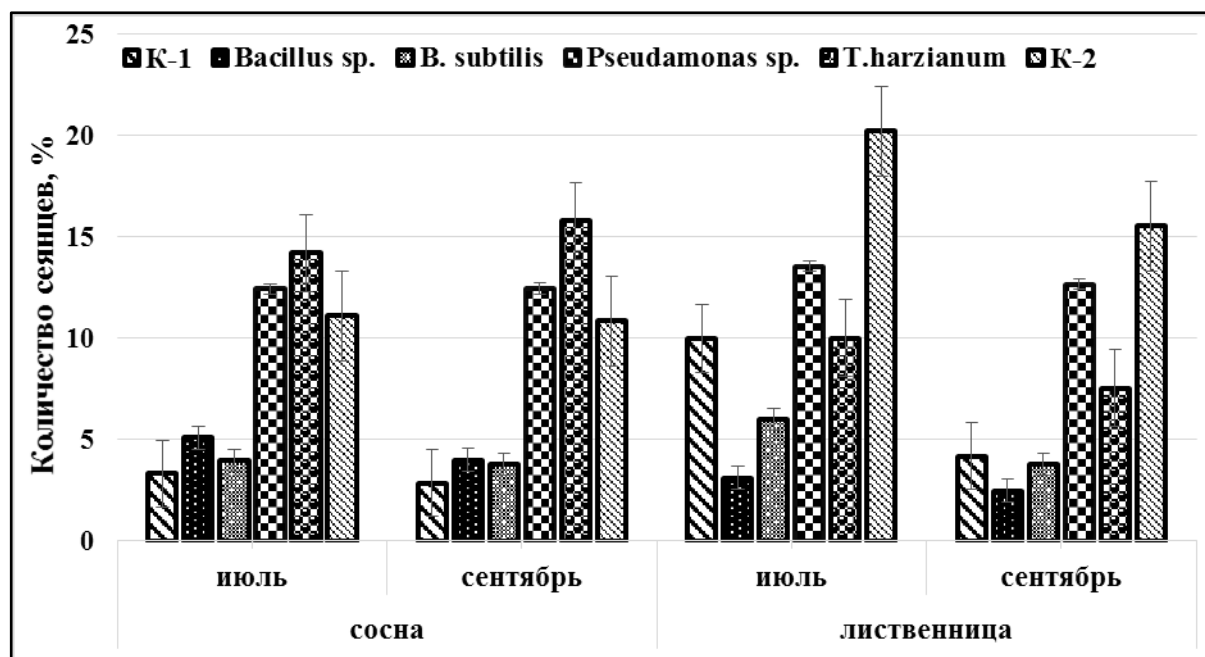


Рисунок 20 – Количество сеянцев сосны обыкновенной и лиственницы сибирской в зависимости от вариантов обработки на участках питомника (июль и сентябрь, 2013 г.)

На протяжении двух следующих месяцев количество сеянцев хвойных изменилось не значительно (Прил. Таблица 1). К концу второго вегетационного сезона (сентябрь) только в контрольных вариантах (К-1 и К-2) количество сеянцев сократилось на 5 %, при обработке семян микроорганизмами это значение не превышало 3 %. Таким образом, количество сохранившихся сеянцев было максимальным у сосны в вариантах обработки *Pseudomonas sp.* и *T. harzianum* – 12.5 и 15.8 %, соответственно, а у лиственницы в К-2 – 15.5 % и при обработке псевдомонадами – 12.7 % (Рисунок 20).

Таблица 12 – Гидротермические, микробиологические показатели темно-серой почвы и количество семян на участках Погорельского питомника при различных вариантах опыта вегетационного периода 2013 г.

Вариант опыта		рН	Т почвы, °С	Влаж ность, %	Численность микроорганизмов, млн КОЕ / г почвы				К _{мин}	Колиг	Количес тво сеянцев, %
					гидролитики	копиотрофы	олиготрофы	грибы			
Май											
сосна	Контроль-1	7.26	7.77	22.87	1.01	1.66	1.81	0.005	2.24	2.38	6.20
	<i>Bacillus</i> sp.	6.89	7.83	22.50	0.80	1.49	2.11	0.006	2.88	4.45	6.60
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.03	7.87	23.40	0.61	1.47	2.16	0.013	2.68	4.44	6.40
	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.09	7.63	21.45	0.62	0.62	0.41	0.023	1.02	0.76	24.4
	<i>Trichoderma harzianum</i>	7.02	7.67	22.33	0.51	1.67	1.34	0.023	3.23	2.83	21.3
	Контроль-2	7.00	7.73	20.73	0.64	1.65	0.64	0.007	2.88	1.09	14.9
лиственница	Контроль-1	7.09	7.70	22.50	1.03	1.18	1.18	0.010	1.57	1.42	21.7
	<i>Bacillus</i> sp.	7.02	7.80	23.10	1.51	2.47	2.18	0.011	1.87	1.70	8.00
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.00	7.76	23.83	1.72	1.92	1.91	0.006	2.10	1.78	11.5
	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.11	7.70	21.90	0.50	1.51	1.54	0.026	3.01	3.06	24.9
	<i>Trichoderma harzianum</i>	7.19	7.60	21.50	0.45	1.87	1.97	0.013	4.82	4.87	13.8
	Контроль-2	7.15	7.80	21.23	0.02	1.63	1.61	0.010	2.92	3.19	37.3
Июль											
сосна	Контроль-1	7.40	20.50	15.67	1.21	3.22	4.04	0.057	2.59	3.35	3.30
	<i>Bacillus</i> sp.	7.06	20.17	16.07	1.56	1.86	2.85	0.041	1.15	1.88	5.00
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.09	20.27	16.60	1.42	2.59	2.52	0.018	1.97	1.92	4.00
	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.23	19.60	15.37	0.83	2.55	3.08	0.012	3.12	3.65	12.40
	<i>Trichoderma harzianum</i>	7.36	20.00	16.37	1.59	1.82	2.33	0.006	1.39	1.80	14.20
	Контроль-2	7.25	19.77	16.20	0.95	2.77	3.13	0.003	4.43	4.62	11.10
лиственница	Контроль-1	7.17	20.50	17.07	0.86	2.21	1.68	0.016	3.38	2.40	10.00
	<i>Bacillus</i> sp.	7.24	20.93	16.30	0.84	2.50	1.91	0.071	3.12	2.30	3.00
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.21	21.30	17.23	1.11	2.48	3.28	0.022	2.65	3.59	6.00
	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.18	19.56	15.10	1.04	3.31	2.73	0.020	3.43	2.89	14.0
	<i>Trichoderma harzianum</i>	7.35	19.60	15.50	1.38	2.73	2.93	0.008	2.10	2.21	10.0
	Контроль-2	7.27	19.73	15.20	1.92	3.53	4.51	0.017	3.10	4.68	20.0

Окончание таблицы 12

Вариант опыта		рН	Т почвы, °С	Влажность, %	Численность микроорганизмов, млн КОЕ / г почвы				К _{мин}	Колиг	Количество сеянцев, %
					Гидролитики	Копиотрофы	Олиготроф ы	Грибы			
Август											
сосна	Контроль-1	6.72	16.83	15.57	0.53	0.49	1.92	0.005	0.91	3.64	4.50
	<i>Bacillus</i> sp.	6.86	16.77	14.73	0.86	1.40	1.93	0.003	1.86	2.52	4.50
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.23	16.80	15.90	0.85	0.54	1.48	0.011	0.66	1.99	4.50
	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.10	16.30	15.43	0.89	1.63	1.42	0.009	1.83	1.59	13.50
	<i>Trichoderma harzianum</i>	7.13	16.40	16.13	1.65	1.34	1.27	0.005	1.03	0.96	15.80
	Контроль-2	7.18	16.37	15.93	0.87	1.31	2.04	0.004	1.68	3.24	10.70
лиственница	Контроль-1	7.48	16.50	15.07	0.75	1.41	1.70	0.022	2.46	2.78	5.50
	<i>Bacillus</i> sp.	7.18	16.63	16.37	0.52	0.90	2.25	0.010	1.72	4.27	3.10
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.22	16.73	16.20	0.67	0.89	2.61	0.005	1.36	3.85	4.90
	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.36	15.90	16.67	1.05	1.36	0.82	0.003	1.26	0.81	14.9
	<i>T. harzianum</i>	7.13	15.93	16.80	1.07	1.68	1.18	0.004	1.62	1.09	8.00
	Контроль-2	7.12	16.07	16.70	1.26	1.52	1.27	0.003	1.18	1.05	19.5
Сентябрь											
сосна	Контроль-1	7.26	6.70	17.63	1.09	2.03	1.55	0.014	1.89	1.44	2.30
	<i>Bacillus</i> sp.	7.18	6.90	17.47	0.53	2.28	1.88	0.012	5.52	4.85	4.00
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.52	6.90	17.40	1.06	1.88	1.09	0.018	2.10	1.06	3.80
	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.71	6.83	17.80	0.41	1.76	1.51	0.018	5.18	4.34	12.50
	<i>Trichoderma harzianum</i>	7.37	7.00	18.77	1.03	1.95	1.59	0.014	3.00	2.42	15.80
	Контроль-2	7.31	7.10	19.00	0.57	1.54	1.19	0.018	3.15	2.67	10.90
лиственница	Контроль-1	7.41	6.73	17.10	0.39	1.54	1.75	0.000	4.46	4.71	4.20
	<i>Bacillus</i> sp.	7.39	6.87	17.27	0.62	1.24	1.79	0.001	1.95	2.83	2.50
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.48	6.90	17.50	0.42	1.33	1.55	0.002	3.41	3.80	3.80
	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.67	6.80	18.77	0.39	0.98	1.21	0.000	2.76	3.55	12.7
	<i>Trichoderma harzianum</i>	7.65	6.87	19.83	0.33	1.20	1.82	0.001	4.70	7.29	7.50
	Контроль-2	7.67	7.00	19.20	0.16	0.82	1.49	0.000	5.69	11.3	15.5

В связи с увеличением количества осадков и сезонным понижением температуры воздуха в сентябре было отмечено положительное влияние гидротермических показателей почвы (температуры₁, рН₂ и влажности почвы₃) на рост и сохранность семян хвойных ($r_1 = 0.5$, $r_2 = 0.5$, $r_3 = 0.7$ – для сосны и $r_1 = 0.5$, $r_2 = 0.8$, $r_3 = 0.6$ – для лиственницы). Погибшая за жаркий период растительность, в том числе и семена, служила источником питания для почвенных групп микроорганизмов, поэтому между сохранившимися сеянцами и ЭКТГМ отмечена высокая корреляционная зависимость: сеянцами сосны и численностью копиотрофов ($r = -0.5$); сеянцами лиственницы и гидролитиками ($r = -0.8$), копиотрофами ($r = -0.9$) и олиготрофами ($r = -0.7$), $p < 0.05$ (Прил. Таблица 1).

Корреляционный анализ данных 2012–2013 гг. показал, что наибольшее влияние на всхожесть семян сосны и лиственницы оказывала температура почвы ($r \geq 0.42$), сохранность семян хвойных зависела от температуры и ферментативной активности почвы ($r \geq 0.4$), а значения основных морфометрических параметров семян – от влажности и рН почвы ($r \geq 0.5$), что подтверждает и факторный анализ (Рисунок 21).

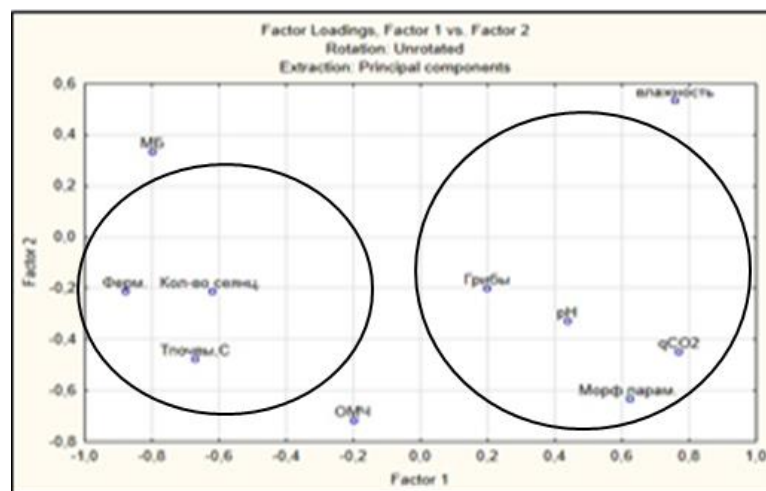


Рисунок 21 – График факторных нагрузок при анализе данных 2012–2013 гг.

Таким образом, к концу второго вегетационного сезона отмечено, что наибольшим эффектом на сохранность семян сосны обыкновенной и лиственницы сибирской обладали: бактерии р. *Pseudomonas* и микромицеты *T. harzianum*. Вермикулит и на второй год вегетации оказывал высокую

эффективность в защите семян хвойных от неблагоприятных погодных условий, особенно в посевах лиственницы.

5.1.3. Морфометрические характеристики семян

Предпосевная обработка семян хвойных неравнозначно повлияла на морфометрические параметры семян. У семян сосны длина мутовки в контрольных вариантах (К-1 и К-2) превышала таковую в вариантах с обработкой микроорганизмами, в среднем на 17,4 %. В то время как у семян лиственницы средняя длина мутовки во всех вариантах опыта была больше контроля (К-1), а в варианте с *T. harzianum* превышала контроль (К-1) в 2 раза, а К-2 – в 1,5 раза (Рисунок 22, Прил. Таблица 2). Кроме того, в контроле с вермикулитом (К-2) средняя длина мутовки, как сосны, так и лиственницы, по сравнению с К-1 была выше на 7 и 41,4 %, соответственно.

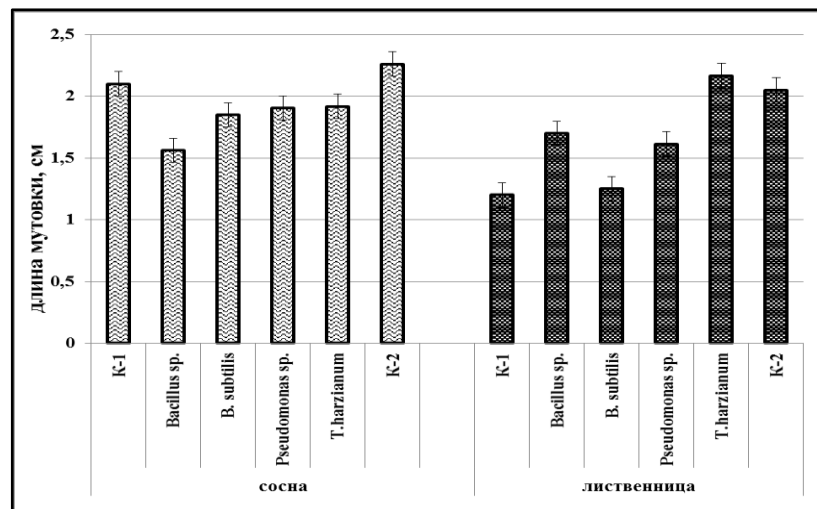


Рисунок 22 – Значения длины мутовки семян сосны обыкновенной и лиственницы сибирской (май, 2013 г.)

Обработка микроорганизмами также повлияла на длину стебелька семян. Средняя длина стебелька семян сосны при обработке микроорганизмами была в среднем в 1,3 раза больше, чем в К-1. Другая ситуация отмечалась в вариантах с сеянцами лиственницы – только обработка микромицетом *T. harzianum* увеличивала длину стебелька по сравнению с контролем. Таким образом,

обработка *Pseudomonas* sp. была более эффективна в увеличении длины стебелька сосны, а *T. harzianum* – лиственницы (Рисунок 23, Прил. Таблица 2). При этом, длину стебелька сосны также увеличивало добавление в почву вермикулита (К-2) на 34.6 % по сравнению с контролем.

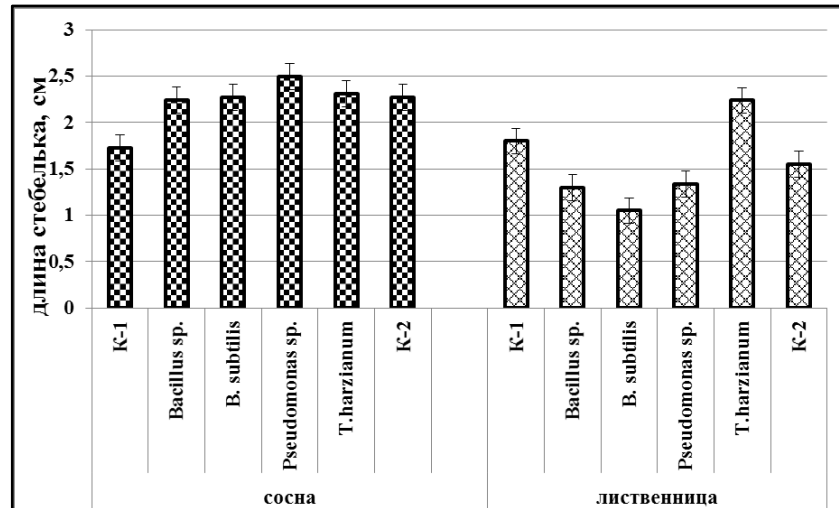


Рисунок 23 – Значения длины стебелька семян сосны обыкновенной и лиственницы сибирской (май, 2013 г.)

Отмечено положительное влияние микроорганизмов-антагонистов и на рост главного корня семян. Так длина корня семян сосны в вариантах с обработкой микроорганизмами была в среднем в 1.2 раза больше чем в К-1. У семян сосны и лиственницы увеличение длины главного корня по сравнению с К-1 отмечено в вариантах с *Bacillus* sp. и *B. subtilis* (в 1.7 и 1.4 раза) (Рисунок 24, Прил. Таблица 2).

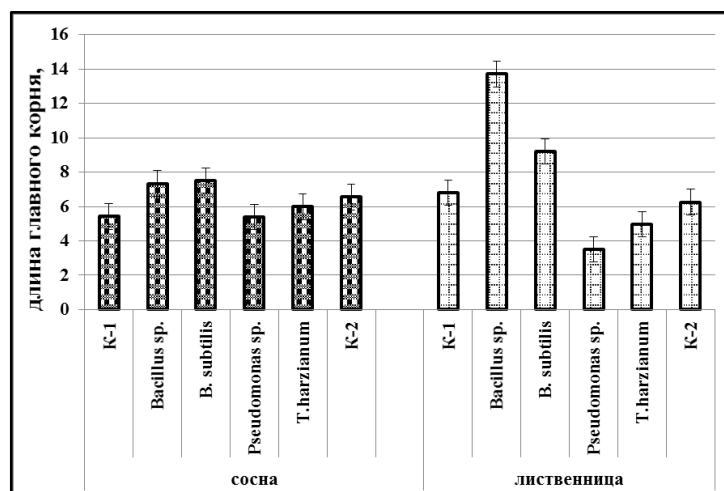


Рисунок 24 – Значения длины главного корня семян сосны обыкновенной и лиственницы сибирской (май, 2013 г.)

Диаметр корневой шейки семян сосны и лиственницы по сравнению с контролем увеличивала обработка семян *T. harzianum* (на 20 %) и *Pseudomonas* sp.

(на 12 %), при обработке бациллами (*Bacillus* sp. и *B. subtilis*) этого не отмечалось (Рисунок 25, Прил. Таблица 2). Кроме того, эффективным для увеличения диаметра корневой шейки сеянца, по сравнению с контролем, оказалось внесение в почву вермикулита (К-2).

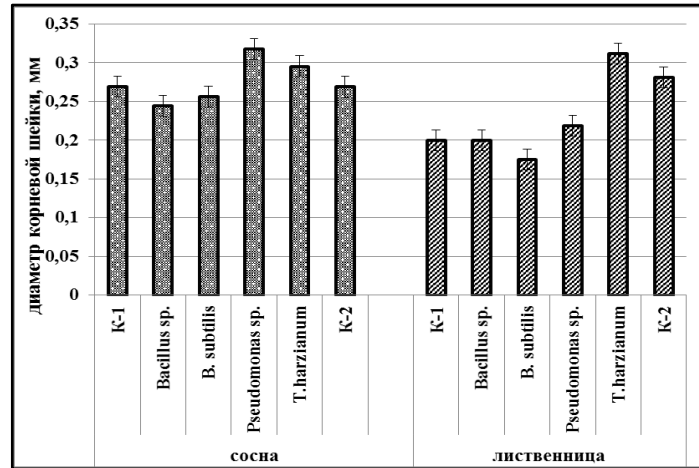


Рисунок 25 – Значения диаметра корневой шейки сеянцев сосны обыкновенной и лиственницы сибирской (май, 2013 г.)

Предпосевная обработка хвойных также сказалась на величине сухого веса сеянцев. Отмечено, что сухой вес сеянцев сосны при обработке *B. subtilis*, *Pseudomonas* sp., *T. harzianum* был выше, чем в контроле в среднем в 1.2 раза. У лиственницы значение сухого веса сеянца было выше контрольного (К-1) только в варианте с *Bacillus* sp. (0.2 г.), в то время как остальные варианты обработки не способствовали увеличению веса сеянцев (Рисунок 26, Прил. Таблица 2).

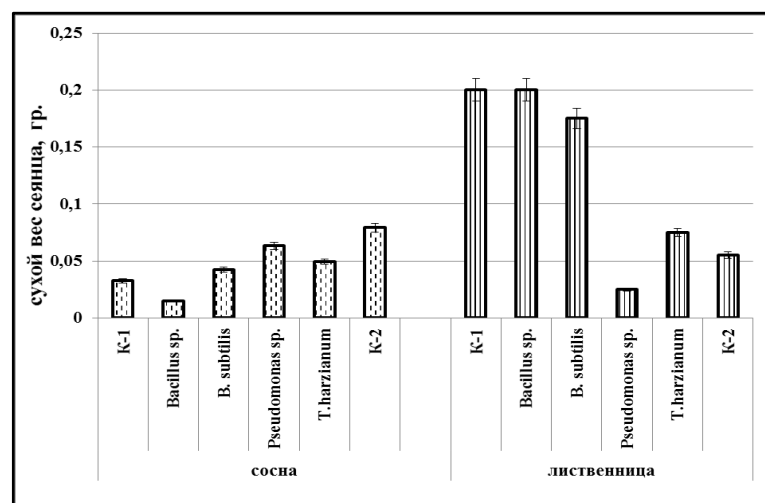


Рисунок 26 – Значения сухого веса сеянцев сосны обыкновенной и лиственницы сибирской (май, 2013 г.)

Результаты полевого эксперимента также выявили положительное

воздействие приема мульчирования почвы вспученным вермикулитом на морфометрические показатели сеянцев сосны и лиственницы. Особенно заметным было влияние вермикулита на сеянцы сосны. Так, согласно полученным данным (Прил. Таблица 2), в варианте с использованием в качестве мульчи вермикулита (К- 2) все морфометрические показатели сеянцев сосны были выше, чем в контроле с использованием в качестве мульчи опилок (К-1). Длина мутовки и диаметр корневой шейки сеянцев лиственницы в варианте с вермикулитом также были несколько выше, чем в К-1. Учитывая засушливые погодные условия вегетационного периода 2012 года, большая эффективность вермикулита по сравнению с опилками могла быть обусловлена лучшим сохранением влаги в верхнем почвенном слое, отсутствием «парникового эффекта», как правило, вызываемого мульчей из опилок, и выделением из состава вермикулита в почву макро- и микроэлементов (калия, кальция, железа, магния и т.п.), позитивно повлиявших на всхожесть и некоторые морфометрические показатели сеянцев сосны и лиственницы.

Таким образом, наибольший положительный эффект на сохранность и морфометрические характеристики сеянцев сосны обыкновенной оказала предпосевная обработка семян штаммами *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas* sp. и *Bacillus subtilis*. На сеянцы лиственницы сибирской максимальный эффект оказала обработка *Trichoderma harzianum* и *Bacillus* sp. Для сохранения влаги и обеспечения сеянцев комплексом необходимых микроэлементов в качестве мульчи можно рекомендовать вспученный вермикулит.

5.1.4. Влияние предпосевной обработки семян на численность эколого-трофических групп микроорганизмов

Перед посевом, обработанных суспензиями микроорганизмов семян хвойных, провели микробиологический анализ почвы двух гряд (№1 и №2) перед разбивкой их на экспериментальные участки (варианты опыта), с целью определения состояния микробного фона (контроль). Расположение гряд

изначально определяло неодинаковые значения pH и влажности почвы (участок №2 расположен немного ниже, чем №1). В целом почва обоих участков характеризуется как слабо-кислая, близкая к нейтральной (6.51) (Таблица 11).

Общая численность микроорганизмов в почве участка №2 была больше, чем на участке №1 в основном за счет аминотрофов (КАА), и в среднем составляла 9.0 млн КОЕ / г почвы (Таблица 11, Рисунок 27). Микромицеты (СА) занимали незначительную долю от общего количества микроорганизмов, на участке №1 – 2.6 %, на №2 – 0.99 % (Рисунок 28).

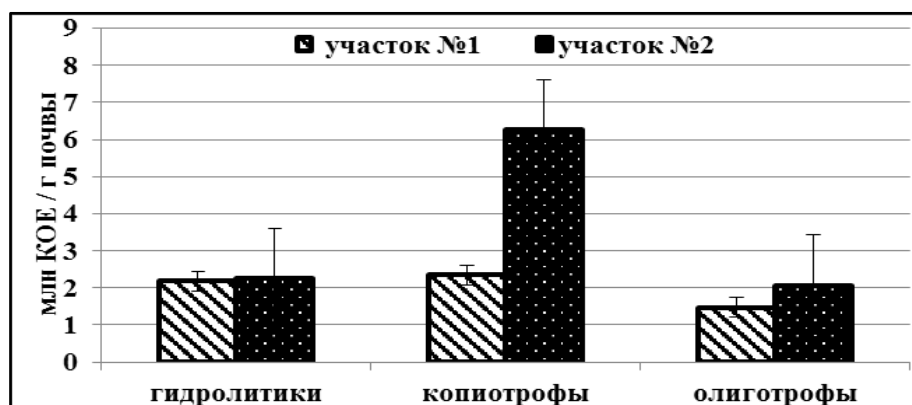


Рисунок 27 – Численность эколого-трофических групп микроорганизмов на участках питомника (контроль) перед посевом семян сосны обыкновенной и лиственницы сибирской (май, 2012 г.)

К началу эксперимента и вегетационного периода (2012 г.) органического вещества было довольно много, трофность почвы высокая. Численность гидролитических микроорганизмов выше, чем олиготрофных, значения $K_{мин} > K_{олиг}$ в 1.5–3.0 раза, что свидетельствует об активности микробной минерализации (Таблица 11).



Рисунок 28 – Доля грибов (%) от общего числа микроорганизмов в темно-серой почве двух участков опытного питомника (май, 2012 г.)

Общая численность микроорганизмов в почве под посевами хвойных была максимальной в июне (в период массовых всходов семян), через месяц после внесения антагонистов с семенами сосны обыкновенной и лиственницы сибирской (в среднем 5.6 млн КОЕ / г почвы). В течение вегетационного сезона общая численность ЭКТГМ постепенно снижалась и к сентябрю в целом под посевами хвойных сократилась в 1.5 раза (3.6 млн КОЕ / г почвы) (Рисунок 29). В июне в почве под посевами сосны и лиственницы численность микроорганизмов гидролитического комплекса была самой высокой и составляла 2.7 млн КОЕ / г почвы, но на протяжении оставшихся трех месяцев сезона (июль-сентябрь) происходило ее снижение, варьирование в пределах от 0.5 до 0.9 млн КОЕ / г почвы (Рисунок 29).

При обработке семян *Pseudomonas* sp. отмечена максимальная численность гидролитиков (1.8 млн КОЕ / г почвы); обработка *Bacillus subtilis* увеличивала, главным образом, численность копитотрофов (2.3 млн КОЕ / г почвы), $p < 0.05$. Однако на протяжении 4 месяцев доминировали олиготрофные микроорганизмы и значения $K_{\text{ОЛИГ}}$ в почве под посевами сосны и лиственницы были в среднем в 1.3–1.4 раз выше, чем $K_{\text{МИН}}$ (Таблица 11). В целом, обработка семян сосны *Bacillus* sp. и *T. harzianum* показала тенденцию к увеличению всех ЭКТГМ (гидролитики, копитотрофы и олиготрофы) на протяжении вегетационного сезона (Таблица 11).

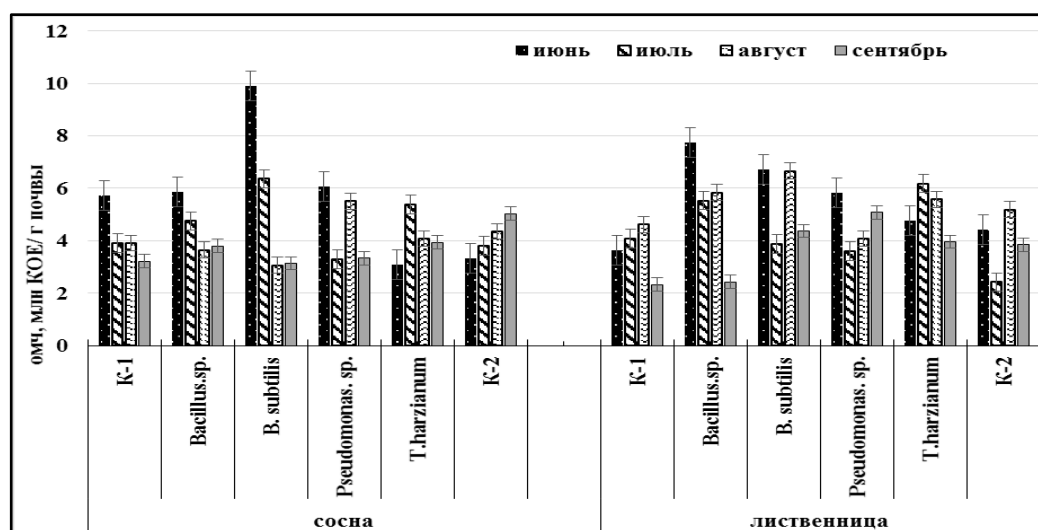


Рисунок 29 – Динамика общей микробной численности (ОМЧ) под посевами сосны обыкновенной и лиственницы сибирской в течение вегетационного сезона 2012 г.

Обработка семян сосны всеми вариантами антагонистов способствовала увеличению численности копиотрофно-олиготрофного комплекса на протяжении периода вегетации. Под посевами лиственницы обработки семян *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp. и *Trichoderma harzianum* способствовали повышению численности гидролитиков и копиотрофов.

Кроме того, к концу вегетационного периода в почве под посевами сосны и лиственницы обработки семян *Pseudomonas* sp. и *Trichoderma harzianum* повысили значения рН на 0.2–0.4 ед., в то время как бациллы снизили рН: *Bacillus* sp. – на 0.1–0.5 ед., и *B. subtilis* – на 0.6 ед. (Таблица 11). Найдена достоверная зависимость ($p < 0.05$) общей численности микроорганизмов от рН₍₁₎, влажности₍₂₎ и температуры₍₃₎ почвы: под сосной ($r_1=0.40$, $r_2=0.52$, $r_3=-0.80$) и лиственницей ($r_1=0.42$, $r_2=-0.65$, $r_3=0.37$, Прил. Таблица 3).

Таким образом, на фоне снижения общей численности микроорганизмов к концу вегетационного периода из-за неблагоприятных погодных условий, что подтверждает снижение коэффициента вариации (CV) с июня по сентябрь с 38.9 до 18.9 %, все варианты обработки семян хвойных микробами-антагонистами в целом, показали тенденцию к увеличению эколого-трофических групп микроорганизмов. В почве питомника под сеянцами сосны обыкновенной микробная обработка способствовала увеличению численности копиотрофно-олиготрофного комплекса, под сеянцами лиственницы сибирской – гидролитиков и копиотрофов. При этом наиболее перспективными вариантами обработки семян сосны были *Bacillus* sp. и *T. harzianum*, а лиственницы – *B. subtilis*, *Pseudomonas* sp. и *T. harzianum*.

Во второй вегетационный сезон общая численность микроорганизмов в почве под посевами хвойных была максимальной в июле (6.7 млн КОЕ / г почвы). В отличие от первого вегетационного сезона, где общая численность ЭКТГМ постепенно снижалась к сентябрю (и была в 1.5 раза ниже майских значений), на второй год ОМЧ повышалось с мая (4.0 млн КОЕ / г почвы) по июль, и в сентябре возвращалось к уровню начала вегетации (май – 3.7 млн КОЕ / г почвы) (Рисунок 30). Кроме того, в июле в почве под посевами сосны и лиственницы численность

гидролитиков была самой высокой за сезон (1.2 млн КОЕ / г почвы), мы связываем это с отпадом сеянцев, а к сентябрю их численность снижалась до 0.6 млн КОЕ / г почвы, также как в первый год после посева семян (Рисунок 30, Таблица 11, 12).

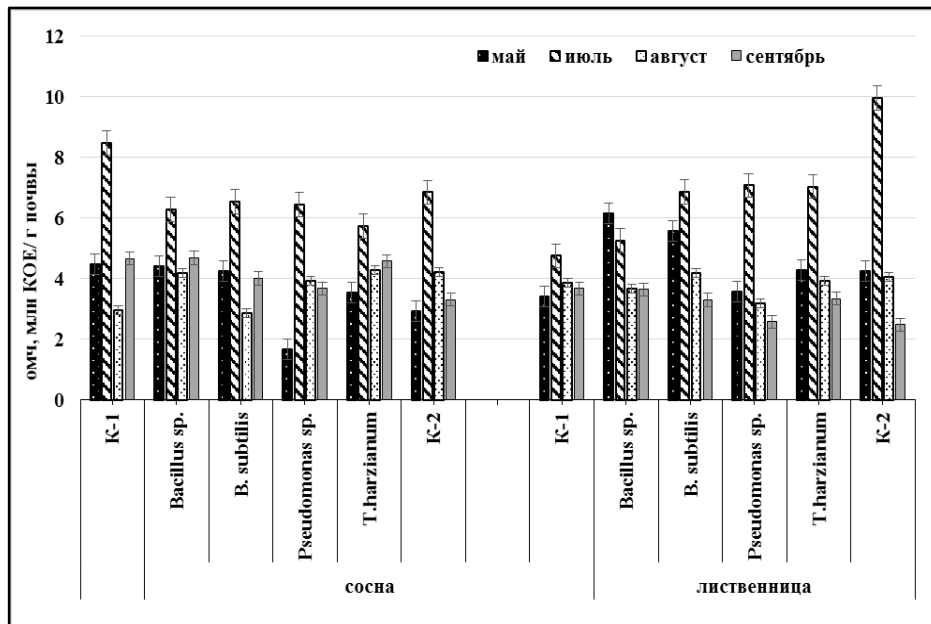


Рисунок 30 – Динамика общей микробной численности (ОМЧ) под посевами сосны обыкновенной и лиственницы сибирской в течение вегетационного сезона 2013 г.

При обработке семян *T. harzianum* отмечена максимальная численность гидролитиков (1.6 млн КОЕ / г почвы); добавление в почву вермикулита (K-2) и обработка *Pseudomonas* sp. увеличивали численность микроорганизмов копиотрофного комплекса (1.4 и 1.5 млн КОЕ / г почвы, соответственно). Как и в первый вегетационный сезон в почве под посевами в основном доминировали олиготрофные микроорганизмы, а значения $K_{\text{ОЛИГ}}$ варьировали в пределах от 1.6 до 4.7 и были в 1.2–1.5 раза выше $K_{\text{МИН}}$ (Таблица 12). В целом, на протяжении второго вегетационного сезона, как и в течение первого, обработка семян сосны штаммами *Bacillus* sp. и *T. harzianum* показала тенденцию к увеличению всех ЭКТГМ (гидролитики, копиотрофы и олиготрофы) (Таблица 12).

В вегетационный период 2013 г, в отличие от 2012 г., под посевами сосны наблюдали увеличение гидролитико-копиотрофного комплекса, в особенности развитию этих групп способствовали обработки *Bacillus subtilis* и *Trichoderma harzianum*, такая же тенденция отмечалась в варианте с вермикулитом (K-2). Под

посевами лиственницы в среднем все микроорганизмы-антагонисты способствовали повышению численности эколого-трофических групп микроорганизмов (гидролитиков, копиотрофов и олиготрофов). В целом в течение второго вегетационного сезона в почве под посевами сосны и лиственницы преобладали также олиготрофные микроорганизмы.

Таким образом, во второй вегетационный период (2013 г.) под посевами хвойных общая численность микроорганизмов в целом поддерживалась на уровне 2012 г., то есть не отмечалось снижения общей микробной численности после двух лет эксперимента. Во всех вариантах обработки семян хвойных микробами-антагонистами отмечали тенденцию к увеличению эколого-трофических групп микроорганизмов (в особенности *T. harzianum* и *B. subtilis*), при этом коэффициент вариации ОМЧ, свидетельствующий об однородности значений, под сосной был средний ($10 > CV < 20$), а под лиственницей – значимый ($20 > CV < 30$).

На второй год эксперимента в почве питомника под посевами сосны в вариантах обработки увеличилась численность гидролитико-олиготрофного комплекса, а под лиственницей – увеличились все группы (гидролитики, олиготрофы и копиотрофы), в то время как в год внесения микробов-антагонистов под посевами хвойных увеличилась численность копиотрофно-олиготрофного комплекса. При этом наиболее перспективными вариантами под сосной также были *Bacillus subtilis* и *Trichoderma harzianum*, а под лиственницей – *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. и *Trichoderma harzianum*.

5.1.5. Ферментативная активность темно-серой почвы питомника

В процессах разложения органических веществ и гумусонакопления в почве важная роль принадлежит ферментам группы гидролаз (Хазиев, 1976). Активность гидролитических ферментов (инвертазы, протеазы, уреазы, фосфатазы), катализирующих расщепление высокомолекулярных органических соединений, свидетельствует об интенсивности мобилизационных процессов (Галстян, 1974). Анализ ферментативной активности темно-серой почвы опытного питомника

показал изменение активности гидролаз в почвенных образцах в зависимости от варианта обработки семян хвойных (Таблица 13).

Таблица 13 – Ферментативная активность темно-серой почвы в зависимости от вариантов обработки (2012г)

Вариант обработки	Инвертаза, мг глюкозы на 1 г почвы	Фосфатаза, мг P_2O_5 на 1 г почвы	Протеаза, мг глицерина на 1 г почвы	Уреаза, мг $N-NH_4$ / 1 г почвы	месяц
Сосна обыкновенная					
К-1	73.44	0.84	1.27	2.55	Июнь
	72.27	1.17	0.73	3.36	Сентябрь
<i>Bacillus</i> sp.	60.02	0.83	1.19	3.49	Июнь
	69.20	1.51	0.76	4.33	Сентябрь
<i>Bacillus subtilis</i>	68.27	0.87	1.22	3.98	Июнь
	71.20	0.88	0.89	2.57	Сентябрь
<i>Pseudomonas</i> sp.	69.10	0.83	1.08	3.12	Июнь
	59.78	1.07	0.86	1.98	Сентябрь
<i>Trichoderma harzianum</i>	69.83	0.51	1.13	3.05	Июнь
	71.98	0.78	1.31	3.02	Сентябрь
К-2	75.35	0.65	0.83	2.89	Июнь
	73.01	0.73	1.07	2.25	Сентябрь
Лиственница сибирская					
К-1	61.78	0.51	1.39	2.38	Июнь
	61.29	0.51	1.08	3.52	Сентябрь
<i>Bacillus</i> sp.	64.17	0.48	1.29	2.60	Июнь
	68.86	0.44	1.08	3.44	Сентябрь
<i>Bacillus subtilis</i>	71.00	0.52	1.04	3.26	Июнь
	56.02	0.46	0.93	3.45	Сентябрь
<i>Pseudomonas</i> sp.	71.10	1.14	1.39	2.33	Июнь
	62.02	0.79	1.28	6.16	Сентябрь
<i>Trichoderma harzianum</i>	68.27	1.03	1.07	4.65	Июнь
	66.37	1.04	0.88	5.33	Сентябрь
К-2	68.13	1.06	1.31	2.51	Июнь
	66.61	1.13	0.66	2.91	Сентябрь

Определение активности инвертазы имеет важное значение, так как она позволяет судить о способности к преобразованию углеводов растительных остатков (Титова, Козлов, 2012). Инвертазная активность в почве под сосной в течение вегетационного сезона снизилась, по сравнению с контролем (К-1 и К-2), во всех вариантах обработки. Однако, относительно июня активность фермента к сентябрю возросла на 4–15 % в вариантах с бациллами, и незначительно (в пределах ошибки, на 3 %) в варианте с триходермой. Под лиственницей активность инвертазы в контроле (К-1 и К-2) оставалась постоянной в течение вегетационного

сезона, а в опытных вариантах в целом увеличилась, и в сентябре наиболее заметно превышала контроль (К-1) в вариантах с бациллами (на 8–12 %) и триходермой (на 8 %) (Таблица 13).

Отмечена корреляционная связь между активностью фермента и численностью гидролитиков ($r=-0.59$) и олиготрофов ($r=0.48$). Тесная связь активности инвертазы с количеством почвенных микроорганизмов и их метаболической активностью свидетельствует о преимуществе в почве инвертазы микробного происхождения (Kiss, 1958; Чундерова, 1976; Trasar-Cepeda et al., 2008). Активность инвертазы связана с $pH_{(1)}$, влажностью $_{(2)}$ и температурой $_{(3)}$ почвы, как под сосной ($r_3=0.80$), так и под лиственницей ($r_1=0.74$, $r_2=-0.84$ и $r_3=0.49$), $p < 0.05$, что согласуется с исследованиями (Галстян, Григорян, 1980; Trasar-Cepeda et al., 2008) (Прил. Таблица 4).

Фосфатаза в почве выполняет такую важную функцию, как минерализация органического фосфора и помощь при его передаче в корни растений (Современная микробиология ... , 2005). Содержание фосфатазы к концу вегетации (сентябрь) под посевами сосны обыкновенной увеличилось, как в контрольных (К-1 – на 39 % и К-2 – на 12 %), так и опытных вариантах (*Bacillus* sp. – на 82 %; *Pseudomonas* sp. – на 29 %; *T. harzianum* – на 20 %) по сравнению с июнем (Таблица 13). Под лиственницей сибирской активность фермента в контроле (К-1, К-2) не изменилась в течение вегетации, в то время, как в вариантах с *Pseudomonas* sp. и *T. harzianum* активность фермента к сентябрю увеличилась, по сравнению с контролем, в 1.5– 2.0 раза (Таблица 13). Изменения кислотности $_{(1)}$, влажности $_{(2)}$ и температуры $_{(3)}$ почвы в течение вегетационного сезона определили зависимость от них активности фосфатазы, как под сосной ($r_1=-0.71$, $r_2=-0.81$, $r_3=-0.51$), так и под лиственницей ($r_1=-0.82$, $r_3=0.55$). Фосфатазная активность также связана с метаболизмом эколого-трофических групп микроорганизмов: под посевами сосны отмечена корреляция с гидролитиками ($r=0.78$) и олиготрофами ($r=-0.44$); под лиственницей – с гидролитиками ($r=-0.86$), копиотрофами ($r=-0.47$) и олиготрофами ($r=0.63$), $p < 0.05$ (Прил. Таблица 4).

Протеазы катализируют расщепление белковых веществ до полипептидов и гидролиз последних до аминокислот, которые могут усваиваться непосредственно микроорганизмами (Хазиев, 1976; Щербакова, 1980). Активность протеазы в почве к концу сезона снизилась, как под сосной (в 1.2 раза), так и под лиственницей (в 1.3 раза), по сравнению с таковой в июне (Таблица 13). В почве под сосной все варианты микробной обработки увеличили активность фермента к концу вегетации, но больше всего – *B. subtilis* (в 1.2 раза) и *T. harzianum* (в 1.7 раз), по сравнению с контролем (К-1). В почве под лиственницей протеаза увеличилась в 1.2 раза только в варианте с *Pseudomonas* sp. (Таблица 13). На активность фермента также оказывали влияние $pH_{(1)}$, влажность $_{(2)}$ и температура $_{(3)}$ почвы, как под сосной ($r_2=0.80$, $r_3=-0.52$), так и под лиственницей ($r_1=-0.46$, $r_2=-0.47$, $r_3=0.76$) (Прил. Таблица 4).

Уреаза активно участвует в регуляции азотного обмена в почве: катализирует гидролиз мочевины до аммиака и CO_2 , вызывая гидролитическое расщепление связи между азотом и углеродом в молекулах органических веществ (Хазиев, 2005). К концу вегетации активность уреазы увеличилась и в контроле, и в опытных вариантах (Таблица 13). В почве под лиственницей активность фермента в июне повышали практически все варианты в среднем в 1.5 раза, по сравнению с К-1; в сентябре активность фермента была выше контрольных значений в вариантах с *Pseudomonas* sp. (в 1.8 раза) и *Trichoderma harzianum* (в 1.5 раза). Под посевами сосны в июне активность уреазы была выше во всех вариантах обработки в 1.2- 1.6 раз, по сравнению с К-1 и К-2. К сентябрю повышение активности фермента отмечено только в варианте с *Bacillus* sp. (в 1.3 раза) (Таблица 13).

В литературе есть сведения о том, что активность уреазы коррелирует с активностью всех основных ферментов азотного метаболизма (Галстян, Григорян, 1980; Trasar-Cepeda et al., 2008). В наших исследованиях активность уреазы под посевами сосны и лиственницы, коррелировала с протеазой ($r=0.57$), инвертазой ($r=0.54$) и фосфатазой ($r=0.74$). На скорость гидролиза мочевины влияли кислотность $_{(1)}$, влажность $_{(2)}$ и температура $_{(3)}$ почвы, как под сосной ($r_1=-0.53$, $r_2=-0.42$), так и под лиственницей ($r_1=0.40$, и $r_3=0.92$), что согласуется с

исследованиями (Иванов, Баранова, 1972; Cortez et al., 1972; Галстян, Абрамян, 1975) (Прил. Таблица 4). Кроме того, активность уреазы тесно связана с деятельностью микроорганизмов в почве, о чем свидетельствуют коэффициенты корреляции между уреазой и общей микробной численностью под посевами сосны обыкновенной и лиственницы сибирской ($r_C=0.72$ и $r_L=0.60$), а также уреазой и микробной биомассой (МБ) ($r_C=0.39$ и $r_L=-0.42$) (уровень достоверности $p \leq 0.05$).

Таким образом, показано, что внесенные в почву с семенами хвойных микробы-антагонисты, неоднозначно влияли на активность почвенных ферментов. Так под посевами сосны обработка *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp. повышала активность фосфатазы к концу сезона, что свидетельствует о повышении доступного фосфора в почве, коэффициент вариации составил 25.9 %. Кроме того, происходило увеличение протеазной (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp. и *T. harzianum*) и уреазной активности (*Bacillus* sp.), коэффициент вариации составил 21 и 27 %, соответственно.

Схожая ситуация наблюдалась под лиственницей, где активность инвертазы повышали обработки *Bacillus* sp. и *T. harzianum*, при этом отмечены низкие значения коэффициента вариации (CV), свидетельствующие о равноценном состоянии активности инвертазы (5.1 и 6.7 % – в начале и конце вегетации, соответственно). Количество уреазы под посевами хвойных в сентябре увеличивали все антагонисты, коэффициент вариации при этом составил 28.6 %.

5.1.7. Дыхательная активность микробного сообщества почвы под посевами хвойных

Важнейшими показателями активности почв являются скорость базального дыхания (БД) и значения микробной биомассы (МБ), которые, вместе с микробным метаболическим коэффициентом (qCO_2), определяют экофизиологическое состояние почвенного микробного сообщества и дают качественную оценку почвы (Harris, 2003). Сезонная динамика дыхания почвенных микроорганизмов контролируется (прямо или косвенно) температурой и влажностью почвы,

фенофазами растительности (Макаров, 1988; Sarathchandra et al., 1989; Raich, Schlesinger, 1992).

На вспаханных, подготовленных под посевы, грядках (№1 и №2) в начале вегетационного сезона 2012 г., невысокие значения микробной биомассы (МБ) и очень высокие – удельного микробного дыхания (qCO_2), говорят о нарушении устойчивости микробоценозов. Базальное дыхание (БД) микробов на первом участке в 2.4 раза было выше, чем на втором, а значения микробной биомассы на обоих участках различались между собой в 1.4 раза (№1 – 152 и №2 – 109 мкг С / г почвы) (Таблица 11, Рисунок 31, 32). На первом участке удельное микробное дыхание было выше, чем на втором в 2 раза (Рисунок 31).

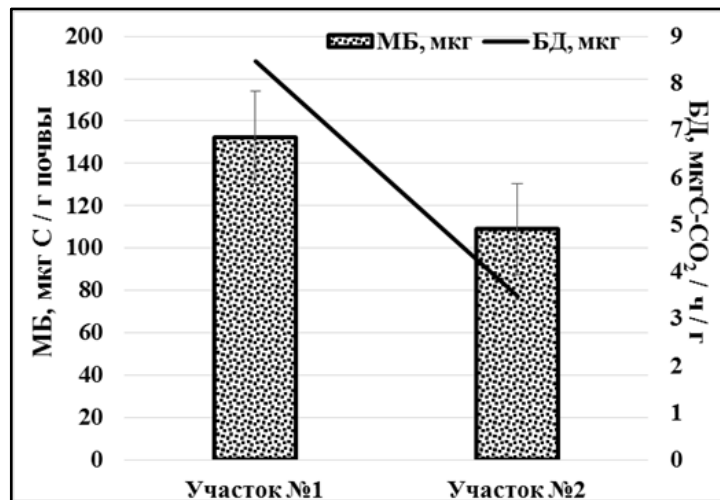


Рисунок 31 – Значения микробной биомассы (МБ) и базального дыхания в почве до посева семян хвойных (май, 2012 г.)

При этом между показателями МБ и температуры почвы под сосной отмечена слабая отрицательная корреляция ($r = -0.4$), и средняя положительная с рН почвы под лиственницей ($r = 0.6$) (Прил. Таблица 5), $p < 0.05$.

После посева семян хвойных в почве произошло увеличение МБ в 2 раза, по сравнению с изначальными условиями, в связи с добавлением с семенами микробов-антагонистов и их активизации. При изучении динамики содержания микробной биомассы и интенсивности почвенного дыхания в различных вариантах опыта под посевами сосны обыкновенной и лиственницы сибирской отмечали положительное влияние обработки бациллами (*Bacillus* sp. и *B. subtilis*). Под посевами семян сосны значения МБ при обработке *Bacillus* sp. и *B. subtilis*

составили 310.9 и 281.8 мкг С / г почвы, соответственно (Рисунок 33, Таблица 11), а под лиственницей – 353.9 и 311.3 мкг С / г почвы.

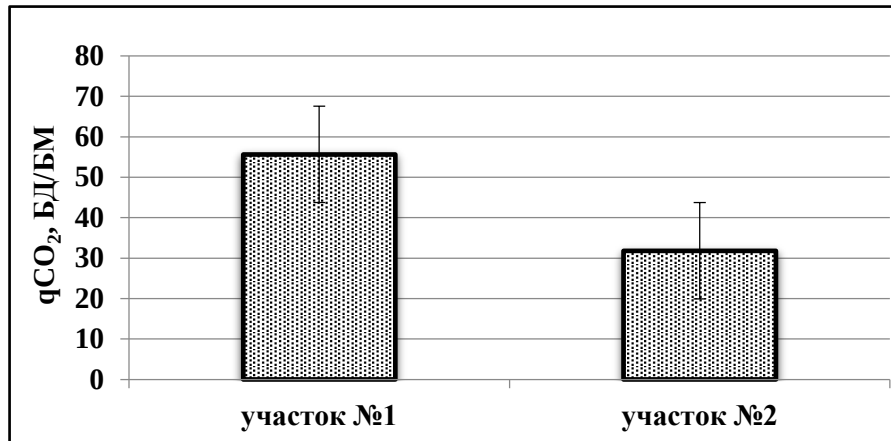


Рисунок 32 – Значение микробного метаболического коэффициента (qCO_2) в почве до посева семян хвойных (май, 2012 г.)

Скорость базального дыхания (БД) через месяц после посева хвойных также увеличилась, как под сосной, так и под лиственницей, и на этот показатель большее влияние оказывала обработка семян *B. subtilis* и *Bacillus* sp. Так под сосной высокие значения БД отмечены в варианте с *B. subtilis* (13.9 мкг С- CO_2 / ч / г почвы), под лиственницей с *B. subtilis* и *Bacillus* sp. (15.9 и 13.2 мкг С- CO_2 / ч / г почвы) (Рисунок 33). Кроме того, благоприятное воздействие на скорость БД оказывала температура воздуха, как под сосной, так и под лиственницей ($r=0.6$ и 0.8 , соответственно) (Прил. Таблица 5).

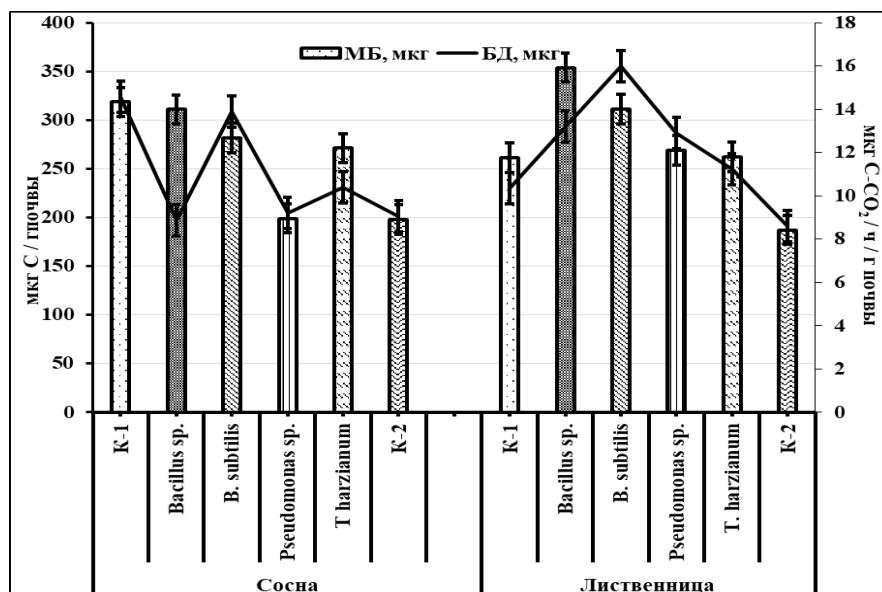


Рисунок 33 – Значения микробной биомассы (МБ) и базального дыхания (БД) в почве под посевами семян хвойных (июнь, 2012 г.)

Значения $q\text{CO}_2$ были достаточно высокими – от 30 до 55 $\text{мкг С-CO}_2 / \text{мг С}_{\text{мик}} / \text{ч}$, поскольку состояние микробоценоза нарушено вспашкой. При этом максимальные значения микробного метаболического коэффициента были в варианте с *B. subtilis* и *Pseudomonas* sp., как под сосной, так и под лиственницей (Рисунок 34).

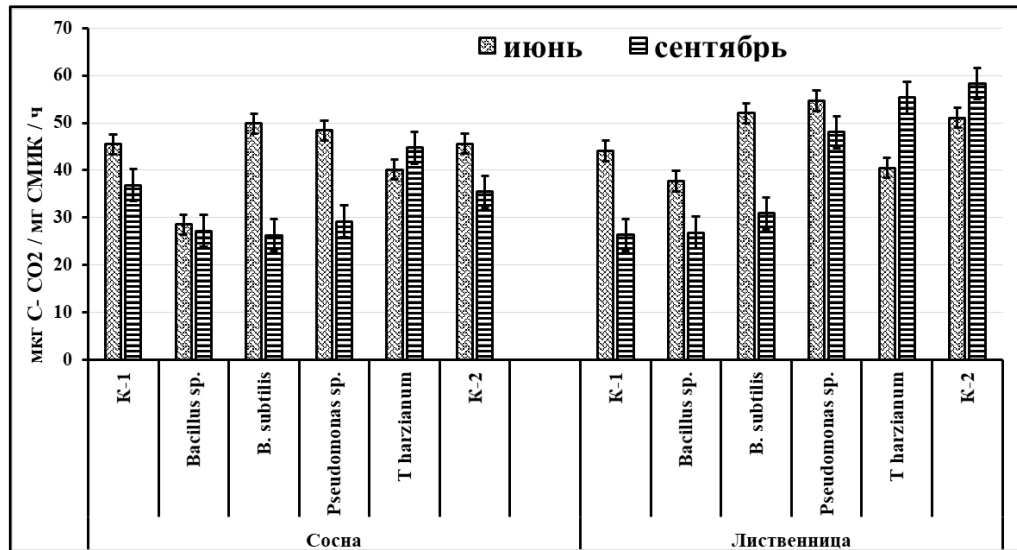


Рисунок 34 – Значение микробного метаболического коэффициента ($q\text{CO}_2$) в почве под посевами семян хвойных (июнь, сентябрь, 2012 г.)

В конце вегетационного периода (сентябрь) значения МБ снизились по сравнению с началом (июнь) во всех вариантах опыта под сосной и лиственницей в 1.3 раза, за исключением вариантов с *Bacillus* sp. и *B. subtilis*. Наименьшие значения МБ на протяжении вегетационного сезона оставались в контроле (K-2) (Рисунок 35, Таблица 11).

Анализ усредненных данных по месяцам не обнаружил достоверных различий в значениях МБ и БД в почве под посевами сосны обыкновенной и лиственницы сибирской ($p=0.52$) (Таблица 11). При этом максимальные значения биомассы под сосной и под лиственницей были в вариантах *Bacillus* sp. и *B. subtilis*, и составили 371.9 и 330.3 $\text{мкг С} / \text{г почвы}$, соответственно – под сосной, и 318.0 и 368.4 $\text{мкг С} / \text{г почвы}$ – под лиственницей. Минимальные значения под сосной в K-2 (125.4 $\text{мкг С} / \text{г почвы}$) и под лиственницей – в варианте с *T. harzianum* (179.4 $\text{мкг С} / \text{г почвы}$).

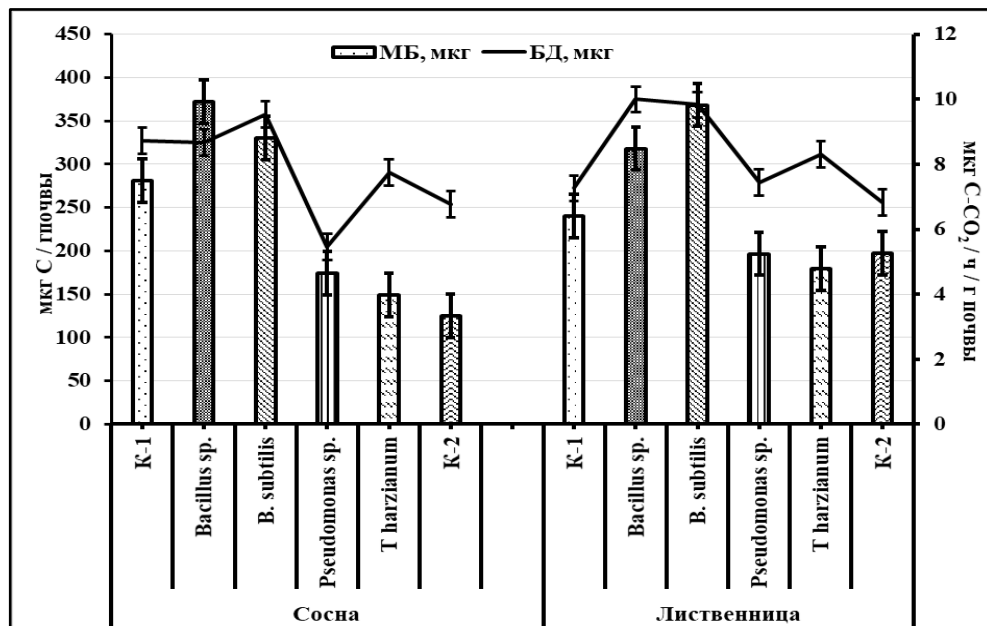


Рисунок 35 – Значения микробной биомассы (МБ) и базального дыхания (БД) в почве под посевами семян хвойных (сентябрь, 2012 г.)

К концу сезона, также как и в начале, было отмечено положительное влияние интродукции микроорганизмов, в особенности бацилл, на скорость базального дыхания. Так БД варьировало от 5.5 до 9.9 мкг С-СО₂ / ч / г почвы с максимумом (9.5 мкг С-СО₂ / ч / г почвы) под сосной при обработке *B. subtilis*, под лиственницей – *Bacillus* sp. (9.9 мкг С-СО₂ / ч / г почвы) (Рисунок 35).

Интродукция бактерий р. *Bacillus* в целом способствовала повышению микробной биомассы в почве под посевами сосны и лиственницы. При этом пространственное варьирование МБ под сосной было немного выше, чем под лиственницей (коэффициент вариации (CV) = 25.8 и 23.1 %, соответственно). Отмечено, что сложившиеся почвенные условия оказывали одинаковое влияние на значения МБ и БД, пространственная вариабельность БД под сосной и лиственницей также различалась не существенно (CV = 32.9 %, и 38.9 %, соответственно). Корреляционный анализ показал, что на значения МБ под сосной влияла влажность почвы ($r = -0.5$), под лиственницей рН, влажность и температура почвы ($r = -0.8$, $r = 0.5$, $r = -0.5$), $p < 0.05$. Значения БД положительно коррелировали с влажностью почвы под лиственницей ($r = 0.8$), и отрицательно – под сосной ($r = -0.85$) (Прил. Таблица 5).

Высокие значения $q\text{CO}_2$ на протяжении всего вегетационного периода (при норме $q\text{CO}_2 \geq 1$) объясняются влиянием агротехнической обработки почвы и неблагоприятными погодными условиями (высокой температурой воздуха и почвы, низкой влажностью), вследствие аномально засушливого лета (Таблица 11), и свидетельствуют о нарушении функционирования микробных сообществ. Значения $q\text{CO}_2$ были максимальными в варианте *T. harzianum* под сосной и лиственницей и составили 45 и 55 мкг С- CO_2 / мг С_{мик} / ч, соответственно. Однако в сентябре было отмечено снижение значений метаболического коэффициента в 1.6 раз, как под сосной, так и под лиственницей (Рисунок 34).

Несмотря на то, что экофизиологический статус почвенных микробоценозов под сосной и лиственницей в исследуемый период был сильно нарушен, к сентябрю наблюдали тенденцию к его восстановлению ($q\text{CO}_2$ снизился в среднем в 1.5 раза). Максимальные значения $q\text{CO}_2$ в почве под сосной и лиственницей на протяжении вегетационного периода отмечены в контроле (К-1, К-2); минимальные – в вариантах с *Bacillus* sp. и *B. subtilis*, как под сосной, так и под лиственницей (Прил. Таблица 5).

Снижение значений $q\text{CO}_2$ к концу вегетационного сезона в почве под посевами хвойных свидетельствует о начале процессов восстановления экофизиологического статуса микробного сообщества. Коэффициент вариации при этом изменялся от 14.7 до 29.7 % под сосной и от 13.5 до 45.9 % – под лиственницей, что говорит об ослаблении степени влияния стрессового фактора на микробоценозы.

Для того, чтобы определить наиболее значимые факторы, влияющие на дисперсию полученных данных, провели факторный анализ. Для определения наиболее значимых факторов, влияющих на дисперсию всех данных, провели факторный анализ на основе метода главных компонент. Получив собственные значения факторов, в модели, согласно методу Кейзера, оставили только два фактора (собственные значения которых >1) (Рисунок 36А, Б).

Доля дисперсии, объясняемая 1-м фактором, равна 46.9 %, вторым – 21.8 %. Установлено, что 4 переменные несут существенные нагрузки на 1-й фактор – это

влажность и pH почвы, ферментативная и дыхательная активность. Фактор 2 имеет довольно значительные нагрузки для переменных температура, ОМЧ и МБ (Рисунок 36А, Б).

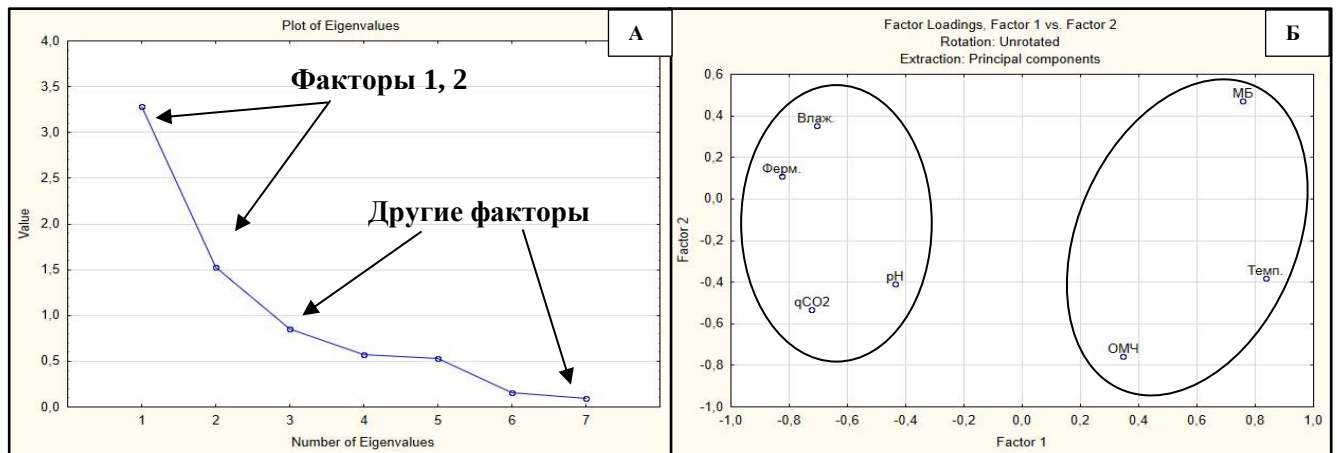


Рисунок 36 – А) График собственных значений «каменистой осыпи», Б) График факторных нагрузок (Фактор 1 и Фактор 2) при анализе данных 2012-2013 гг.

В период исследований 2012–2013 гг. наиболее важными факторами, влияющими на ферментативную активность почвы, были влажность и pH почвы ($r=0.5$), на общую микробную численность и микробную биомассу – температура почвы ($r=0.49$), а на микробный метаболический коэффициент больше всего влияла кислотность среды (pH).

Таким образом, внесение микробов-антагонистов и использование в качестве дополнительного субстрата вермикулита по-разному влияло на активность микробного сообщества под посевами хвойных в почве опытного питомника, но в целом положительно сказалось на восстановлении экофизиологической нормы функционирования микробных сообществ.

К концу двухлетнего эксперимента в антропогенно-преобразованной почве под посевами хвойных, обработанных микроорганизмами, и при внесении вермикулита наблюдали снижение микробного метаболического коэффициента, приближающегося к норме, а также стабилизацию почвенного микробного сообщества. Внесение антагонистов способствовало накоплению в почве микробной биомассы, увеличению численности олиготрофной и гидролитической групп микроорганизмов, при доминировании олиготрофов. А мульчирование почвы вермикулитом способствовало повышению интенсивности базального

дыхания микробоценоза, и доминированию численности копитрофного комплекса.

Обработка семян хвойных микроорганизмами способствовала повышению активности протеазы и уреазы, а значит обогащению почвы аминокислотами и подвижными формами аммиака. Добавление же в почву вермикулита способствовало накоплению в почве простых сахаров, происходящих в связи с увеличением активности инвертазы.

Установлено, что на фоне повышения биогенности почвы в вариантах с добавлением микроорганизмов-антагонистов, и при мульчировании вермикулитом, отмечали наилучшую грунтовую всхожесть семян, сохранность и морфометрические параметры сеянцев хвойных.

5.2. Влияние внесения добавочных субстратов на пролонгирование активности микроорганизмов-антагонистов

Интегрированная защита растений подразумевает использование различных методов, в том числе механических и химических, однако все больше внимания уделяется биологическим, разработанным на основе метаболитов микроорганизмов или прямого воздействия живых клеток биологически активных микроорганизмов. Кроме этого, предлагаются и различные препараты растительного происхождения, в том числе полученные механохимическими способами (Рожанская и др., 2003; Бычков, Ломовский, 2017). В настоящее время применяются различные способы предпосевной обработки семян хвойных микроэлементами, которые повышают активность ферментов, ускоряют рост и развитие сеянцев, повышают их устойчивость к неблагоприятным условиям внешней среды (Василенко, 1985; Долгошеев, 1985; Савченко, 1985). Перед посевом семена обрабатываются растворами солей марганца, меди, кобальта, мочевины. Действию микроэлементов на рост и развитие хвойных, особенно сосны, посвящено немало работ (Писаренко, 1977; Василенко, 1985, 1996).

Однако этот вопрос недостаточно глубоко разработан и не исчерпан.

Поскольку, по нашему мнению, для эффективного выращивания качественного лесопосадочного материала можно использовать различные методы, с одним лишь условием – чтобы внесенные вещества или организмы были экологически безопасны, не наносили вреда окружающей среде. Мы поставили задачу сравнить различные варианты обработки семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) для определения наиболее эффективного способа биоремедиации нарушенной почвы и защиты сеянцев хвойных. В разные годы нами проведена простая химическая обработка микроэлементами, водными суспензиями микроорганизмов и фитопрепаратами. Для сравнения влияния этих препаратов на рост и развитие хвойных в естественных условиях были заложены различные варианты опыта на территории Погорельского опытного питомника (2014–2016 гг.).

В связи с тем, что микробные агенты имеют ограниченный период активности в почвенном микробоценозе, быстро элиминируются из-за постепенного истощения питательных веществ, перед тем как испытывать различные варианты микробных, и растительных агентов, мы провели предварительные исследования с целью изучить влияние разных вариантов добавочного субстрата на функционирование микробоценоза.

5.2.1. Функционирование микробных сообществ почвы березово-соснового леса при внесении добавочных субстратов (микокомпоста и опилок)

Одним из вариантов эффективного выращивания лесопосадочного материала и пролонгирования микробной активности может быть внесение в посевы добавочных органических субстратов (продуктов переработки лесоперерабатывающей промышленности). Такие субстраты экологически безопасны для аборигенного / нативного микробоценоза и для педобиоты. В связи с чем провели эксперимент в темно-серой лесной почве и в качестве таких субстратов использовали древесные (сосновые) опилки (ОП) и микокомпост (МК) – продукт биоконверсии опилок с помощью дереворазрушающих грибов, при

внесении которых оценивали основные составляющие функциональной активности микробных сообществ темно-серой почвы сосново-березового леса.

Измерение влажности почвы показало, что внесение МК или ОП способствовало небольшому увеличению влагосодержания в поверхностном слое почвы по сравнению с контролем, что особенно сказывалось к концу вегетационного периода (Рисунок 37).

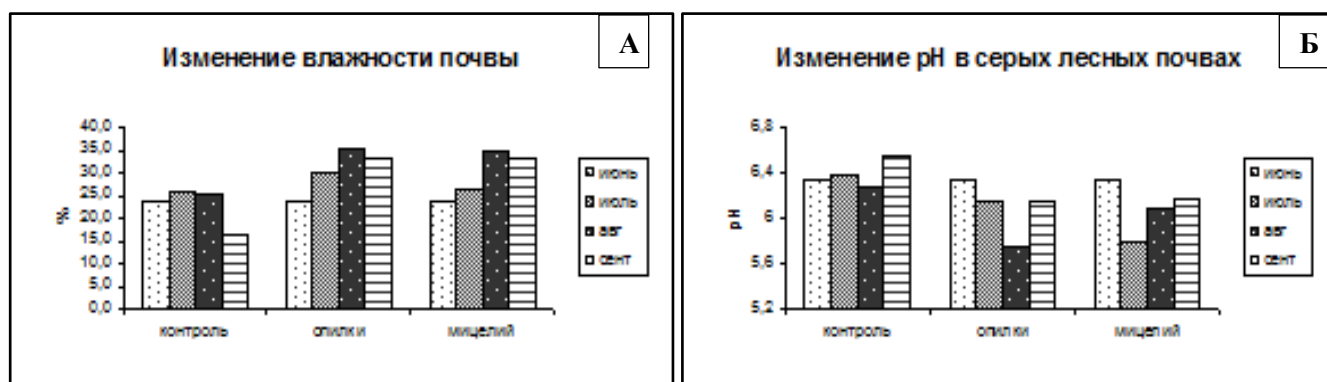


Рисунок 37 – Изменение влажности (А) и pH (Б) серой лесной почвы в период наблюдений

Значение pH, колебавшееся в контрольном варианте в пределах 6.3–6.5, на некоторое время снижалось до 5.8 в почве, содержащей 1 % микокомпоста или опилок через 1 и 2 месяца после их внесения, соответственно (Рисунок 37). Однако связи этого понижения с общей численностью микроорганизмов или отдельных физиологических групп (аммонификаторов, копиотрофов, грибов и т.п.) не установлено. Численность эколого-трофических групп микроорганизмов приведены в Таблице 14.

В контроле регистрировалась невысокая численность копиотрофов на протяжении летних месяцев, с небольшим повышением к сентябрю, в опытных вариантах после увеличения численности в июле наблюдалась ее понижение. Была отмечена общая закономерность – возрастание к концу периода наблюдений сравнительно низкой в начале численности гидролитиков во всех вариантах, хотя в варианте МК для июля отмечен высокий уровень численности, но, учитывая значительное варьирование среднего показателя, различия между данными за июль и август могут быть недостоверными.

Таблица 14 – Численность эколого-трофических групп микроорганизмов по месяцам 2011 г. после внесения в почву микокомпоста и опилок

ЭКТГМ, млн КОЕ / г почвы асв	Месяц отбора образца	Вариант опыта		
		Контроль	Опилки	Микокомпост
Копиотрофы	Июль	8.85±2.88	48.74±14.10	68.02±14.51
	Август	8.86±3.50	15.50±10.37	26.18±9.26
	Сентябрь	12.51±0.90	7.57±2.54	40.34±4.06
Гидролитики	Июль	4.45±0.82	10.40±1.48	43.96±20.03
	Август	10.90±2.67	12.88±5.10	19.14±5.83
	Сентябрь	10.48±1.91	39.86±2.86	57.94±7.35
Олигонитрофилы	Июль	9.64±1.06	28.35±11.60	14.81±2.69
	Август	12.48±1.30	10.56±2.46	22.77±6.21
	Сентябрь	5.10±0.51	11.01±1.10	20.94±2.09
Олиготрофы	Июль	0.59±0.01	1.25±0.01	16.11±0.16
	Август	–	–	–
	Сентябрь	5.42±0.64	6.73±1.06	13.19±2.48
Мицелиальные грибы	Июль	0.49±0.21	1.24±0.46	0.95±0.24
	Август	1.48±0.76	0.98±0.24	0.51±0.18
	Сентябрь	1.08±0.21	0.65±0.31	1.45±0.17

Численность олигонитрофил в контроле немного увеличивалась в летние месяцы, затем сменялось падением в сентябре, в варианте ОП – сравнительно высокая численность в июле снижалась в 2 раза в августе и сентябре, в варианте МК достаточно высокая численность в июле (14.8 млн КОЕ / г почвы) увеличивалась на треть в августе и сохранялась на этом же уровне в сентябре. Численность олиготрофов в контроле и варианте ОП увеличивалась к концу вегетационного сезона, а в варианте МК сохранялась на достаточно высоком уровне в течение всего сезона (Таблица 14).

Численность грибов в почве отмечена составляла около 1.5 млн КОЕ / г почвы (Таблица 14). В вариантах с опилками и микокомпостом в начале первого вегетационного сезона численность грибов была в 2 раза выше, чем в контроле. В контроле этот показатель достиг того же уровня только к концу сезона (август-сентябрь). К концу вегетационного сезона численность грибов падала (вариант ОП) или снижалась в августе, но снова увеличивалась к сентябрю (вариант МК).

Маловероятно, что высокая численность копиотрофов в июле в варианте с опилками связана только с обильным размножением почвенных микроорганизмов, поскольку древесина (опилки) не способна обеспечить эту группу легко

утилизируемыми органическими соединениями. Возможно, здесь определенный вклад вносила сапротрофная / покаяющаяся микрофлора опилок, которая, попав в почву, начала развитие и стала физиологически активной. В микокомпосте, в отличие от опилок, поверхностная микрофлора была устранена стерилизацией субстрата перед засевом базидиомицета-делигнификатора, а мицелий базидиального агента биоконверсии, не имеющий спороносных или покаяющихся структур, потерял жизнеспособность в процессе сушки микокомпоста перед внесением в почву. Поэтому в варианте МК повышение численности копиотрофов в июле, скорее всего, было связано с активным ростом и размножением почвенных микроорганизмов, вызванное внесением доступного для утилизации органического субстрата (микокомпоста).

Возрастание численности аммонификаторов, отмечаемое во всех вариантах опыта в сентябре, может быть связано с поступлением в почву органики естественным путем и отмиранием части микробной биомассы. Однако, следует отметить, что на фоне этой общей закономерности численность аммонификаторов в почве, содержащей опилки или микокомпост, была выше в 3.8 и 5.5 раза, соответственно (Таблица 14).

Коэффициенты минерализации в серой лесной почве в течение вегетационного сезона изменялись от 1.99 (в июле) до 1.00 (в августе и сентябре) (Таблица 15). В варианте ОП отмечены наиболее значительные изменения данного показателя: понижение коэффициента минерализации с 4.68 (в июле) до 0.19 (в сентябре). В варианте МК коэффициент минерализации держался на уровне 1.4–1.6 в июле и августе и понижался до 0.7 в сентябре (Таблица 15). Эти данные показывают, что во всех вариантах минерализация органики наиболее активно происходила в летние месяцы, при этом соотношение численности аммонификаторов и копиотрофов, наблюдаемое в варианте МК, больше соответствовало контролю (приблизительно одинаковая численность представителей обеих эколого-трофических группировок – ЭКТГМ), чем в варианте ОП.

Внесение микокомпоста или опилок приводило к усилению субстрат-индуцированного и базального дыхания микроорганизмов в серой лесной почве. Данные, характеризующие базальное дыхание, показывают, что в июле и августе 2011 года физиологическая активность почвенных микроорганизмов в вариантах с добавлением опилок и микокомпоста была выше, чем в исходной почве. Это положение сохранялось и в сентябре, несмотря на общее снижение уровня базального дыхания. В варианте с внесением в почву микокомпоста более высокий уровень базального дыхания проявлялся и в течение 2011 года. Уровень базального дыхания в ОП держался на уровне контроля (Таблица 16).

Таблица 15 – Изменение коэффициента минерализации в темно-серой почве в период проведения эксперимента

Вариант	2011г.			2012г.			2013г.		
	Июль	Август	Сентябрь	Июнь	Июль	Август.	Июнь	Июль	Август
Контроль	1.3	0.8	1.2	1.1	1.3	0.6	0.7	1.3	1.4
Опилки	4.2	1.2	0.2	1.2	1.3	0.9	1.7	1.8	1.4
Микокомпост	1.5	1.4	0.7	2.1	2.3	0.6	1.1	1.6	2.0

Таблица 16 – Базальное дыхание микроорганизмов серой лесной почвы (2011-2012 гг.)

Дата отбора образцов	Дыхание, CO ₂ , мл/г асв почвы/сут		
	Почва (К)	Почва+опилки (ОП)	Почва+микокомпост (МК)
июль	0.119±0.007	0.178±0.042	0.284±0.017
август	0.112±0.027	0.292±0.095	0.226±0.045
сентябрь	0.015±0.008	0.154±0.028	0.150±0.027
июнь	0.037±0.004	0.039±0.003	0.079±0.015
июль	0.050±0.007	0.072±0.010	0.113±0.009
август	0.059±0.009	0.071±0.004	0.095±0.008

Внесение в серую лесную почву микокомпоста и опилок приводило к заметному увеличению микробной биомассы в первый год исследований, и это в наибольшей степени проявилось в варианте МК (Таблица 17). На второй год

наблюдений отмечено понижение данного показателя во всех вариантах опыта. Однако, если вариант ОП по данным показателям слабо отличался от контроля, то в варианте МК общая микробная биомасса была в 2–3 раза выше.

Накопление общей микробной биомассы в почве наблюдалась на протяжении всего вегетационного сезона, причем в варианте МК данный показатель был наиболее высоким (Рисунок 38). Как свидетельствуют данные, представленные на Рисунок 37, через 1 и 2 месяца после закладки опыта содержание микробной биомассы оставалось приблизительно на одном уровне в вариантах МК, ОП: около 1000 мкг / г почвы, и около 600 мкг / г почвы в К.

Таблица 17 – Изменение микробной биомассы (мкг С / г почвы) в темно-серой лесной почве

Год исследований	Дата отбора образцов	Вариант опыта		
		Контроль (почва)	Почва + опилки (ОП)	Почва + микокомпост (МК)
2011	Июль	296±25	411±141	611±133
	Август	211±21	421±52	586±112
	Сентябрь	631±86	993±39	1182±48
2012	Июль	140±68	140±46	457±27
	Август	222±27	200±41	451±43
	Сентябрь	113±6.0	158±8.0	308±6.0

Внесение в серую лесную почву микокомпоста и опилок приводило к заметному увеличению микробной биомассы в первый год исследований, и это в наибольшей степени проявилось в варианте с внесением микокомпоста. На второй год наблюдений отмечено понижение данного показателя во всех вариантах опыта. Однако если вариант с добавлением опилок по данному показателю незначительно отличался от контроля, то в варианте с микокомпостом общая микробная биомасса была в 2–3 раза выше. К концу вегетативного сезона третьего года наблюдений количество микробной биомассы в почве с микокомпостом составляло 1200 мкг/г почвы, тогда как в контроле и почве с опилками этот показатель находился на уровне 645 и 773 мкг/г почвы (Рисунок 38).

Таким образом, исследования показали, что внесение в серую лесную почву

микокомпоста или опилок в течение первого вегетационного сезона приводило по сравнению с контролем к увеличению: 1) влагоудерживающих свойств поверхностного слоя почвы; 2) микробной биомассы в почве в 1.5–2.0 раза (к концу вегетационного сезона). Согласно расчету коэффициентов минерализации, была выявлена тенденция активной минерализации органического вещества в течение летних месяцев и накопления органики к концу вегетационного сезона во всех исследуемых вариантах.

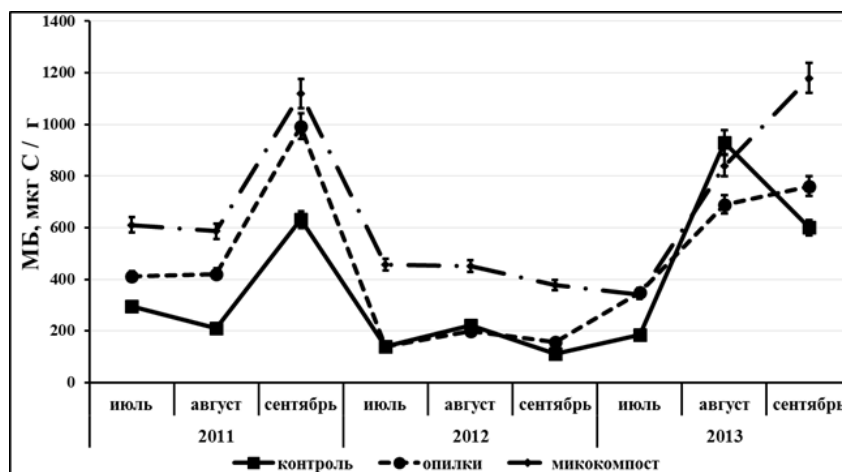


Рисунок 38 – Изменение микробной биомассы (мкг/г) в почвах пробных площадей: Контроль – почва без добавок, Опилки, Микокомпост (2011-2013 гг.)

Следует отметить, что ожидаемое негативное влияние необработанных опилок (ОП) на микробоценоз серой лесной почвы не подтвердилось, по крайней мере, в первый год исследований. Однако, увеличение численности и биомассы микроорганизмов, вызванное внесением в почву опилок, было ниже, чем в варианте с микокомпостом.

Внесение микокомпоста и опилок в течение первого года эксперимента не ухудшило микробиологическую ситуацию в почве: на фоне возросших численности и биомассы микроорганизмов (это особенно проявилось в варианте с микокомпостом) поддерживался баланс между минерализацией и синтезом органики в почве, что в конечном итоге ведет к улучшению питательного режима древесных растений).

5.2.2. Основные почвенные и микробиологические показатели темно-серой почвы березово-соснового леса и опытного питомника

Получив положительные результаты исследования влияния добавочных субстратов в ненарушенной темно-серой лесной почве, провели сравнительный анализ систематически возделываемой (нарушаемой) почвы опытного питомника Погорельского ОЭХ ИЛ СО РАН и лесной почвы естественного фитоценоза «Погорельский бор». Результаты показали их значительные различия не только по физико-химическим ($C_{\text{орг}}$, pH, влажность, температура), биохимическим (ферментативная активность), но и по микробиологическим и респирометрическим показателям. Содержание гумуса в лесной почве в среднем превышало таковое в нарушаемой почве в 1.2 раза (Таблица 18).

Таблица 18 – Некоторые параметры темно-серой почвы Погорельского бора, пахотной и лесной части

Параметры почвы	Пахотная почва питомника	Лесная почва питомника
pH почвы	7.1	6.2
Влажность почвы, %	11.9	22.2
$C_{\text{орг}}$, %	3.1	4.4
$N_{\text{вал}}$, мг/100г	60.1	76.4
Гумус, %	6.6	7.5
Протеаза, ед. ф.	0.76	0.76
Уреаза, ед. ф.	1.7	2.12
Инвертаза, ед. ф.	75.0	82.3
Общее микробное число, млн КОЕ / г почвы	4.1	24.1
Гидролитики, млн КОЕ / г почвы	0.54	8.6
Копиотрофы, млн КОЕ / г почвы	1.7	10.1
Олиготрофы, млн КОЕ / г почвы	1.9	5.4
Грибы, млн КОЕ / г почвы	0.01	1.02
МБ, мкг С / г почвы	154	269
БД, мкг С-СО ₂ / ч / г почвы	5.1	6.5

В почве питомника $C_{\text{ОРГ}}$ – под сеянцами хвойных в 1.4 раза ниже, чем в лесной почве, а значения азота в 1.3 раза (Таблица 18). Средние показатели

влажности лесной почвы (22 %) в 2 раза выше, чем нарушаемой почвы питомника (11.9 %), значения pH лесной почвы – слабо-кислые (6.2), в то время как pH нарушаемой почвы питомника приблизились к нейтральным (7.0) к концу экспериментов. Исследуемые почвы (в лесу и в питомнике) различались также и по ферментативной активности. Активность протеазы в этих двух почвах была одинаковой, а активность уреазы в лесной почве была выше в 1.3 раза, чем в возделываемой почве питомника. Кроме того, в лесной почве на 8.9 % была выше активность инвертазы (Таблица 18).

Влияние периодического нарушения/возделывания почвы питомника ухудшает состояние микробоценоза, по сравнению с лесной почвой. Так ОМЧ и содержание МБ в питомнике ниже в 6 и 1.8 раза, соответственно, чем в почве лесного участка. В почве лесных участков содержание МБ в среднем составило 269 мкг С / г почвы, а в почве питомника – 154 мкг С / г почвы. Отличались также и значения скорости базального дыхания, в почве питомника оно было в 1.3 раза меньше, чем в почве леса.

Соотношение ЭКТГМ в лесной почве следующее – копиотрофы-гидролитики-олиготрофы, в почве питомника – олиготрофы-копиотрофы-гидролитики. Доминирование в лесной почве копиотрофной группы (10.1 млн КОЕ / г почвы), а в питомнике олиготрофной (1.9 млн КОЕ / г почвы), указывает на более высокую скорость процессов минерализации органического вещества в лесу (Таблица 18). Кроме того, в почве лесных участков обнаружена большая численность мицелиальных грибов (на 100 %), чем в пахотной почве питомника (1.02 и 0.01 млн КОЕ / г почвы). Периодические нарушения почвы питомника также сказались и дыхательной ее активности.

5.3. Влияние химического и биологического способов обработки семян сосны обыкновенной на состояние почвенного микробоценоза и сохранность сеянцев при добавлении микокомпоста

В 2014–2015 гг. семена сосны обыкновенной (лаб. всхожесть – 30 %) перед посевом были обработаны водной суспензией штаммов: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma longibrachiatum*, а также – 0.5 % раствором микроэлемента $\text{CuSO}_4 \cdot 5 (\text{H}_2\text{O})$. Для большей сохранности и активности антагонистов в почву внесли микокомпост, в качестве добавочного субстрата, а в контрольную почву – опилки. Исследовали следующие варианты опыта: 1) контроль (H_2O), почва перемешана с опилками; 2) *T. harzianum*, почва с микокомпостом; 3) *T. lignorum*, почва с микокомпостом; 4) *T. longibrachiatum*, почва с микокомпостом; 5) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 (\text{H}_2\text{O})$, почва с микокомпостом (Рисунок 39).

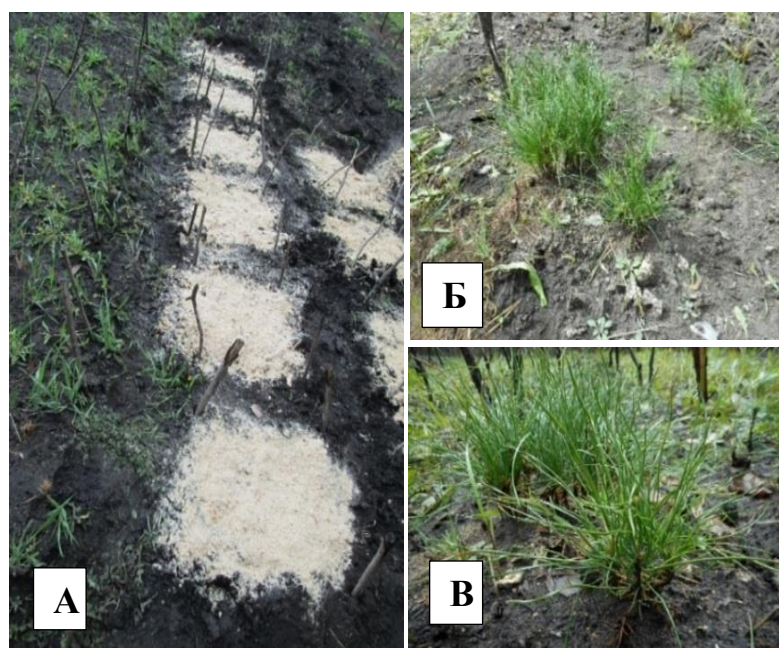


Рисунок 39 – Варианты опыта на Погорельском стационаре: А) май 2014; Б) и В) сентябрь 2015 г.

В связи с холодным и снежным началом вегетационного периода (май, 2014 г.) посев семян сосны обыкновенной обработанных активными микроорганизмами и микроэлементом (CuSO_4) проводили в конце мая (26.05.2014 г.), в связи с чем первые всходы наблюдали только в июле.

5.3.1. Влияние предпосевной обработки семян на грунтовую всхожесть, рост и развитие сеянцев

В первых числах июля регистрировали грунтовую всхожесть семян сосны обыкновенной. Температура воздуха была 38.9°C, температура почвы – 21.5°C, влажность – 15.4 %, pH почвы – 6.9. Грунтовая всхожесть семян сосны обыкновенной была максимальной *T. longibrachiatum* 6.6 %, в вариантах обработки *T. harzianum*, *T. lignorum* и CuSO₄ грунтовая всхожесть варьировала от 3 до 6 % (Таблица 19, Рисунок 40).

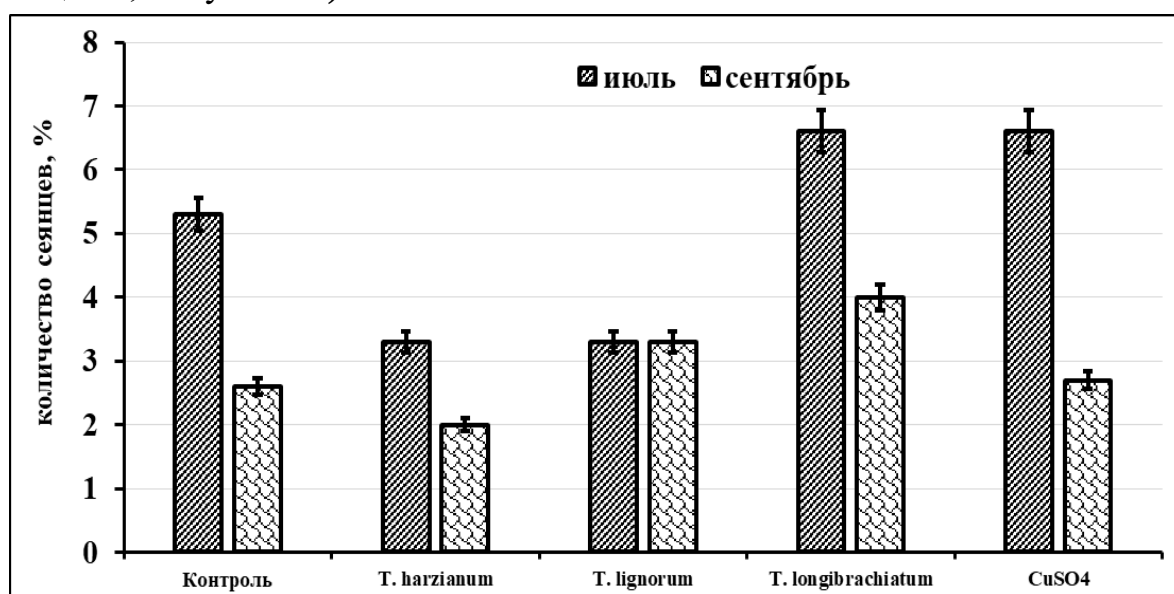


Рисунок 40 – Грунтовая всхожесть (июль) и количество сеянцев сосны обыкновенной (сентябрь) в зависимости от варианта обработки (2014 г.)

Таблица 19 – Некоторые физико-химические и микробиологические показатели темно-серой почвы, и количество семян на участках Погорельского питомника при различных вариантах опыта вегетационного периода 2014 г.

Вариант обработки	рН	Т почвы, °С	Влажно сть, %	Численность микроорганизмов, млн КОЕ / г почвы			К _{мин}	К _{олиг}	БМ, мкг С / г почвы	БД, мкг С-СО ₂ /ч /г почвы	qCO ₂ мкг С- СО ₂ / мг С _{мик} / ч	Сеянцы, %
				Гидролит ики	Копиотро фы	Олигот рофы						
Май												
Контроль до посева	6.4	6.2	21.9	0.17	0.97	1.21	5.7	7.1	397	4.3	11	-
Июнь												
Контроль (H ₂ O)	7.1	15.0	18.1	0.24	1.75	0.98	7.3	4.1	310	6.4	21	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	7.7	15.2	18.1	0.44	1.69	0.89	3.9	2.0	318	8.3	26	-
<i>Trichoderma lignorum</i>	7.7	15.6	11.8	0.19	1.31	1.32	6.6	6.7	248	9.4	38	-
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	7.5	16.1	16.2	0.19	1.91	1.05	10.3	5.7	330	5.2	16	-
CuSO ₄	7.5	15.6	16.5	0.21	1.99	0.90	9.4	4.2	347	9.4	27	-
Июль												
Контроль (H ₂ O)	6.9	21.3	16.2	0.15	1.50	0.75	9.8	4.9	255	13.6	53	5.3
<i>Trichoderma harzianum</i>	6.9	20.9	16.1	0.32	1.49	1.04	4.6	3.2	295	10.2	35	3.3
<i>Trichoderma lignorum</i>	7.1	22.0	12.8	0.12	0.63	0.66	5.4	5.7	318	15.4	49	3.3
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	7.0	21.8	15.3	0.10	1.25	1.15	12.5	11.5	405	15.5	38	6.6
CuSO ₄	7.2	21.9	16.0	0.34	1.68	1.43	5.0	4.2	303	13.3	44	6.6
Август												
Контроль (H ₂ O)	7.5	18.1	19.3	1.11	2.86	2.57	2.6	2.3	196	7.1	36	2.6
<i>Trichoderma harzianum</i>	7.2	19.2	18.9	0.65	0.79	1.67	1.2	2.6	282	9.2	32	2.6
<i>Trichoderma lignorum</i>	7.1	18.8	17.8	0.51	0.66	0.76	1.3	1.5	230	5.3	23	2.0
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	7.7	18.6	19.3	0.83	1.15	2.25	1.4	2.7	177	7.8	44	4.7
CuSO ₄	8.0	19.1	20.0	0.82	1.18	1.79	1.4	2.2	155	4.2	27	4.7
Сентябрь												
Контроль (H ₂ O)	7.5	9.7	24.0	0.79	2.58	1.57	3.3	2.0	193	4.5	23	2.6
<i>Trichoderma harzianum</i>	7.2	9.8	24.2	0.70	9.06	2.15	13.0	3.1	268	6.4	24	2.0
<i>Trichoderma lignorum</i>	7.1	9.9	23.8	0.57	1.60	1.65	2.8	2.9	228	6.6	29	3.3
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	7.8	9.9	24.7	0.68	2.28	1.80	3.4	2.7	284	6.9	24	4.0
CuSO ₄	8.1	9.9	24.4	1.07	2.84	2.10	2.6	2.0	279	7.7	27	2.7

Поскольку на протяжении двух последних месяцев вегетационного сезона (август-сентябрь) температура и влажность почвы были оптимальны для роста и развития семян сосны обыкновенной ($r=0.4$) количество семян к концу вегетации практически не изменилось, по сравнению с августом, за исключением варианта с CuSO_4 (в 2 раза) (Таблица 19). И в сентябре максимальное количество семян сосны по-прежнему осталось в варианте с *T. longibrachiatum* – 4.0 %. В остальных вариантах количество семян сократилось, при этом минимальное было при обработке *T. harzianum* – 2 % (Рисунок 40). В контроле и в варианте с CuSO_4 численность семян составила 2.7 %, в вариантах с *T. lignorum* и *T. longibrachiatum* количество семян составило 4 и 3.3 % (Рисунок 40, Таблица 19). Количество оставшихся семян положительно коррелировало с численностью олиготрофной группы микроорганизмов ($r= 0.9$), которая доминировала среди других ЭКТГМ (Прил. Таблица 6).

Таким образом, наилучшую грунтовую всхожесть семян и сохранность семян хвойных в конце вегетации наблюдали при обработке *T. longibrachiatum*. Грунтовая всхожесть семян и сохранность семян сосны при обработке микроэлементами статистически не отличались от контроля.

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA Краскелла-Уолиса) подтвердил наличие достоверного влияния микробиологической обработки на количество семян сосны, $p = 0.047$.

5.3.2. Влияние предпосевной обработки семян на рост и развитие семян второго года жизни

Погодные условия, сложившиеся после конца вегетационного сезона первого года и до начала сезона второго года, повлияли на сохранность семян, в результате чего в июне 2015 г. было отмечено снижение количества семян по сравнению с сентябрем 2014 года. Во всех вариантах опыта было отмечено уменьшение количества семян в среднем на 1.4 %, за исключением вариантов *T. harzianum* и CuSO_4 , где количество семян по сравнению с сентябрем 2014 г.

увеличилось (Таблица 19, 20). Максимальное количество семян сосны в начале второго вегетационного сезона было в варианте с *T. longibrachiatum* 2.9 %, минимальное – в контроле 1.5 % ($p < 0.05$) (Таблица 20).

К концу второго вегетационного сезона количество семян сосны снизилось незначительно. Поэтому, как и в конце первого года эксперимента, в конце второго вегетационного сезона максимальное количество семян сосны было в варианте с *T. longibrachiatum* – 3.1 %, а минимальное в контроле – 1.1 % (Рисунок 41А, Таблица 20). На протяжении всего второго года эксперимента количество семян сосны обыкновенной значительно не изменилось при обработках семян сосны микроэлементами и штаммом *T. harzianum*, и составило 2.4 и 2 %, соответственно (Рисунок 41А).

Низкие средние температуры воздуха (9.7°C) и высокая влажность почвы (23 %) в конце второго вегетационного сезона не способствовали активному росту семян сосны обыкновенной ($r = -0.7$ и -0.58 , соответственно) (Таблица 20, Прил. Таблица 6). Отмечено, что наибольшее влияние на количество семян оказывали температура, влажность и ферментативная активность почвы ($r = 0.4$) (Рисунок 41Б), а однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA Краскелла-Уолиса) подтвердил наличие достоверного влияния микробиологической обработки на количество семян сосны ($p = 0.047$).

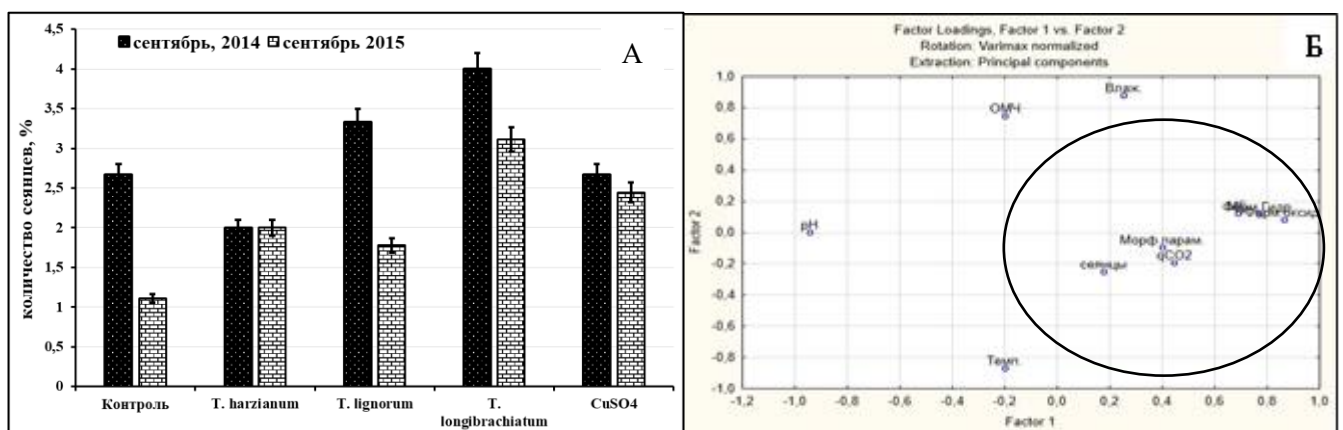


Рисунок 41 – А) Количество семян сосны обыкновенной в зависимости от вариантов обработки на участках Погорельского опытного питомника (сентябрь, 2014 г. и 2015 г.); Б) График факторных нагрузок при анализе данных 2014–2015 гг.

Таблица 20 – Некоторые физико-химические и микробиологические показатели темно-серой почвы, и количество семян на участках Погорельского питомника при различных вариантах опыта вегетационного периода 2015 г.

образцы	рН	Т почвы, °С	Влажность, %	Численность микроорганизмов, млн КОЕ / г почвы			Кмин	Колиг	Количество сеянцев, %
				Гидролитики	Копиотрофы	Олиготрофы			
Июнь									
Контроль (H ₂ O)	5.4	23.5	8.7	0.68	0.97	2.10	1.4	3.1	1.6
<i>Trichoderma harzianum</i>	5.4	25.4	6.8	0.69	2.36	0.47	3.4	0.7	2.2
<i>Trichoderma lignorum</i>	5.4	23.8	6.6	0.07	3.30	1.77	45.7	24.6	1.8
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	5.6	24.5	6.9	0.58	2.02	1.08	3.5	1.9	2.9
CuSO ₄	5.6	24.1	7.5	1.35	1.12	1.17	0.8	0.9	2.9
Июль									
Контроль (H ₂ O)	5.8	24.9	18.1	0.45	2.05	0.66	4.5	1.5	1.1
<i>Trichoderma harzianum</i>	6.1	24.1	18.7	0.16	1.46	0.80	8.9	4.9	2.0
<i>Trichoderma lignorum</i>	6.3	26.0	19.1	0.19	1.04	0.56	5.5	3.0	1.8
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	5.6	26.1	16.9	0.15	1.10	0.80	7.6	5.6	3.1
CuSO ₄	6.3	24.8	17.9	0.27	1.29	0.99	4.8	3.7	2.7
Август									
Контроль (H ₂ O)	5.8	16.1	18.1	2.05	0.77	0.29	0.4	0.1	1.1
<i>Trichoderma harzianum</i>	6.1	15.5	18.7	1.78	1.50	1.07	0.8	0.6	2.0
<i>Trichoderma lignorum</i>	6.3	16.5	19.1	1.77	0.83	0.44	0.5	0.3	1.8
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	5.6	17.1	16.9	1.42	0.83	0.65	0.6	0.5	3.3
CuSO ₄	6.3	18.8	17.9	2.23	2.02	2.48	0.9	1.1	2.7
Сентябрь									
Контроль (H ₂ O)	6.3	9.6	24.9	2.69	2.93	3.93	1.1	1.5	1.1
<i>Trichoderma harzianum</i>	6.5	9.8	23.9	0.61	1.66	1.31	2.7	2.1	2.0
<i>Trichoderma lignorum</i>	6.2	9.8	23.0	0.61	1.58	1.60	2.6	2.6	1.8
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	6.0	9.8	22.5	0.74	1.52	1.33	2.1	1.8	3.1
CuSO ₄	6.3	9.9	23.4	0.61	2.07	1.65	3.4	2.7	2.4

Таким образом, наиболее эффективной предпосевной обработкой семян сосны обыкновенной на протяжении двух вегетационных периодов была обработка *T. longibrachiatum*.

5.3.3. Морфометрические характеристики семян

Морфометрический анализ двухлетних семян сосны обыкновенной показал разное влияние обработки на некоторые показатели. Так микробы-антагонисты во всех вариантах способствовали увеличению длины мутовки, по сравнению с контрольными значениями: в вариантах с *T. lignorum* на 34.5 %, с *T. harzianum* и *T. longibrachiatum* на 21.3 и 18.1 %, соответственно, а при обработке микроэлементами (CuSO_4) – на 25.9 % (Рисунок 42, Прил. Таблица 7). Наибольшие значения длины мутовки отмечены в варианте обработки семян *T. lignorum* (11.2 см), минимальные значения – в контроле (7.4 см) (Рисунок 42, Прил. Таблица 7).

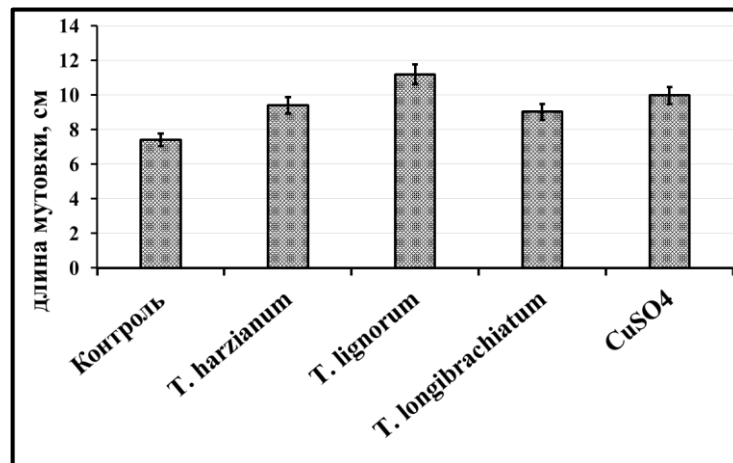


Рисунок 42 – Длина мутовки семян сосны обыкновенной в зависимости от вариантов обработки семян (сентябрь, 2015 г.)

Увеличение диаметра корневой шейки максимально стимулировала обработка микромицетами р. *Trichoderma*: *T. lignorum* – на 23.9 %, *T. harzianum* и *T. longibrachiatum* – на 13.6 %, а при обработке CuSO_4 – на 13.3 %, по сравнению с контролем (Рисунок 43, Прил. Таблица 7).

Обработка семян всеми микроорганизмами увеличила и вес семян сосны

обыкновенной, максимальное значение среди всех вариантов отмечено с *T. longibrachiatum* – в 1.9 раз (0.72 г) по сравнению с контролем (Рисунок 44).

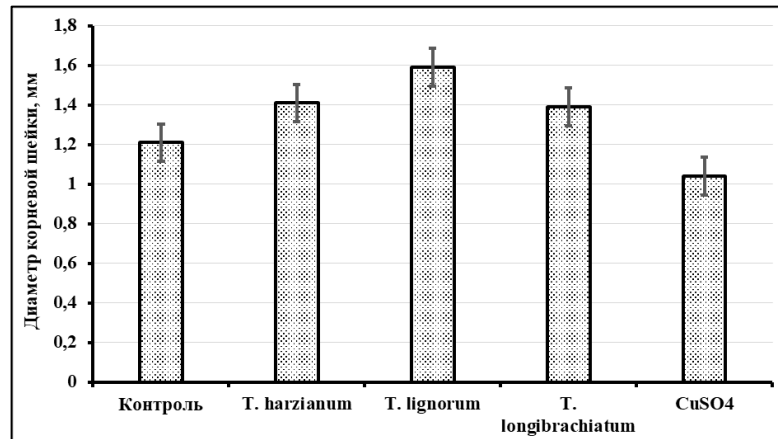


Рисунок 43 – Диаметр корневой шейки сеянцев сосны обыкновенной в зависимости от вариантов обработки семян (сентябрь, 2015 г.)

При обработке семян сосны *T. harzianum* и *T. lignorum* сухой вес сеянцев превышал таковой в контроле в среднем в 1.4 раза. Достаточно эффективной была обработка семян микроэлементами (CuSO_4) – на 17.8 % больше, по сравнению с контролем (Рисунок 44, Прил. Таблица 7).

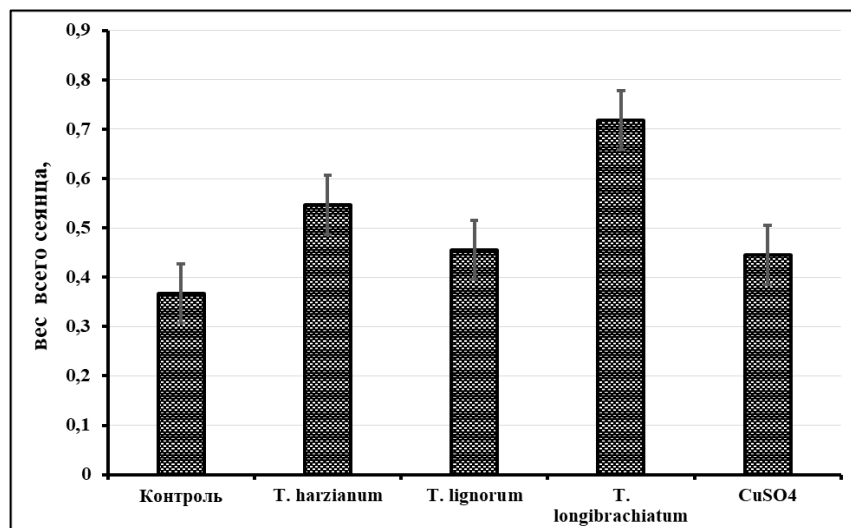


Рисунок 44 – Сухой вес сеянцев сосны обыкновенной в зависимости от вариантов обработки семян (сентябрь, 2015 г.)

При анализе длины стебелька и корня были получены следующие результаты: только в варианте обработки *T. harzianum* длина стебелька превышала контрольные значения на 10.5 и 14.5 %, соответственно, в остальных вариантах опыта (*T. lignorum*, *T. longibrachiatum* и CuSO_4) значения длин стебелька были ниже

контрольных (3.25 см) (Прил. Таблица 7). Длина главного корня была максимальной в контроле (14.68 см), однако вся корневая система контрольных сеянцев при этом была менее разветвленной, что, на наш взгляд, отрицательно влияло на их всасывающую способность (Прил. Таблица 7).

Таким образом, отмечено, что микроорганизмы-антагонисты увеличивали большинство морфометрических показателей сеянцев сосны. Так наилучший результат показал микромицет *T. harzianum*, обработка которым увеличивала сразу четыре показателя (длину мутовки и стебелька, диаметр корневой шейки и сухой вес сеянца). Три показателя увеличивала обработка семян *T. lignorum*, *T. longibrachiatum* (длина мутовки, диаметр корневой шейки и сухой вес сеянца), а обработка микроэлементами CuSO_4 способствовала увеличению двух показателей – длины мутовки и сухого веса сеянца.

5.3.4. Влияние предпосевной обработки семян на численность эколого-трофических групп микроорганизмов

В начале вегетационного сезона (май, 2014 г.) в момент отбора образцов температура воздуха составляла 5.6 °C, pH – 6.39, влажность – 21.9 %, температура почвы – 6.2°C (Таблица 19).

Результаты учета микроорганизмов почвы опытного участка до посева семян сосны (контроль) показали низкую степень обогащенности гидролитами (0.17 млн КОЕ / г почвы), использующих органические формы азота (Рисунок 45, Таблица 19). В почве преобладал олиготрофно-копиотрофный комплекс, численность олиготрофов превышала гидролитиков в 6 раз (1.2 млн КОЕ / г почвы), а копиотрофов – в 1.2 раза, $p < 0.05$ (Рисунок 45, Таблица 19).

Общая численность микроорганизмов в мае в 1 г почвы составляла 2.4 млн КОЕ, грибов было 0.35 %, актиномицетов – 2 % от общего числа микроорганизмов (Таблица 19). Коэффициент олиготрофности, преобладающий в 1.5 раза (7.35) над коэффициентом минерализации ($K_{\text{мин}} = 5.7$) говорит о замедленно протекающих иммобилизационных процессах в почве (Таблица 19).

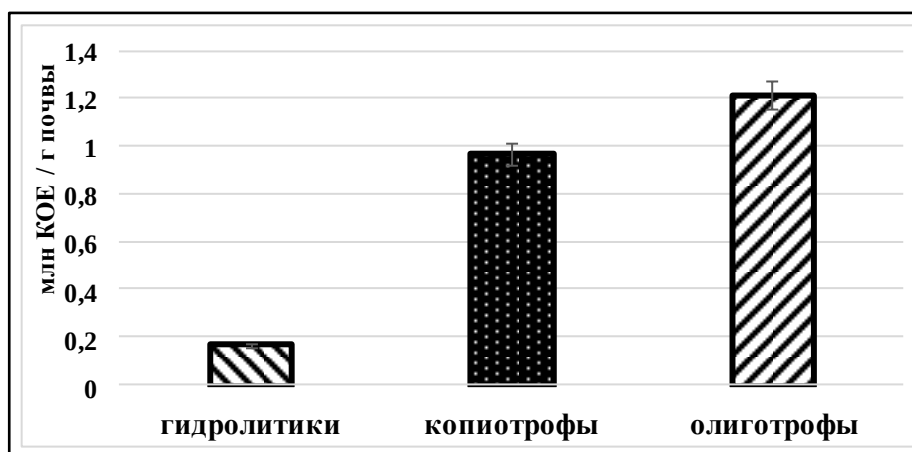


Рисунок 45 – Численность эколого-трофических групп микроорганизмов на участках питомника (контроль) перед посевом семян сосны обыкновенной (май, 2014 г.)

Отмечено, что общая численность микроорганизмов была минимальной в мае (2.4 млн КОЕ / г почвы), в начале сезона до посева семян сосны обыкновенной, до внесения в почву микробов-антагонистов и CuSO_4 (Таблица 19, Рисунок 46). После посева семян сосны, обработанных микроорганизмами, было отмечено увеличение общего микробного числа в среднем на 25 %, при этом ОМЧ оставалось на одинаковом уровне до конца вегетационного сезона. В сентябре, в связи с поступлением дополнительной органики в виде отмерших растительных остатков, произошло закономерное увеличение микроорганизмов в почве (в 2.5 раза), по сравнению с фоновыми условиями (Рисунок 46). В первую очередь произошло увеличение численности микроорганизмов гидролитического комплекса во всех вариантах опыта, в особенности в вариантах с добавлением микробов-антагонистов, где она варьировала от 0.2 до 0.9 млн КОЕ / г почвы (Таблица 19). Численность гидролитиков была максимальной в начале сезона в варианте *T. harzianum* (0.4 млн КОЕ / г почвы) и в конце сезона – в варианте CuSO_4 (1.1 млн КОЕ / г почвы) (Рисунок 46).

Через месяц после внесения в почву семян сосны, обработанных микроорганизмами и микроэлементами, было отмечено увеличение копиотрофной микрофлоры, численность которой повысилась в 2–2.5 раза (Таблица 19, Рисунок 46).

Численность копиотрофов, на которую положительно повлияло увеличение

влажности почвы ($r = 0.71$), доминировала на протяжении всего вегетационного сезона, что отразилось в преобладании коэффициентов минерализации над олиготрофными ($K_{\text{мин}} > K_{\text{олиг}}$ в 1.5 раз) (Таблица 19, Прил. Таблица 8).

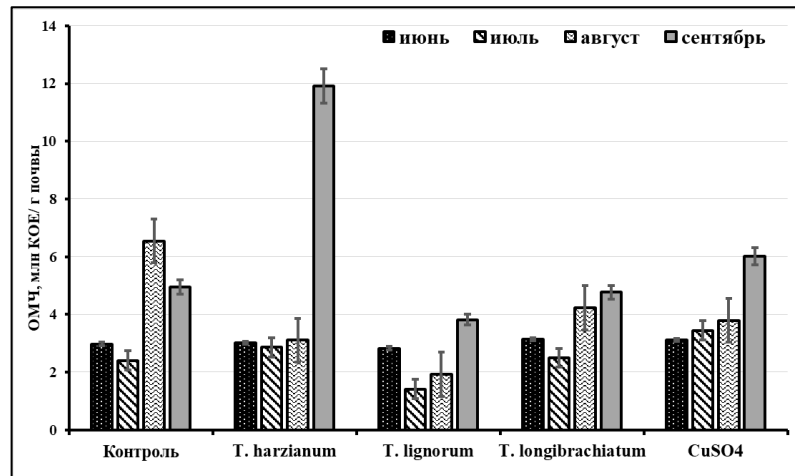


Рисунок 46 – Динамика общей микробной численности (ОМЧ) под посевами сосны обыкновенной в течение вегетационного сезона 2014 г.

В конце вегетационного сезона было отмечено, что в вариантах обработки *T. longibrachiatum* и CuSO_4 произошло подщелачивание почвы с 6.4 (фон) в среднем до 7.9, в то время как в остальных вариантах pH среды в среднем варьировала от 7.0 до 7.5, что отразилось на численности гидролитических микроорганизмов (Таблица 19).

На протяжении всего первого вегетационного периода внесенные в почву микроорганизмы в целом способствовали увеличению копитрофно-олиготрофного почвенного комплекса, а вариант обработки *T. harzianum* способствовал увеличению всех эколого-трофических групп микроорганизмов, что подтверждается повышением коэффициента вариации (CV) с июня по сентябрь с 10.6 до 41.3 %. При этом наиболее перспективной была обработка семян сосны обыкновенной *T. harzianum*.

Во второй вегетационный сезон (2015 г.) наиболее высокую численность микроорганизмов регистрировали в июне (3.9 млн КОЕ / г почвы) и в сентябре (5.2 млн КОЕ / г почвы). Также, как и в первый год эксперимента, численность микроорганизмов на протяжении трех месяцев держалась на одном уровне (около 3 млн КОЕ / г почвы), а к концу сезона повысилась в 1.5 раза (Таблица 20, Рисунок 47). В сентябре отмечалась максимальная численность копитрофов и

олиготрофов – по 1.7 млн КОЕ / г почвы (Таблица 20, Рисунок 47).

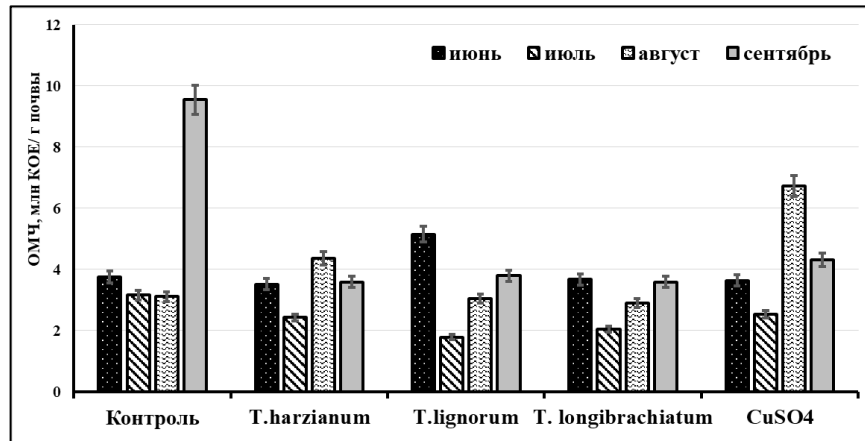


Рисунок 47 – Динамика общей микробной численности (ОМЧ) под посевами сосны обыкновенной в течение вегетационного сезона 2015 г.

При обработке семян сосны *T. harzianum* численность копиотрофного комплекса была довольно высокой на протяжении всего первого вегетационного сезона, максимальные значения отмечены в июне (2.4 млн КОЕ / г почвы) (Таблица 20). Кроме того, *T. harzianum*, показал тенденцию к увеличению всех ЭКТГМ (гидролитиков, копиотрофов, олиготрофов) и на протяжении второго сезона вегетации. Штамм *T. lignorum* повышал численность гидролитиков в начале сезона, а обработка *T. longibrachiatum* повышала численность олиготрофов к концу сезона. В контроле в этом месяце также была высокая численность гидролитиков (2.7 млн КОЕ / г почвы), что объясняется высокой гибелью сеянцев, на которые негативно повлияли температура₍₁₎ и влажность почвы₍₂₎ ($r_1 = -0.7$, $r_2 = -0.6$) (Таблица 20, Прил. Таблица 8). Однако на темпы минерализации органического вещества эти почвенные параметры не повлияли ($r = < 0.5$), $p < 0.05$ (Прил. Таблица 8).

Второй вегетационный сезон показал, что под посевами сосны общая численность микроорганизмов на протяжении всего сезона поддерживалась на уровне 2014 года, и в 2 раза превышала ОМЧ фоновых условий. Процессы микробной минерализации в опытных вариантах протекали более активно, что отразилось на значениях коэффициентов минерализации ($K_{\text{мин}}$) и олиготрофности ($K_{\text{олиг}}$), которые в среднем составили 4.4 и 2.8 ($K_{\text{мин}} > K_{\text{олиг}}$ в 2 раза), в то время как в контроле доминировала олиготрофная группа ($K_{\text{олиг}} > K_{\text{мин}}$ в 1.8).

Исследования микробных сообществ под посевами сосны обыкновенной на

протяжении двух вегетационных периодов (2014 и 2015 гг.) показали, что внесенные с семенами микробы-антагонисты способствовали увеличению всех эколого-трофических групп микроорганизмов, особенно гидролитико-копиотрофного комплекса, в то время как в контроле доминировала олиготрофная микробная группа. При этом численность копиотрофов увеличивала в основном обработка – *T. harzianum*.

Такие различия в микробном составе на соседних участках мы связываем с внесением в опытные варианты добавочного субстрата – микокомпоста, который способствовал на протяжении двух лет повышенной активности гидролитических и копиотрофных групп микробоценозов.

Кроме того, было отмечено, что обработка семян сосны обыкновенной микроэлементами (CuSO_4) способствовала увеличению общего микробного числа за счет повышения численности микроорганизмов гидролитического комплекса.

Общая микробная численность сильно варьировала в середине сезона – июль-август ($\text{CV} = 42.5 \%$), но к сентябрю варьирование значений общего микробного числа снижалось, коэффициент вариации составил 17.6% .

5.3.5. Ферментативная активность темно-серой почвы под посевами сосны

Ферменты, присутствующие в почве, играют основную роль в поддержании почвенного плодородия, физических и химических свойств, экологии и здоровья почвы (Хазиев, 1976; Wang et al., 2014). Количество и состав ферментов в почве зависит от типа почвы, времени вегетации, почвенной активности и истории землепользования (Lahdesmaki, Pispunen, 1988; Wang et al., 2014), поэтому изучение ферментативной активности почвы необходимо для полноценного анализа почвенного состояния. Проведенный анализ ферментативной активности темно-серой почвы опытного питомника в 2014 году показал динамику содержания ферментов в почвенных образцах (Таблица 21).

Таблица 21 – Ферментативная активность темно-серой почвы в зависимости от вариантов опыта (2014 г).

Вариант обработки	Инвертаза, мг глюкозы на г почвы	Фосфатаза, мг P_2O_5 на г почвы	Протеаза, мг глицина на г почвы	Полифенол-оксидаза, мг бензохинона / г почвы	Пероксидаза, мг бензохинона / г почвы	Коэффициент гумификации	месяц
Контроль (H_2O)	73.10	0.93	0.83	0.26	0.42	0.61	Июнь
	76.96	0.71	0.69	0.24	0.42	0.58	Сентябрь
<i>Trichoderma harzianum</i>	66.17	0.57	1.03	0.25	0.45	0.57	Июнь
	82.91	0.74	1.07	0.32	0.46	0.71	Сентябрь
<i>Trichoderma lignorum</i>	63.20	1.19	1.05	0.31	0.37	0.84	Июнь
	60.71	0.67	0.90	0.28	0.42	0.67	Сентябрь
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	58.66	0.90	0.99	0.35	0.33	1.04	Июнь
	58.32	0.87	0.92	0.33	0.45	0.74	Сентябрь
$CuSO_4$	61.93	1.18	0.61	0.27	0.39	0.69	Июнь
	67.34	0.94	0.63	0.34	0.49	0.70	Сентябрь

Инвертазная активность почвы, катализирующая разложение сахаров, в начале вегетационного сезона (2014 г.), была выше в контроле (73.1 ед. ф.), чем в остальных вариантах опыта (микробы-антагонисты и $CuSO_4$). Активность фермента на опытных участках варьировала от 56.7 ($CuSO_4$) до 67.9 (*T. harzianum*) ед. ф., $p < 0.05$. К концу вегетации (сентябрь) в почве процессы разложения органики усилились, вследствие чего увеличилась и активность инвертазы на 18.5 ед. ф., в вариантах *T. harzianum* и *T. lignorum* ее значения превысили контроль на 6.5 % (Таблица 21). Увеличение фермента в опытных вариантах говорит о повышении активности создания предгумусовой фракции (Пушкарева, Маковский, 2008).

Отмеченная тесная корреляционная связь между активностью фермента в почве, в вариантах с добавлением микробов, и численностью гидролитиков ($r = 0.5$) свидетельствует об инвертазе преимущественно микробного происхождения (Чундерова, 1976; Kiss, 1958; Trasar-Cepeda et al., 2008) (Прил. Таблица 9). Кроме того, активность инвертазы зависела от pH ($r = -0.68$) и температуры почвы ($r = -0.92$).

В почве фосфатаза осуществляет мобилизацию закрепленного в органических веществах фосфора (Секбаева, 2013; Девятова, Горбунова, 2012).

Высокие показатели уровня фосфатазы, таким образом, способствуют высокому показателю круговорота фосфора (Haynes, Knight, 1989). Фосфатазная активность в июне в вариантах обработки *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, и CuSO_4 была выше, чем в контроле на 11.4 %. Однако к концу сезона активность фосфатазы снизилась во всех вариантах, кроме обработки *T. lignorum*, где активность фермента повысилась на 22.9 % и составила 0.74 ед. ф. (Таблица 21), что объясняется повышением в почве содержания подвижного фосфора (Турусов и др., 2012). Кроме того, на активность фосфатазы в начале и в конце вегетационного сезона повлияли значения pH почвы (7.5), которые были пороговыми, так как оптимум ее активности лежит в пределах от 6.5 до 7.5. Известно, что при подщелачивании среды доступность фосфора уменьшается из-за присутствия карбоната кальция, который подавляет растворение фосфатов кальция, а при изменениях в кислую сторону – повышается содержание железа и алюминия в растворе, образование относительно нерастворимых фосфатов железа и алюминия (Chen et al., 2011; Пилецкая, 2015). Отрицательная корреляционная зависимость между активностью фермента и значениями pH ($r=-0.9$) подтверждает эту тенденцию. Также найдена обратная корреляция между активностью фосфатазы и влажностью почвы ($r=-0.6$) (Прил. Таблица 9).

Активность протеазы, отвечающей за гидролиз белков, в июне была выше во всех вариантах обработки в среднем на 23.7 % (0.2 ед. ф.), чем в контрольной почве (Хазиев, 1976; Щербакова, 1980). При этом протеазная активность была максимальной при обработке *T. harzianum* (1.1 ед. ф.). К концу сезона на фоне понижения pH почвы ($r= - 0.6$) активность протеазы понизилась в вариантах обработки *T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, микроэлементами (CuSO_4) и в контроле на 12.4 % (0.16 ед. ф.) $p < 0.05$ (Прил. Таблица 9). В конце вегетационного сезона максимальное значение протеазной активности было отмечено в варианте с *T. lignorum* (1.1 ед. ф.), минимальное – в контроле (0.7 ед. ф.).

Фенолоксидазы, играющие важную роль в процессах гумификации, оказывают защитное действие на почву, разлагая различные ксенобиотики, учувствуют в процессах разложения и синтеза органических соединений

ароматического ряда (Сулейманова, Шорина, 2012). Анализ активности этих ферментов показал способность исследуемой почвы к самоочищению. Так в начале вегетационного сезона (июнь) полифенолоксидазная активность (ПФО) почвы, после внесения *T. longibrachiatum* и CuSO_4 , была выше контрольных значений на 19.4 %. Максимальные значения активности ПФО наблюдали при обработке микроэлементами (0.4 ед. ф.), минимальные – в варианте с *T. harzianum* (0.25 ед. ф.) (Таблица 21). К концу вегетационного сезона, по сравнению с началом, активность ПФО повысилась на 16.1 % во всех вариантах обработки микробами, кроме *T. longibrachiatum*, а также контроля и варианта с CuSO_4 , где активность фермента снизилась на 7.7 и 5.7 % (соответственно), что может свидетельствовать об увеличении скорости накопления в почве компонентов гумуса (Сулейманова, Шорина, 2012). Но не смотря на снижение активности фермента к концу сезона, самая высокая активность полифенолоксидазы в сентябре была в варианте обработки CuSO_4 (0.34 ед. ф.) (Таблица 21). Проведенный корреляционный анализ показал прямую зависимость активности ПФО и температуры почвы (отмечалось понижение температуры с 15.5°C в июне до 9.8°C в сентябре) ($r=0.8$), и с значениями почвенной влажности ($r = 0.7$) (Таблица 20, 21, Прил. Таблица 9).

Пероксидаза (ПО) в почве выполняет важную функцию окисления органических веществ за счет кислорода воздуха и перекиси водорода (Сулейманова, Шорина, 2012). Ее активность в почве под сеянцами сосны в июне при обработке *T. lignorum* (0.5 ед. ф.) была выше, чем в контроле на 6.7 % ($p < 0.05$) (Таблица 21). Наиболее сильное влияние на активность фермента оказали температура ($r=0.78$) и влажность ($r=0.53$) почвы (Прил. Таблица 9). К концу сезона активность пероксидазы возросла во всех вариантах обработки в среднем на 11.4 %. При обработках микромицетами и микроэлементами активность ПО была выше, чем в контроле (Таблица 21). Часто повышение активности пероксидазы в почве объясняют включением фермента в процессы детоксикации загрязняющих веществ (Сулейманова, 2012).

Анализ ферментативной активности почвы в начале и конце вегетационного сезона 2014 г. показал различное влияние предпосевной обработки семян сосны

обыкновенной на активность основных ферментов. Зачастую ответ ферментативной активности почвы на изменения, происходящие в окружающей среде, происходит позже, чем ответ остальных участников, отвечающих за биогенность почвы, поэтому отклик в изменении активности ряда ферментов отмечен нами только к концу вегетационного сезона. Отмечено, что на активность почвенных ферментов повлияло внесение, вместе с семенами сосны, микроорганизмов и микроэлементов. Так активность инвертазы выше контрольных значений к концу вегетации стимулирует обработка микроорганизмами *T. harzianum* и *T. lignorum*. На активность фосфатазы и протеазы обработка микроорганизмами повлияла уже в июне, особенно в вариантах с микромицетами *T. harzianum* и *T. longibrachiatum*. Заметный активирующий фермент эффект наблюдали и в варианте с микроэлементами (CuSO_4). К концу сезона активность протеазы понизилась, кроме варианта с *T. lignorum*. Такое снижение активности протеазы говорит о повышении степени разложения органического вещества в почве.

Активность ферментов ПФО и ПО в июне была выше контрольных значений, в сентябре – повысилась во всех вариантах обработки, включая контроль. Наибольшее влияние на активность оксидоредуктаз оказывали *T. harzianum* и *T. lignorum*. Показатели активности этих ферментов в среднем были не высокими на протяжении сезона, что с одной стороны, говорит о равномерных процессах трансформации и минерализации органических веществ, а с другой – о небольшом количестве этих веществ (т.к. трава систематически изымалась с исследуемых участков) (Середина, 2015). Коэффициенты вариации (CV) варьировали в пределах от 6.1 до 24.0 %, что говорит о незначительной (для пероксидазы) и средней (для всех остальных ферментов) степени рассеивания данных. Увеличение активности ферментов группы оксидоредуктаз к концу сезона свидетельствует о повышении интенсивности процессов превращения ароматических органических веществ в почве, а их более низкое значение в контрольном варианте опыта подтверждает гипотезу о значительном вкладе внесенных микроорганизмов в эти процессы.

Таким образом, наибольшее влияние на активность почвенных ферментов

класса гидролаз и оксидоредуктаз оказывала обработка микромицетами (*T. harzianum* и *T. lignorum*). Обработка микроэлементами способствовала повышению активности протеазы и полифенолоксидазы, как через месяц после посева семян (июнь), так и к концу вегетационного сезона (сентябрь).

5.3.6. Дыхательная активность микробоценозов экспериментальных участков темно-серой почвы питомника под посевами сосны

Микробная биомасса (МБ), базальное дыхание (БД), микробный метаболический коэффициент ($q\text{CO}_2$) – показатели биологической активности почвы, которые отражают потенциальную и актуальную активность почвенной микробиоты (Сергеева, Шкребова, 2013; Ильяшенко, 2014). Изменения функциональной активности микробоценоза можно проследить по этим показателям.

В начале эксперимента (май 2014 г.), перед посевом семян сосны обыкновенной в почву были определены показатели микробной биомассы (МБ), микробного (базального) дыхания и оценена удельная дыхательная активность микробоценоза ($q\text{CO}_2$). Значения микробной биомассы и базального дыхания составили 397 мкг С / г почвы и 4.3 мкг С- CO_2 /ч /г, соответственно (Рисунок 48, Таблица 19). Значение микробного метаболического коэффициента ($q\text{CO}_2$) для пахотных почв было невысоким (11 мкг С- CO_2 / мкг С_{мик} / ч) (Рисунок 49, Таблица 17).

В июне, после внесения микробов-антагонистов и микроэлементов, значения микробной биомассы в почве всех участков заметно уменьшились, по сравнению со значениями до посева, однако в вариантах обработки семян оставались наиболее высокими, по сравнению с контролем, на протяжении всего вегетационного сезона. Содержание микробной биомассы было выше контроля (в среднем на 21.7 мкг С /г почвы) в обработках *T. harzianum* и *T. longibrachiatum* и микроэлементами (CuSO_4). В варианте обработки *T. lignorum* (247.5 мкг С /г почвы) значения МБ было меньше, чем в контроле (Рисунок 48, Таблица 19, Прил. Таблица 10).

К концу вегетационного сезона (сентябрь) показатели микробной биомассы, по сравнению с маем, понизились на 21 %, однако во всех вариантах опыта значения МБ превышали контроль в среднем в 1.3 раза (Рисунок 48, Таблица 19). Максимальные значения МБ отмечены в вариантах обработки микромицетами *T. harzianum* (276.8 мкг С /г почвы), *T. lignorum* (283.8 мкг С /г почвы) и CuSO_4 (279.1 мкг С /г почвы) (Рисунок 48, Таблица 19). На протяжении периода вегетации на развитие МБ оказывали существенное влияние влажность почвы (в июне $r=0.6$; в сентябре – $r=0.9$, $p < 0.05$) и pH (в июне – $r= - 0.3$, в сентябре – $r=0.5$) (Прил. Таблица 10).

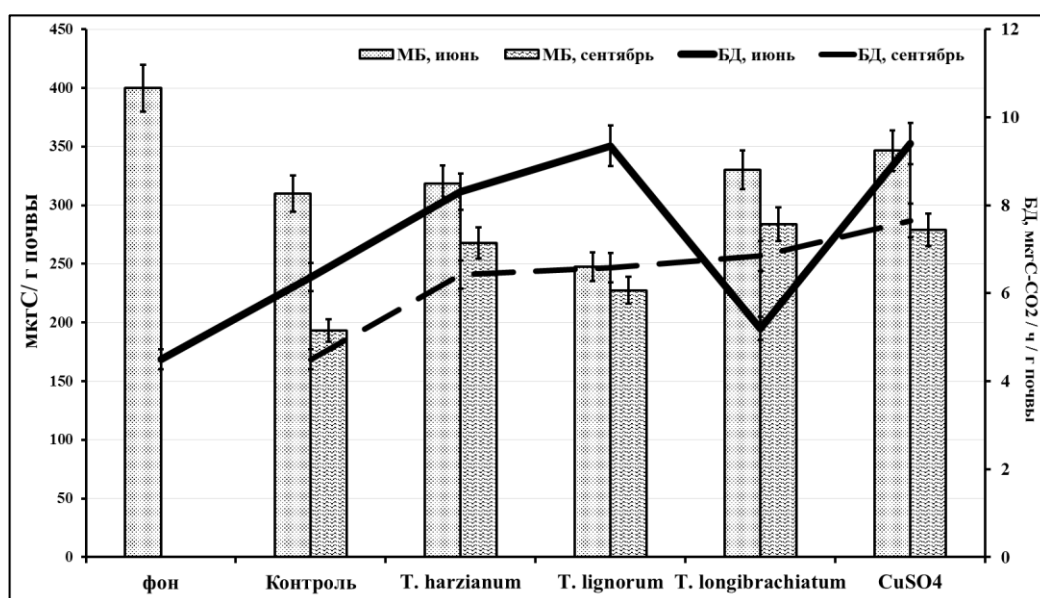


Рисунок 48 – Значения микробной биомассы (МБ) и базального дыхания (БД) в почве под сосной (май (фон), июнь и сентябрь 2014г.) в зависимости от варианта обработки

Скорость базального дыхания в июне, после внесения микробов и микроэлементов, увеличилась практически во всех вариантах в 2 раза, кроме *T. longibrachiatum*, по сравнению с фоновыми условиями, и в среднем на 29 % по сравнению с контролем. Максимальное значение БД было в варианте с CuSO_4 (9.44.3 мкг С-СО₂ /ч /г), минимальное с *T. longibrachiatum* (5.24.3 мкг С-СО₂ /ч /г) (Рисунок 48, Таблица 19). Интенсивность микробного дыхания увеличивалась вместе с подщелачиванием почвы ($r= 0.5$) (pH 6.4 в мае, и 7.8 в июне), $p < 0.05$ (Прил. Таблица 10). На протяжении вегетационного периода интенсивность БД была максимальной в июле, и к сентябрю снизилась в 1.3 раза

(ср. значение = 7.9 мкг С-СО₂ /ч /г). Под посевами сеянцев сосны, обработанных антагонистами, БД превышало контрольные значения на 28 %. Максимальных значений микробное дыхание достигало в вариантах с *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* и с CuSO₄ (7.7 мкг С-СО₂ /ч /г), минимальные значения БД были в контроле (4.5 мкг С-СО₂ /ч /г) (Рисунок 48, Таблица 19).

Значения микробного метаболического коэффициента, как и БД, также существенно увеличились, по сравнению с маем, из-за увеличения агротехнической нагрузки на почву (вспашка, внесение микокомпоста, микроорганизмов и микроэлементов, посев семян) (Таблица 19). Максимальные его значения были отмечены в варианте с *T. lignorum* (38 мкг С-СО₂ / мкг С_{мик} / ч) (Рисунок 49, Таблица 19). В остальных вариантах значения $q\text{CO}_2$ варьировали от 21 до 32 мкг С-СО₂ / мкг С_{мик} / ч, и были выше контрольного в среднем в 1.5 раза. В течение вегетации значения $q\text{CO}_2$ варьировали в зависимости от погодных условий, pH и наличия доступной органики для микробов, однако к концу сезона (сентябрь) его значения снизились в среднем до значений июня. А в вариантах *T. harzianum* (24 мкг С-СО₂ / мкг С_{мик} / ч) и *T. longibrachiatum* (24.1 мкг С-СО₂ / мкг С_{мик} / ч) значения $q\text{CO}_2$ стали сопоставимы с контролем (Рисунок 49, Таблица 19). На значения $q\text{CO}_2$ оказывали достоверное влияние температура ($r=0.5$), влажность ($r=-0.5$) и pH почвы (Прил. Таблица 10).

Таким образом, обработка микробами-антагонистами способствовала увеличению МБ и БД не только по сравнению с контролем, но и к концу вегетационного периода по сравнению с фоновыми условиями, что подтверждается значительной степенью рассеивания данных. Коэффициент вариации в среднем варьировал от 8.9 до 31.2 %. Обработка семян сосны микроэлементами и микромицетами *T. harzianum* и *T. longibrachiatum* способствовала улучшению состояния микробного фона.

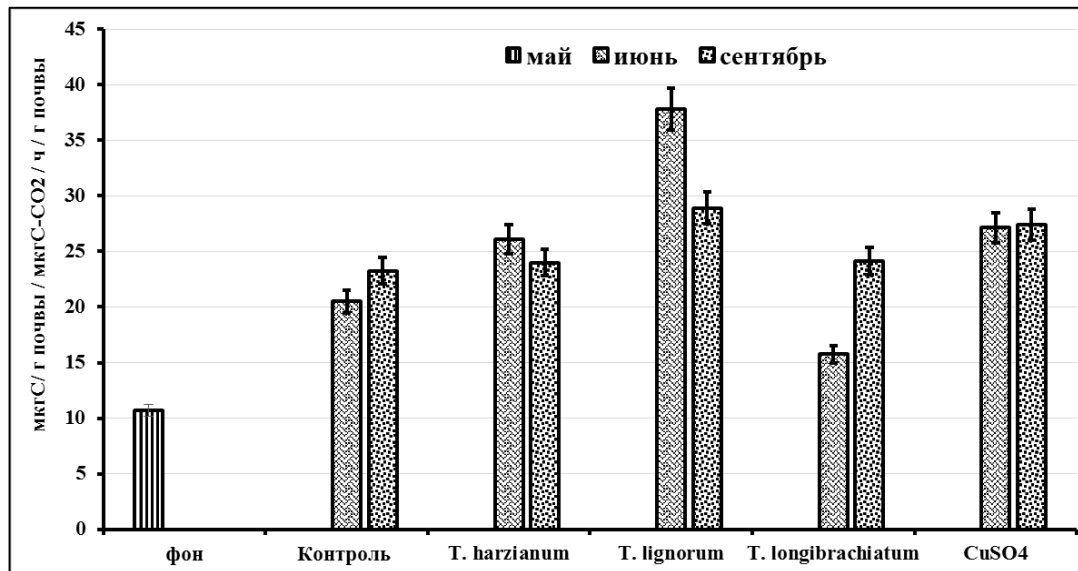


Рисунок 49 – Значения микробного метаболического коэффициента (qCO_2) в почве под посевами сосны (фон, до посева (май) и после посева (июнь, сентябрь 2014г.) в зависимости от варианта опыта

В начале второго вегетационного сезона (май 2015 год) запас микробной биомассы в почве увеличился по сравнению с сентябрем 2014 в среднем в 1.9 раз. Максимальные значения микробной биомассы также отмечались в июне, в вариантах с микромицетами: *T. lignorum*, *T. longibrachiatum* и *T. harzianum* (718, 481 и 430 $МКГ С / г почв$) (Рисунок 50, Таблица 20).

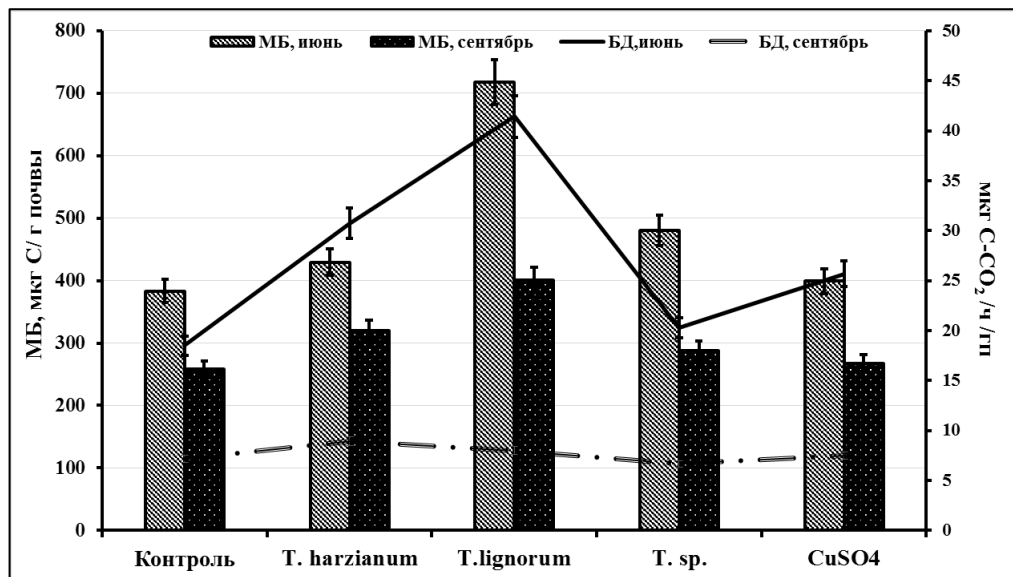


Рисунок 50 – Значения микробной биомассы (МБ) и базального дыхания (БД) в почве под посевами сосны обыкновенно в зависимости от вариантов опыта (июнь, сентябрь 2015 г.)

На протяжении всего сезона 2015 г. скорость базального дыхания, также, как и МБ, была максимальной в июне, и показатели БД в среднем были выше в 4 раза,

чем в сентябре 2014 г. (Таблица 20). Минимальные показатели БД зарегистрированы в контроле (18.5 мкг С-СО₂ /ч /г) на протяжении всей вегетации. Наиболее высокие значения БД в июне отмечены в вариантах с микромицетами (*T. longibrachiatum*, *T. lignorum* и *T. harzianum*) и микроэлементами CuSO₄ (6.8, 6.6, 6.4 и 7.7 мкг С-СО₂ /ч /г, соответственно).

В сентябре интенсивность БД в вариантах *T. harzianum*, *T. lignorum* и CuSO₄ (8.9, 7.9 мкг С-СО₂ /ч /г и 7.5 мкг С-СО₂ /ч /г, соответственно) превышала контрольные значения в среднем на 11.1% (Таблица 20, Рисунок 50). В этот период на значения микробной биомассы и базального дыхания наибольшее влияние оказывали влажность и pH почвы ($r = -0.68$ и -0.7 , соответственно) (Прил. Таблица 10). Хотя к концу вегетационного сезона 2015 года значения показателей МБ, БД снизились, согласно сезонной динамики активности микробоценозов, однако при этом их значения были выше в вариантах с микроорганизмами-антагонистами, чем в контроле. Так, в среднем значения МБ во всех вариантах обработки были выше контрольных на 17.8 %, максимальными – в вариантах *T. lignorum* и *T. harzianum* (401 и 320 мкг С / г почвы) (Таблица 20, Рисунок 50). В среднем наибольшая разница в запасе МБ между первым вегетационным сезоном (июнь 2014 г.) и вторым (сентябрь 2015 г.) была отмечена при обработке семян сосны *T. lignorum* и CuSO₄.

Значения микробного метаболического коэффициента ($q\text{CO}_2$) в начале второго вегетационного сезона были высокими (в среднем 55 мкг С-СО₂ / мкг С_{мик} / ч), выше таковых сентября 2014 г., что свидетельствует об агротехническом вмешательстве. Минимальные показатели $q\text{CO}_2$ отмечены в варианте с *T. longibrachiatum* (46 мкг С-СО₂ / мкг С_{мик} / ч) (Рисунок 51).

К концу вегетации значения микробного метаболического коэффициента снизились, по сравнению с серединой (июль-август), оставаясь наиболее высокими в контроле (28 мкг С-СО₂ / мкг С_{мик} / ч) и в варианте с *T. harzianum* (28 мкг С-СО₂ / мкг С_{мик} / ч) (Рисунок 51, Таблица 20).

Корреляционный анализ, проведенный между МБ, БД и $q\text{CO}_2$ и температурой₍₁₎, влажностью₍₂₎ и pH₍₃₎ почвы, выявил достоверную зависимость

($p < 0.05$) только с БД ($r_1 = 0.7$, $r_2 = 0.5$ и $r_3 = 0.7$, соответственно) (Прил. Таблица 10).

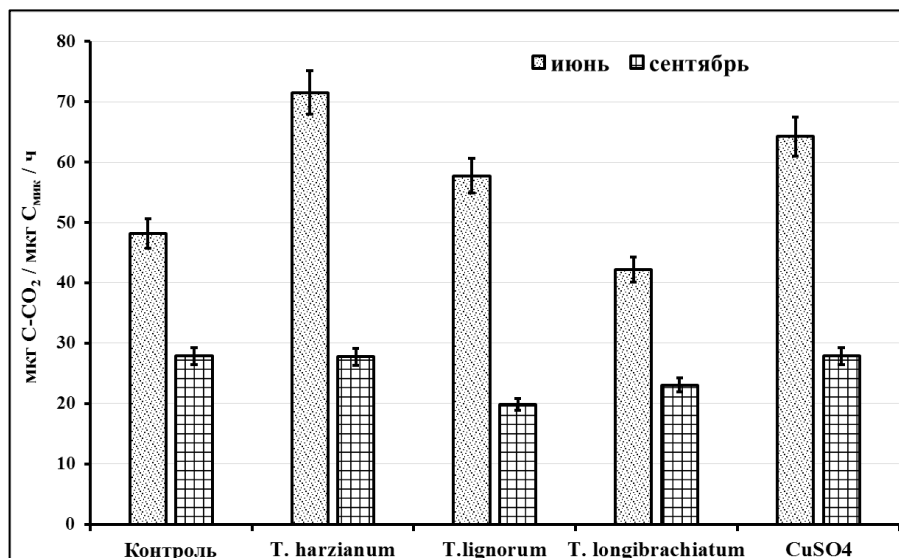


Рисунок 51 – Значения микробного метаболического коэффициента ($q\text{CO}_2$) в почве под посевами сосны обыкновенной в зависимости от вариантов опыта (июнь, сентябрь 2015 г.)

Таким образом, в течении двух вегетационных сезонов (2014 и 2015 гг.) отмечали увеличение МБ и БД в вариантах опыта с обработкой семян микробами-антагонистами и микроэлементами. Максимально значение МБ увеличивали микромицеты р. *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum*). В варианте с *T. lignorum* отмечены наиболее низкие значения микробного метаболического коэффициента, что свидетельствовало о том, что на данном участке микробоценоз восстанавливался быстрее. Рассеивание данных МБ и $q\text{CO}_2$ было средним ($\text{CV} = 15.9, 14.5 \%$), а БД – выше ($\text{CV} = 21.5 \%$).

Для определения наиболее важных экологических факторов, влияющих на микробиологические показатели, провели факторный анализ, который показал, что два фактора несли 64.7 % суммарной дисперсии, из них 44.9 % приходилось на первый фактор и 19.7 % – на второй. Наибольшую факторную нагрузку на первый фактор несли активность ферментов и значения рН почвы, на 2-й фактор – температура почвы и $q\text{CO}_2$ (Рисунок 52А, Б).

Установлено, что обработка семян сосны микроорганизмами была более эффективной, чем CuSO_4 , поскольку активности антагонистов на протяжении

сезона вегетации способствовал внесенный в почву микокомпост. Однако при обработке семян CuSO_4 получены более высокие результаты, чем в контроле.

Показано, что в период исследований 2014–2015 гг. главными факторами, влияющими на: ферментативную активность и общую микробную численность, были pH и влажность ($r=-0.7$ и -0.6), а на значения удельного микробного дыхания и запасы микробной биомассы – температура почвы ($r>0.5$).

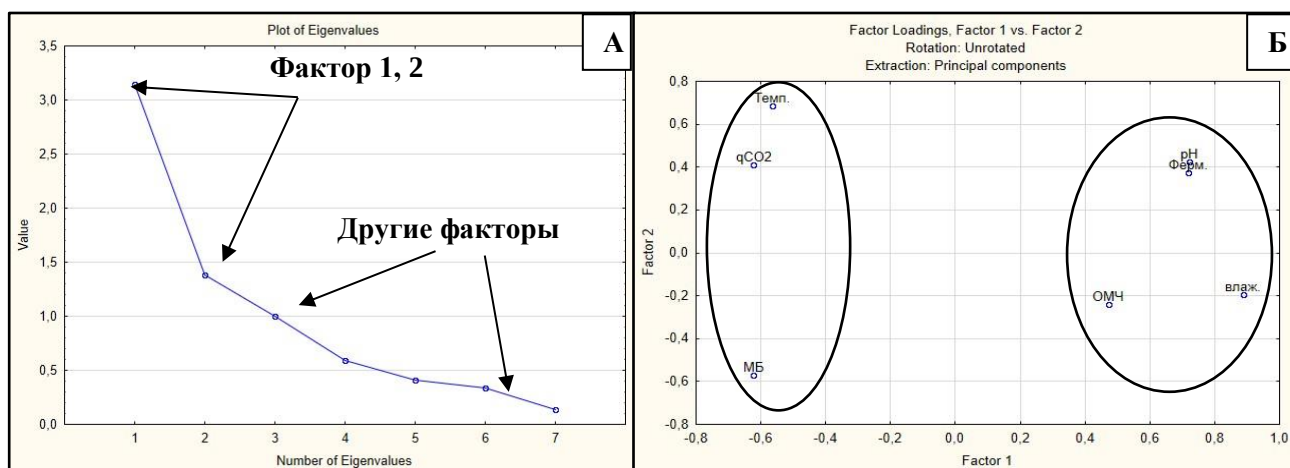


Рисунок 52 – А) График собственных значений «каменистой осыпи», Б) График факторных нагрузок (Фактор 1 и Фактор 2) при анализе данных 2014–2015 гг.

За период двух вегетационных сезонов 2014–2015 гг. отмечали ряд изменений параметров биогенности почвы при внесении в нее семян сосны обыкновенной обработанных микроорганизмами и микроэлементами. Так обработка семян микроорганизмами (микровицеты р. *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum*) и микроэлементами способствовала повышению содержания микробной биомассы в 2 раза по сравнению с фоновыми условиями и в 2 и 1.1 раза с контролем. Микробное дыхание (БД) вслед за биомассой (МБ), также повышалось. Значения микробного метаболического коэффициента к концу вегетации снижались до фонового уровня (до посева семян), способствуя восстановлению экофизиологического статуса микробиоценоза.

Обработка семян микробами и внесение микокомпоста как добавочного субстрата для стимуляции активности антагонистов способствовали увеличению содержания микробной биомассы и численности микроорганизмов гидролитического и копитрофного комплексов. При этом численность

копиотрофов увеличивала в основном обработка – *T. harzianum*. Микроэлементы с микокомпостом оказывали значимое увеличение микроорганизмов гидролитического комплекса. В контроле отмечалось преобладание олиготрофных микроорганизмов.

Еще одним важным показателем биогенности, на который оказывали влияние вносимые микроорганизмы, была ферментативная активность почвы. Через месяц после посева наибольшее влияние на активность почвенных ферментов класса гидролаз и оксидоредуктаз оказывала обработка микромицетами (*T. harzianum* и *T. lignorum*), особенно сильно микроорганизмы способствовали увеличению активности фосфатазы и протеазы. Применение микроэлементов эффективно сказалось на активности трех ферментов – фосфатазы, протеазы и полифенолоксидазы.

Кроме повышения биогенности почвы под посевами сосны обыкновенной применение микроорганизмов, в качестве предпосевной обработки, способствовало улучшению всхожести семян и сохранности сеянцев (*T. longibrachiatum*). Также микроорганизмы способствовали увеличению ряда морфометрических показателей сеянцев (длина мутовки и стебелька, диаметр корневой шейки и сухой вес сеянца), в особенности при применении микромицета *T. harzianum*, обработка семян сосны микроэлементами (CuSO_4) увеличивала длину мутовки и сухой вес сеянца, по сравнению с контролем.

5.4. Сравнение влияния предпосевной обработки семян сосны обыкновенной микроорганизмами-антагонистами и фитопрепаратами на биогенность почвы и сохранность сеянцев

В условиях ОЭХ Погорельский бор института леса СО РАН в мае 2016 г. был заложен эксперимент по изучению влияния микроорганизмов-антагонистов и фитопрепаратов на всхожесть, рост, развитие и сохранность семян сосны обыкновенной, а также на состояние микробоценоза почвы под ними. Образцы, полученные из растительного сырья и предварительно проверенные на

цитокининовую и ростстимулирующую активность на сельскохозяйственных растениях (Рожанская и др., 2003; Бычков, Ломовский, 2017), были любезно предоставлены для их тестирования на хвойных О.И. Ломовским из Института химии твердого тела и механохимии СО РАН.

5.4.1. Влияние предпосевной обработки семян на грунтовую всхожесть, рост и развитие сеянцев

В мае 2016 г. семена сосны обыкновенной (лаб. всхожесть – 30 %) перед посевом обрабатывали водной суспензией антагонистов (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma lignorum*, *Bacillus amiloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp.) и фитопрепаратами. Обработанные семена сосны обыкновенной сеяли на участки Погорельского лесопитомника в следующих вариантах:

1) контроль (H_2O), 2) ШГ+5 %NaOH; 3) ШР+ЗЧ; 4) БУ+NaOH; 5) ШР+ШГ; 6) *T. harzianum*; 7) *T. longibrachiatum*; 8) смесь микромицетов р. *Trichoderma* (*harzianum*, *lignorum*, *longibrachiatum*); 9) *B. amiloliquefaciens*; 10) смесь бактерий (*B. amiloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Pseudomonas* sp.). После посева семян почву мульчировали опилками (Рисунок 53).



Рисунок 53 – Варианты опыта на Погорельском стационаре: А) май 2016 г; Б) сентябрь 2016 г.

Посев семян сосны обыкновенной производили на заранее подготовленные гряды в мае 2016 г. при температуре почвы 11.2°C, влажности 18.9 %, значении pH

6.5 (Таблица 22)

Грунтовую всхожесть сосны обыкновенной учитывали в конце июня, которая в среднем была выше с микроорганизмами-антагонистами, чем фитопрепаратами в 1.5 раза. Максимальное количество всходов сосны было отмечено в контроле (23.1 %) и при обработках *T. harzianum* (23.1 %) и *B. amyloliquefaciens* (17 %), минимальное количество всходов отмечено в вариантах *T. longibrachiatum* (2.4 %), $p < 0.05$ (Рисунок 54А). Среди вариантов с фитопрепаратами лучшая грунтовая всхожесть была при обработке семян ШР+ШГ (11.5 %), самая низкая – при ШГ+5 %NaOH (3.1 %) (Таблица 22, Рисунок 54А).

К концу вегетационного сезона количество сеянцев сосны обыкновенной снизилось во всех вариантах опыта на 50 % по сравнению с июнем, но, как и на протяжении всего сезона, максимальная сохранность сеянцев была в варианте *T. harzianum* и в контроле (15.6 и 15.7 %), ниже в вариантах *B. amyloliquefaciens* (7.6 %) и ШГ+5%NaOH (2.4 %) (Рисунок 54А). На протяжении всего сезона количество сеянцев коррелировало с влажностью почвы ($r = -0.6$), $p < 0.05$ (Таблица 22, Прил. Таблица 11). Отмечено, что на количество сеянцев сосны обыкновенной наибольшее влияние оказывали pH и ферментативная активность, в то время как для значений морфометрических показателей сеянцев большую роль играли влажность почвы и ОМЧ (Рисунок 54Б).

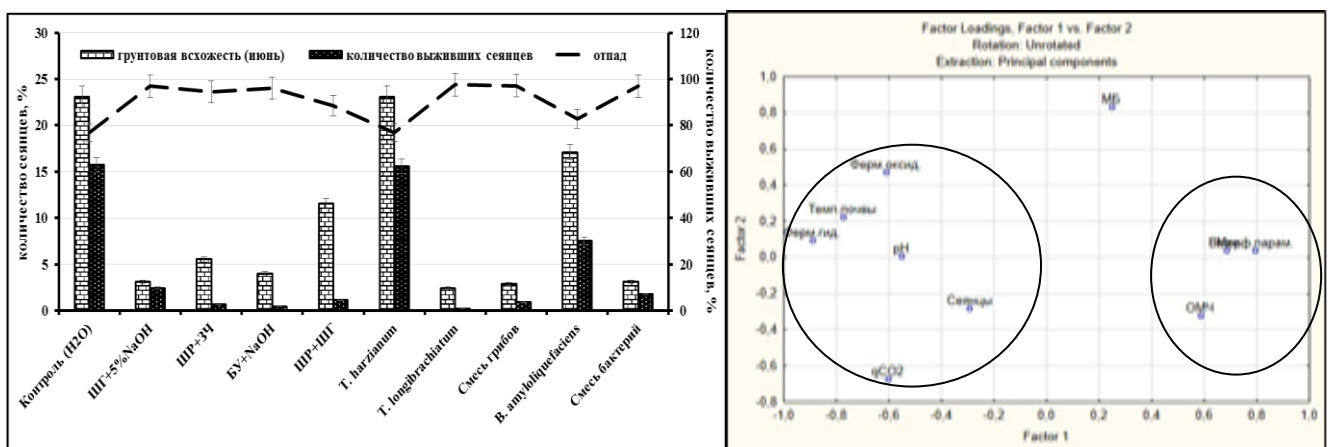


Рисунок 54 – А) Грунтовая всхожесть семян, количество выживших сеянцев и отпад сосны обыкновенной в зависимости от вариантов обработки (июнь, сентябрь 2016 г.); Б) График факторных нагрузок при анализе данных 2016 г.

Высокую гибель сеянцев хвойных к концу вегетационного сезона отмечали

при обработке фитопрепаратами, в особенности ШР+ШГ и БУ+NaOH (в 10.4 и 9 раз, соответственно).

В течение вегетационного сезона учитывали не взошедшие семена и погибшие сеянцы. Наибольший их отпад был отмечен в вариантах с фитопрепаратом ШГ+5 %NaOH (97 %) (Таблица 22).

Таблица 22 – Некоторые физико-химические и микробиологические показатели темно-серой почвы, и количество семян хвойных на участках Погорельского питомника при различных вариантах опыта вегетационного периода 2016 г.

Вариант опыта	рН	Т почвы, °С	Влажность, %	Численность микроорганизмов, млн КОЕ / г почвы				К _{мин}	К _{лиг}	МБ, мкг С / г почвы	БД, мкг С-СО ₂ /ч /г почвы	qCO ₂ мкг С- CO ₂ / мг С _{мик} / ч	Количество сеянцев, %
				Гидроли тики	Копио трофы	Олиго трофы	грибы						
Май													
Контроль (Фон)	6.4	11.2	18.9	1.2	2.9	4.6	0	2.4	3.9	218	9.4	43	-
Июнь													
Контроль (H ₂ O)	6.8	18.5	15.6	0.2	1.3	1.8	0.002	5.6	7.9	30	2.7	90	34.7
Шелуха гречихи + 5% NaOH	6.5	18.3	16.3	0.2	0.8	1.5	0	3.5	6.5	93	4.8	52	4.7
Шелуха гречихи + шелуха риса	6.7	18.3	13.4	2.2	3.4	2.0	0.003	1.6	0.9	172	5.2	30	8.3
Шелуха гречихи + зеленый чай	7.0	18.6	17.6	0.2	1.9	1.8	0	8.0	7.5	219	11.9	55	6.0
Бурый уголь + NaOH	6.6	18.8	17.2	1.7	2.6	2.1	0.005	1.5	1.2	117	6.3	54	17.3
<i>Trichoderma harzianum</i>	6.6	18.4	14.3	0.2	1.3	2.0	0.008	7.2	10.9	269	7.13	27	34.7
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	6.6	18.5	17.3	0.2	0.9	1.8	0.008	5.6	10.8	178	4.46	25	3.7
Смесь микромицетов	6.7	18.5	15.5	0.3	0.3	1.6	0.013	1.0	4.9	263	7.4	28	4.3
<i>Bacillus amyloliquephaciaes</i>	7.7	18.5	17.3	0.1	1.9	0.9	0	30.5	13.3	196	4.8	25	25.7
Смесь бактерий	6.9	18.8	15.9	0.3	2.3	3.8	0	8.3	13.5	180	7.8	44	4.7
Июль													
Контроль (H ₂ O)	7.1	25.3	13.4	0.2	1.9	1.2	0.002	8.3	5.5	78	5.8	74	27.7
Шелуха гречихи + 5% NaOH	7.1	24.3	14.5	0.2	1.3	0.6	0	8.5	4.0	124	8.1	66	4.0
Шелуха гречихи + шелуха риса	7.0	24.5	11.2	1.0	1.5	1.2	0.011	1.5	1.1	164	11.7	71	1.7
Шелуха гречихи + зеленый чай	7.3	25.2	16.7	0.4	1.1	1.7	0	2.9	4.5	59	4.5	76	0.7
Бурый уголь + NaOH	7.1	26.4	15.6	0.2	1.3	0.8	0.005	5.7	3.3	177	6.5	37	5.3
<i>Trichoderma harzianum</i>	6.9	24.2	15.5	0.3	0.7	0.9	0.060	2.1	2.8	168	6.7	40	24.7
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	7.3	24.5	16.7	0.4	1.7	2.3	0.006	4.1	5.8	175	4.3	25	0.3
Смесь микромицетов	6.8	25.2	15.4	0.1	0.7	0.9	0.037	5.1	7.4	224	8.5	38	1.3
<i>Bacillus amyloliquephaciaes</i>	7.0	24.4	14.7	0.1	1.4	0.9	0.002	10.8	7.2	173	4.8	28	8.7
Смесь бактерий	6.9	24.4	13.1	1.3	1.6	1.6	0.003	1.3	1.3	184	8.2	45	2.3

Окончание таблицы 22

Вариант опыта	рН	Т почвы, °С	Влажность, %	Численность микроорганизмов, млн КОЕ / г почвы				К _{мин}	Колиг	МБ, мкг С / г почвы	БД, мкг С-СО ₂ /ч /г почвы	qCO ₂ , мкг С- CO ₂ / мг С _{мик} / ч	Сеянцы, %
				Гидрол итики	Копио трофы	Олиго трофы	Грибы						
Август													
Контроль (Н ₂ О)	6.4	13.7	17.3	1.29	2.52	2.68	0.04	2.0	2.0	249	7.8	31	21.3
Шелуха гречихи + 5% NaOH	6.4	13.8	18.2	1.10	3.51	3.69	0.00	3.2	3.4	228	4.2	19	4.0
Шелуха гречихи + шелуха риса	6.6	13.7	19.4	2.32	3.91	4.04	0.01	1.7	1.7	113	4.1	36	1.0
Шелуха гречихи + зеленый чай	6.6	13.8	18.4	1.65	2.34	2.39	0.00	1.4	1.5	148	6.3	43	0.7
Бурый уголь + NaOH	6.6	13.9	18.3	0.77	0.69	4.10	0.01	0.9	5.3	170	3.9	23	2.7
<i>Trichoderma harzianum</i>	6.9	13.7	13.6	1.56	1.26	2.04	0.02	0.8	1.3	177	5.4	31	21.0
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	6.3	13.7	18.0	1.84	1.15	2.68	0.02	0.6	1.5	152	3.8	25	0.3
Смесь микромицетов	6.5	13.5	15.9	1.04	0.76	2.36	0.01	0.7	2.3	173	3.0	17	1.3
<i>Bacillus amyloliquephaciaes</i>	6.6	13.9	17.6	1.33	2.03	3.11	0.01	1.5	2.3	135	6.3	47	12.0
Смесь бактерий	7.3	13.8	19.1	4.58	2.54	4.68	0.02	0.6	1.0	213	4.4	21	2.7
Сентябрь													
Контроль (Н ₂ О)	7.1	20.1	13.1	0.37	0.80	1.30	0.002	2.2	3.5	159	4.3	27	23.7
Шелуха гречихи + 5% NaOH	6.7	19.5	17.9	0.87	0.80	1.71	0.002	0.91	2.0	227	4.5	20	3.7
Шелуха гречихи + шелуха риса	6.5	20.2	16.5	1.29	2.19	2.83	0.000	1.69	2.2	199	4.3	22	1.0
Шелуха гречихи + зеленый чай	6.6	18.5	16.3	1.04	0.88	1.21	0.003	0.85	1.2	126	3.9	31	0.7
Бурый уголь + NaOH	7.1	21.5	19.1	0.24	0.35	1.25	0.006	1.47	5.2	216	3.0	14	1.7
<i>Trichoderma harzianum</i>	6.6	19.3	16.2	0.68	1.17	2.40	0.100	1.72	3.5	227	3.1	14	23.3
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	6.7	20.5	19.6	0.32	0.29	1.88	0.019	0.92	5.9	170	5.0	29	0.3
Смесь микромицетов	6.5	20.4	18.1	0.28	1.36	1.03	0.004	4.91	3.7	118	3.4	29	1.3
<i>Bacillus amyloliquephaciaes</i>	6.8	19.4	19.0	0.28	1.45	2.54	0.002	5.11	9.0	232	5.0	22	11.3
Смесь бактерий	6.6	18.2	18.6	1.65	2.68	3.46	0.012	1.63	2.1	257	4.7	18	2.7

Таким образом, наилучшие результаты грунтовой всхожести и сохранности семян сосны были отмечены в варианте *T. harzianum* и в контроле. Фитопрепараты показали хорошие результаты грунтовой всхожести, но к концу вегетационного сезона более низкой сохранности семян, по сравнению с обработкой микробами. В вариантах обработки семян сосны бактериями резкой гибели семян сосны не отмечалось. Лучшая сохранность семян была в вариантах с *B. amyloliquefaciens* и в Смеси бактерий.

5.4.2. Морфометрические характеристики семян

Через год после посева семян сосны обыкновенной, обработанных микробами-антагонистами и фитопрепаратами, сеянцы сосны обыкновенной были отобраны для проведения морфометрического анализа.

Обработка семян микробными и фитопрепаратами показала практически одинаковые показатели длины корня, которые были меньше на 22 % контрольных (Рисунок 55). В контроле корневая система была менее разветвленной, чем в вариантах с *T. harzianum*, *B. amyloliquefaciens* и ШГ+NaOH. Известно, что разветвленная корневая система способна более качественно обеспечить растение влагой и питательными веществами (Рисунок 55).

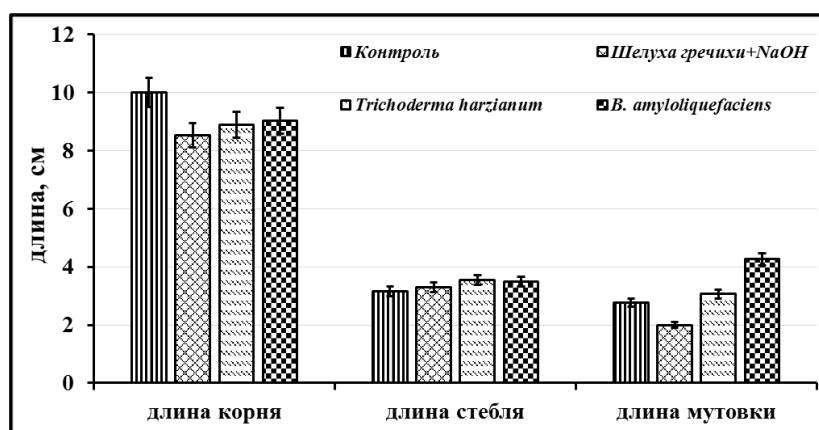


Рисунок 55 – Влияние предпосевной обработки семян сосны обыкновенной на морфометрические параметры сеянцев 2017 г.

Длина стебля сеянцев сосны обыкновенной сильно не различалась в зависимости от варианта обработки и варьировала от 3.2 до 3.6 см. Минимальные

значения были в контроле (на 9.7 % ниже, чем при обработке микромицетами), а максимальные – при обработке *T. harzianum*. На длину мутовки сеянцев лучше всего повлияли обработки *B. amyloliquefaciens* (4.3 см) и *T. harzianum* (3.1 см), что превышало контроль в 2.6 раза. При обработке фитопрепаратом ШГ+NaOH значения длины мутовки были ниже контроля в 1.4 раза, $p < 0.05$ (Рисунок 55, Прил. Таблица 12).

Увеличение диаметра корневой шейки сеянцев стимулировали две обработки: *B. amyloliquefaciens* (0.65 мм) и *T. harzianum* (0.4 мм). В контроле и с препаратом ШГ+NaOH значения диаметра корневой шейки были ниже, чем при микробной обработке, и составили 0.32 и 0.26 мм, соответственно (Рисунок 56, Прил. Таблица 12).

Увеличение веса сеянцев стимулировали варианты ШГ+NaOH и *B. amyloliquefaciens* в 6.5 раз по сравнению с контролем, средний вес сеянцев варьировал от 0.14 до 0.65 г, соответственно (Рисунок 56).

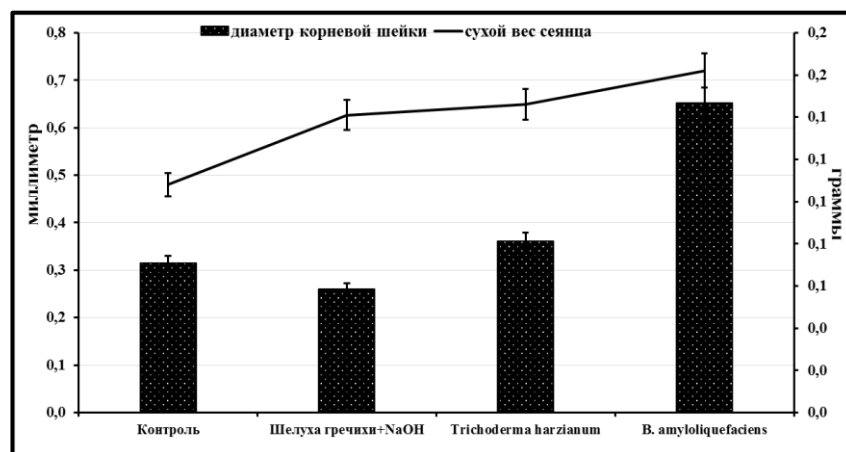


Рисунок 56 – Значения диаметра корневой шейки и сухого веса однолетних сеянцев в зависимости от варианта обработки (май, 2017г.)

Таким образом, наибольший положительный эффект на морфометрические характеристики сеянцев сосны обыкновенной, особенно на увеличение длины корня, стебля и мутовки, оказала предпосевная обработка семян штаммами *B. amyloliquefaciens* и *T. harzianum* ($p < 0.05$ Тест Уилкоксона).

5.4.3. Влияние предпосевной обработки семян на численность эколого-трофических групп микроорганизмов

Анализ численности эколого-трофических групп микроорганизмов в почве до посева семян сосны (май) показал, что самой большой по численности группой были олиготрофы – 6.1 млн КОЕ / г почвы, а копиотрофов (3.8 млн КОЕ / г почвы) и гидролитиков (1.6 млн КОЕ / г почвы) было в 1.6 и в 3.9 раз меньше. Общая численность микроорганизмов в этот период составляла 11.4 млн КОЕ / г почвы (Таблица 22, Рисунок 57А).

В микробном составе доминировали бактерии, из них 1 % приходился на актиномицеты, грибов практически не было (численность <0.001 %) (Рисунок 57Б). Олиготрофные процессы в почве преобладали над минерализационными: $K_{\text{мин}}$ составил – 2.4, а $K_{\text{олиг}}$ – 3.9 (Таблица 22).

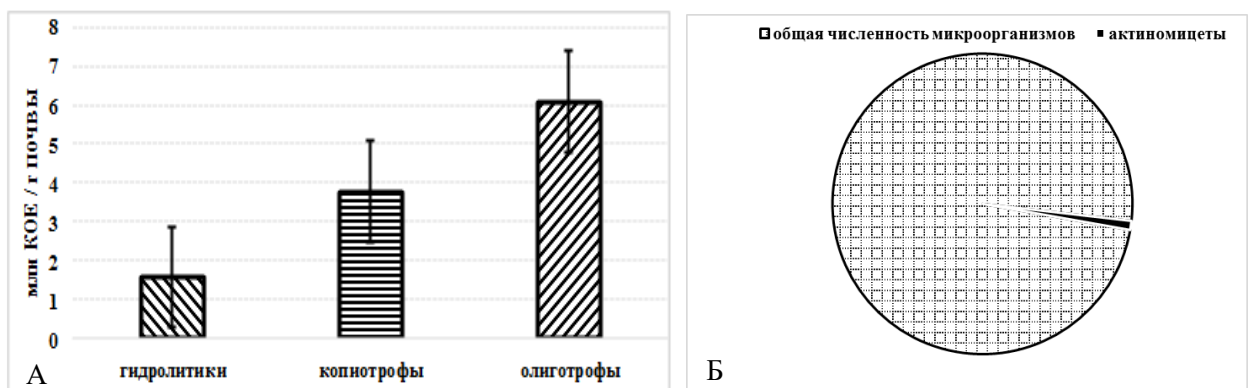


Рисунок 57 – А) численность эколого-трофических групп микроорганизмов на участке питомника (контроль) перед посевом семян сосны обыкновенной (май, 2016 г.), Б) соотношение (%) таксономических групп микроорганизмов в темно-серой почве опытного участка (май, 2016 г.)

Общая численность микроорганизмов в течение вегетационного периода изменялась согласно сезонной динамики, максимумы ОМЧ при этом отмечались в июне и августе (Рисунок 58). Так, через месяц после посева семян хвойных в июне ОМЧ составило 4.4 млн КОЕ / г почвы, что было в 3 раза меньше, чем при фоновых условиях, что говорит о незавершенности адаптации внесенных микроорганизмов к новым условиям (Рисунок 58, Таблица 22). Однако внесенные микробы усилили гидролитико-копиотрофный комплекс почвенных

микроорганизмов, и на протяжении первой половины сезона (июнь-июль) в почве под сеянцами активно происходили процессы деструкции органического вещества, об интенсивности этого процесса свидетельствует снижение CV с 39.9 до 29.3 %.

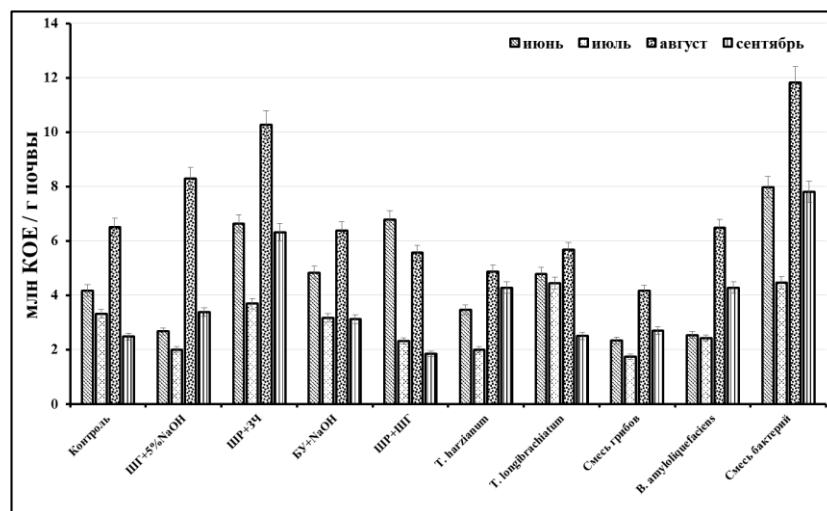


Рисунок 58 – Динамика общей микробной численности (ОМЧ) под посевами сосны обыкновенной в зависимости от вариантов обработки в течении вегетационного сезона 2016 г.

В июне более высокая численность микроорганизмов, по сравнению с контролем, была в вариантах с *T. longibrachiatum* и Смесь бактерий (4.8 и 7.9 млн КОЕ / г почвы, соответственно), а также в вариантах ШР+ЗЧ, ШР+ШГ и БУ+NaOH (6.6, 6.8 и 4.8 млн КОЕ / г почвы, соответственно), в остальных вариантах значения ОМЧ были ниже контрольных (Рисунок 58, Таблица 22). Отмечено, что обработка семян сосны Смесью микромицетов р. *Trichoderma* и фитопрепаратами (ШР+ЗЧ, БУ+ NaOH, ШР+ШГ) способствовала увеличению активности гидролитико-копиотрофного комплекса в 2.7 раз, *T. longibrachiatum* – гидролитико-олиготрофного, а обработка Смесью бактерий увеличила активность всех ЭКТГМ в 2 раза по сравнению с контролем (Таблица 22). Отмечено, что на увеличение общей численности микроорганизмов благоприятно повлияли значения почвенной температуры ($r=0.5$) (Прил. Таблица 13).

Значительное варьирование микробной численности в течение вегетации подтверждает изменение коэффициентов вариации с 31.4 до 45.4 % (Таблица 22).

Наибольшая численность эколого-трофических групп (ЭКТГМ) была в августе во всех вариантах обработки, что мы связываем с наиболее благоприятными условиями среды (pH $r=0.5$, и влажностью почвы, $r=0.6$) (Рисунок 58, Таблица 22) (Прил. Таблица 13). Действие фитопрепаратов на развитие микроорганизмов в этот период проявилось наиболее интенсивно. Микробная численность в вариантах ШР+ЗЧ и ШГ+5 %NaOH была выше контроля в 2.9 раза. В этот период $K_{\text{ОЛИГ}}$, преобладали над $K_{\text{МИН}}$ в 2 раза.

К концу сезона (сентябрь) общая численность микроорганизмов снизилась, с явным преобладанием в микробоценозе олиготрофов, кроме варианта Смесь микромицетов, где преобладали копиотрофы (Таблица 22). Значения $K_{\text{ОЛИГ}}$, преобладали над $K_{\text{МИН}}$ в 1.7 раз. Однако во всех вариантах обработки (микробы-антагонисты и фитопрепараты) ОМЧ превышало контроль в среднем в 1.7 раз (Таблица 22, Рисунок 58). Наибольшая численность микроорганизмов отмечена в вариантах Смесь бактерий, *T. harzianum*, *B. amyloliquefaciens* и ШР+ЗЧ (7.8, 4.3, 4.3 и 6.3 млн КОЕ / г почвы, соответственно). В то же время обработка семян БУ+NaOH и ШГ+5 %NaOH увеличивала активность гидролитико-копиотрофного и гидролитико-олиготрофного комплексов, а обработка *B. amyloliquefaciens* – копиотрофно-олиготрофного. Отмечена обратная корреляция численности гидролитиков и копиотрофов с pH среды ($r = > -0.5$). Коэффициент вариации ОМЧ составил 31.1 % ($p < 0.05$) (Прил. Таблица 13).

Таким образом, внесенные в почву с семенами сосны обыкновенной микробы-антагонисты и фитопрепараты, способствовали повышению ЭКТГМ, по сравнению с контролем, на протяжении всей вегетации. Особенно перспективными оказались варианты Смесь бактерий, *T. longibrachiatum* и *B. amyloliquefaciens*, а также один вариант с фитопрепаратом – ШР+ЗЧ. Внесение микроорганизмов, в отличие от порошков, заметнее изменяло численность и соотношение эколого-трофических групп микроорганизмов.

5.4.4. Дыхательная активность микробоценозов экспериментальных участков темно-серой почвы питомника под посевами сосны

Перед посевом (май, 2016 г.) основные показатели respirometric активности микроорганизмов были следующие: МБ фоновой почвы – 218 мкг С / г почвы, БД – 9.4 мкг С-СО₂/ч/г, $q\text{CO}_2$ – 43 мкг С-СО₂ / мкг С / ч (Рисунок 59, Таблица 22). Высокие значения БД и $q\text{CO}_2$ свидетельствовали о нарушенном и неустойчивом состоянии микробоценоза вспаханной почвы, что подтверждает исследования других авторов (Селивановская и др., 2001; Ильяшенко, 2014).

Через месяц после посева семян сосны обыкновенной (июнь), обработанных микроорганизмами-антагонистами и фитопрепаратами, значения МБ, БД и $q\text{CO}_2$ изменялись в зависимости от вариантов обработки. В июне значения микробной биомассы варьировали от 196 до 361 мкг С / г почвы. В вариантах с *T. harzianum*, Смесь микромицетов р. *Trichoderma*, *B. amyloliquefaciens*, Смесь бактерий, БУ+NaOH значения МБ были больше, чем в контроле в 7.4 раза. В то же время, по сравнению с фоновыми условиями (май), в июне значения МБ в контроле снизилась в 7 раз (на 86 %), максимальные значения МБ отмечены в вариантах с *T. harzianum* и Смесью микромицетов (361, 269 и 263 мкг С / г почвы, соответственно) (Таблица 22, Рисунок 59). В сентябре значения микробной биомассы в среднем существенно не отличались от июньских, были выше всего на 10 мкг С / г почвы (197 мкг С / г почвы) (Рисунок 59, Таблица 22). Однако в вариантах обработки микробами-антагонистами *T. harzianum*, *B. amyloliquefaciens*, Смесь бактерий (227, 232 и 257 мкг С / г почвы, соответственно) и фитопрепаратами ШГ+5 %NaOH, ШР+ЗЧ (227 и 199 мкг С / г почвы, соответственно) значения МБ увеличились, по сравнению с июнем. Наиболее перспективными вариантами, повышающими значения МБ, по сравнению с контролем, были ШГ+5 %NaOH, ШР+ЗЧ, ШР+ШГ, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *B. amyloliquefaciens* и Смесь бактерий.

Значения МБ варьировали в течение вегетационного сезона, что отражают коэффициенты вариации – с 30.2 % в июне до 16.5 % к концу сезона.

Интенсивность БД в июне увеличивали также все варианты обработки, по сравнению с контролем. В среднем при обработке микроорганизмами значения БД были выше контроля в 2.3 раза, а при обработке фитопрепаратами – в 2.7 раз. Максимальным микробное дыхание было в вариантах *T. harzianum* (7.1 мкг С-СО₂/ч/г), Смесь микромицетов (7.4 мкг С-СО₂/ч/г), Смесь бактерий (7.8 мкг С-СО₂/ч/г) и БУ+NaOH (11.9 мкг С-СО₂/ч/г) (Рисунок 59, Таблица 22).

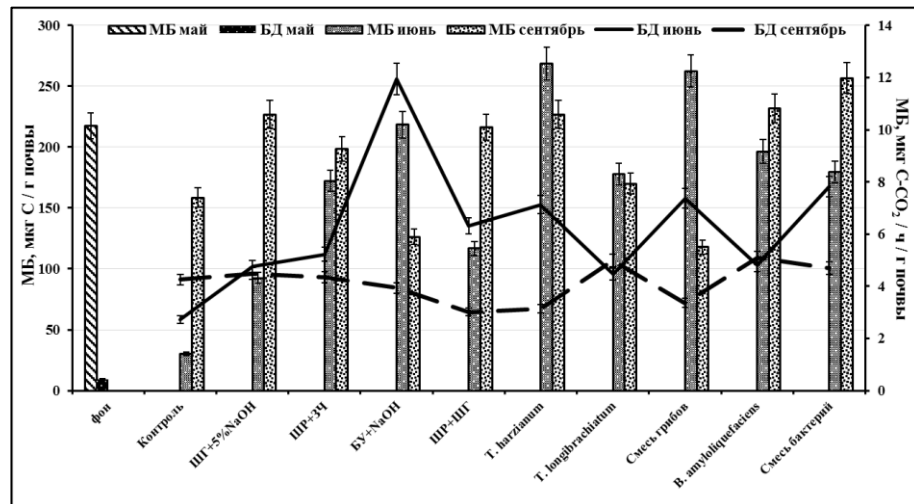


Рисунок 59 – Значения микробной биомассы (МБ) и базального дыхания (БД) в почве до посева (фон) и под посевами сосны обыкновенной (июнь и сентябрь) 2016 г.

К концу вегетационного сезона скорость базального дыхания микробных сообществ снизилась в 2 раза. Однако при обработках семян сосны *T. harzianum*, *B. amyloliquefaciens* и Смесь бактерий значения БД были выше контрольных на 14.3 % (4.9, 5.1 и 4.7 мкг С-СО₂/ч/г, соответственно) (Рисунок 59). Коэффициент вариации (CV) в течение вегетации варьировал от 23.5 до 37.4 %.

Показатели микробного метаболического коэффициента в фоновых условиях были высокими, что связано с нарушением состояния почвенного микробоценоза. В июне значение $q\text{CO}_2$ было максимальным (90 мкг С-СО₂ / мг С_{мик} / ч) в контроле, в то время как при обработке фитопрепаратами его значения были ниже контроля в 2 раза, микроорганизмами – в 3 раза (Таблица 22, Рисунок 60). Минимальные значения $q\text{CO}_2$ отмечены при обработке *B. amyloliquefaciens* (25 мкг С-СО₂ / мг С_{мик} / ч).

К концу сезона тенденция к понижению $q\text{CO}_2$ сохранилась во многих

вариантах, кроме БУ+NaOH, *T. longibrachiatum*, и Смесь микромицетов. Значения микробного метаболического коэффициента в зависимости от варианта обработки варьировали от 11 до 31 мкг С-СО₂ / мкг С_{мик} / ч (БУ+NaOH) (Рисунок 60). На протяжении всего вегетационного сезона отмечена тенденция снижения $q\text{CO}_2$, также, как и CV с 48.7 до 32.8 %. Отмечено, что на значения МБ и БД наибольшее влияние оказывала температура и влажность почвы ($r=0.6$ и -0.6 , соответственно) (Прил. Таблица 14).

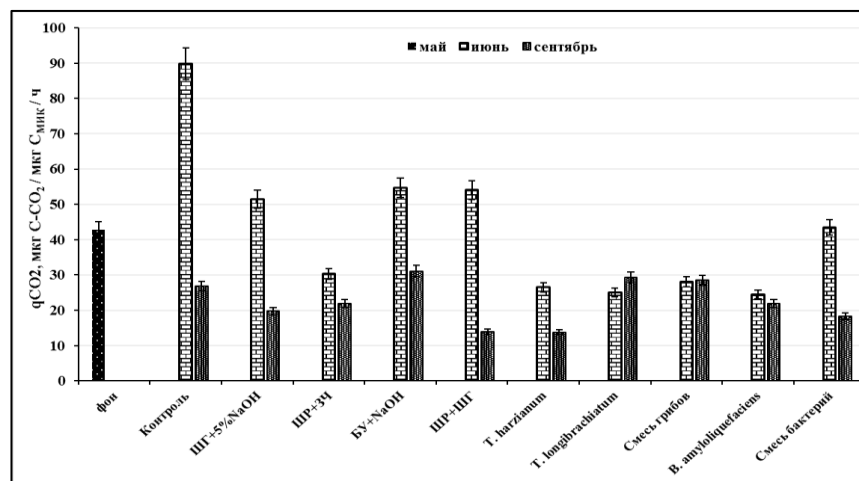


Рисунок 60 – Значения микробного метаболического коэффициента ($q\text{CO}_2$) в почве до посева (фон) и под посевами сосны обыкновенной в зависимости от вариантов обработки (июнь и сентябрь 2016 г.)

Таким образом, предпосевная обработка семян сосны микроорганизмами-антагонистами и фитопрепаратами в целом способствовала увеличению МБ и снижению $q\text{CO}_2$. Наилучшие результаты показали обработки микроорганизмами *T. harzianum*, *B. amyloliquefaciens* и Смесь бактерий.

5.4.5. Ферментативная активность темно-серой почвы питомника под посевами сосны обыкновенной в зависимости от вариантов обработки

Как известно активность основных ферментов в почве является показателем ее качества, здоровья и биогенности, от их активности также зависит качество посадочного материала. На ферментативную активность, в свою очередь, влияет ряд факторов не только физико-химической, но и биологической природы (Бачурина и др., 2013).

Анализ активности наиболее важных ферментов в почве до и после посева семян сосны обыкновенной, а также в конце вегетации (сентябрь), показал, что активность основных ферментов группы гидролаз и оксидоредуктаз (уреаза, фосфатаза, инвертаза, полифенолоксидаза и пероксидаза) изменялась в зависимости от периода вегетации и варианта обработки семян.

Нами показано, что предпосевная обработка семян антагонистами способствовала повышению инвертазной активности, т.е. способности к преобразованию углеводов растительных остатков. При этом увеличение активности фермента отмечалось не только непосредственно после посева обработанных семян, но и сохранялось до конца сезона вегетации (Таблица 23).

В начале сезона (июнь) активность инвертазы была выше фоновых условий в среднем в 1.5 раза, и варьировала от 58.95 до 85.1 ед. ф. с минимальными значениями в контроле, и максимальными в ШГ+5 %NaOH (Таблица 23). При этом активность инвертазы в вариантах с фитопрепаратами (76.5 ед. ф.) была выше таковой в вариантах с микроорганизмами (68.8 ед. ф.). Максимальные значения активности фермента были в вариантах ШГ+5 %NaOH (85.1 ед. ф.) (Таблица 23).

Отмечена отрицательная корреляционная зависимость между активностью фермента и температурой почвы ($r = -0.6$) (Прил. Таблица 15). Пространственная вариация (CV) этого показателя была средней и составила 15.6 % в начале сезона и 13.4 % в конце.

К концу вегетационного сезона (сентябрь) активность инвертазы в среднем была выше июньских значений на 5.4 %. Минимальные значения активности инвертазы были также, как и в июне, в контроле (63.4 ед. ф.) и в варианте со Смесью бактерий (59.3 ед. ф.). Во всех остальных вариантах активность фермента превышала контроль на 18.7 % (Таблица 23). Наибольшее влияние на активность инвертазы в сентябре оказывала обработка штаммами *B. amyloliquefaciens* и *T. harzianum* (88.8, 84.2 и 74.6 ед. ф., соответственно), и фитопрепаратами ШР+ШГ (85.6 ед. ф.), ШР+ЗЧ (83.2 ед. ф.) (Таблица 23).

Таблица 23 – Ферментативная активность темно-серой почвы питомника в зависимости от варианта обработки (2016 г).

Вариант обработки	Инвертаза, мг глюкозы / г почвы	Фосфатаза, мг P_2O_5 / г почвы	Уреаза, мг N- NH_4 / г почвы	Полифенол-оксидаза, мг бензохинона / г почвы	Пероксидаза, мг бензохинона / г почвы	Коэффициент гумификации	месяц
Фон	50.02	1.7	1.53	0.17	0.20	0.85	Май
Контроль (H_2O)	59.0	1.08	2.19	0.32	0.11	2.9	Июнь
	63.4	2.17	1.24	0.17	0.19	0.9	Сентябрь
Шелуха гречихи + 5 % NaOH	85.1	1.66	2.63	0.38	0.14	2.64	Июнь
	84.5	1.56	2.04	0.31	0.31	0.99	Сентябрь
Шелуха гречихи + шелуха риса	77.9	0.64	2.37	0.27	0.20	1.36	Июнь
	83.2	2.05	2.26	0.45	0.34	1.33	Сентябрь
Шелуха гречихи + зеленый чай	72.8	1.06	2.72	0.44	0.24	1.88	Июнь
	66.8	1.24	2.12	0.36	0.33	1.09	Сентябрь
Бурый уголь + NaOH	72.4	1.08	1.72	0.35	0.26	1.34	Июнь
	85.6	1.31	2.04	0.43	0.34	1.25	Сентябрь
<i>Trichoderma harzianum</i>	71.4	2.52	2.42	0.39	0.29	1.35	Июнь
	74.6	1.26	1.31	0.29	0.27	1.08	Сентябрь
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	74.7	1.19	2.25	0.39	0.18	2.13	Июнь
	72.3	2.33	2.22	0.30	0.29	1.04	Сентябрь
Смесь микромицетов	78.0	1.51	1.13	0.39	0.11	3.28	Июнь
	75.3	1.49	2.18	0.30	0.25	1.29	Сентябрь
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	67.9	0.91	1.51	0.31	0.29	1.40	Июнь
	88.8	1.83	0.98	0.32	0.31	1.02	Сентябрь
Смесь бактерий	42.4	1.41	1.64	0.36	0.28	1.30	Июнь
	59.3	2.12	0.92	0.28	0.35	0.79	Сентябрь

Активность фосфатазы в июне, после внесения в почву семян, снизилась по сравнению с фоновым значением. В вариантах с фитопрепаратами активность фосфатазы уменьшилась на 32.8 %, а при обработке семян микробами-антагонистами – на 12.6 % (Таблица 23), (CV составил 36.1 %). Только в варианте с *T. harzianum* активность фосфатазы была в 1.5 раза (2.5 ед. ф.) выше фонового значения (Таблица 23). Но по сравнению с контролем активность фосфатазы была выше в 1.5 раза при обработке практически всеми микроорганизмами (за исключением *B. amyloliquefaciens*).

К сентябрю активность фосфатазы в почве под посевами сосны в среднем возросла и достигла уровня фоновых условий – 1.7 ед. ф. Однако выше контроля (2.2 ед. ф.) активность фосфатазы отмечена только в варианте с *T. longibrachiatum* (2.3 ед. ф.), и близкой к контролю – со Смесью бактерий (2.1 ед. ф.). При обработке фитопрепаратами активность фермента была меньше контрольной, наиболее близкая к контролю – в варианте с ШР+ЗЧ (2.05 ед. ф.) (Таблица 23).

При изучении сезонной динамики активности уреазы было отмечено, что активность фермента, регистрируемая в мае (1.5 ед. ф.), увеличилась в июне во всех вариантах в среднем на 25 %. Наиболее заметным фактором, влияющим на активность уреазы, была температура почвы ($r = 0.5$), $p < 0.05$ (Прил. Таблица 15). Из микробных вариантов наиболее эффективными были обработки *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* и Смесь бактерий (2.4, 2.3 и 2.0 ед. ф., соответственно), из фитопрепаратов – ШГ+5 %NaOH (2.6 ед. ф.), БУ+NaOH (2.7 ед. ф.) и ШР+ЗЧ (2.4 ед. ф.), где активность фермента была выше контрольных значений (CV составил 22.7%) (Таблица 23).

К сентябрю активность уреазы почвы опытных участков соответствовала уровню фонового значения, пространственная вариабельность уреазы составила 34.6 %. В вариантах обработки семян сосны фитопрепаратами, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* и Смесь бактерий активность уреазы была выше, чем в контроле в 1.5 раза. Максимальные значения уреазы в сентябре отмечены в варианте Смесь микромицетов р. *Trichoderma* и БУ+NaOH (2.2 и 2.0 ед. ф., соответственно) (Таблица 23).

Активность ферментов группы оксидоредуктаз (полифенолоксидаза и пероксидаза), участвующая в превращении органических соединений ароматического ряда в компоненты гумуса, в фоновых условиях была низкой (0.17 ед. ф.), и свидетельствовала о замедленных процессах трансформации органических веществ (Сулейманова, Шорина, 2012, Середина, 2015). Как известно активность ферментов зависит от целого ряда факторов, в том числе и от pH (Устимов, 2014). До посева семян (в фоновых условиях) pH составляла 6.5,

после посева (в июне) рН стала близка к нейтральной (6.7), сохранив эти значения на протяжении всего сезона. Однако для высокой активности этих ферментов требуются условия, при которых $\text{pH} = 7.5\text{--}8.5$ (Пушкарева, Маковский, 2008).

В наших исследованиях, после посева семян сосны (в июне) кислотность почвы сместилась к нейтральным значениям, что способствовало повышению активности ПФО в 2 раза (0.37 ед. ф.), по сравнению с фоновыми условиями, что сохранилось до конца вегетационного сезона (сентябрь) (CV составил 12.8 %, $p < 0.05$). Во всех вариантах обработки, кроме ШР+ЗЧ, активность ПФО была выше контроля. Максимальные значения активности фермента отмечены в вариантах БУ+NaOH, *B. amyloliquefaciens*, *T. longibrachitum* (0.44, 0.40 и 0.39 ед. ф. соответственно) (Таблица 23).

К сентябрю активность ПФО существенно не изменилась и во всех вариантах опыта была выше, чем в контроле в 2 раза. Максимальные значения ПФО были в вариантах Смесь микромицетов р. *Trichoderma* (по 0.32 ед. ф.), ШР+ЗЧ (0.45 ед. ф.) и ШР+ШГ (0.43 ед. ф.), коэффициент вариации составил 20.7 % (Таблица 23). Влажность почвы в этот период оказалась оптимальной для активности полифенолоксидазы ($r = 0.7$) (Прил. Таблица 15).

Схожая ситуация отмечалась и с пероксидазой, ее активность на протяжении сезона изменялась незначительно, повысившись на 0.1 ед. ф. к концу сезона (Таблица 23). На протяжении всего периода вегетации минимальные значения активности фермента отмечались в контроле (0.10 ед. ф.). Наиболее эффективными вариантами обработки для активности фермента были – *T. harzianum* (0.29 ед. ф.), *B. amyloliquefaciens* (0.29 ед. ф.) и Смесь бактерий (0.28 ед. ф.), пространственная вариация составила 30.1 %.

В конце сезона вегетации среднее значение активности ПО составило 0.31 ед. ф., с максимальным значением в вариантах Смесь бактерий (0.28 ед. ф.) и ШР+ШГ (0.34 ед. ф.). Пространственная вариация CV снизилась с 30.1 до 14.5 % (Таблица 23).

Коэффициент гумификации после внесения препаратов был выше в июне и сентябре, по сравнению с фоном, что свидетельствует о повышении интенсивности переработки органических веществ и синтеза гуминовых и фульвокислот после посева семян сосны обыкновенной (Титова, Козлов, 2012). В июне в вариантах с фитопрепаратами $K_{ГУМ}$ составил в среднем 1.7 ед. ф, а с микроорганизмами – 1.85 ед. ф. В сентябре $K_{ГУМ}$ немного снизился по сравнению с июнем и составил – 1.2 (с порошками) и 1.1 (с микроорганизмами) (Таблица 23).

Анализ результатов, полученных в эксперименте 2016 года, показал, что обработка семян микроорганизмами и фитопрепаратами по-разному влияют на показатели биогенности почвы. Так, запас микробной биомассы в почве при обработке семян микроорганизмами был выше, чем при обработке фитопрепаратами и в контроле, при этом микробная биомасса активнее накапливалась в вариантах с микромицетами, чем с бактериями (на 19 и 17 % больше чем в контроле). Значения микробной биомассы при обработке семян растительными препаратами также были выше, чем в контроле (на 7 %).

Сложившиеся в вариантах опыта с обработкой микроорганизмами условия способствовали восстановлению экофизиологического статуса, так микробный метаболический коэффициент при обработке микромицетами снизился в 2 раза, а при обработке бактериями – в 1.7 раз. В целом, как микроорганизмы, так и фитопрепараты, в разной степени способствовали переходу микробоценоза в более равновесное состояние, по сравнению с фоновыми условиями до посева семян сосны обыкновенной, чего не наблюдалось в контроле.

Внесение в почву семян сосны обыкновенной, обработанных микроорганизмами-антагонистами и фитопрепаратами, способствовало увеличению активности гидролитических (инвертаза, уреазы, фосфатаза) ферментов и группы оксидоредуктаз (полифенолоксидаза, пероксидаза), по сравнению с почвой перед посевом (фон). Обработка микромицетами в целом способствовала увеличению активности всех исследуемых ферментов (гидролаз

и оксидоредуктаз), в свою очередь бактерии наиболее активно увеличивали содержание в почве инвертазы и ПФО и ПО, что свидетельствует о сдвиге окислительно-восстановительных процессов в сторону интенсивной переработки сахаров и фенолов. Схожая тенденция отмечалась при обработке семян фитопрепаратами, в этом случае увеличивалась помимо инвертазы, ПФО и ПО еще и активность уреазы. Наибольшее влияние на активность ферментов оказывала обработка штаммами-антагонистами *B. amyloliquefaciens*, *T. harzianum*, а также фитопрепаратами ШР+ЗЧ, ШР+ШГ, ШГ+5 %NaOH. Статистический анализ подтвердил влияние на активность ферментов pH почвы, общей численности микроорганизмов, микробной биомассы, и интенсивности базального дыхания, $p < 0.05$ (Тест Уилкоксона).

Проведенный факторный анализ выделил два фактора, суммарная дисперсия которых составила 66.1 %, на другие факторы приходились оставшиеся 33.9 % дисперсии. На фактор-1 приходилось 45.3 % дисперсии, на фактор-2 – 20.8 % (Рисунок 61А). Анализ факторных нагрузок показал, что существенные нагрузки на первый фактор несут ферментативная активность, удельное микробное дыхание, pH и температура почвы на, ОМЧ и МБ – влажность почвы (Рисунок 61Б).

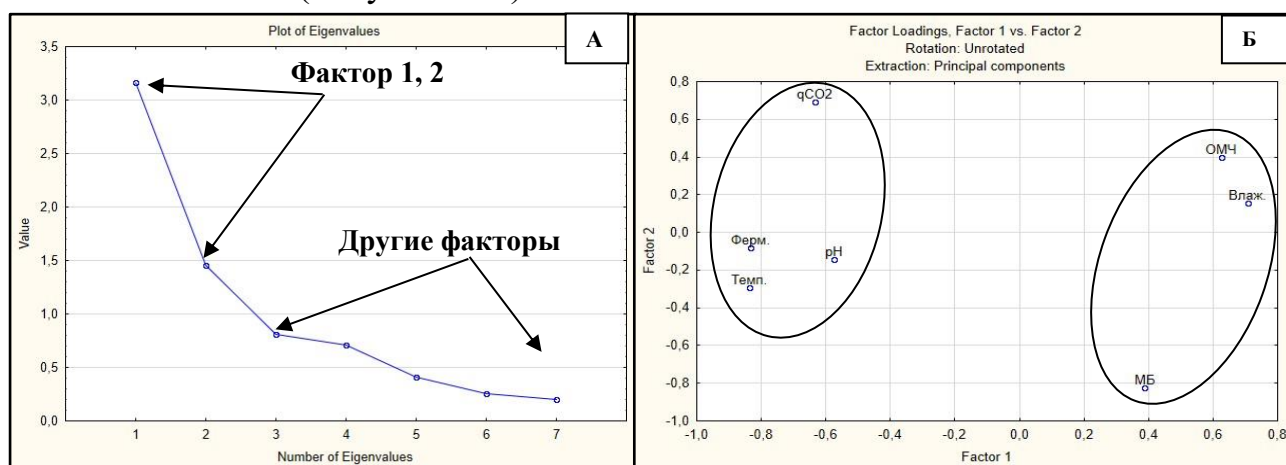


Рисунок 61 – А) График собственных значений «каменистой осыпи», Б) График факторных нагрузок (Фактор 1 и Фактор 2) при анализе данных 2016 года

Следовательно, в исследуемый период (2016 г.) основными факторами, влияющими на общую микробную численность и микробную биомассу, была

влажность почвы, а на дыхательную и ферментативную активность – рН и температура почвы ($r > 0.5$).

В рамках задачи восстановления нарушенных земель, таких как почвы лесных питомников, внесение микроорганизмов-антагонистов соответствует требованиям экологичности, экономичности и безопасности. Поэтому наши исследования были сосредоточены на изучении функционирования микробного сообщества почвы при внесении в нее, совместно с семенами хвойных, микроорганизмов-антагонистов, в градиенте их изменения под влиянием экологических факторов. Анализ данных, полученных в течении пяти лет экспериментов, проведенных на Погорельском лесном опытном питомнике ИЛ СО РАН, позволил охарактеризовать функционирование микробных сообществ почвы при внесении с семенами хвойных аборигенных штаммов микроорганизмов (грибов и бактерий), и других препаратов, применяемых в качестве агентов биоремедиации (микроэлементов и фитопрепаратов на основе растительного сырья, опилок, микокомпоста и вермикулита).

Полученные результаты показали, что многолетнее использование почвы питомника, с применением в качестве предпосевной обработки микробов-антагонистов, отразилось на экофизиологическом состоянии микробного сообщества серой лесной почвы. Оказалось, что внесение микроорганизмов, микроэлементов, фитопрепаратов и микокомпоста, способно изменять соотношение эколого-трофических групп микроорганизмов с доминирования олиготрофов в сторону преобладания копиотрофов и повышения активности гидролитиков, увеличить запас микробной биомассы, уменьшить интенсивность микробного дыхания, и снизить стресс, посредством снижения удельного дыхания микробоценозов, приводя к относительной норме их функционирования, повышать активность ряда ферментов класса гидролаз и оксидоредуктаз, и как следствие всего вышеперечисленного, защищать посевы хвойных от заболеваний, увеличивать их сохранность и качество.

В качестве подтверждения вышеизложенного, проведенный анализ главных компонент, усредненных данных за весь период экспериментов показал,

что 73.3 % в дисперсию данных вносят 3 компоненты. Активность трех ферментов (протеаза, ПФО, ПО) вносят 33.5 % дисперсии данных (1-я компонента), респирометрические показатели микробоценоза (МБ, БД и $q\text{CO}_2$), а также активность инвертазы и фосфатазы – 21.4 % дисперсии (2-я компонента), и ОМЧ, в особенности численность гидролитиков и копиорофов – 18.4 %. Эти показатели в сумме дают 73.3 % дисперсии, что свидетельствует о том, что примерно 28.7 % дисперсии объясняются другими факторами, такими как температур и влажность почвы. Таким образом, шкала данных обладает приемлемым качеством, так как доля дисперсии выше 70 % объясняется вышеперечисленными факторами.

Дополнительное внесение в почву питомника вермикулита, опилок, микокомпоста способствовало эффективному развитию в почве гидролитико-копиотрофной микрофлоры, повышающей биохимическую активность почвы, что отразилось в поддержке роста и развития сеянцев хвойных. Вермикулит и опилки оказывали как влагосохраняющее и защитное действие на сеянцы хвойных, так способствовали поступлению минеральных элементов и углеродсодержащей органики в почву. Микокомпост являлся дополнительным источником питательных веществ для поддержания и активности вносимых микроорганизмов-антагонистов. В целом нами показано, что все эти мероприятия способны поддерживать биологическую продуктивность почвы питомника, улучшать ее биогенность, предотвращать от истощения и олиготрофности, что снизит появление фитопатогенных форм микроорганизмов и повысит эффективность получения качественного лесопосадочного материала хвойных.

Метагеномный анализ почвы без внесенных микроорганизмов (2012–2016 гг.) показал изменения, происходящие в микробоценозе на таксономическом уровне. В почве питомника отмечено снижение доли фил *Proteobacteria* и *Firmicutes*, являющихся представителями гидролитико-копиотрофного комплекса, повышение фил, тяготеющих к олиготрофии (низшие *Actinobacteria*, *Verrucomycrobia*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*), и

ксерофитных форм (*Gemmatimonadetes*), что является индикатором антропогенно-нарушенных почв и указывает на снижение ее продуктивности.

Заключение

В результате поведенных исследований были сделаны следующие выводы:

1. Ежегодная агротехническая обработка почвы питомника в течение 5 лет изменяла качественный состав микробоценоза. Доля микромицетов и актиномицетов снизилась в 5 и 2.5 раза, представителей сапротрофного бактериального комплекса – в 3 раза. В прокариотном микробиоме почвы уменьшилось количество основных таксонов (фил и классов) гидролитико-копиотрофного комплекса (*Proteobacteria* и *Firmicutes*), и увеличилась доля олиготрофов (низшие *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*), что является индикатором антропогенного нарушения почв.

2. В лабораторных условиях установлено наличие полифункциональных свойств у исследуемых микроорганизмов. Микромицеты р. *Trichoderma* в разной степени проявляли антагонистические и миколитические, а бактерия *B. amyloliquefaciens* – антагонистические свойства, по отношению к фитопатогенным грибам р. *Fusarium*. Активность выделяемых гидролитических ферментов (хитиназы, липазы и протеиназы) у микромицетов р. *Trichoderma* сильная и средняя, а у *B. amyloliquefaciens* – слабая.

3. Установлено, что предпосевная обработка семян хвойных микроорганизмами-антагонистами улучшала рост, сохранность и морфометрические параметры сеянцев хвойных. На сохранность сеянцев наиболее эффективно влияли варианты обработки *T. harzianum*, *Pseudomonas* sp., *T. longibrachiatum*, *B. amyloliquefaciens*, увеличивая ее в среднем на 15–20 %, по сравнению с контролем. Морфометрические параметры сеянцев улучшали все варианты обработки в среднем в 1.5 раза.

4. Влияние микроэлементов (CuSO_4) и фитопрепаратов на сохранность сеянцев хвойных было существенно ниже микробных. Отдельные варианты обработки фитопрепаратами увеличивали грунтовую всхожесть семян и

некоторые морфометрические параметры семян сосны обыкновенной в среднем на 12.6 % относительно контроля.

5. Показано, что обработка семян микроорганизмами-антагонистами изменяла эколого-почвенные условия опытного питомника. Наибольший положительный эффект отмечен в вариантах с р. *Bacillus* и р. *Trichoderma*, которые увеличивали численность копитрофно-олиготрофного комплекса, содержание МБ, активность гидролитических и оксидоредуктазных ферментов в 1.4 раза, а CuSO_4 и фитопрепараты – в 1.3 раза, по сравнению с контролем. Внесенные антагонисты способствовали снижению стрессового состояния микробоценоза питомника, уменьшая изначально высокие значения удельного микробного дыхания ($q\text{CO}_2$), приближая их к экофизиологической норме.

6. Доказано, что мульчирование посевов хвойных вермикулитом с добавлением в почву микокомпоста, положительно сказалось на сохранности и морфометрических параметрах семян хвойных, биогенности почвы (МБ и ферментативная активность), пролонгировании биологической активности внесенных антагонистов. Вермикулит оказывал влагосохраняющее и защитное действие на семена хвойных, способствовал поступлению в почву минеральных элементов и $\text{C}_{\text{орг}}$; микокомпост, как дополнительный источник питательных веществ, способствовал увеличению общей численности микроорганизмов.

Практические рекомендации:

1. Для улучшения/повышения биогенности почв нарушаемых фитоценозов и улучшения качества лесопосадочного материала в лесных питомниках Сибири вместо пестицидов использовать микробные препараты полифункционального типа действия на основе аборигенных экологически безопасных штаммов-антагонистов: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas* sp.

2. Для повышения грунтовой всхожести семян, стимуляции роста и развития семян хвойных, повышения их качества и сохранности, а также снижения вредоносности фитопатогенов, предлагается проводить предпосевную обработку семян микробными препаратами (или их смесью)

полифункционального типа действия на основе перспективных штаммов-продуцентов *T. harzianum*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum*, *Pseudomonas* sp. *B. amyloliquefaciens*. Расход рабочей жидкости (10^7 кл/мл) 100 мл/500 семян.

3. Подготовку семян к посеву проводить путем замачивания на 4 ч. в 0.05 % растворе KMnO_4 , после полной просушки до сыпучего состояния в водной суспензии препарата на 8 ч. Посев производить после полного высыхания семян.

4. Для пролонгирования активности микроорганизмов-антагонистов вносить в почву перед посевом семян поддерживающие субстраты микокомпост или опилки в количестве 300 г на 1 м^2 .

Перспективы дальнейшей разработки темы

Продолжить научные исследования в следующих направлениях: разработка и оптимизация микробиологических препаратов для восстановления биогенности деградированных почв и повышения сохранности и качества посадочного материала хвойных в условиях лесных питомников Сибири; скрининг перспективных микроорганизмов-антагонистов с учетом региональных особенностей почв; оценка изменения качественного и количественного состава микробиомов почв лесных питомников в зависимости от степени их эксплуатации.

Список сокращений

1. **МБ** – микробная биомасса;
2. **БД** – базальное дыхание;
3. **$q\text{CO}_2$** – микробный метаболический коэффициент;
4. **ОМЧ** – общая микробная численность;
5. **ЭКТГМ** – эколого-трофические группы микроорганизмов;
6. **$K_{\text{мин}}$** – коэффициент минерализации;
7. **$K_{\text{олиг}}$** – коэффициент олиготрофности;
8. **$\text{C}_{\text{орг}}$** – органический углерод;
9. **$\text{N}_{\text{вал}}$** – валовый азот.

Список использованной литературы

1. Актуганов Г. Э. Особенности продукции комплекса хитинолитических ферментов в периодической культуре *Bacillus sp.* 739 / Г. Э. Актуганов, А. И. Мелентьев, Н. Г. Усанов // Биотехнология. – 2001. – № 3. – С.25–33.
2. Актуганов Г. Э. Хитинолитическая активность и антагонистические свойства бактерий-деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот / Г. Э. Актуганов, Н. Ф. Галимзянова, Н. В. Жарикова, Е. Ю. Журенко, В. В. Коробов, Т. Р. Ясаков, Т. В. Маркушева // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2017. – № 2. – С. 50–56.
3. Алимова Ф. К. Некоторые вопросы применения препаратов на основе грибов рода *Trichoderma* в сельском хозяйстве // Журнал Агро XXI. – 2006. – № 4–6. – С. 18–21.
4. Алимова Ф. К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma* / Ф. К. Алимова. – Казань: Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, 2006. – 209 с.
5. Ананьева Н. Д. Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв / Н.Д. Ананьева. – Наука, – 2003. – 222 с.
6. Ананьева Н. Д. Особенности определения углерода микробной биомассы почвы методом субстрат-индуцированного дыхания / Н. Д. Ананьева // Почвоведение. – 2011. – №11. – С.1327.
7. Ананьева Н. Д. Углерод микробной биомассы и микробное продуцирование двуокиси углерода дерново-подзолистыми почвами постагрогенных биогеоценозов и коренных ельников южной тайги (костромская область) / Н. Д. Ананьева, Е. А. Сусьян, И. М. Рыжова, Е. О. Бочарникова, Е. В. Стольникова // Почвоведение. – 2009. – № 9. – С. 1108–1116.
8. Андронов Е. Е. Изучение структуры микробного сообщества почв разной степени засоления с использованием T-RFLP ПЦР с детекцией в реальном времени / Е. Е. Андронов, С. Н. Петрова, А. Г. Пинаев, Е. В. Першина, С. Ж. Рахимгалиева, К. М. Ахмеденов, А. В. Горобец, Н. Х. Сергалиев // Почвоведение.

– 2012. – № 2. – С. 173–183.

9. Антонов Г. И. Оптимизация лесовыращивания с использованием биоконверсии древесно-опилочной массы в условиях Красноярской лесостепи / Г. И. Антонов, Н. Д. Сорокин, А. П. Барченков, О. Э. Кондакова // Лесоведение. 2018. – № 1. – С.56–64.

10. Аринушкина Е. В. Руководство по химическому анализу почв / Е. В. Аринушкина. – М.: МГУ, 1970. – 488 с.

11. Аристовская Т. В. Микробиология подзолистых почв / Т.В. Аристовская. – М. : Наука, 1965. – 188 с.

12. Асатунова А. М. Отбор агентов биологического контроля для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза / А. М. Асатунова, В. М. Дубяга // Научный журнал КубГАУ. – 2012. – № 75. – С. 1.

13. Баранов О. Ю. Молекулярно-генетическая диагностика грибных болезней в лесных питомниках / О. Ю. Баранов, В. А. Ярмолович, С. В. Пантелеев, Д. Г. Купреев // Лесное и охотничье хозяйство. – 2012. – № 6. – 9 с.

14. Бардина Т. В. Изучение экотоксичности урбаноземов методами биотестирования / Т. В. Бардина, М. В. Чугунова, В. И. Бардина // Электронное периодическое издание ЮФУ «Живые и биокосные системы». – 2013. – № 5. – 10 с.

15. Бачурина А. В. Биологическая активность лесных почв, подверженных аэротехногенному загрязнению / А. В. Бачурина, А. Н. Михеев, С. В. Бачурина // Леса России и хозяйство в них. – 2013. – № 1 (44). – С. 40–42.

16. Берсенева О. А. Почвенные микромицеты основных природных зон / О. А. Берсенева, В. П. Саловарова, А. А. Приставка // Известия Иркутского государственного университета. – 2008. – Т. 1. – № 1. – С. 3–9.

17. Билай В. И. Аспергиллы: определитель / В. И. Билай, Э. З. Коваль. – Киев: Наукова думка, 1989. – 182 с.

18. Билай В. И. Метод микрокультуры для получения типичного конидиеобразования у фузариев / В. И. Билай, И. А. Элланская // Микология и фитопатология. – 1975. – Т. 9, вып. 1. – С. 74–76.

19. Билай В. И. Фузариин / В. И. Билай. – Киев: Наукова думка, 1977. – 442 с.
20. Биологическая защита растений: Учебники и учеб. Пособия для студентов высш. учеб. Заведений / М. В. Штерншис (и др.). – М.: КолосС, 2004. – 264 с.
21. Богомолова Н. В. Фитотоксическая активность сибирских штаммов грибов рода *Fusarium* при твердофазном культивировании на растительных субстратах / Н. В. Богомолова, Ю. А. Литовка // Лесной и химический комплексы – проблемы и решения : материалы Всероссийской научно-практической конференции. – 2007. – Т. 2. – С. 3.
22. Болормаа Ч. Биоразнообразие актиномицетов рода, выделенных из почв республики Татарстан, и их ферментативная активность / Ч. Болормаа, Н. Абдул Ахмад Г. Д. Кадырова // Ученые записки казанского университета. – 2013. – Т. 155. – С. 148.
23. Бондарь П. Н. Оценка возможности использования сибирских штаммов *Trichoderma* для создания биопрепаратов защиты растений / П. Н. Бондарь, В. С. Садыкова // Лесной и химический комплексы – проблемы и решения : материалы Всероссийской научно-практической конференции. – 2007. – Т. 2. – С. 7.
24. Бондарь П. Н. Штаммы грибов рода *Trichoderma* Pers (Fr.) как основа для создания препаратов защиты растений и получения кормовых добавок: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06. / Бондарь Полина Николаевна. – М., 2011. – 22 с.
25. Боронин А. М. Биологические препараты на основе псевдомонад / А. М. Боронин, В. В. Кочетков // АГРО XXI. – 2000. – № 3. – С. 3–5.
26. Ботбаева Ж. Т. Идентификация почвенных штаммов бактерий-антагонистов рода *Bacillus* молекулярно-генетическими методами / Ж. Т. Ботбаева (и др.) // Вестник науки. – 2011. – № 1. – С. 2–8.
27. Брюханов А. Экологическая оценка: состояние лесов Сибири: тревожные итоги // Устойчивое лесопользование. – 2009. – № 2 (21). – С. 21–31.
28. Бузыкин А. И. Ресурсно-экологический потенциал лесов

Красноярского края / А. И. Бузыкин, Л. С. Пшеничникова // Хвойные бореальной зоны. – 2008. – № 3-4. – С. 327–332.

29. Бычков А. Л. Современные достижения в механоферментативной переработки растительного сырья / А.Л. Бысков, О.И. Ломовский // Химия растительного сырья. – 2017. – № 2. – С.35–47.

30. Валуева Т. А. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений / Успехи биологической химии. – 2002. – Т. 42. – С. 193 – 216.

31. Василенко А. В. Влияние физиологически активных веществ и лазерного облучения семян на ускорение роста сеянцев сосны / А.В. Василенко. – Новочеркасск, 1985. – С. 15–22.

32. Василенко А. В. Ускорение роста сеянцев сосны обыкновенной // Лесное хозяйство. – 1996. – № 1. – С. 39–40.

33. Ведерников Н. М. Учет и прогноз очагов болезней сеянцев и меры борьбы с ними в питомниках: доп. к наставлению по защите растений от вредных насекомых и болезней в лесных питомниках / Н. М. Ведерников. – Москва: Научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства, 1988. – 16 с.

34. Ведомственная целевая программа «развитие Алтайского края» на 2011 – 2015 годы (текст): РД 354-2010: утв. Администрацией Алтайского края 10.08.2010: ввод. в действие.

35. Веремеенко С. И. Изменение агрохимических свойств темно-серой почвы западной лесостепи Украины под влиянием длительного сельскохозяйственного использования / С. И. Веремеенко, О. А. Фурманец // Почвоведение. – 2014. – № 5. – С. 602.

36. Вершинин А. А. Дыхательная активность дерново-карбонатной почвы, загрязненной дизельным топливом / А. А. Вершинин, А. М. Петров, Ю. А. Игнатьев, Р. Р. Шагидуллин // Вестник Казанского технологического университета. – 2011. – № 7. – С. 168–174.

37. Галстян А. Ш. О регуляции активности ферментов почвы // А. Ш. Галстян, С. А. Абрамян // Известия с/х наук министерства с/х Арм. СССР. – 1975.

– С. 47–51.

38. Галстян А. Ш. Ферментативная активность почв Армении / А. Ш. Галстян. – Ереван: Айастан, 1974. – 275 с.

39. Галстян А. Ш. Ферментативная диагностика почв / А. Ш. Галстян, К. В. Григорян. М. : 1980. – С. 132–143.

40. Гарибова Л. В. Основы микологии: морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов: Учебное пособие / Л. В. Гарибова, С. Н. Лекомцева. – М.: Товарищество научных изданий КМК, – 2005. – 220 с.

41. Гельман В. Я. Решение математических задач средствами *Excel*: практикум / В. Я. Гельман. – Питер, 2003 – 237 с.

42. Гео-Сибирь-2010: Сборник материалов VI международного научного конгресса. – Новосибирск, 2010. – Т.3, 308 с.

43. Глебов Ф. З. Почвы сосновых лесов Сибири: Сб. научн. Тр. / Ф. З. Глебов. – Красноярск: ИЛиД, – 1986. – 123 с.

44. Голованова Т. И. Влияние грибов рода *Trichoderma* на ростовые процессы растений пшеницы / Т. И. Голованова, Е. В. Долинская, Ю. Н. Костицына // Электронный научный журнал «Исследовано в России». – 2008. – № 13. – С. 173.

45. Горовцов А. В. Показатели структуры микробоценоза почв г. Ростова-На-Дону как инструмент мониторинга состояния антропогенно-преобразованных почв // Научный журнал КубГАУ. – 2013. – № 89. – С. 5.

46. ГОСТ 13056.6-97. Семена деревьев и кустарников. Метод определения всхожести. – Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 1998. – 31 с.

47. Гридасова О. В. Особенности микробных сукцессий в вегетационной и многолетней динамике в черноземах заповедной луговой степи и черного пара / О. В. Гридасова, Н. В. Верховцева, А. А. Проценко, Е. П. Проценко, Л. А. Савченко, Н. П. Неведров // Проблемы агрохимии и экологии. – 2015. – № 4. – С. 37–44.

48. Гришко В. Н. Сообщества актиномицетов рода *Streptomyces* в почвах.

Загрязненных тяжелыми металлами/ В. Н. Гришко, О. В. Сыщикова // Почвоведение. – 2009. – № 2. – С. 235.

49. Гродницкая И. Д. Внесение микробов-интродуцентов в лесные почвы питомников Сибири / И. Д. Гродницкая, Н. Д. Сорокин // Почвоведение. – 2007. – № 3. – С. 359–364.

50. Гродницкая И. Д. Использование микромицетов из рода *Trichoderma* в биоремедиации почв лесопитомников / И. Д. Гродницкая, Н. Д. Сорокин // Известия РАН. Серия биологическая. – 2006. – № 4. – С. 491.

51. Громовых Т. И. Новые аборигенные штаммы грибов рода *Trichoderma*, распространенные на территории средней Сибири / Т. И. Громовых, С. В. Прудникова, В. С. Громовых // Микология и фитопатология. – 2001. – Т. 35. – Вып. 1. – С. 56–61.

52. Девятова Т. А. Изменение ферментативной активности почв в черноземе, выщелоченном при пирогенном воздействии / Т. А. Девятова, Ю. С. Горбунова // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2012. – № 2. – С. 136–143.

53. Демиденко Г. А. Оценка влияния гербицидов на почвенную микрофлору / Г. А. Демиденко, Н. В. Фомина // Вестник КрасГАУ. – 2013. – № 8. – С. 49.

54. Добровольская Т. Г. Структура и функции бактериальных сообществ в агроценозе / Т. Г. Добровольская (и др.) / Почвоведение. – 2016. – № 1. – С. 79–86.

55. Долгошеев Ю. В. Предпосевная обработка семян и внесение минеральных удобрений в посевы хвойных в теплице / Ю. В. Долгошеев // Восстановление лесов Западной Сибири : материалы конференции, – Красноярск, 1985. – С. 87–90.

56. Дудка И. А. Методы экспериментальной микологии / И. А. Дудка (и др.) – Киев: Наукова думка, 1982. – 552 с.

57. Дурынина Е. П. Почвенные фитопатогенные грибы / Е. П. Дурынина, Л. Л. Великанов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. – 107с.

58. Егоров Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности / Н. С. Егоров. – М: Высшая школа, 1965. – 211с.
59. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. – М.: Высшая школа, – 1979. – 480 с.
60. Егоров Н. С. Практикум по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. М.: Изд-во Моск. университета, 1976. – 307 с.
61. Егорова Л. Н. Почвенные грибы Дальнего Востока: гифомицеты / Л. Н. Егорова. – Л.: Наука, 1986. – 192 с.
62. Журавлева Н. В. Хитинолитические ферменты: источники, характеристика и применение в биотехнологии / Н. В. Журавлева, П. А. Лукьянов // Вестник ДВО РАН. – 2004. – № 3. – С. 76–86.
63. Заболотных М. В. Разработка методов длительного хранения культур *Corynebacterium pseudotuberculosis* / М. В. Заболотных, И. В. Якушкин // Вестник ОмГАУ. – 2016. – № 4 (24). – С. 139–147.
64. Захарченко И. С. Влияние ризосферных бактерий *Pseudomonas aureofaciens* на устойчивость растений к фитопатогенам при микроразмножении / И. С. Захарченко, В. В. Кочетков, Я. И. Бурьянов, А. М. Боронин // Биотехнология. – 2010. – № 5. – С. 81–88.
65. Звенигородский В. И. Микробы-антагонисты (стрептомицеты и бациллы), выделенные из почв разных типов / В. И. Звенигородский А. И. Кузин, Е. М. Шагов // Почвоведение. – 2004. – № 7. – С. 860.
66. Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. – М.: Изд-во Моск. университет, 1991. 303 с.
67. Звягинцев Д. Г. Регуляция почвенных микробных сообществ и их воздействие на рост растений // Почвоведение. – 2011. – № 11. – С. 1393.
68. Зенова Г.М. Экстремофильные и экстремотолерантные актиномицеты в почвах разных типов / Г. М. Зенова, Н. А. Манучарова, Д. Г. Звягинцев // Почвоведение. – 2011. – № 4. – С. 457.
69. Зинякова Н. Б. Активное органическое вещество в серой лесной почве

при органической и минеральной системах удобрения: дис. ... канд. биол. наук : 06.01.04 / Зинякова Наталья Борисовна. – Пушино, 2014.

70. Зинякова Н. Б. Углеродминерализующая активность серой лесной почвы при органической и минеральной системах земледелия / Н. Б. Зинякова, Н. А. Семенова // Наследие И. В. Тюрина в современных исследованиях в почвоведении : материалы Международной научной конференции. – 2013. – С. 65–67.

71. Ибрагимова Р. М. Влияние метаболитов некоторых почвенных микроорганизмов, выделенных из почв Азербайджана, на рост и развитие растений / Известия академии наук Армянской ССР. – 1964. – № 4. – С. 43.

72. Иванов Н. А. Динамика ферментативных и биохимических процессов в некоторых почвах лесостепного Зауралья / Н. А. Иванов, Р. П. Баранова // Труды Свердловского с/х института. – 1972. – Т. 26. – С. 24–36.

73. Иванчина Н. В. Ростстимулирующий эффект различных концентраций клеток эндофитных штаммов *Bacillus subtilis*, их комбинаций с эталонным штаммом *Rhizobium leguminosarum* BV. *viceae* в динамике / Н. В. Иванчина, Э. Р. Файзуллина // Актуальные аспекты современной микробиологии : материалы III международной молодежной школы-конференции. – 2007. – С. 40.

74. Иващенко К. В. Биомасса и дыхательная активность почвенных микроорганизмов в антропогенно-измененных экосистемах (Московская область) / К. В. Иващенко, Н. Д. Ананьева, В. И. Васенев // Почвоведение. – 2014. – № 9. – С. 1077.

75. Иващенко К. В. Обилие и дыхательная активность микробного сообщества почвы при антропогенном преобразовании наземных экосистем: дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03 / Иващенко Кристина Викторовна. – Пушино. – 2017.

76. Ильяшенко М. А. Почвы и растительный покров структурно-функциональных компонентов парка музея-усадьбы «Архангельское»: дис. ... канд. биол. наук : 03.02.13 / Ильяшенко Мария Александровна. – Москва, 2014. – 164 с.

77. Кабрера Фуентес К. Э. А. *Trichoderma koningii* в биологическом контроле *Fusarium oxysporum* / Э. А. Кабрера Фуентес, Р. Т. Мухаметшина // Микроорганизмы и биосфера : тезисы международной научной конференции. – 2002. – С. 48–49.

78. Кадырова Г. Х. Биовосстановление засоленных почв цианобактериями / Г. Х. Кадырова, Б. А. Расулов, О. И. Джаббарова // Микроорганизмы и биосфера : тезисы международной научной конференции. – 2002. – С. 49–50.

79. Казеев К. Ш. Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований / К. Ш. Казеев. – Ростов-На-Дону: Изд-во РГУ, 2003. – 216 с.

80. Карягина Л. А. Определение активности полифенолоксидазы и пероксидазы / Л. А. Карягина, Н. А. Михайловская // Весні АН БССР. Сер. сельскогоспод. Наву. – 1986. – № 2. – С. 15–21.

81. Кириленко Т. С. Атлас родов почвенных грибов / Т. С. Кириленко. – Киев: Наукова думка, 1977. – 128 с.

82. Кирилова Д. А. Фузариоз сои и перспективные штаммы (*Chaetomium* и *Pseudomonas*) для микробиологической защиты культуры: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 06.01.07 / Кирилова Дина Александровна. – СПб., 2013. – 27 с.

83. Классификация и диагностика почв России / Л. Л. Шишов (и др.). – Смоленск: Ойкумене, 2004. – 342 с.

84. Клинкаре А. А. Эпифитная микрофлора люпина и ее влияние на рост и развитие растения-хозяина / А.А. Клинкаре // Микроорганизмы и растения. – Рига: Зинатне, 1970. – Вып. 4. – С. 43–53.

85. Ковалева В. А. Микробиота ризосферы растений и ее роль в изменении субстрата на посттехногенных территориях крайнесеверной подзоны Тайги (Республика Коми) / В. А. Ковалева, И. А. Лиханова // Известия Коми научного центра УрО РАН. – 2013. – № 3. – С. 48.

86. Ковалевская Н. П. Молекулярные подходы в исследовании микробных популяций / Н. П. Ковалевская // Микроорганизмы и биосфера : тезисы международной научной конференции. – 2002. – С. 61.

87. Ковалевская Н. П. Молекулярные подходы в исследовании микробных популяций / Н. П. Ковалевская // Институт микробиологии и им. С.Н. Виноградского. – Москва. – 2007. – С. 61.

88. Козлова А. А. Специфика почвенно-растительных и микробиологических свойств черноземов южного предбайкалья, сформированных в условиях бугристо-западинного рельефа / А. А. Козлова, А. П. Макарова // Вопросы естествознания. – 2013. – № 1. – с. 22.

89. Козлова Е. Н. Применение бактериально-гумусовых препаратов в целях ремедиации почв, загрязненных дизельным топливом / Е. Н. Козлова, А. Л. Степанов // Почвоведение. – 2014. – № 5. – С. 580.

90. Коростик Е. В. Универсальные 16S РНК праймеры BD1 для описания генетического разнообразия сообщества почвенных прокариот / Е. В. Коростик, А. Г. Пинаев, Г. А. Ахтемова, Е. Е. Андронов // Экологическая генетика. – 2006. – Т. IV. – № 4. – С. 32–37.

91. Коротков И. А. Лесорастительное районирование России и республик бывшего СССР / И. А. Коротков // Углерод в экосистемах лесов и болот России. – Красноярск: ИЛ СО РАН. – 1994. – С.29–47.

92. Коротченко И. С. Фиторемедиация почв, загрязненных тяжелыми металлами (Co, Ni) / И. С. Коротченко // Проблемы современной аграрной науки : материалы международной научной заочной конференции. – 2015. – С. 1–3.

93. Кузин А. И. Штамм *Bacillus amyloliquefaciens* 16-K11, обладающий фунгицидной активностью против возбудителей фузариоза зерновых культур / А. И. Кузин, Н. И. Кузнецова, М. А. Николаенко, Р. Р. Азизбеян // Биотехнология. – 2013. – № 5. – С. 31–39.

94. Кузнецова М. В. Изучение биологических свойств клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* при многократных пересевах и хранении / М. В. Кузнецова, Т. И. Карпунина, Ю. К. Щербакова, Л. Н. Сторчеус, Е. В. Афанасьева // Медиаль. – 2013. – № 2 (7). – С. 3–16.

95. Кузьмина Л. Ю. Биологическая активность сурфактина, продуцируемого штаммом *Bacillus subtilis* ИБ-17 / Л. Ю. Кузьмина, А. И.

Мелентьев, О. В. Яковлева // Микроорганизмы и биосфера : тезисы международной научной конференции. – 2002. – С. 69–71.

96. Курамшина З. М. Влияние антагонистического штамма *Bacillus subtilis* 26Д на численность микроорганизмов почвы, прилегающей к семенам пшеницы / З. М. Курамшина, Р. М. Хайруллин, М. А. Лукьянцев // Почвоведение. – 2014. – № 9. – С. 1102.

97. Литвинов М. А. Определитель микроскопических почвенных грибов / М. А. Литвинов. – Л.: 1967. – 302 с.

98. Лысак А. В. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификация почвенных бактерий / А. В. Лысак, Т. Г. Добровольская, И. Н. Скворцова. – М.: Макс-Пресс, 2003. – 120 с.

99. Макаров Б. Н. Газовый режим почвы / Б. Н. Макаров. – М.: Агропромиздат, 1988. – 105 с.

100. Максимов И. В. Трофические группы фитопатогенов: механизмы взаимодействия и коэволюция с хозяевами / И. В. Максимов, Л. Г. Яруллина // Биотические связи грибов: мосты между царствами : материалы VII всероссийской микологической школы-конференции с международным участием. Сборник докладов и тезисов. – 2015. – С. 106–172.

101. Микробиология / Е. О. Мурадова, К.В. Ткаченко. – М.: Эксмо, 2011. – 336 с.

102. Милько А. А. Определитель муковых грибов / А. А. Милько. – Киев: Наукова думка, 1974. – 303 с.

103. Миренков Ю. А. Интегрированная защита растений: учебник для студентов учреждений, обеспечивающих получение высшего образования по агрономическим специальностям / Ю. А. Миренков. – Минск: ИВЦ Минфина, 2008. – 360 с.

104. Мирчик Т. Г. Современные подходы к оценке биомассы и продуктивности грибов и бактерий в почве / Т. Г. Мирчик, Н. С. Паников // Успехи микробиологии. – 1985. – № 20. – С. 198–226.

105. Мишустин Е. Н. Микроорганизмы и продуктивность земледелия / Е.

Н. Мишустин. – М.: Наука, 1972. – 343 с.

106. Муртазин М. Г. (Влияние) Применение препаратов ЖУСС в лесных питомниках / М. Г. Муртазин, С. Г. Муртазина, И. А. Гайсин, Х. Г. Мусин // Агрохимический вестник. – 2009. – С. 25–26.

107. Мустафаева Р. С. Влияние протеаз штамма *Enterococcus faecalis* AN1 на образование антимикробных пептидов из казеинов и их резистентность в условиях *in vitro* стимулированной желудочно-кишечной системы / Р. С. Мустафаева, С. Г. Гюльяхмедов, А. А. Кулиев // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». – 2012. – № 3. – С. 38–42.

108. Мясницкий С. Э. Методическое пособие по использованию программы STATISTICA при обработке данных биологических исследований / С. Э. Мясницкий. – М. : РУП Институт рыбного хозяйства, 2010. – 76 с.

109. Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Academia, – 2005. – 603 с.

110. Никитина Д. И. Почвенная микробиология / Д. И. Никитина – М.: Колос, 1979. – 316 с.

111. Никитина З. И. Микробиологический мониторинг наземных экосистем / З. И. Никитина. – Новосибирск: Наука, 1991. – 222 с.

112. Новикова И. И. Биологическая эффективность биопрепаратов на основе микробов-антагонистов против корневых гнилей огурца и вилта земляники и их влияние на видовой состав микромицетов почвы / И. И. Новикова, А. И. Литвиненко // Вестник защиты растений. – 2011. – № 2. – С. 10.

113. Новикова И. И. Биологические особенности и компонентный состав активного комплекса штамма *Streptomyces chrysomallus* P-21- антагониста фитопатогенных грибов / Вестник защиты растений. – 2003. – № 3. – С. 13.

114. Новикова И. И. Перспективы использования биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для защиты картофеля от болезней при хранении / И. И. Новикова, И. В. Бойкова, В. А. Павлюшин // Вестник защиты растений. – 2013. – № 4. – С. 12.

115. Орлов Д. С. Химическое загрязнение почв и их охрана: словарь-

справочник / Д. С. Орлов, М. С. Малинина, Г. В. Мотузова. – М. : Агропромиздат, – 1991. – 303 с.

116. Орлова Е. В. Оценка возможности создания биоремедиационного комплекса растений и микроорганизмов из препарата Олеоворин / Е. В. Орлова, А. Ю. Стапанова // АГРОХИМИЯ. – 2012. – № 10. – С. 72–78.

117. Острошенко В. В. Применение стимулятора роста «Крезацин» при выращивании сеянцев рода Пихта (*Abies*) / В. В. Острошенко, Л. Ю. Острошенко, В. Ю. Острошенко // Вестник КрасГАУ. – 2015. – № 5. – С. 184.

118. Павлюшин В. А. Новые комплексные биопрепараты для защиты овощных культур от грибных и бактериальных болезней / В. А. Павлюшин, С. Л. Тютерев, Э. В. Попова, И. И. Новикова, Г. А. Быкова, Н. С. Домнина // Биотехнология. – 2010. – № 4. – С. 69–80.

119. Падутов В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Мн.: Юнипол, 2007. – 176 с.

120. Пак Л. Н. Особенности выращивания сеянцев лиственницы в питомниках байкальского бассейна / Л. Н. Пак, Бобринев В. П. // Вестник КрасГАУ. – 2013. – № 12. – С. 157.

121. Пасько О. А. Оценка лесных ресурсов / О. А. Пасько – Томск: Издательство Томского политехнического университета, 2011. – 123 с.

122. Пат. 2451069 Российская федерация, МПК51 С 12 N 1/20 А 02 N 63/00 С 12 R 1/38. Фосфатрастворяющий штамм *Pseudomonas species* 181a с фунгицидными свойствами / Дунайцев И. А. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. – опубл. 20.05.2010, Бил. № 14. – 6 с.

123. Пашенова Н.В. Влияние отвара чистотела на биоконверсию сосновых опилок культурами базидиальных грибов-ксилотрофов / Н.В. Пашенова (и др.) // Материалы IV всероссийской конф. «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». – 2009. – С. 39–41.

124. Перфильев Н. В. Влияние систем обработки на микробиологическую

активность темно-серой лесной почвы в северном зауралье / Н. В. Перфильев, О. А. Вьюшина, Д. Р. Майсямова // Вестник КрасГАУ. – 2015. – № 2. – С. 3.

125. Першина Е. В. Изучение структуры микробного сообщества засоленных почв с использованием высокопроизводительного секвенирования / Е. В. Першина, Г. С. Тамазян, А. С. Дольник, А. Г. Пинаев, Н. Х. Сергалиев, Е. Е. Андронов // Экологическая генетика. – 2012. – Т.10. – № 2. – С. 32–39.

126. Першина Е. В. Концепция таксономического пространства и интегральная оценка сдвигов в структуре микробных сообществ по данным анализа библиотек гена 16S-rРНК / Е. В. Першина, А. С. Дольник А. Г. Пинаев, К. А. Лошакова, Е. Е. Андронов // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 4. – С. 76–87.

127. Першина Е. В. Сравнительный анализ микробиомов природных и антропогенно-нарушенных почв северо-западного Казахстана / Е. В. Першина, Е. А. Иванова, А. Г. Нагиева, А. Т. Жиенгалиев, Е. Л. Чирак, Е. Е. Андронов, Н. Х. Сергалиев // Почвоведение. – 2016. – № 6. – С. 720–732.

128. Петрова С. Н. Перспективы использования методов молекулярно-генетического анализа в почвенной экологии / С. Н. Петрова, Е. Е. Андронов, А. Г. Пинаев, Е. В. Першина // Вестник ОрелГАУ. – 2010. – № 5. – С. 45–49.

129. Пидопличко Н. М. Пенициллин / Н. М. Пидопличко. – Киев: Медицина, 1972. – 150 с.

130. Пилецкая О. А. Биологическая активность черноземовидной почвы при использовании различных систем удобрения: автореф. дис. ... д-ра. биол. наук : 03.02.08 / Ольга Алексеевна Пилецкая. – Владивосток, 2015. – 22 с.

131. Писаренко А. И. Лесовосстановление / А. И. Писаренко. – М.: Лесная пром-ть, 1977. – 270 с.

132. Подгорбунских Е. М. Влияние механической активации на реакционную способность полимеров растительного сырья / Е. М. Подгорбунских, Н. В. Булина, А. Л. Бычков, О. И. Ломовский // Химия твердого тела и функциональные материалы – 2016 : материалы Всероссийской конференции. – 2016. – С. 251–253.

133. Покаржевский А. Д. Методы оценки структуры, функционирования и разнообразия детритных пищевых сетей: Методическое руководство / Под ред. А. Д. Покаржевского, К. Б. Гонгальского, А. С. Зайцева. – М.: Изд-во ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, 2003. – 100 с.

134. Потехина Н. В. Тейхоевые кислоты трех типовых штаммов группы «*Bacillus subtilis*» – *Bacillus mojavensis* ВКМ В-2650, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Amyloliquefaciens* ВКМ В-2582 и *Bacillus sonorensis* ВКМ В-2652 / Н. В. Потехина, А. С. Шашков, Г. М. Стрешинская // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – № 5. – С. 571.

135. Практикум по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. – М.: МГУ, 1976. – 307 с.

136. Пузаченко Ю. Г. Математические методы в экологических и географических исследованиях / Ю. Г. Пузаченко. – М.: Academia, 2004. – 416 с.

137. Пунегов В. Количественное определение фитогармонов методами газо-жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии / В. Пунегов, И. Груздев // Вестник института биологии Коми НЦ УР ОРАН. – 2010. – № 3. – С. 18–22.

138. Пушкарева Н. Г. Известкование и ферментативная активность почвы / Н. Г. Пушкарева, Р. Д. Маковский // Проблемы агроэкологии смоленской области. Агрохимический вестник. – 2008. – № 3. – С. 7–8.

139. Раднагуруева А. А. Внеклеточная протеазная активность в природных образцах термальных источников Прибайкалья / А. А. Раднагуруева, Е. В. Лаврентьева // Известия Иркутского государственного университета, серия «Науки о Земле». – 2009. – Т. 2. – № 2. – С. 162–166.

140. Родин Л. Е. Динамика органического вещества и биологический круговорот в основных типах роста / Л. Е. Родин, Н. Н. Базилевич. – М.: Наука, 1965. – 253с.

141. Рожанская О. А. Влияние продуктов механохимической активации торфа и древесного сырья на морфогенез растений *in vitro* и *in vivo* / О. А. Рожанская, Н. В. Юдина, О. И. Ломовский, К. Г. Королев // Химия растительного

сырья. – 2003. – № 3. – С. 29–34.

142. Романенко Н. Д. Перспективы использования бактерий-антагонистов против фитопатогенных видов нематод, вирусов и грибов / Н. Д. Романенко, И. О. Попов // АгроXXI. – 2008. – № 1–1. – С. 23.

143. Рыбалко Т. М. Бактериозы хвойных Сибири / Т. М. Рыбалко, А. Б. Гукасян. – Новосибирск: Изд-во «Наука», 1986. – 84 с.

144. Савченко А. И. Сокращение сроков предпосевной подготовки семян / А. И. Савченко // Лесное хозяйство. – 1985. – № 2. – С. 61–62.

145. Садыкова В. С. Антимикробная активность штаммов грибов рода *Trichoderma* из Средней Сибири / В. С. Садыкова, А. В. Кураков, А. Е. Куварина, Е. А. Рогожин // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – № 3. – С. 340–347.

146. Садыкова В. С. Видовой состав и распространенность грибов рода *Trichoderma* в наземных экосистемах бассейна реки Енисей / В. С. Садыкова, А. В. Кураков, А. Н. Лихачев, А. В. Якушев // Микология и фитопатология. – 2013. – Т. 47. – Вып. 6. – С. 390–396.

147. Садыкова В. С. Экология грибов рода *Trichoderma* (PERS: Fr.) бассейна реки Енисей, их биологические свойства и практическое использование: автореф. дис. ... д-ра. биол. наук : 03.02.12 / Садыкова Вера Сергеевна. – М., 2012. – 46 с.

148. Сахнов В. В. Особенности развития сеянцев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и лиственницы сукачевы (*Larix sukaczewii* Dyl.) при использовании препарата «ГУМИРАЛ» в лесных питомниках среднего Поволжья: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16 / Владимир Васильевич Сахнов. – Уфа, 2007. – 21 с.

149. Секбаева З. И. Изменение ферментов фосфатаз в почвах вертикальной поясности горных почв южного Кыргызстана / З. И. Секбаева, Н. А. Карабаев // Наука и новые технологии. – 2013. – № 3. – С. 118–120.

150. Селивановская С. Ю. Микробная биомасса и биологическая активность серых лесных почв при внесении осадков городских сточных вод / С.

Ю. Селивановская, В. З. Латыпова, С. Н. Киямова // Почвоведение. – 2001. – № 2. – С. 227.

151. Сергеева М. А. Динамика микробной биомассы олиготрофного болота / М. А. Сергеева, С. В. Шкрёбова // Вестник ТГПУ (TSPU Bulletin). – 2013. – № 8. (136). – С. 143–148.

152. Середина В. П. Исследование ферментативной активности в техногенных почвах Кузбасса / В. П. Середина, К. А. Андросова, Л. Н. Сысоева // V международная научная конференция, посвященная 85-летию кафедры почвоведения и экологии почв ТГУ : материалы V международной научной конференции. – 2015. – С. 360–364.

153. Смирнов Г. А. Сопряженная динамика численности экологотрофических групп микроорганизмов в искусственных насаждениях красноярской лесостепи / Г. А. Смирнов, Н. Д. Сорокин // Вестник КрасГАУ. – 2012. – № 12. – С. 79.

154. Сморгалов И. А., Воробейчик Е. Л. Почвенное дыхание лесных экосистем в градиентах загрязнения среды выбросами медеплавильных заводов / И. А. Сморгалов, Е. Л. Воробейчик // Экология. – 2011. – № 6. – С. 429–435.

155. Современная микробиология / Й. Ленгелер (и др.). – М.: Мир, 2005. – Т. 2. – 493с.

156. Современное состояние бореальных лесов Восточной Сибири в аспекте естественного возобновления сосны обыкновенной / А. А. Маркатыук (и др.) // Системы. Метода. Технологии. – 2013. – № 1 (17). – С. 163–169.

157. Соколов М. С. Состояние, проблемы перспективы применения экологически безопасных пестицидов в растениеводстве // Агрохимия. – 1990. – № 10. – С. 124–136.

158. Сорокин Н. Д. Микробиологическая диагностика лесорастительного состояния почв Средней Сибири / Н. Д. Сорокин. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009. – 217 с.

159. Сорокин Н. Д. Микробиологическая индикация нарушенных лесных экосистем Сибири / Н. Д. Сорокин, А. И. Машанов, Н. В. Пашенова, И. Д. Г

родницкая, С. Ю. Евграфова // Лесоведение. – 2000. – № 2. – С. 3–7.

160. Сорокин Н. Д. Структурно-динамические особенности формирования микробоценозов в лесных почвах приангарья / Н. Д. Сорокин // Динамика лесных биоценозов Сибири. – Новосибирск: Наука. – 1980. – С. 113–130.

161. Сорокин Н. Д. Экспериментальная оценка устойчивости почвенного микробоценоза при химическом загрязнении / Н.Д. Сорокин, И.Д. Гродницкая, О.А. Шапченкова, С.Ю. Евграфова // Почвоведение. – 2009. – № 6. – С. 701–707.

162. Сорокина К. Н. Компьютерный анализ структуры липаз бактерий рода *Geobacillus* и выявление мотивов, влияющих на их термостабильность / К. Н. Сорокина (и др.) // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 4/1. – С. 666–674.

163. Степанов А. Л. Методы газовой хроматографии в почвенной микробиологии: Учебное пособие / Под. Ред. Д. Ю. Ступина – СПб.: Изд-во Лань, 2009. – 432 с.

164. Старшов А. А. Микроорганизмы с фосфатрастворяющими и фунгицидными свойствами как основа для создания комплексного препарата, альтернативного фосфорным удобрениям и химическим фунгицидам: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03 / Старшов Алексей Александрович. – Оболенск, 2013. – 149 с.

165. Ступин Д. Ю. Загрязнение почв и новейшие технологии их восстановления: Учебное пособие / Д. Ю. Ступин – СПб.: Изд-во Лань, 2009. – 432 с.

166. Сулейманова Р. Р. Влияние нефтяного загрязнения на динамику биохимических процессов чернозема обыкновенного (Оренбургская область) / Р. Р. Сулейманова, Т. С. Шорина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14. – № 1 – С. 240.

167. Сурина Е. А. Актуальные экологические проблемы современности и их решение (на примере архангельской области) / Е. А. Сурина, А.О. Сеньков // Труды Санкт-Петербургского НИИ лесного хозяйства. – 2011. – № 1 (24). – с. 256.

168. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильников, Г. И. Переверзева. – М.: Колос, – 1979. – 216 с.
169. Тимофеева М. Г. Влияние различных групп синтетических пестицидов на развитие, выживаемость и антагонистическую активность некоторых видов аэробных спорообразующих бактерий / М. Г. Тимофеева, Г. Э. Актуганов // Известия Самарского научного центра РАН. – 2011. – Т. 13. – № 5. – С. 239.
170. Титова В. И. Методы оценки функционирования микробоценоза почвы, участвующего в трансформации органического вещества / В. И. Титова, А. В. Козлов // Нижегородская с.-х. академия. – Нижний Новгород: 2012. – 64 с.
171. Трофимов Н. А. Биоремедиация загрязненных экосистем // Наука за рубежом. – 2013. – № 25. – С. 6.
172. Тулемисова К. А. Микробиологические методы защиты растений // Вестник АН Каз ССР. – 1990. – 36 с.
173. Турусов В. И. Биогенность черноземов в севооборотах с бобовыми культурами / В. И. Турусов, Т. И. Дьячкова, В. М. Гармашов // Плодородие. – 2012. – № 2. – С. 39–41.
174. Тхюи Д. Т. Биодegradация нефти и нефтепродуктов с использованием нового консорциума бактерий рода *Acinetobacter*: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.08 / Данг Тху Тхюи. – Воронеж, – 2012. – 24 с.
175. Устимов Н. Г. Эколого-физиологическая характеристика почвы в окрестностях крупного промышленного города на основе оценки активности почвенного дыхания и ферментов / Н. Г. Устимов, Е. Ю. Козлякевич // Человек, экология, культура: Современные практики и проблемы : материалы Международной молодежной научной конференции. – 2014. – С. 337–342.
176. Фомина Н. В. Микробиологическая оценка агропочв лесных питомников лесостепной зоны / Н. В. Фомина // Вестник КрасГАУ. – 2015. – № 1. – С. 3.
177. Фомина Н. В. Оценочная роль гидролитических ферментов в агропочвах (на примере Абазинского лесного питомника) // Наука и

образование: опыт, проблемы, перспективы развития : материалы XIV Международной научно-практической конференции. – 2015. – № 1. – С. 3.

178. Фрунзе Н. Н. Биомасса почвенных микроорганизмов в пахотных черноземах Молдовы / Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 2. – С. 92–99.

179. Хазиев Ф. Х. Методы почвенной энзимологии / Ф. Х. Хазиев. – М.: Наука, 1990. – 188 с.

180. Хазиев Ф. Х. Методы почвенной энзимологии/ Ф. Х. Хазиев. – М.: 2005. – 252 с.

181. Хазиев Ф. Х. Ферментативная активность почв / Ф. Х. Хазиев. – М.: 1976. – 179 с.

182. Холодов В. А. Адсорбция и токсичность гербицида ацетохлора в почвах различных типов: дис. ... канд. биол. наук : 03.00.27 / Холодов Владимир Алексеевич Холодов. – М., 2003. – 102 с.

183. Цыганова Е. Н. Действие бактериально-гумусового препарата на биологическую активность почв / Е. Н. Цыганова, Д. Г. Звягинцев, Л. В. Лысак // Почвоведение. – 2013. – № 7. – С. 867.

184. Чан Т. Т. Х. Гидролиз и модификация липидов с применением липолитических ферментов дрожжей *Candida rugose* и *Yarrowia lipopytica*: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06 / Хыонг Чан Тхи Тху. – Казань, – 2013. – 23 с.

185. Чеботарь В. К. Эндوفитные бактерии в микробных препаратах, улучшающих развитие растений (обзор) / В. К. Чеботарь, Н. В. Мальфанова, А. В. Щербаков, Г. А. Ахтемова, А. Ю. Борисов, Б. Люгтенберг, И. А. Тихонович // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – № 3. – С. 283–289.

186. Чирак Е. Л. Таксономическая структура микробных сообществ в почвах различных типов по данным высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16S-rРНК / Е. Л. Чирак, Е. В. Першина, А. С. Дольник, О. В. Кутовая, Е. С. Василенко, Б. М. Когут, А. В. Мерзлякова, Е. Е. Андронов // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 3. – С. 100–109.

187. Чундерова А. И. Ферментативная активность почвы. Агрономическая микробиология / А. И. Чундерова. Труды ВАСХНИЛ. Л.: Колос, 1976. С. 47–80.
188. Шабает В. П. Влияние внесения азотфиксирующей бактерии *Pseudomonas putida* 23 на баланс азота в почве // Почвоведение. – 2010. – № 4. – С. 471.
189. Шеламова С. А. Индукция биосинтеза липаз микромицетом / С. А. Шеламова, Ю. А. Тырсин // ВЕСТНИК ОГУ. – 2012. – № 1 (137). – С. 172–176.
190. Шлегель Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
191. Щербакова Т. А. Почвенные ферменты, их выделение, свойства и связи с компонентами почвы // Почвоведение. 1980. – № 5. – С. 102–113.
192. Экология растений: учеб. пособие для студ. высш. учеб. Заведений / Н. А. Березина, Н. Б. Афанасьева. – М.: Издательский центр Академия, – 2009. – 400 с.
193. Якименко Е. Е. Влияние грибов рода *Trichoderma* на почвенные микромицеты, вызывающие инфекционное полегание сеянцев хвойных в лесных питомниках Сибири / Е. Е. Якименко, И. Д. Гродницкая // Микробиология. – 2000. – Т. 69. – № 6. – С. 850–854.
194. Янкевич М. И. Биоремедиация почв: вчера, сегодня завтра / М. И. Янкевич, В. В. Хадеева, В. П. Мурыгина // Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера». – 2015. – Т. 7. – № 2. – С. 199–208.
195. Anderson J. P. E. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils / J. P. E. Anderson, K. H. Domsch // Soil Biol. Biochem. – 1978. – Vol. 10. – № 3. – P. 314–322.
196. Atagana I. H. Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi / I. H. Atagana, R. J. Haynes, F. M. Wallis // Water, Air, and Soil Pollution. – 2006. – V. 172. – P. 201–219.
197. Baath E. Comparison of soil fungal / bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques / E. Baath, T. N. Anderson // Soil Biology and Biochemistry. – 2003. – Vol. 35. – Is. 7. P. 955–963.

198. Backnas S. Phosphorus forms and related soil chemistry in preferential flowpaths and the soil matrix of a forested podzolic till soil profile / S. Backnas, H. Laine-Kaulio, B. Klove // *Geoderma*. – 2012. – Vol. 189-190. – P. 50–54.
199. Bailey K. L. Pest control: fungi, streptomycetes, and yeasts // *Agricultural sciences*. – 2005. – Vol. 2. – P. 8.
200. Balci Y. O. Involvement of *Phytophthora* species in white oak (*Quercus alba*) decline in southern / Y. O. Balci, R. P. Long, M. Mansfield, D. Balser, W. L. MacDonald // *Forest Pathology*. – 2010. – V. 40. – N. 5. – C. 430–442.
201. Bates S. T. Examining the global distribution of dominant archaeal population in soil / S. T. Bates (et al.) // *The SME Journal*. – 2011. Vol. 5. – P. 908–917.
202. Benzohra I. E. *In vitro* biocontrol using the antagonist *Trichoderma harzianum* against the Algerian isolates of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the agent of *Ascochyta* blight in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) / I. E. Benzohra, B. S. Bendahmane, M. M. Labdi Bnekada // *International Journal of Microbiological*. – 2011. – P. 124.
203. Bergmann G. T. The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities / G. T. Bergmann, S. T. Bates, K. G. Eilers, C. L. Lauber, J. G. Caporaso, W. A. Walters, R. Knight, N. Fierer // *Soil Boilogy and Biochemistry*. – 2011. – Vol. 43. – P. 1450–1455.
204. Bjornsson L. Filamantous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal / L. Bjornsson, P. Hugenholtz, G.W. Tyson, L.L. Blackall // *Microbiology*. – 2002. – V. 148. – P. 2309–2318.
205. Bollag J-M. Role of microorganisms in soil bioremediation / J-M. Bollag, T. Martz, L. Otjea // *ACS Symposium Series*; American Chemical Society. – 1994.
206. Caron J. Utilisation d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec / J. Caron, L. Laverdière, P. O. Thibodeau, R. R. Bélanger // *Phitoprotection*. – 2002. – V. 83 (2). – P. 73–87.
207. Cawoy H. *Bacillus*-Based biological control of plant diseases / H. Cawoy,

W. Bettiol // Pesticides in the modern world – pesticides use and management. – 2011. – P. 274.

208. Chen J. Enhanced bioremediation of soil contaminated with viscous oil through microbial consortium and ultraviolet mutation / J. Chen, Y. Q. Huang, T. Y. Zhang, R. Ding // World J Microbiol Biotechnol. – 2011. – V. 27. – P. 1381–1389.

209. Cortes C. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor / C. Cortes, A. Gutierrez // Mol Gen Genet. – 1998. – Vol. 260. – P. 218.

210. Cortez J. Biological activity of soils in the Mediterranean ecosystems III Enzymatic activities / J. Cortez, P. Lossaint, G. Billes // Rev. Ecol. Boil. Soc. – 1972. – N. 9. – P. 1–2.

211. Cullimore J. V. Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes / J. V. Cullimore, R. Ranjeva, J-J. Bono // Trends Plant Sci. – 2001. – Vol. 6. – P. 24–30.

212. Daniel F. The metagenomics of soil // Microbiology. – 2005. – V. 3. – P. 470–478.

213. DeBruyn J. M. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil / J. M. DeBruyn, L. T. Nixon, M. N. Fawaz, A. M. Johnson, M. Radosevich // Applied and environmental microbiology. – 2011. – Vol. 77. – No. 170099-2240. – P. 6295–6300.

214. Delgado-Baquerizo M. A global atlas of the dominant bacteria found in soil / M. Delgado-Baquerizo (et al.) // Science. – 2018. – Vol. 359. – P. 320–325.

215. Dhanasekaran D. *Actinobacteria* Basics and Biotechnological Applications / D. Dhanasekaran, Y. Jiang. – InTech, Chapters published February, 2016. – 398 p.

216. Dhanasekaran D. Distribution and ecobiology of antagonistic streptomycetes from agriculture and coastal soil in Tamin Nadu, India / D. Dhanasekaran, N. Thajuddin // Journal of culture collections. – 2008. – Vol. 6. – P. 10.

217. Duffy B. Pathogen self-defense: mechanism to counteract microbial antagonism / B. Duffy, A. Schouten, J. M. Raaijmakers // Annu. Rev. Phytopathol. – 2003. – Vol. 41. – P. 501.

218. Edvards R. A. Viral metagenomics / R. A. Edvards, F. Rohwer // Microbiology. – 2005. – V. 3. – P. 504–510.
219. Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications / J. C. Bertrand (et al.). – New York: Microbial ecology. – 2011. 933 c.
220. Fawaz M. N. Revealing the ecological role of *Gemmatimonadetes* through cultivation and molecular analysis of agricultural soil: mast. sciens. degree / M. N. Fawaz. – Tennessee, 2013. – 133 c.
221. Fedotov G. N. Influence of microphase Stratification of soil gels on catalase activity of soils / G. N. Fedotov, G. V. Dobrowolskii, T. F. Rudometkina // General biology. – 2011. – V. 438. – P. 179–181.
222. Fierer N. The diversity and biogeography of soil bacterial communities / N. Fierer, B. Robert, B. Jackson // PNAS. – 2006. – Vol. 103. – No. 3. – P. 626–631.
223. Foth O. H. D. Fundamental of soil science / O. H. D. Foth. – Michigan: JOHN WILEY & SONS, 1990. – 369 p.
224. Galstlan A. Sh. Enzymatic activity of soils // Geoderma. – 1974. – V. 12. – P. 43–48.
225. Gu Y. Reconstruction of xylose utilization pathway and regulons in *Firmicutes* / Y. Gu, Y. Ding, C. Ren, Z. Sun, D.A. Rodionov, W. Zhang, S. Yang, C. Yang, W. Jiang // BMC Genomics. – 2010. – V. 11. – P. 2–14.
226. Guwy A. J. Catalase activity measurements in suspended aerobic biomass and soil samples / A. J. Guwy, S. R Martina, F. R Hawkesb, D. L. Hawkesa // Enzyme and Microbial Technology. – 1999. – V. 25. – P. 669–676.
227. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms // Microbiology and molecular biology reviews. – 2004. – Vol. 68. – No. 4. – P. 669–685.
228. Harris D. Analyses of DNA extracted from microbial communities // British Society of Soil Science and Sayce Publishing. – 1994. – P. 111–118.
229. Harris J. A. Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration // Eur. J. Soil Sci. – 2003. – V. 54. – P. 801–808.
230. Haynes R. J. Comparison of soil chemical properties, enzyme activities,

levels of biomass N and aggregate stability in the soil profile under conventional and no-tillage in Canterbury / R. J. Haynes, T. L. Knight // Soil & Tillage Research. – 1989. – V. 14. – P. 197–208.

231. Higa T. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment / T. Higa, J. Parr. – Atami: International nature farming research center. – 1994. – 17 c.

232. Inbar J. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control / J. Inbar, A. Menendez, I. Chet // Soil Biol. Biochem. 1996. – Vol. 28. – № 6. – PP. 757–763.

233. Janarthanam K. *In vitro* and *in vivo* biocontrol of *Vibrio harveyi* using indigenous bacterium, *Bacillus* spp. / K. Janarthanam, M. R. George // Indian Journal of Geo-Marine sciences. – 2012. – Vol. 41. – P.83.

234. Jasper D. A. Bioremediation of agricultural and forestry soil with symbiotic microorganisms // Soil Biology and Biochemistry. – 1994. – V. 32. – P. 1301–1316.

235. Johri B. N. Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health / B.N. Johri, A. Sharma, J. S. Viridi // Adv Biochem Engin / Biotechnol. – 2003. – Vol. 84. – P.49.

236. Kaszubiak H. Mutual antagonism between *Pseudomonads fluorescent* and soil *Actinomycetes* // Polish Journal of Environmental Studies. – 1998. – Vol. 7. – P. 207.

237. Kiss S. Invertase activity in clay mineral soil mixture // Nature. – 1958. – V. 182. – No. 4629. – P. 203–204.

238. Landesmaki P. Degradation products and the hydrolytic enzyme activities in the soil humification processes / P. Landesmaki, R. Pispanen // Soil Bioi, Biock. – 1988. - Vol. 20. – No. 3. – P. 287–292.

239. Lauber C. L. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale / C. L. Lauber, M. Hamady, R. Knight, N. Fierer // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – V. 75. – No. 15. – P. 5111–5120.

240. Lauber C. L. The influence of soil properties on the structure of bacterial

and fungal communities across land-use types / C. L. Lauber, S. M. Strickl, M. A. Bradford, N. Fierer // *Soil Biology & Biochemistry*. – 2008. – Vol. 40. – P. 2407–2415.

241. Luna-Romero I. Inhibitory compound of the soil bacteria *Pseudomonas fluorescens* against the fungus *Aspergillus flavus* L. / I. Luna-Romero, M. Carvajal // *Mexican journal of a mycology*. – 2007. – No. 24. – P. 19–31.

242. Mansour M. T. M. Biological control of six soil-borne fungi of cotton using antagonistic *Streptomyces* isolates / M. T. M. Mansour, S. H. M. Hussein // *Pak. J. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 3. – P. 99.

243. Mishra B. K. Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiate* L. / B. K. Mishra, R. K. Mishra // *Advances in Applied science research*. – 2011. – No. 3. – P. 361.

244. Montealegre J. R. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2003. – Vol. 6. – No. 2. – P. 115.

245. Monteiro L. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* / L. Monteiro, R. L. R. Mariano // *Brazilian archives of biology and technology*. – 2005. – Vol. 48. – No. 1. – P. 23.

246. Mukherjee P. K. *Trichoderma* research in the genom era / P. K. Mukherjee, B. A. Horwitz // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2013. – No. 51. – P. 105.

247. Nacke H. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soil / H. Nacke, A. Thürmer, A. Wollherr, C. Will, L. Hodac, N. Herold, I. Schöning, M. Schrumpf, R. Daniel // *Plos one*. 2011. – V. 6 – Is. 2. – P. 1–12.

248. Neelakanta G. The use of metagenomics approaches to analyze changes in microbial communities / G. Neelakanta, H. Sultana // *Microbiology Insights*. – 2013. – V. 6. – P. 37–48.

249. Ondena M. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol / M. Ondena, P. Jacques // *Trends in Microbiology*. – 2007. – Vol. 16. – No. 3. – P. 115.

250. Raes J. Prediction of effective genome size in metagenomic samples / J.

Raes , J.O. Korbelt, M.J. Lercher, C. Mering, P. Bork // *Genome biology*. – 2007. – V. 8. – Is. 1. – P. 1–11.

251. Raich J. W. The global carbon dioxide flux in soil respiration and relationship to vegetation and climate / J. W. Raich, W. H. Schlesinger // *Tellus B*. – 1992. – V. 44. – P. 81–99.

252. Regalado A. P. The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, IF3, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds / A. P. Regalado, C. Pinheiro, S. Vidal // *Planta*. – 2000. – Vol. 210. – P. 543–550.

253. Rokade K. Investigation of physicochemical and microbiological properties of soil from selected regions around Sangli district, Maharashtra / K. Rokade, C. Mane // *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*. – 2013. – Vol. 4. – No. 3. – P. 35.

254. Saengnak V. Antagonistic *Streptomyces* species can protect chili plants against wilt disease caused by *Fusarium* / V. Saengnak, C. Chaisiri, S. Nalumpang // *Journal of Agricultural Technology*. – 2013. – Vol. 9 (7). – P. 1895.

255. Sarathchandra S. U. Soil microbial biomass: Influence of simulated temperature changes on size, activity and nutrient-content / S. U. Sarathchandra, K. W. Perrott, R. A. Liter // *Soil Biol. Biochem.* – 1989. – V. 21. – N. 8. – P. 987–993.

256. Shah S. A. H. Microbial analysis of different top soil samples of selected sites in Gilgit, Gilgit-Baltistan, Pakistan / S. A. H. Shah, K. Ahmed // *Academia Journal of Scientific Research*. – 2013. – V. 1. – P. 006–009.

257. Shahnava B. The effect of pH and temperature on spatial variation of *Acidobacteria* / *Actinobacteria* communities from Alpine soil / B. Shahnava, R. A. Geremia // *Journal of Cell and Molecular Research*. – V. 4 (1). – P. 28–33.

258. Shange R. S. Distinct soil bacterial communities revealed under a diversely managed agroecosystem / R. S. Shange, R. O. Ankumah, A. M. Ibekwe, R. Zabawa, S. E. Dowd // *PloS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – P. 1–11.

259. Sivan A. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum* / A. Sivan, I. Chat // *Journal of General Microbiology*. – 1989. – No. 135. – P. 675.

260. Soil microbiology: Important aspects. – Goa: Journal of hygiene sciences, 2001. – Vol. 3. – 16 p.

261. Solevic T. Investigation of the bioremediation potential of aerobic zymogenous microorganisms in soil for crude oil biodegradation / T. Solevic, M. Novakovic, M. Ilic, M. Antic, M. M. Vrvic, B. Jovancicevic // Journal of the Serbian Chemical Society. – 2011. – V. 76. – P. 425–438.

262. Suleimanova A. D. High-quality draft genome sequence of new phytase-producing microorganism *Pantoea* sp. 3.5.1 / A. D. Suleimanova, A. A. Toymentseva, E. A. Boulygina, S. V. Kazakov, A. M. Mardanova, N. P. Balaban, M. R. Sharipova // Standards in Genomic Sciences. – 2015. – Vol. 10:95. – P. 1–9.

263. Suprpta D. N. Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens / J.ISSAAS. – 2012. – Vol. 18. – No. 2. – P. 1–8.

264. Susyan E. A. The antibiotic-aided distinguishing of fungal and bacterial substrate-induced respiration in various soil ecosystems / E. A. Susyan, N. D. Ananyeva, E. V. Blagodatskaya // Micobiology. – 2005. – Vol. 74. – P. 336–342.

265. Swiontek M. Microbial activity in the landfill soil / M. Swiontek, A. Burkowska, M. Walczak // Prikl Biokhim Mikrobiol. – 2012. – Vol. 48. – No. 4. – C. 411–416.

266. Taipale S. Vertical diversity of bacteria in an oxygen-stratified humic lake, evaluated using DNA and phospholipid analyses / S. Taipale, R. I. Jones, M. Tirola // Aquatic microbial ecology. – 2009. – Vol. 55. – P. 1–16.

267. Tamez-Guerra P. Prevalence of *Proteobacteria* and *Armatimonadetes* phyla in a *Proteobioreactor* under Carbon- and Nitrogen-Free production process / P. Tamez-Guerra, J. O. Zuñiga-Sanchez, A. A. Orozco-Flores, J. A. Valadez-Lira, C. Rodriguez-Padilla, R. O. Cañizares-Villanueva, R. Gomez-Flores // Ferment Technol. – 2017. – Vol. 6. – Is. 2. – P. 1–8.

268. Torsvik V. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review / V. Torsvik, R. Sorheim, J. Goksoyr // Journal of Industrial Microbiology. – 1996. – V. 17. – P. 170–178.

269. Trasar-Cepeda C. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest

soils. Some implications for their use as indicators of soil quality // C. Trasar-Cepede, M. C. Leirós, F. Gil-Sotres // Soil Biol. Biochem. – 2008. – V. 40. – P. 2146–2155.

270. Vogel T. M. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome / T. M. Vogel, P. Simonet, J. K. Jansson, P. R. Hirsch, J. M. Tiedje, J. D. Elsas, M. J. Bailey, R. Nalin, L. Philippot // Nat Rev Microbiol. – 2009. – No. 7. – P. 252.

271. Wang H. Effects of the biocontrol agent *Aspergillus flavipes* on the soil microflora and soil enzymes in the rooting zone of pepper plants Infected with *Phytophthora capsici* / H. Wang, Z. Xinhua, L. Changyuan, L. Liu, Sh. Yu, Ch. Liang, T. Guan, M. Irfan, K. Zhao // J Phytopathol. – 2014 – P. 1–9.

272. Ward L. M. Draft genome sequences of a novel lineage of *Armatimonadetes* recovered from Japanese hot springs / L. M. Ward, S. E. McGlynn, W. W. Fischer // Genome Announcements. – 2017. – V. 5. – Is. 40. – P. 1–2.

273. Watanabe T. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species / T. Watanabe. – Florida: 2000. – P. 411.

274. Weber P. Influence of single trees on spatial and temporal patterns of belowground properties in native pine forest / P. Weber, R. D. Bardgett // Soil Biology & Biochemistry. – 2011. – V. 43. – P. 1372–1378.

275. Wu W. Ecological effects of soil properties and metal concentration on the composition and diversity of microbial communities associated with land use patterns in an electronic waste recycling region / W. Wu, C. Dong, J. Wu, X. Liu, Y. Wu, X. Chen, S. Yu. // Science of the Total Environment. – 2017. – V. 601-602. – P. 57–65.

276. Xu D. Microbial community compositions in different functional zones of Carrousel oxidation ditch system for domestic wastewater treatment / D. Xu, S. Liu, Q. Chen, J. Ni // AMB Expr. – 2017. – V. 40. – P. 2–13.

277. Yao H. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use / H. Yao, Z. He, M. J. Wilson, C. D. Campbell // Microb Ecol. – 2000. – Vol. 40. – P. 223–237.

278. Yilmaz M. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil / M. Yilmaz, H. Soran, Y. Beyatli // Microbiological research. – 2006. –

No. 161. – P. 127.

279. Zhang, H. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphateaccumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. / H. Zhang, Y. Sekiguchi, S. Hanada, P. Hugenholtz, H. Kim, Y. Kamagata, K. Nakamura // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2003. – No. 53. – P. 1155–1163.

280. Zimmermann J. Biocontrol agent *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* has no adverse affection indigenous total fungal communities and specific AMF taxa in contrasting maize rhizospheres / J. Zimmermann, M. K. Musyoki, G. Cadisch, F. Rasche // Fungal Ecology. – 2016. – V. 23. – P. 1–10.

**Приложение А Коэффициенты корреляции между некоторыми
параметрами почвы и морфометрические характеристики семян
хвойных**

Таблица 1 - Коэффициенты корреляции (r) между сеянцами сосны обыкновенной и лиственницы сибирской, pH, влажностью, температурой темно-серой почвы и численностью эколого-трофических групп микроорганизмов (2012–2013 гг.).

Месяц	Сеянцы	Численность микроорганизмов (млн КОЕ / г почвы), выросших на питательных средах			Абиотические факторы		
		гидролит ики	копиотро фы	олиготро фы	pH	Влажност ь, %	Т°С почвы
2012 г.							
Июнь	Сосна	0.02	-0.10	-0.72	-0.35	0.37	0.24
	Лиственница	-0.39	-0.21	0.10	-0.43	0.11	-0.27
Июль	Сосна	0.36	-0.26	-0.56	-0.62	0.83	0.20
	Лиственница	0.07	-0.12	0.42	0.64	-0.28	0.48
Август	Сосна	0.61	0.84	-0.56	-0.82	-0.14	-0.26
	Лиственница	-0.21	0.15	-0.12	0.16	-0.22	-0.89
Сентябрь	Сосна	-0.35	-0.54	0.81	0.11	0.32	0.69
	Лиственница	-0.46	-0.81	0.46	0.09	0.24	-0.60
2013 г.							
Май	Сосна	-0.65	-0.55	-0.84	-0.05	-0.62	-0.93
	Лиственница	-0.39	-0.64	-0.64	0.30	-0.70	0.09
Июль	Сосна	-0.35	-0.34	-0.42	0.31	-0.15	-0.85
	Лиственница	0.79	0.77	0.76	0.02	-0.50	-0.56
Август	Сосна	0.68	0.51	-0.72	0.46	0.53	-0.83
	Лиственница	0.85	0.48	-0.66	-0.17	0.42	-0.66
Сентябрь	Сосна	-0.12	-0.49	-0.07	0.49	0.69	0.46
	Лиственница	-0.77	-0.88	-0.69	0.82	0.62	0.44

Таблица 2 - Морфометрические характеристики сеянцев сосны обыкновенной и лиственницы сибирской (2012 г.)

Объект	Вариант обработки	Морфометрические показатели				
		Длина мутовки	Длина стебелька	Длина корня	Диаметр корневой шейки, мм	Сухой вес всего сеянца, г
		см				
сосна	К-1	2.10±0.48	1.73±0.46	5.43±0.87	0.27±0.17	0.04±0.03
	<i>Bacillus</i> sp.	1.56±0.13	2.24±0.18	7.34±0.29	0.24±0.05	0.02±0.01
	<i>Bacillus subtilis</i>	1.85±0.45	2.28±0.49	7.50±0.85	0.26±0.17	0.04±0.06
	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.90±0.05	2.50±0.06	5.39±0.09	0.32±0.02	0.06±0.01
	<i>Trichoderma harzianum</i>	1.92±0.04	2.31±0.05	5.99±0.07	0.30±0.02	0.05±0.01
	К-2	2.26±0.05	2.27±0.06	6.56±0.10	0.27±0.02	0.08±0.01
лиственница	К-1	1.20±0.07	1.80±0.07	6.80±1.21	0.20±0.34	0.20±0.02
	<i>Bacillus</i> sp.	1.70±0.60	1.30±0.60	13.7±1.77	0.20±0.07	0.20±0.07
	<i>Bacillus subtilis</i>	1.25±0.21	1.05±0.20	9.20±1.52	0.18±0.04	0.18±0.02

Таблица 3 - Коэффициенты корреляции (r) между численностью экологотрофических групп микроорганизмов, рН, влажностью и температурой темносерой почвы (2012-2013 гг.).

Месяц	Численность микроорганизмов (млн КОЕ / г почвы), выросших на питательных средах								Абиотические факторы
	гидролитики		копиотрофы		олиготрофы		грибы		
	С*	Л**	С*	Л**	С*	Л**	С*	Л**	
2012									
Июнь	-0.38	-0.01	0.15	0.36	0.38	-0.16	0.02	0.13	рН
	-0.26	-0.26	0.49	-0.04	-0.13	-0.61	-0.23	-0.11	Влажность, %
	0.20	0.06	-0.39	-0.33	-0.68	0.13	0.07	0.15	Т почвы, °С
Июль	0.06	-0.28	0.20	-0.02	0.27	0.29	-0.33	0.35	рН
	0.49	-0.02	-0.03	0.47	-0.17	-0.16	0.19	-0.28	Влажность, %
	0.66	-0.06	0.31	-0.46	0.34	-0.12	-0.06	0.29	Т почвы, °С
Август	-0.5	-0.39	-0.52	-0.39	0.14	0.25	-0.57	-0.47	рН
	0.37	-0.13	0.01	-0.39	0.13	0.08	-0.05	0.06	Влажность, %
	0.05	-0.18	0.27	-0.27	0.44	-0.29	-0.05	-0.03	Т почвы, °С
Сентябрь	-0.39	-0.23	-0.30	0.28	-0.13	0.37	-0.04	0.12	рН
	-0.17	0.01	0.36	-0.42	0.19	0.11	0.09	-0.27	Влажность, %
	-0.29	0.04	-0.61	0.46	-0.18	0.14	-0.01	0.41	Т почвы, °С
2013									
Май	0.34	-0.34	0.03	-0.09	-0.03	-0.40	-0.27	0.31	рН
	-0.04	0.37	0.25	0.22	0.59	0.10	-0.01	-0.27	Влажность, %
	0.09	0.27	-0.04	0.15	0.50	0.18	-0.50	-0.20	Т почвы, °С
Июль	-0.27	0.23	0.21	0.08	0.13	0.32	-0.15	-0.07	рН
	0.46	-0.24	-0.13	-0.57	-0.27	-0.49	-0.36	0.17	Влажность, %
	0.18	-0.49	-0.39	-0.33	-0.18	-0.15	-0.04	0.38	Т почвы, °С
Август	0.28	0.08	0.30	0.20	-0.16	-0.01	-0.02	-0.10	рН
	-0.36	0.15	-0.06	0.13	-0.05	-0.27	-0.08	-0.16	Влажность, %
	-0.21	-0.70	-0.60	-0.44	0.28	0.80	0.02	0.24	Т почвы, °С
Сентябрь	-0.09	-0.29	-0.07	0.03	-0.01	-0.06	-0.02	-0.21	рН
	0.11	-0.51	-0.39	-0.14	-0.26	0.08	-0.12	-0.30	Влажность, %
	-0.18	-0.18	-0.15	-0.31	-0.25	0.06	-0.12	0.15	Т почвы, °С

*С- сосна обыкновенная
**Л- лиственницы сибирская

Таблица 4 – Коэффициенты корреляции активности ферментов с ЭКТГМ и гидротермическими условиями почвы (2012 г.).

фермент	месяц	Эколого-трофическая группа микроорганизмов			Гидротермические условия почвы		
		гидролитики	копиготрофы	олиготрофы	pH	влажность, %	температура, °C
сосна							
Инвертаза	июнь	0.2	-0.1	-0.3	-0.5	-0.2	0.8
	сентябрь	-0.5	0.8	-0.3	0.4	0.4	-0.8
Фосфатаза	июнь	0.5	0.2	0.8	0.1	-0.6	-0.5
	сентябрь	0.8	-0.2	-0.4	-0.7	-0.8	-0.8
Уреаза	июнь	-0.01	0.98	0.7	-0.9	0.5	-0.9
	сентябрь	0.3	0.3	-0.5	-0.05	-0.4	0.2
Протеаза	июнь	-0.1	0.4	0.6	0.2	0.04	-0.5
	сентябрь	0.2	0.2	0.6	0.3	0.8	-0.04
лиственница							
Инвертаза	июнь	-0.4	0.4	0.5	-0.2	-0.3	0.4
	сентябрь	-0.6	0.4	-0.3	0.7	0.2	0.05
Фосфатаза	июнь	-0.6	-0.5	0.1	-0.8	-0.1	0.6
	сентябрь	-0.9	0.2	0.6	0.8	-0.1	0.1
Уреаза	июнь	-0.2	0.04	0.04	0.1	-0.01	-0.5
	сентябрь	-0.1	0.7	0.4	0.4	-0.3	0.9
Протеаза	июнь	0.02	-0.5	-0.2	-0.5	0.2	0.3
	сентябрь	0.6	0.6	-0.3	-0.3	-0.5	0.8

Таблица 5 - Коэффициенты корреляции (r) между микробной биомассой, базальным дыханием и qCO_2 , и pH, влажностью и температурой темно-серой почвы (2012 г.).

Вариант обработки	Микробная биомасса (МБ)	Базальное дыхание (БД)	Микробный метаболический коэффициент, qCO_2	Параметры почвы
сосна				
июнь	0.6	0.2	-0.5	pH
	0.01	-0.01	-0.1	влажность, %
	-0.4	-0.1	0.3	температура, °C
июль	-0.4	-0.6	0.04	pH
	0.5	0.8	0.2	влажность, %
	-0.1	0.4	0.7	температура, °C
август	-0.2	-0.2	0.2	pH
	0.5	0.4	-0.01	влажность, %
	-0.5	0.3	0.6	температура, °C
сентябрь	-0.4	0.1	0.5	pH
	-0.5	-0.01	0.3	влажность, %
	-0.3	-0.5	-0.1	температура, °C
лиственница				

Продолжение таблицы 5

Вариант обработки	Микробная биомасса (МБ)	Базальное дыхание (БД)	Микробный метаболический коэффициент, qCO_2	Параметры почвы
июнь	0.4	-0.1	-0.1	pH
	-0.2	-0.3	0.03	влажность, %
	-0.5	0.8	0.7	температура, °C
июль	0.3	0.3	0.1	pH
	-0.3	-0.9	-0.9	влажность, %
	-0.2	0.2	0.5	температура, °C
август	0.1	0.7	0.5	pH
	-0.1	0.6	-0.1	влажность, %
	-0.3	0.6	0.5	температура, °C
сентябрь	-0.8	-0.4	0.8	pH
	0.5	0.8	-0.02	влажность, %
	-0.5	-0.3	0.2	температура, °C

Таблица 6 - Коэффициенты корреляции (r) между численностью экологотрофических групп микроорганизмов, pH, влажностью, температурой темносерой почвы и сеянцами сосны (2014 г.).

Месяц	Сеянцы	Численность микроорганизмов (млн КОЕ / г почвы), выросших на питательных средах			Абиотические факторы почвы		
		гидролити-ки	копиотро-фы	олиготро-фы	pH	Влажность, %	T°C почвы
2014 г							
июль	сосна	0.51	0.30	0.98	-0.76	0.28	-0.28
август		-0.53	0.06	-0.28	0.11	0.70	-0.45
сентябрь		0.23	-0.25	0.94	-0.15	-0.69	0.37
2015 г							
июнь	сосна	0.14	-0.18	-0.19	0.38	0.37	0.30
июль		0.61	-0.59	0.11	-0.27	-0.47	0.01
август		-0.20	-0.35	-0.26	-0.28	-0.48	0.02
сентябрь		0.46	-0.24	0.02	-0.29	-0.58	-0.67

Таблица 7 - Морфометрические характеристики сеянцев сосны обыкновенной в конце второго вегетационного сезона (сентябрь) 2015 г.

Вариант обработки	Морфометрические показатели				
	Длина мутовки	Длина стебелька	Длина корня	Диаметр корневой шейки, мм	Сухой вес всего сеянца, г
	см				
Контроль	7.40±0.68	3.25±0.45	14.68±0.96	1.21±0.27	0.37±0.15
<i>Trichoderma harzianum</i>	9.40±0.38	3.80±0.24	12.30±0.44	1.41±0.15	0.55±0.09
<i>Trichoderma lignorum</i>	11.20±0.4 2	2.99±0.22	11.80±0.43	1.59±0.16	0.72±0.11

Продолжение таблицы 7

Вариант обработки	Морфометрические показатели				
	Длина мутовки	Длина стебелька	Длина корня	Диаметр корневой шейки, мм	Сухой вес всего сеянца, г
	см				
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	9.03±0.3 0	3.23±0.18	11.72±0.34	1.39±0.12	0.46±0.07
CuSO ₄	9.98±0.2 8	3.16±0.17	8.91±0.26	1.04±0.11	0.45±0.06

Таблица 8 - Коэффициенты корреляции (r) между численностью экологотрофических групп микроорганизмов, pH, влажностью и температурой темносерой почвы (вегетационный сезон, 2014-2015 гг.).

Месяц	Численность микроорганизмов (млн КОЕ / г почвы), выросших на питательных средах				Абиотические факторы
	гидролитики	копиотрофы	олиготрофы	грибы	
2014 г					
Июнь	0.30	-0.43	0.06	-0.20	pH
	0.16	0.71	-0.24	-0.30	Влажность, %
	-0.07	-0.18	-0.23	-0.57	Т почвы, °C
Июль	-0.36	-0.23	-0.74	-0.16	pH
	0.56	0.97	0.30	0.07	Влажность, %
	-0.50	-0.50	-0.32	-0.60	Т почвы, °C
Август	0.45	0.17	0.48	0.37	pH
	0.11	0.37	0.35	0.06	Влажность, %
	-0.17	-0.75	-0.25	0.58	Т почвы, °C
Сентябрь	0.71	-0.29	-0.11	0.53	pH
	0.02	0.14	-0.63	0.22	Влажность, %
	0.09	-0.32	0.35	0.38	Т почвы, °C
2015 г					
Июнь	0.53	-0.26	-0.32	0.76	pH
	0.38	-0.83	0.50	-0.08	Влажность, %
	0.14	0.19	-0.94	0.50	Т почвы, °C
Июль	-0.26	-0.12	0.10	0.55	pH
	-0.24	0.22	-0.47	0.18	Влажность, %
	-0.22	-0.47	-0.41	-0.47	Т почвы, °C
Август	0.58	0.64	0.58	0.38	pH
	0.33	0.19	0.01	-0.24	Влажность, %
	-0.55	-0.54	-0.37	-0.29	Т почвы, °C
Сентябрь	-0.02	0.32	0.14	-0.11	pH
	0.33	0.82	0.68	-0.11	Влажность, %
	-0.93	-0.37	-0.68	0.55	Т почвы, °C

Таблица 9 – Коэффициенты корреляции активности ферментов с ЭКТГМ и гидротермическими условиями почвы (2014 г.).

фермент	месяц	Эколого-трофическая группа микроорганизмов			Гидротермические условия почвы		
		гидролитики	копиотрофы	олиготрофы	pH	влажность , %	температу ра, °C
сосна							
Инвертаза	июнь	-0.08	-0.05	0.10	-0.68	0.48	-0.92
	сентябрь	0.28	0.61	0.54	-0.33	-0.51	-0.51
Фосфатаза	июнь	-0.65	-0.09	0.30	-0.03	-0.63	0.28
	сентябрь	0.66	-0.09	0.02	0.93	0.66	0.43
Протеаза	июнь	-0.11	-0.13	0.65	0.33	-0.12	-0.14
	сентябрь	-0.32	-0.09	0.04	-0.57	0.19	0.04
Полифенолоксидаза	июнь	-0.18	-0.30	-0.04	0.32	-0.59	0.93
	сентябрь	0.23	0.33	-0.08	0.50	0.68	0.56
Пероксидаза	июнь	0.65	-0.05	-0.34	-0.15	0.53	-0.78
	сентябрь	0.60	0.32	-0.12	0.70	0.63	0.27

Таблица 10 - Коэффициенты корреляции (r) между микробной биомассой, базальным дыханием и qCO_2 , и pH, влажностью и температурой темно-серой почвы (2014-2015 гг.).

Месяц	Микробная биомасса (МБ)	Базальное дыхание (БД)	Микробный метаболический коэффициент, qCO_2	Абиотические параметры
2014				
Июнь	0.3	-0.3	-0.3	pH
	0.6	-0.3	-0.5	Влажность, %
	-0.3	0.5	0.5	Температура, °C
Июль	0.5	0.9	-0.2	pH
	-0.3	-0.6	0.1	Влажность, %
	0.8	0.5	-0.8	Температура, °C
Август	0.2	0.04	-0.2	pH
	-0.5	-0.2	0.1	Влажность, %
	-0.9	-0.4	0.3	Температура, °C
Сентябрь	0.4	0.7	0.7	pH
	0.9	0.6	-0.5	Влажность, %
	0.5	0.4	-0.1	Температура, °C
2015				
Июнь	-0.3	-0.1	0.3	pH
	-0.7	-0.7	-0.4	Влажность, %

Продолжение таблицы 10

Месяц	Микробная биомасса (МБ)	Базальное дыхание (БД)	Микробный метаболический коэффициент, $q\text{CO}_2$	Абиотические параметры
Июнь	-0.2	-0.3	-0.2	Температура, °C
Июль	-0.2	0.1	0.4	pH
	0.1	0.1	-0.01	Влажность, %
	0.6	0.3	-0.3	Температура, °C
Август	0.4	-0.3	-0.4	pH
	-0.1	0.2	0.2	Влажность, %
	0.5	-0.2	-0.3	Температура, °C
Сентябрь	0.2	0.7	0.4	pH
	-0.3	0.5	0.8	Влажность, %
	0.01	0.7	0.6	Температура, °C

Таблица 11 - Коэффициенты корреляции (r) между численностью эколого-трофических групп микроорганизмов, pH, влажностью, температурой темно-серой почвы и сеянцами сосны (2016 г).

Месяц	Численность микроорганизмов (млн КОЕ / г почвы), выросших на питательных средах			Абиотические факторы почвы		
	Гидро литики	Копио трофы	Олиго трофы	pH	Влажность, %	Т°С почвы
Сосна, июнь	-0.04	0.02	-0.27	0.27	-0.15	-0.16
Сосна, июль	-0.24	-0.11	-0.27	-0.03	-0.13	-0.24
Сосна, август	-0.21	-0.03	-0.40	0.04	-0.64	-0.08
Сосна, сентябрь	-0.25	-0.08	0.08	0.43	-0.65	-0.04

Таблица 12 - Морфометрические характеристики сеянцев сосны обыкновенной в начале второго вегетационного сезона (май, 2017 г).

Вариант обработки	Морфометрические показатели				
	Длина мутовки	Длина стебелька	Длина корня	Диаметр корневой шейки, мм	Сухой вес всего сеянца, г
	см				
Контроль (H ₂ O)	0.32±0.2	3.2±0.2	10.0±1.2	0.32±0.02	0.11±0.02
Шелуха гречихи + 5% NaOH	1.2±0.2	3.3±0.2	8.5±0.3	0.26±0.01	0.14±0.07
<i>Trichoderma harzianum</i>	3.1±0.25	3.6±0.09	8.9±0.3	0.36±0.01	0.15±0.01
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	4.3±0.3	3.5±0.2	9.04±0.6	0.7±0.13	0.16±0.01

Таблица 13 - Коэффициенты корреляции (r) между численностью эколого-трофических групп микроорганизмов, pH, влажностью и температурой темно-серой почвы (второй вегетационный сезон, 2016 г).

Месяц	Численность микроорганизмов (млн КОЕ / г почвы), выросших на питательных средах				Абиотические факторы
	гидролитики	копиотрофы	олиготрофы	грибы	
Июнь	-0.26	0.20	-0.01	-0.37	pH
	-0.26	-0.01	0.01	-0.08	Влажность, %
	0.05	0.38	0.58	-0.12	Т почвы, °C
Июль	-0.01	-0.02	0.44	-0.29	pH
	-0.61	-0.30	0.24	0.11	Влажность, %
	-0.16	-0.22	-0.09	-0.04	Т почвы, °C
Август	0.78	0.04	0.45	0.01	pH
	0.32	0.38	0.61	-0.09	Влажность, %
	0.06	0.13	0.46	-0.10	Т почвы, °C
Сентябрь	-0.50	-0.51	-0.29	-0.16	pH
	-0.13	-0.01	0.12	-0.12	Влажность, %
	-0.43	-0.44	-0.23	-0.13	Т почвы, °C

Таблица 14 - Коэффициенты корреляции (r) между микробной биомассой, базальным дыханием и $q\text{CO}_2$, и pH, влажностью и температурой темно-серой почвы (2016 г).

Месяц	Микробная биомасса (МБ)	Базальное дыхание (БД)	Микробный метаболический коэффициент, $q\text{CO}_2$	Абиотические параметры
Июнь	-0.03	0.01	-0.07	pH
	-0.01	0.24	0.12	Влажность, %
	-0.07	0.29	0.18	Температура, °C
Июль	-0.47	-0.39	0.26	pH
	-0.07	-0.76	-0.42	Влажность, %
	-0.08	-0.10	0.12	Температура, °C
Август	0.06	-0.10	-0.10	pH
	-0.29	0.07	0.31	Влажность, %
	-0.18	0.36	0.46	Температура, °C
Сентябрь	0.05	0.06	-0.03	pH
	0.25	0.01	-0.23	Влажность, %
	-0.03	0.06	0.08	Температура, °C

Таблица 15 – Коэффициенты корреляции активности ферментов с ЭКТГМ и гидротермическими условиями почвы (2016 г.).

фермент	месяц	Эколого-трофическая группа микроорганизмов			Гидротермические условия почвы		
		гидролитики	копиготрофы	олиготрофы	pH	влажность , %	температур а, °C
сосна							
Инвертаза	июнь	0.13	-0.48	-0.70	-0.34	-0.60	-0.53
	сентябрь	-0.42	-0.19	-0.13	0.06	0.45	0.13
Фосфатаза	июнь	-0.42	-0.47	0.10	-0.35	-0.23	-0.14
	сентябрь	0.06	0.26	0.38	0.08	0.02	-0.10
Уреаза	июнь	0.03	0.16	-0.02	-0.33	-0.08	-0.45
	сентябрь	-0.07	-0.34	-0.28	-0.04	0.04	0.52
Полифенолок сидаза	июнь	-0.55	-0.28	-0.12	0.21	0.71	0.05
	сентябрь	0.31	0.26	0.54	-0.08	0.29	-0.13
Пероксидаза	июнь	0.74	0.42	-0.23	-0.12	-0.10	0.01
	сентябрь	0.53	0.33	0.43	-0.31	0.59	-0.23