

Ефекти от осемгодишно торене и варуване на пасища от типа *Danthonia alpina* в планинския район на Република Сърбия

Владимир Зорнич¹, Зоран Лугич¹, Неделико Рачич¹, Снежана Анджелкович¹, Далибор Томич², Йордан Маркович¹, Джордже Лазаревич¹, Миряна Петрович¹

¹Институт за фуражни култури Крушевац, Крушевац, Сърбия
²Агрономически факултет, Университет Крагуевац, Чачак, Сърбия

The Effects of Eight Years of Liming and Fertilizer Addition on the *Danthonia alpina* Type Grassland in the Mountain Region of Republic of Serbia

Vladimir Zornić¹, Zoran Lugić¹, Nedeljiko Racić¹, Snežana Anđelković¹, Dalibor Tomić², Jordan Marković¹, Đorđe Lazarević¹, Mirjana Petrović¹

¹Institute for forage crop Kruševac, Kruševac, Serbia
²Faculty of Agronomy, University of Kragujevac, Čačak, Serbia
E-mail: vladimir.zornic@ikbks.com

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

Използването на минерални торове променя флористичния състав на тревните съобщества и увеличава продуктивността. По-малко са обаче проучванията за средносрочните (5-10 години) ефекти на минералните торове върху добива и флористичния състав, особено върху промените в почвения микробиом. След период от осем години (2012-2020) е наблюдаван ефектът на торовете (**контрола** - без торове, , **PK**-60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O, **N20PK**-20 kg ha⁻¹ N, 60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O, **N80PK**-80 kg ha⁻¹ N, 60 kg

SUMMARY

The use of mineral fertilizers changes the floristic composition of grassland communities and increases productivity. However, fewer studies have been conducted on the medium-term (5–10 years) effects of mineral fertilizers on yield and floristic composition, particularly on changes in soil microbiom. After eight years (2012-2020), the effect of fertilizers (**control** – no fertilizers, **PK**-60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O, **N20PK**-20 kg ha⁻¹ N, 60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O, **N80PK**-80 kg ha⁻¹ N, 60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O, and

ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O, and **N140PK**-140 kg ha⁻¹ N, 60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O) и варуване (**без вар** и **вар** с 1 t/ha) върху тревните съобщества на *Danthonia alpina* Vest (syn *Danthonia calycina*). Изследвахме ефектите от обработката върху производителността и дела на житните растения (семејство *Poaceae*), бобовите (семејство *Leguminosae*) и разнотреви (други видове).

Почвеният микробиом беше идентифициран чрез анализиране на броя на: общия брой микроби, гъбичките, свободно живеещите азотфиксиращи организми и актиномицетите. Третирането с РК стимулира бобовите растения, докато тревното покритие намаля. Също така, с увеличаването на добавения азот, тревното покритие се увеличи.

Варуването значително увеличава общото количество на микроорганизмите и актиномицетите, докато броят на гъбите е значително намален. Третирането N20PK включваше най-голямо количество микроби и гъби, докато третирането РК съдържа най-голям брой актиномицети и свободни азотфиксиращи вещества. Според получените резултати, третиранията с торове показват значително увеличение на добива и той постепенно нараства с увеличаване на прилагания азот. Най-високият добив в сравнение с контролата (1,8 t ha⁻¹) е постигнат при N140PK (5,68 t ha⁻¹), но той не се различава съществено от този при N80PK (5,27 t ha⁻¹). Добивът не е значително увеличен чрез повишаване на азотното съдържание от 80 t ha⁻¹ до 140 t ha⁻¹, но числеността на повечето от изследваните видове микроби драстично намалява, така че тази доза не е напълно подходяща.

Ключови думи: микробиом, брой микроби, , треви, NPK торове

N140PK-140 kg ha⁻¹ N, 60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O) and liming (**no lime** and **lime** with 1 t/ha) on the grassland community of *Danthonia alpina* Vest (syn *Danthonia calycina*) were observed.

We researched the effects treatments on productivity and share of grasses (Fam *Poaceae*), legumes (fam *Leguminosae*) and forbs (other species).

Soil microbiome have been identified by analyzing the number of: total microbial count, fungi, free living nitrogen fixers and actinomycetes.

PK treatments stimulated legumes, while grass cover decreased. Also increasing nitrogen added, grass cover abundance has risen.

Liming significantly increased the total number of microorganisms and actinomycetes, while the number of fungi was significantly reduced.

Treatment N80PK involved the greatest amount of microbes and fungus, whereas treatment PK contained the highest number of actinomycetes and free nitrogen fixers. According to the results, fertilizer treatments showed a significant increase yield and it gradually rose as applied nitrogen increased. The highest yield compared to the control (1,8 t ha⁻¹) was achieved in N140PK (5,68 t ha⁻¹), however, it was not significantly different to the N80PK (5,27 t ha⁻¹).

The yield was not significantly increased by raising the nitrogen content from 80 t ha⁻¹ to 140 t ha⁻¹, but abundance of the most of examined groups of microorganisms significantly decreased, so the dose N140PK is not completely appropriate.

Key words: microbial count, legumes, grasses, NPK fertilizers

УВОД

Осигуряването на хранителни вещества е един от най-важните начини за стимулиране на продуктивността в полуестествените тревостои (Shelberg and Pontes, 2012). Торенето води до увеличаване на добива на тревостоя, качеството на биомасата (Zornić, 2020) и пасищната стойност (Duru et al., 1998). То е и основен инициатор на промени във видовия състав и е свързано с функциите и услугите на тревните съобщества. Повишаването на добива, чрез добавяне на торове, се дължи на увеличаване на тревите и други по-продуктивни и по-силно конкурентни видове (Wesche et al., 2012). По този начин се променя структурата на тревостоя (Honsova et al., 2007; Smith et al., 2008) и той се превръща в храсталаци, които се състоят от няколко продуктивни и по-силно конкурентни видове (Isselstein et al., 2005). Като последица от добавянето на торове видовото богатство на тревните съобщества е намаляло в Централна и Западна Европа (De Vries et al., 2002). Богатите на видове тревни съобщества са се разпространили в малки маргинални райони, където не е прилагано торене (Krauss et al., 2010).

Промяната на състоянието на хранителните вещества и ботаническият състав води до промяна на броя на микроорганизмите в почвата като важни и съществени представители на почвената екосистема и функция (Broeckling et al., 2008). Те участват в разграждането на органичната материя, в цикъла на хранителните вещества, като N, P и Fe, или като регулират нивата на растителните хормони. Те могат да стимулират растежа директно, като подобряват достъпа на растенията до хранителни вещества, докато непрекият ефект е свързан с инхибирането на почвените патогени, като по този начин растежът и развитието се увеличават (Shilev et

INTRODUCTION

Nutrient supply is one of the most important way for promoting productivity in seminatural grasslands (Schellberg and Pontes, 2012). Fertilizing cause increasing herbage yield, quality biomass (Zornić, 2020), and pastoral value (Duru et al., 1998).

It is also a major species composition change initiator and it is related to functions and services grassland community. Increasing yield, by fertilizers addition, is caused by increasing of grasses and others more productive and stronger competitive species (Wesche et al., 2012).

In that way grassland vegetation structure changes (Honsova et al., 2007; Smith et al., 2008), and it has converted into swards which makes of a few productive and stronger competitive species (Isselstein et al., 2005).

As a fertilizers addition consequence, grasslands species richness have decreased across Central and Western Europe (De Vries et al., 2002).

Species-rich grasslands have spread in small marginal areas, where no fertilization did apply (Krauss et al., 2010).

Change nutrient status and botanical composition, leads change microbial count in soil as important and essential representatives of the soil ecosystem and function (Broeckling et al., 2008).

They have involved in the decomposition of organic matter, nutrient cycles such as N, P, and Fe, or by regulating the levels of plant hormones.

They may stimulate the growth directly by improving plant access to nutrients, while indirect effect is related to the inhibition of soil pathogens, thus the growth and development increase (Shilev et al., 2021).

al., 2021). Всички групи микроорганизми имат специфична роля в екологичните процеси в почвата, а броят им показва продуктивността на биологичния статус на почвата (Milošević et al., 2007). Общият брой на микроорганизмите е изключително важен за създаването и поддържането на почвеното плодородие, тъй като допринася за биологичната достъпност на хранителните вещества (Rashid et al., 2016). Почвените гъбички регулират ключови екосистемни процеси, включително първичната продуктивност на растенията и минерализацията на въглерода (Lekberg et al., 2021).

Свободно живеещите азотфиксатори, обитаващи почвите, могат да допринесат значително за азотните запаси и да играят важна роля за плодородието, особено в екосистеми с малко външно азотно хранене. Actinomyцетите представляват група организми, които обхващат значителна част от почвената микрофлора (Takisawa et al., 1993). Те активно разграждат органичната материя, осигуряват вещества, които действат благоприятно върху физиологичните процеси в растенията (Kumar et al., 2010), и такива, които потискат растителните патогени (Getha et al., 2005).

Целта на изследването е да се проучи промяната в ботаническия състав, добива и броя на микроорганизмите в почвата, в резултат на внесените минерални торове.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Местоположения и климатични условия

Полският експеримент се проведе в Митрово поле в Централна Сърбия, община Александровац (43°30' н.ш., 20°52' н.в.). Тревостоят е

All microbe groups have specific role in soil ecological processes, and their number indicate biological soil status/productivity (Milošević et al., 2007).

The total number of microorganisms is extremely important for the creation and maintenance of soil fertility because contribute to nutrients bioavailability (Rashid et al., 2016).

Soil fungi regulate key ecosystem processes, including plant primary productivity and carbon mineralization (Lekberg et al., 2021).

Free living nitrogen fixers inhabiting soils can significantly contribute to the nitrogen budgets and play an important role in maintaining soil fertility.

Actinomyцetes represent a group of organisms which encompass the significant share of the soil micro-flora (Takisawa et al., 1993).

They actively decompose organic matter, provide substances that act favorably on physiological processes in plants (Kumar et al., 2010), and those that suppress plant pathogens (Getha et al., 2005).

The study was aimed to research change botanical composition, yield and microbial count in soil which is influenced by eight years fertilizers and lime application.

MATERIAL AND METHODS

Locations and weather conditions

The field experiment was located at Mitrovo Polje in the central Serbian municipality of Aleksandrovac (latitude 43°30'N°, longitude 20°52'E).

категоризиран като *Danthonietum calycinae* (Cincović and Kojić, 1962) и е развит в изключително кисела почва (рН KCl 4,09). Малкото съдържание на фосфор (2,65 mg kg⁻¹) и калий (7,96 mg kg⁻¹) в почвата, в съчетание с високото ниво на органично вещество (8,96%), показва дисбаланс между основните хранителни елементи и органичната материя, която в известна степен може да компенсира липсата на минерали. Преди създаването на трасето, ливадата е била косена ежегодно за сено през лятото с електрическа косачка. След първата коситба ливадата е била използвана за паша от говеда.

Умерените стойности на температурата на въздуха и валежите характеризират местоположението на трасето (Таблица 1).

The grassland community classified as *Danthonietum calycinae* (Cincović and Kojić, 1962) and it was developed in extremely acid soil (pH KCl 4.09 which is characterized by small content in phosphorus (2.65 mg kg⁻¹) and potassium (7.96 mg kg⁻¹) and high level of organic matter (8.96%).

Before the trail established, the meadow, had cut annually for hay in the summer using an electric hay mower. After the first cut the grassland was grazed with cattle.

The moderate air temperature and precipitation values characterized trail location (Table 1).

Таблица 1. Средна температура и валежи през периода на изследване (2012-2020)

Table 1. Mean temperature and precipitation in during research period (2012-2020)

Месеци / Months	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Средна температура (°C) / Average temperature (°C)	-											
	0.3	1.2	2.2	7.7	11.0	14.3	17.1	17.0	12.3	8.2	4.3	0.9
Сума валжи (mm) / Precipitation sum (mm)	69	59	114	109	152	141	110	95	84	92	132	85

Експеримент

Експериментът беше започнат през 2012 г. с разделен блоков дизайн и три повторения. Площта на всеки участък беше 10 м². Торове бяха приложени в началото на експеримента, а оценката беше извършена през 2020 г., след осем години..

Участъците бяха отделени с защитни ивици от 0,5 м вътре в блоковете и 1 м между блоковете.

Experiment

The field experiment was set up 2012 and it was arranged in a split plot design, and research was done after eight years fertilizers added, 2020. Plot was 10 m² in size, in 3 replications.

Plots was separated with protection borders of 0.5 m within blocks and 1 m between blocks. We researched influence

Изследвани бяха влиянието на минералните торове (**контрол** – без торове, **PK**-60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O, **N20PK**-20 kg ha⁻¹ N, 60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O, **N80PK**-80 kg ha⁻¹ N, 60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O and **N140PK**-140 kg ha⁻¹ N, 60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O) и варуването (без вар и варуване с 1 t ha⁻¹). Варуването беше извършено ръчно като повърхностно третиране в началото на експеримента през есента на 2012 г. и отново пет години по-късно през 2017 г. Варовият материал беше хидратирана вар (Ca(OH)₂). Фосфорът и калият бяха приложени по 60 kg ha⁻¹ всяка есен. Фосфорът беше добавен като суперфосфат (P₂O₅, 18.5% фосфор), а калият като калиев хлорид (KCl, 60% калий). Азотът беше добавен всяка година през средата на март под формата на амониев нитрат (NH₄NO₃ - 33%).

Анализ на растителния състав

Преди първата коситба през 2021 г. покритието и изобилието на всеки вид във всяко третиране е оценено с помощта на шесткласната скала на Braun-Blanquet (+ = <1%, 1 = 1-10%, 2 = 10-25%, 3 = 25-50%, 4 = 50-75%, 5 = 75-100%).

Покритието е оценено в различни участъци (три повторения). Стойностите по скалата на Braun-Blanquet бяха преобразувани в проценти (+ = 0,5%, 1 = 5%, 2 = 17,5%, 3 = 37,5%, 4 = 62,5%, 5 = 87,5%).

На база на метода на Браун-Бланке, изчислихме относителния дял на житни (сем. *Poaceae*), бобови (сем. *Fabaceae*) и разнотреви (останалите видове).

Анализ на почвата

Почвените проби, използвани за микробиологични анализи, бяха взети от ризосферата на дълбочина 0 до 20 см. Вземането на пробите беше извършено с почвен пробовземач в началото на юни, по същото време,

of application mineral fertilizers (**control** – no fertilizers, **PK**-60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O, **N20PK**-20 kg ha⁻¹ N, 60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O, **N80PK**-80 kg ha⁻¹ N, 60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O and **N140PK**-140 kg ha⁻¹ N, 60 kg ha⁻¹ P₂O₅, 60 kg ha⁻¹ K₂O) and liming (no lime and lime with 1 t ha⁻¹).

Lime was applied by hand as a surface treatment at the start of the trial in the fall of 2012 and again five years later in 2017.

Liming material was hydrated lime (Ca(OH)₂). The phosphorus and potassium were applied at 60 kg ha⁻¹ in autumn, each years. Phosphorus was added as single superphosphate (P₂O₅, 18.5 % phosphorus), and potassium as potassium chloride (KCl, 60 % potassium). Nitrogen was in mid-March, every year in the form of ammonium nitrate (NH₄NO₃ - 33%).

Plant composition analyses

Prior to the first cut in 2021, the cover-abundance of each species in each treatment was estimated using the six-class Braun-Blanquet scale (+ = <1%, 1 = 1-10%, 2 = 10-25%, 3 = 25-50%, 4 = 50-75%, 5 = 75-100%).

Cover-abundance was estimated in different plots (three replications). The Braun-Blanquet scale values were converted to percentages (+ = 0.5%, 1 = 5%, 2 = 17.5%, 3 = 37.5%, 4 = 62.5%, 5 = 87.5%).

Based of Braun-Blanquet releve we calculated share of grasses (fam *Poaceae*), legumes (fam. *Fabaceae*) and forbs (other species)

Soil analyses

The soil samples, which used for microbiological analyses, were collected from the rhizosphere at a depth of 0 to 20 cm. Sampling was performed by a soil sampler, in the beginning of June, as the same time as Braun-Blanquet cover was

когато беше извършена оценката по скалата на Браун-Бланке. Почвени проби бяха взети от всяко третиране в три повторения. Всяка проба е анализирана в три повторения в микробиологичната лаборатория и е изчислена средната стойност за всяка. Броят на микроорганизмите е определен по метода на разреждането върху подходящи хранителни среди: агаризиран почвен екстракт за общия брой микроорганизми, синтетичен агар за броя на актиномицетите, агар на Чапек за броя на гъбите и среда на Фьодоров за броя на свободно живеещите азотфиксиращи организми. Микроорганизмите бяха кумулирани при температура 28°C. Броят на израсналите колонии е изчислен на 1 g абсолютно суха почва (Jarak and Djurić, 2006). Броят на микроорганизмите беше изразен в логаритмичен вид - логаритмично число.

Статистика

За установяване на значими разлики между обработките по отношение на продуктивността и броя на почвените микроорганизми в почвата беше приложен дисперсионен анализ (ANOVA), последван от post hoc сравняване с помощта на Post-hoc теста на Фишер ($\alpha < 0,05$).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Третирането с азот стимулира тревната покривка (Фигура 1) и тя постепенно расте с увеличаването на количеството азот. Същият резултат е отчетен и от Lazarević et al., 2009; Zornić et al., 2019, в същото тревно съобщество *Danthonietum alpinae*. Те регистрират, че прилагането на минерални торове с азот насърчава развитието на тревните видове, като най-голям ефект има при третиранията с най-голямо количество азот. Авторите също така, съобщават, че тревното покритие е намаляло при третиранията с азот и това съвпада с нашето изследване. Всъщност

estimated. Soil samples were taken from each treatment, in three replications. Each samples was analyzed in three repetitions in the microbiological laboratory, and calculate average for each soil samples.

The number of microorganisms was determined using the dilution method on appropriate nutrient media: agarised soil extract for the total number of microorganisms, synthetic agar for the number of actinomycetes, Chapek agar for the number of fungi and Feodorov medium for the number of free-living nitrogen-fixers.

Microorganisms were cultured at the temperature of 28°C. The number of grown colonies was calculated per 1 g of absolutely dry soil (Jarak and Djurić, 2006). The microorganisms number was expressed in a logarithmic - log of number.

Statistics

Analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc comparison using the Fisher's post-hoc test ($\alpha < 0.05$) was applied to identify significant differences between the treatments in terms of productivity and soil microbial count in soil.

RESULTS AND DISCUSSION

Treatments with nitrogen promoted grasses cover (Figure 1) and it was gradually increased with increasing amount of nitrogen.

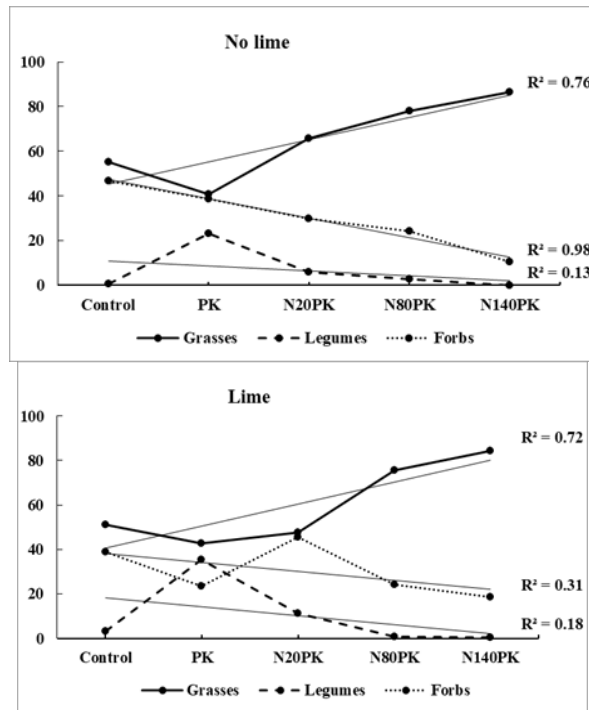
The same result was also reported by Lazarević et al., 2009; Zornić et al., 2019, in the same grassland community *Danthonietum alpinae*. They recorded that application mineral fertilizers with nitrogen promoted grass species and the highest effect was in treatments with the largest nitrogen amount.

The authors also, reported that forbs cover decreased in treatments with

богатите на азот минерални торове насърчават бързорастящите треви, които оказват вредно въздействие върху останалите чрез по-високата си конкурентоспособност за светлина, хранителни вещества вода и т.н. (Midolo et al., 2018). Добавянето на РК торове стимулира бобовите растения и покритието им се увеличава. Прилагането на калий и фосфор за по-дълъг период от време увеличава броя на бобовите растения, което в резултат увеличава продуктивността и директно подобрява качеството на фуража (Hejzman et al., 2010). Подобни резултати са отчетени от Galka et al., (2005), Zornić et al., (2019). Съвсем сходен ефект са имали минералните торове във варовитите участъци без варуване.

nitrogen and it agrees with our investigation. Actually, nitrogen-rich mineral fertilizer promotes fast-growing grass species, which have a detrimental effect on others by their higher competences for light, nutrients water etc. (Midolo et al., 2018).

Addition PK fertilizers stimulated legumes, and its cover increased. Applying potassium and phosphorus for a longer period of time increased the number of legumes, which in effect increased productivity and directly improved the quality of the feed (Hejzman et al., 2010). Similar results were reported by Galka et al., (2005), Zornić et al., (2019). Quite similar effect mineral fertilizers had in lime on no limed plots.



Фиг. 1. Влияние на торенето и варуването върху ботанични групи растения в тревостоя *Danthonia alpina*

Fig. 1. Influence fertilizing and liming on share grasses (fam *Poaceae*), legumes (fam. *Leguminosae*) and forbs (other species) in *Danthonia alpina* grassland

При всички третираня се наблюдава забележимо увеличение на добива след деветгодишното прилагане на минерални торове (Таблица 2). При третиранията с РК добивът се е увеличил поради увеличаване на дела на бобовите растения, които са по-продуктивни и осъществяват процеса на биологично свързване на азота, което е оказало положително влияние върху увеличението на добива. При третиранията с азот преобладават тревите, които използват азота по-ефективно от другите растения, което оказва пряко влияние върху добива Aliegorić Grbić (2005). В тези изследвания беше наблюдавано, че с увеличаването на количеството приложен азот в торовете NPK, настъпва постепенно увеличаване на добива. Въпреки това, не бяха установени значителни разлики между N80 и N140 (Таблица 2).

Според Lazarević et al., 2009, добивът на сухо вещество е значително увеличен чрез прилагане на минерален азот (60, 80 и 100 kg ha⁻¹) в съобществото *Danthonietum calycinae* заедно с фосфор и калий (30 kg ha⁻¹). Въпреки това, увеличението на добива от 80 kg ha⁻¹ до 100 kg ha⁻¹ не е статистически значимо, което е в съгласие с нашето изследване. Подобен резултат в съобществото *Agrostietum vulgare* регистрират Tomić et al., (2013).

Минералното торене води до значително увеличение на общия брой микроорганизми при всички обработки (Таблица 2, Фигура 2). Броят на микроорганизмите и дехидрогеназната активност се използват като едни от показателите за общата микробиологична активност и потенциалното плодородие на почвата (Milošević et al., 2007). Почвените микробни съобщества са отговорни за кръговрата на хранителните вещества в тревостоите, включително за

All treatments showed a notable increase in yield following the nine-year application of mineral fertilizers (Table 2).

In the PK treatments, the yield increased due to the increase in the share of legumes that are more productive and that carry out the process of biological nitrogen fixation, which had a positive effect on the increase in yield.

In the nitrogen-applied treatments, grasses predominated, and they utilized nitrogen more effectively than other plants, which had a direct impact on yield Aliegorić Grbić (2005).

In these studies, it was observed that with the increase in the amount of applied nitrogen, within NPK fertilizers, there was a gradual increase in the yield, but differences between N80 and N140 was no significant Table 2.

According to Lazarević et al 2009, dry matter yield was greatly increased by applying mineral nitrogen (60, 80, and 100 kg ha⁻¹) to the *Danthonietum calycinae* community along with phosphorus and potassium (30 kg ha⁻¹). However, the yield increase from 80 kg ha⁻¹ to 100 kg ha⁻¹ was not statistically significant, what agree with our investigation. Similar result in *Agrostietum vulgare* community recorded Tomić et al., (2013).

Mineral fertilization led to a significant increase in total microbial counts in all treatments (Table 2, Figure 2).

The number of microorganisms and dehydrogenase activity are used as some of the indicators of the general microbiological activity and potential soil fertility (Milošević et al., 2007).

Soil microbial communities are responsible for the cycling of nutrients in the grassland ecosystems including soil fertility, in the decomposition of native

почвеното плодородие, при разграждането на местната органична материя и минерализацията на растителните хранителни елементи (Castro et al., 2010). Минералното торене в нашето изследване, доведе до значително увеличение на общия брой микроби във всички обработки, и това съответства на резултатите, получени от Zornić et al., (2019).

organic matter and mineralization of plant nutrient elements (Castro et al., 2010).

Mineral fertilization in our research, led to a significant increase in total microbial counts in all treatments, and it consistent with the results obtained by Zornić et al., (2019).

Таблица 2. Влияние на третирането върху добива и числеността на микробните групи (средни стойности ± стандартни отклонения)
Table 2. Effect of treatments on yield and microbial groups abundance (means ± standard deviations)

		Добив на сухо вещество / Dry matter yield	Общ брой микроорганизми / Total number microorganisms	Гъбички / Fungi	Свободни азотфиксиращи бактерии / Free nitrogen-fixing bacteria	Актиномицети / Actinomycetes
Торене / Fertilizing	F	147.4	351	417.4	22.0	380
	p	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
Варуване / Liming	F	0.3	2964	315.0	1.77	140
	p	0.588 ^{ns}	0.000*	0.000*	0,199 ^{ns}	0.000*
Торене x варуване / Fertilizing x liming	F	1.1	101	170.7	4.22	706
	p	0.384 ^{ns}	0.000*	0.000*	0.012*	0.000*
Контрол / Control		1.80±0.23c	6.83±0.13d	5.21±0.07b	6.91±0.02b	3.63±0.09c
PK		2.61±0.30b	6.93±0.09c	5.15±0.02e	6.94±0.03a	3.77±0.20a
N20PK		2.79±0.22b	6.97±0.07b	5.17±0.02d	6.89±0.02c	3.67±0.13b
N80PK		5.27±0.63a	7.04±0.08a	5.28±0.02a	6.86±0.01d	3.60±0.29d
N140PK		5.68±0.10a	6.93±0.17c	5.18±0.02c	6.87±0.02d	3.61±0.33d
Без вар / No lime		3.60±0.73	6.84±0.10b	5.22±0.06a	6.89±0.03	3.47±0.14b
Вар / Lime		3.67±0.54	7.04±0.06a	5.18±0.05b	6.90±0.04	3.84±0.07a

Варуването има значителен положителен ефект върху общия брой микроорганизми във всички торени участъци (Фигура 2). Резултатите са в съответствие с Li et al 2021, които съобщават, че добавянето на вар увеличава броя на микробните групи, участващи в различни цикли в почвата.

Liming had a significantly positive effect on the total number of microorganisms in all fertilized treatments (Table 2, Figure 2). The results are consistent with Li et al 2021, who report that the addition of lime increases the number of microbial groups involved in different cycles in the soil.

Торовете имат различен ефект върху броя на гъбичките в почвата (Фигура 2). Броят им е значително увеличен при третиране с N140PK, докато намалява при другите третирания с торове. Това е в съгласие с (Stanojković-Sebić, 2014), които отбелязват, че внасянето на азот има благоприятен ефект върху почвените гъбички. Те представляват важно звено в системата почва - растение и допринасят за подобряване на почвеното разнообразие, което оказва важно влияние върху свойствата на растенията и почвата. Тези микроорганизми предпочитат слабо кисели почви с ниска степен на нарушения, многогодишни растения, вътрешни източници на хранителни вещества директно от растението. Прилагането на вар обикновено води до намаляване на гъбичната биомаса и промени във функционалните свойства на микроорганизмите (Bolan, 1991; Brodie et al., 2003; Lekberg et al., 2021). Числеността на почвените гъбички е негативно повлияна от варуването, тъй като почвите с леко кисели условия са пригодени за гъбичките (Rouck et al., 2009).

Приложението на минерални торове с азот показва общо негативен ефект върху броя на свободните азотфиксирующите бактерии (Таблица 2, Фигура 4). Това съвпада с резултатите на Berthrong et al., (2014), които установяват, че големите количества азот в минералните торове имат негативен ефект върху микробиологичната активност на почвата, а азотфиксирующите бактерии реагират комплексно и взаимодействат с промените в екосистемните фактори.

Резултатите също съвпадат с тези на Timofeeva et al., (2023), които посочват, че при увеличени количества минерален азот се наблюдава намаляване на броя на свободните азотфиксируещи бактерии и

Fertilizers had different effect on fungus count in soil (Table 2, figure 3).

Fungi number was significantly increased in treatment N140PK, while decrease significantly in other fertilizer treatments. It agrees with (Stanojković-Sebić et al., 2014) who recorded that incorporation of nitrogen has a favorable effect on soil fungi.

Fungi represent an important link in the soil – plant system and contribute to the enhancement of soil and fungal diversity had an important influence on plant and soil properties.

These microorganisms prefers slightly acidic low disturbance soils, perennial plants, internal nutrient sources directly from the plant. Lime applications typically resulting decreased fungal biomass and changes in microbial functional properties (Bolan, 1991; Brodie et al., 2003; Lekberg et al., 2021), and it is agree with our research.

Soil fungi number in our investigation negatively affected by liming, because of soils with slightly acidic conditions as recorded (Rouck et al., 2009) are suitable for fungi.

Application of mineral fertilizers with nitrogen generally showed a negative effect on the number free nitrogen-fixing bacteria (Table 2., Figure 4). It is consistent with Berthrong et al., (2014) who recorded that large amounts of nitrogen mineral fertilizers have a negative effect on the microbiological activity of the soil and N-fixing bacteria have complex, interacting responses on change factors in ecosystem ().

The results also are in agreement with Timofeeva et al., (2023), who state that under conditions of increased amounts of mineral nitrogen, there is a reduction in the number of free nitrogen fixers as well as a decrease in the

намаляване на процеса на свободно фиксиране на азот.

Тези автори също отбелязват, че тези бактерии използват минерален азот, вместо да го фиксират сами. В противоположност на добавянето на минерален азот, приложението на РК тор има стимулиращ ефект върху броя на свободните азотфиксируещи бактерии. Това съвпада с изследванията на Van Langenhove et al., (2021), които установяват, че приемът на фосфор увеличава броя и активността на свободните азотфиксируещи бактерии.

Броят на почвените актиномицети беше значително увеличен при третиранията с РК и N20PK торове (Таблица 2, Фигура 5). Обаче, торовете N80PK и N140PK оказаха противоположен ефект, като броят на почвените актиномицети намалява в тези третиранията. Варуването оказа положителен ефект върху броя на почвените актиномицети при всички торови обработки, с изключение на контролната и N140PK, където варовете не оказаха влияние върху броя на актиномицетите.

Актиномицетите са известни със своята добра толерантност към различни условия в почвата благодарение на силно развитата си ензимна система (Pešaković et al., 2009). Нашите резултати показват, че броят на актиномицетите се увеличава във всички варианти с приложение на вар, както и в третиранията с P60P60.

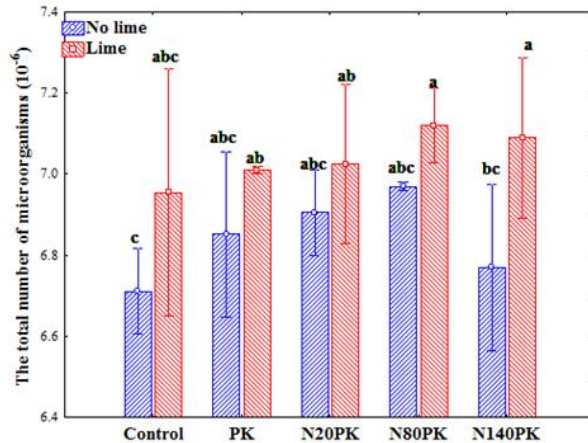
process of free nitrogen fixation.

The same authors also recorded that these bacteria use mineral nitrogen instead of fixing it themselves. As opposed to the addition of mineral nitrogen, the application of PK fertilizer had a stimulating effect on the number of free nitrogen fixers.

This is consistent with research by Van Langenhove et al., (2021) that found that phosphorus intake increases the number and activity of free nitrogen fixers.

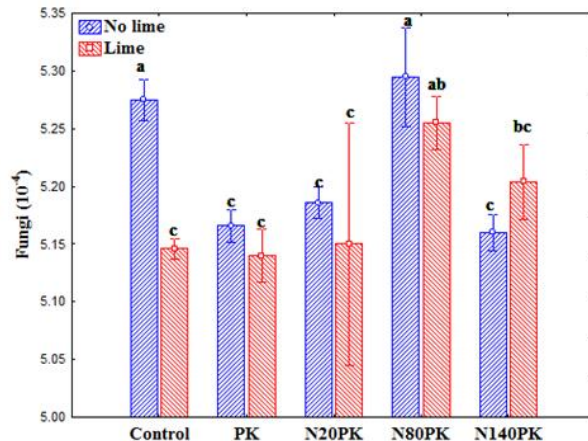
The numbers of soil actinomycetes were significantly increased by fertilized treatment PK and N20PK (Table 2, Figure 5). Fertilizers N80PK and N140PK had quite opposite effect on number soil actinomycetes, because in the treatments soil actinomycetes decreased. Soil actinomycetes number was positively affected by liming in all fertilizers treatments, except in control and N140PK where there was no effect lime in number soil actinomycetes.

Actinomycetes has a good tolerance to different conditions in soil due to their strongly developed enzyme system (Pešaković et al., 2009) and our results showed that the numbers of actinomycetes was increase in all variants with lime as well as the treatment on which it was fertilized P60P60.



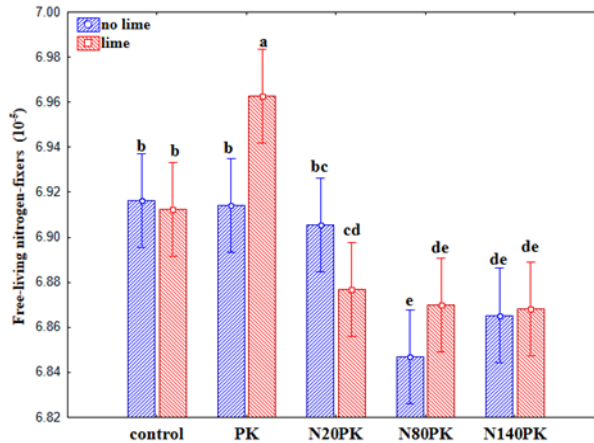
Фиг. 2. Общ брой на микроорганизмите в зависимост от обработките с торове и варуване (средни стойности \pm стандартна грешка). Различните малки букви показват значителни разлики (тест на Фишър за най-малка значителна разлика, $P < 0.05$)

Fig. 2. Total microbial count, depending on fertilizing and liming treatments (means \pm standard error). Different lower-case letters indicate significant differences (Fishers LSD (least significant difference) test, $P < 0.05$)



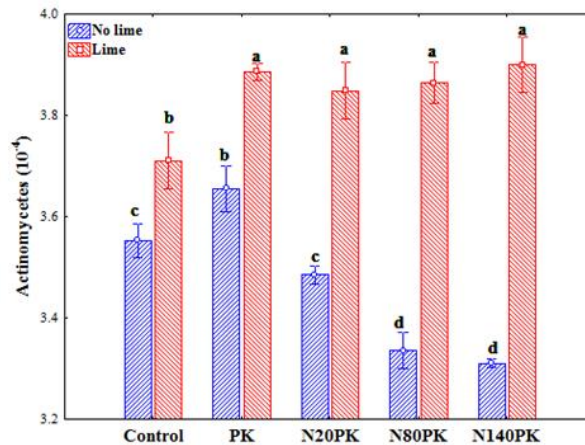
Фиг. 3. Брой на гъбите в зависимост от обработките с торове и варуване (средни стойности \pm стандартна грешка). Различните малки букви показват значителни разлики (тест на Фишър за най-малка значителна разлика, $P < 0.05$)

Fig. 3. Number of fungi, depending on fertilizing and liming treatments (means \pm standard error). Different lower-case letters indicate significant differences (Fishers LSD (least significant difference) test, $P < 0.05$)



Фиг. 4. Брой на свободните азотфиксируещи бактерии в зависимост от обработките с торове и варуване (средни стойности \pm стандартна грешка). Различните малки букви показват значителни разлики (тест на Фишър за най-малка значителна разлика, $P < 0.05$)

Fig 4. Number of free leeving nitrogen fixers depending on fertilizing and liming treatments (means \pm standard error). Different lower-case letters indicate significant differences (Fishers LSD (least significant difference) test, $P < 0.05$)



Фиг. 5. Брой на актиномицетите в зависимост от обработките с торове и варуване (средни стойности \pm стандартна грешка). Различните малки букви показват значителни разлики (тест на Фишър за най-малка значителна разлика, $P < 0.05$).

Fig 5. Number of actinomycetes, depending on fertilizing and liming treatments (means \pm standard error). Different lower-case letters indicate significant differences (Fishers LSD (least significant difference) test, $P < 0.05$).

ИЗВОДИ

Прилагането на тор в продължителен период не само води до увеличаване на производството, но и драстично променя пасищните съобщества. Растенията от семейство *Poaceae* доминират в обработките, при които се прилагат по-големи количества азот, докато видовете от семейство *Fabaceae* доминират в обработките, при които се добавя фосфор и калий без азот.

Прилагането на вар не доведе до значително увеличаване на производството, но доведе до съществено увеличение на общия брой микроорганизми и актиномицети. Намали броя на гъбичките, като не оказа значително влияние върху броя на свободните азотфиксиращи съединения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е финансирано от Министерството на науката, технологичното развитие и иновациите (Сърбия) под номер 451-03-136/2025-03/200217.

CONCLUSION

Applying fertilizer over a mid term period of time not only increases production but also drastically changes grassland communities. Plants from fam. *Poaceae* dominate in treatments where higher amounts of nitrogen are applied, and species from fam *Fabaceae* dominate in treatment where added phosphorus and pottasium with no nitrogen

The application of lime did not significantly increase the production, but it led to a significant increase in the total number of microorganisms and actinomycetes, it reduced the number of fungi, while it had a no significant effect on the number of free nitrogen-fixing compounds.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was financed by Ministry of Science, Technological Development and Innovation (Serbia) number 451-03-136/2025-03/200217.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Berthrong, S.T., C. M. Yeager, L. Gallegos-Graves, B. Steven, S. A. Eichorst, R. B. Jackson and C.R. Kuske**, 2014. Nitrogen fertilization has a stronger effect on soil nitrogen-fixing bacterial communities than elevated atmospheric CO₂. *Appl Environ Microbiol*, 80 (10), 3103–3112.
2. **Bolan, N. S.**, 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil*, 134, 189–207.
3. **Brodie, E., S. Edwards and N. Clipson**, 2003. Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 45 (2), 105–114.
4. **Broeckling, C. D., K. A. Broz, J. Bergelson, D. K. Manter and J. M. Vivanco**, 2008. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (3), 738-744.
5. **Castro, F. H., T.A. Classen, E. E. Austin, J. R. Norby and C. Schadt**, 2010. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (4), 999–1007.
6. **Cincović, T. and M. Kojić**, 1962. On the meadow association of *Danthonietumcalicinae* in western Serbia. *Archives of Agricultural Sciences*, 15(47), 100-109 (Sr).

7. **De Vries, M. F., P. Poschlod and J. H. Willems**, 2002. Challenges for the conservation of calcareous grasslands in northwestern Europe: Integrating the requirements of flora and fauna. *Biological Conservation*, 104 (3), 265-273.
8. **Duru, M., G. Balent, A. Gibon, D. Magda, J. P. Theau, P. Cruz and C. Jouany**, 1998. Fonctionnement et dynamique des prairies permanentes. Exemple des Pyrénées Centrales. *Fourrages*, 153, 97-113.
9. **Galka, A., J. Zarzynski and M. Kopeć**, 2005. Effect of different fertilization regimes on species composition and habitat in long-term grassland experiment. *Grassland Science in Europe*, 10, 132–135.
10. **Getha, K., S. Vikineswary, W. H. Wong, T. Seki, A. Ward and M. Goodfellow**, 2005. Evaluation of *Streptomyces* sp. strain G10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology*, 32 (1), 24-32.
11. **Hejcman, M., M. Češková, J. Schellberg and S. Pätzold**, 2010. The Rengen grassland experiment: effect of soil chemical properties on biomass production, plant species composition and species richness. *Folia Geobotanica*, 45, 125-142.
12. **Honsova, D., M. Hejcman, M. Klaudivsova, V. Pavlu, D. Kocourkova and J. Hakl**, 2007. Species composition of an alluvial meadow after 40 years of applying nitrogen, phosphorus and potassium fertiliser. *Preslia*, 79 (3), 245-258.
13. **Isselstein, J., B. Jeangros and V. Pavlu**, 2005. Agronomic aspects of extensive grassland farming and biodiversity management. *Grassland Science in Europe*, 10, 211-220.
14. **Jarak, M. and S. Djurić**, 2006. *Practicum of Microbiology. Faculty of Agriculture, Novi Sad. (Sr)*.
15. **Krauss, J., R. Bommarco, M. Guardiola, R.H. Heikkinen, A. Helm, M. Kuussaari, O. Lindborg, E. Ckinger, M. Partel, J. Pino et al.**, 2010. Habitat fragmentation causes immediate and time-delayed biodiversity loss at different trophic levels. *Ecology letters*, 13 (5), 597-605.
16. **Kumar, N., R.K. Singh, S.K. Mishra, A.K. Singh and U.C. Pachouri**, 2010. Isolation and screening of soil *Actinomycetes* as source of antibiotics active against bacteria. *International Journal of Microbiology Research*, 2 (2), 12-16.
17. **Lazarević, D., M. Stošić, Z. Dajić, D. Terzić and M. Cvetković**, 2009. Productivity and quality of plant mass of meadow ass. *Danthonietumcalycinae* depending on the fertilization and utilization time. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25 (1-2), 133-142.
18. **Lekberg, Y., C. A. Arnillas, L. S. Borer, E. T. Bullington, N. Fierer, P. G. Kennedy, J. W. Leff, A. D. Luis, E. W. Seabloom, J. A. Henning**, 2021. Nitrogen and phosphorus fertilization consistently favor pathogenic over mutualistic fungi in grassland soils *Nature communications*, 12 (1), 3484.
19. **Li, S., X. Ji, C. Chen, Z. Liu, J. Zhu and H. Peng**, 2021. Effects of increasing lime application rates on microbial diversity and community structure in paddy soils. *Applied Soil Ecology*, 161, 103837.
20. **Midolo, G., R. Alkemade, A. M. Schipper, A. Benítez-López, M. P. Perring and W. De Vries**, 2018. Impacts of nitrogen addition on plant species richness and abundance: A global meta-analysis. *Global ecology and Biogeography*, 28 (3), 398-413.
21. **Milošević, N., B. Tintor, D. Dozet and G. Cvijanović**, 2007. Microbiological properties of soils in natural grasslands. *Field and Vegetable Crops Research*, 44 (1), 541-546.
22. **Pešaković, M., D. A. Dukić, L. Mandić, M. Rakićević and R. Miletić**, 2009.

Mineral fertilizers as a governing factor of the regulation of the number of fungi in soil. *Journal for Natural Sciences*, 116, 201-207.

23. **Rashid, M. I., L. H. Mujawar, T. Shahzad, T. Almeelbi, M. I. Ismail and M. Oves**, 2016. Bacteria and fungi can contribute to nutrient bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiological Research*, 183, 26-41.
24. **Rouck, J., S. P. Brookers and E. Bath**, 2009. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied Environmental Microbiology*, 75 (6), 1589-1596.
25. **Schellberg, J. and L. da S. Pontes**, 2012. Plant functional traits and nutrient gradients on grassland. *Grass and Forage Science*, 67 (3), 305–319.
26. **Shiley, S., Y. Kartalska and K. Dimitrova**, 2021. Bacterial alleviation of drought stress in plants: Potential mechanisms and challenges. *Microbial Management of Plant Stresses, Current Trends, Application and Challenges*, 55-71.
27. **Smith, N., J. Willems and R. Bobbink**, 2008. Long-term after-effects of fertilization on the restoration of calcareous grasslands. *Applied Vegetation Science*, 11 (2), 279-286.
28. **Stanojković-Sebić, A., D. Djukić, L. Mandić, R. Pivić, A. Stojanović and D. Josić**, 2014. Mineral and bacterial fertilisation effect on the number of fungi in soil under winter wheat and the yield of wheat. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 15(3), 983-999.
29. **Takisawa, M., R. R. Colwell and R. T. Hill**, 1993. Isolation and diversity of *Actinomycetes* in the Chesapeake Bay. *Applied and environmental microbiology*, 59 (4), 997-1002.
30. **Timofeeva, A. M., M. R. Galyamova and S. E. Sedykh**, 2023. Plant growth-promoting soil bacteria: nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other biological activities. *Plants (Basel)*, 12 (24), 4074.
31. **Tomić, D., V. Stevović, D. Đurović and Đ. Lazarević**, 2013. Effect of nitrogen rate on the productivity of grassland types *Agrostietum vulgaris*. *Proceedings of the 48th Croatian and 8th International Meeting of Agronomy*, 16–21 February 2013, Dubrovnik, Croatia, 430-433.
32. **Van Langenhove, L., T. Depaepe, L. T. Verryckt, H. Vallicrosa, L. Fuchslueger, L. F. Lugli, L. Bréchet, R. Ogaya, J. Llusia, I. Urbina, A. Gargallo-Garriga, O. Grau, A. Richter, J. Penuelas, D. Van Der Straeten and I. A. Janssens**, 2021. Impact of nutrient additions on free-living nitrogen fixation in litter and soil of two French-Guianese lowland tropical forests. *Functional Ecology*, 126 (7).
33. **Wesche, K., B. Krause, H. Culmsee and C. Leuschner**, 2012. Fifty years of change in Central European grassland vegetation: Large losses in species richness and animal-pollinated plants. *Biological Conservation*, 150 (1), 76-85.
34. **Zornić, V., V. Stevović, Z. Lugić, S. Anđelković, G. Jevtić, J. Radović and M. Petrović**, 2019. Effect of nitrogen and lime on the floristic composition, soil microbes and dry matter yield of *Danthonietumcalycinae* grassland. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47 (4), 1055-62.
35. **Zornić, V.**, 2020. Effect of fertilisation, liming and plant development stage on the floristic composition, yield and quality of *Danthonietumcalycinae* grassland. *Doctoral thesis*, University of Kragujevac, Faculty of Agronomy Čačak.