

АГРОХИМИЯ И ПЛОДОРОДИЕ ПОЧВ

УДК 631.46631.81

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЧЕРНОЗЕМА ПРИ СОВМЕСТНОМ ПРИМЕНЕНИИ ХЛОРИДА КАЛИЯ С АЗОТНЫМИ УДОБРЕНИЯМИ

© 2023 г. К. В. Павлов^а, Е. В. Морачевская^а, *, А. П. Власова^а, Н. А. Манучарова^а

^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: agrosoil@mail.ru

Поступила в редакцию 14.06.2022 г.

После доработки 20.07.2022 г.

Принята к публикации 28.07.2022 г.

С целью оценки возможного токсического эффекта от хлорида калия, применяемого совместно с минеральными азотными удобрениями, изучалась структурная и функциональная составляющие микробного комплекса чернозема, в частности, его прокариотный компонент. Объектом исследований являлись почвенные образцы чернозема типичного, отобранные из вегетационного опыта с вариантами с внесением азотно-фосфорных и азотно-фосфорно-калийных удобрений. Для получения устойчивого действия легкорастворимых солей на микробное сообщество почвы проведено долгосрочное компостирование почвенных образцов при чередовании циклов увлажнения и высушивания почвы. В течение первых двух лет компостирования обнаружено подавление эмиссии диоксида углерода, которое нивелировалось только спустя 5 лет. Первоначальное сокращение эмиссии углекислого газа, как и активности денитрификации, достигало двукратных значений. Негативный эффект проявлялся при содержании в почве хлоридов и нитратов существенно ниже градации, установленной для слабозасоленных почв. Длительное компостирование образцов плодородного чернозема под действием хлорида калия привело к уменьшению численности и биомассы метаболически активного прокариотного комплекса, что подтверждает его токсическое действие на микробное сообщество почвы. Определены устойчивые и чувствительные к повышенному содержанию хлоридов и нитратов в почве представители прокариотного комплекса. Среди представителей домена Bacteria практически все оказались чувствительными за исключением двух филлумов *Firmicutes* и *Verrucomicrobia*. Для некоторых представителей филогенетической группы *Actinobacteria* чувствительность к ионам хлора подтверждается на родовом уровне (*Streptomyces* и *Micromonospora*). Для домена Archaea представители филума *Euryarchaeota* выявляются как наиболее устойчивые к наличию хлоридов. Таким образом, подавление микробиологической активности чернозема при внесении хлорида калия объясняет выявленное ранее уменьшение доступности питательных элементов для растений.

Ключевые слова: Каменная степь, прокариотный комплекс, минеральные удобрения, эмиссия диоксида углерода, активность денитрификации, Voronic Chernozem

DOI: 10.31857/S0032180X22600822, **EDN:** JKNJLQ

ВВЕДЕНИЕ

Применение в качестве калийного удобрения хлористого калия совместно с азотно-фосфорными удобрениями на плодородном черноземе может приводить к уменьшению биомассы растений и доступности для них основных питательных элементов [9]. Известно, что нарушение питания растений возникает в результате антагонизма между хлоридами и нитратами [13, 17, 18] или фосфатом [14, 16], вследствие чего их доступность будет сокращаться. Однако в аналогичных исследованиях на дерново-подзолистой почве такого явления не наблюдали [8]. Трансформация в почве различных соединений, в том числе вносимых

вместе с удобрениями, осуществляется микробными сообществами, специфичными для каждого типа почв [1]. Поэтому было выдвинуто предположение, что наблюдаемый токсический эффект связан с падением уровня минерального питания растений вследствие влияния удобрений на функционирование микробного комплекса чернозема. Предварительные данные, полученные в лабораторных условиях методом инициации микробной сукцессии, подтверждали эту гипотезу. В варианте с внесением хлорида калия было обнаружено двукратное уменьшение эмиссии почвой углекислого газа. Промывание почвы несколько сокращало токсический эффект, что позволило связать его

возникновение с содержанием в почве легкорас-творимых солей. Но устойчивость негативного эффекта указывала на возможность существенных изменений в микробном комплексе почвы и важность его изучения [9].

По данным Ибекве с соавт. [15], высокие концентрации хлоридов в почве отрицательно сказываются на жизнедеятельности почвенных микроорганизмов. Высокие дозы этих солей могут привести к осмотическому стрессу, за которым следует потеря воды из микробных клеток и их лизис, что уменьшает содержание микробной биомассы в засоленных почвах по сравнению с незасоленными.

Целью работы явилась оценка влияния хлорид- и нитратсодержащих солей на разнообразие и активность микробного сообщества чернозема.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований явились смешанные почвенные образцы, отобранные из вегетационного опыта с вариантами с внесением азотно-фосфорных (NP) и азотно-фосфорно-калийных удобрений (NP + KCl). Удобрения в виде нитрата аммония, двойного суперфосфата и хлорида калия вносили в стандартных дозах 0.1 г/кг (что приблизительно соответствует 200 кг/га) равномерным способом в начале закладки опыта. Подробнее с условиями и результатами опыта можно ознакомиться в публикации [10]. В качестве контрольного варианта использовался образец почвы (КОНТ) без внесения удобрений. Почва контрольного варианта представляет собой верхнюю часть гумусово-аккумулятивного горизонта типичного чернозема, отобранного из-под старовозрастной лесополосы (№ 40), длительное время не находившейся в сельскохозяйственном использовании (Каменная степь, Воронежская область, Таловский район). Характеризуется высоким содержанием углерода — 4.7% и нейтральной реакцией среды: pH_{KCl} 6.4, pH_{H_2O} 7.0. Несмотря на то, что минеральная масса почвы с глубины 5–20 см не вскипает от соляной кислоты, в ней встречаются рыхлые карбонатные конкреции размером 1–3 мм, происхождение которых нуждается в дальнейшем исследовании. Незначительное количество карбонатных новообразований позволяет поддерживать устойчивыми кислотно-основные свойства почвы, которые не изменяются под влиянием применения удобрений и выращивания растений. Даже локальное формирование слабощелочных условий в почве, является важной особенностью чернозема, по сравнению с другими почвами (например, дерново-подзолистой), так как может усиливать токсическое действие солей. Предварительные данные по эмиссии диоксида углерода из почвы с вариантов NP и NPK в течение года, а также агрохимическая характеристика почвы и

условий вегетационного опыта изложены ранее [9]. Анализ водной вытяжки осуществлялся до инкубации в соответствии с ГОСТ 26423-85 [11].

Для оценки микробиологической активности почвы был проведен лабораторный эксперимент методом инициации микробной сукцессии [3, 5, 6].

После отбора образцов почва (5 г) находилась в пенициллиновых флаконах (8-кратная повторность для каждого варианта) при минимальной влажности, близкой к влаге завядания растений (20% от предельно полевой влагоемкости (ППВ)). При изучении эмиссии углекислого газа и закиси азота в почвенных образцах влажность увеличивали до оптимальной — 60% от ППВ. Эмиссия CO_2 из почвы измерялась через год, 2 и 5 лет от начала компостирования при чередовании циклов увлажнения и высушивания в интервале от 20 до 60% от ППВ (один цикл соответствовал 6 мес.). Подробное описание измерения эмиссии углекислого газа приведено ранее [10]. Изучение эмиссии диоксида углерода из исследуемых образцов проводилось на газовом хроматографе с детектором по теплопроводности (модель 3700) [5]. Длина колонки 3 м, наполнитель — Полисорб-1. Скорость потока газа-носителя (He) — 25 мл/мин. Активность денитрификации изучалась по интенсивности эмиссии закиси азота (N_2O) из почвенных образцов в параллельных микрокосмах, где предварительно искусственно создавались анаэробные условия, оптимальные для восстановления нитратов в почве (газовая фаза над почвенными образцами замещалась инертным газом (N_2)). С целью остановки процесса денитрификации на моменте образования закиси азота в микрокосмы добавлялся ацетилен (C_2H_2), блокирующий заключительный этап процесса — работу фермента редуктазы закиси азота [6].

Оценку численности и структуры прокариотного комплекса проводили с помощью молекулярно-биологических и люминесцентно-микроскопических методов с использованием различных флюорохромов (окраски акридином оранжевым и Cy3). Подсчет сделан с использованием люминесцентного микроскопа Zeiss microscope axioskop 2 plus (Германия).

Учет численности метаболически активных прокариот производился методом флуоресцентной гибридизации клеток *in situ* методом FISH. В его основе лежит реакция гибридизации между искусственно созданным флуоресцентным РНК-зондом и комплементарной ему нуклеотидной последовательностью участка 16S рибосомальной РНК, что позволяет учесть только количество метаболически активных представителей различных филумов. Были применены зонды, специфичные для доменов Archaea и Bacteria, а также для отдельных филогенетических групп представителей прокариот [4].

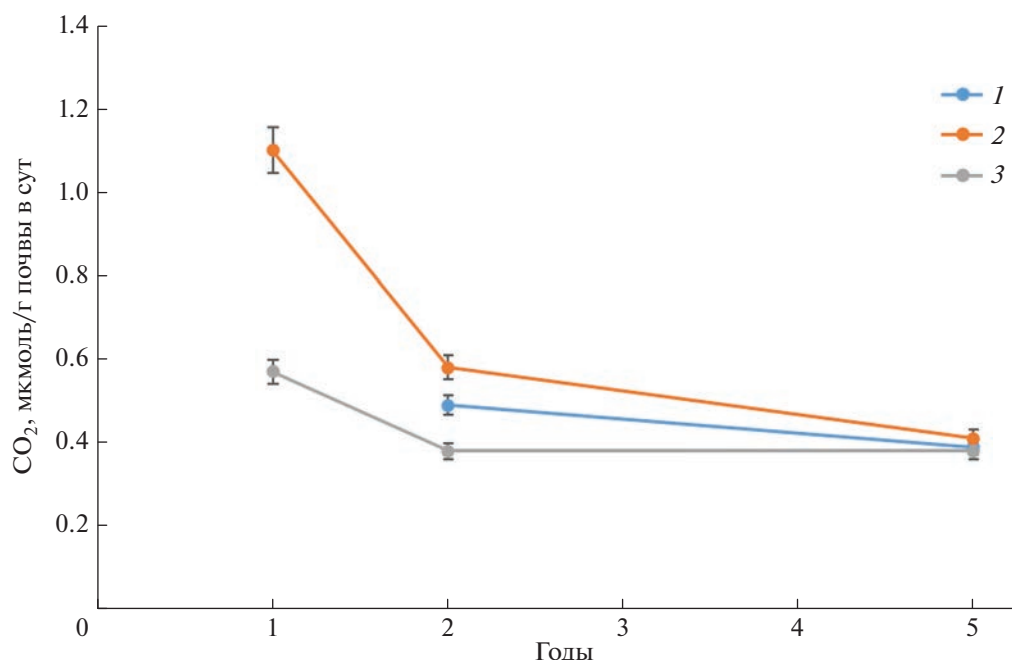


Рис. 1. Влияние хлорида калия на эмиссию CO₂, мкмоль/г почвы в сутки: 1 – контроль, 2 – NP, 3 – NP + KCl.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ водной вытяжки показал, что как по содержанию хлоридов (табл. 1), так и по величине удельной электропроводности, значения в вариантах с внесением солей меньше значений, характерных для засоленных почв. Максимальная удельная электропроводность – 0.36 дСм/м, наблюдается на варианте NP, в то время как минимальное засоление по электропроводности – >0.6 дСм/м. Порог токсичности для хлорида – 0.3 смоль/кг почвы, а его максимальное значение отмечалось на варианте NP + Cl и составило 0.17 смоль/кг. Необходимо подчеркнуть, что содержание нитратов при анализе водной вытяжки для оценки засоления обычно не нормируется [2].

Удельная электропроводность характеризует общее содержание солей в почве, а в эксперименте общее содержание солей складывается в основном из хлоридов и, особенно, нитратов. Отметим

повышенное содержание нитратов в почве, что в 1.5 раза больше внесенной дозы азотных удобрений (10 мг N/100 г почвы). Указанные особенности возможны для чернозема с высоким содержанием гумуса при внесении азотных удобрений и благоприятным водно-тепловым режимом, формирующимся в условиях вегетационного опыта. Все эти факторы способствуют возрастанию микробиологической активности и минерализации органического вещества, а, следовательно, увеличению содержания нитратов в почве. Кроме того, отмечается негативный эффект действия хлорида калия на содержание нитратов (уменьшение с 15.6 до 14.0 мг N/100 г почвы).

Применение азотно-фосфорных удобрений способствовало увеличению интенсивности микробного дыхания – возрастанию эмиссии CO₂ из почвы по сравнению с контролем (рис. 1). Контрольная почва, на которой удобрения не приме-

Таблица 1. Анализ водной вытяжки почвы

Вариант	Cl ⁻		NO ₃ ⁻		Удельная электропроводность, дСм/м
	мг/100 г	смоль/кг	Мг N/100 г	смоль/кг	
Контроль	<0.01	<0.002	0.50	0.04	0.07
NP	0.70	0.02	15.6	1.11	0.36
NP + KCl	6.00	0.17	14.0	1.00	0.34
НСР0.05	0.50	0.01	1.20	0.09	0.04
Порог токсичности	—	0.3*	—	—	>0.6

* По [7].

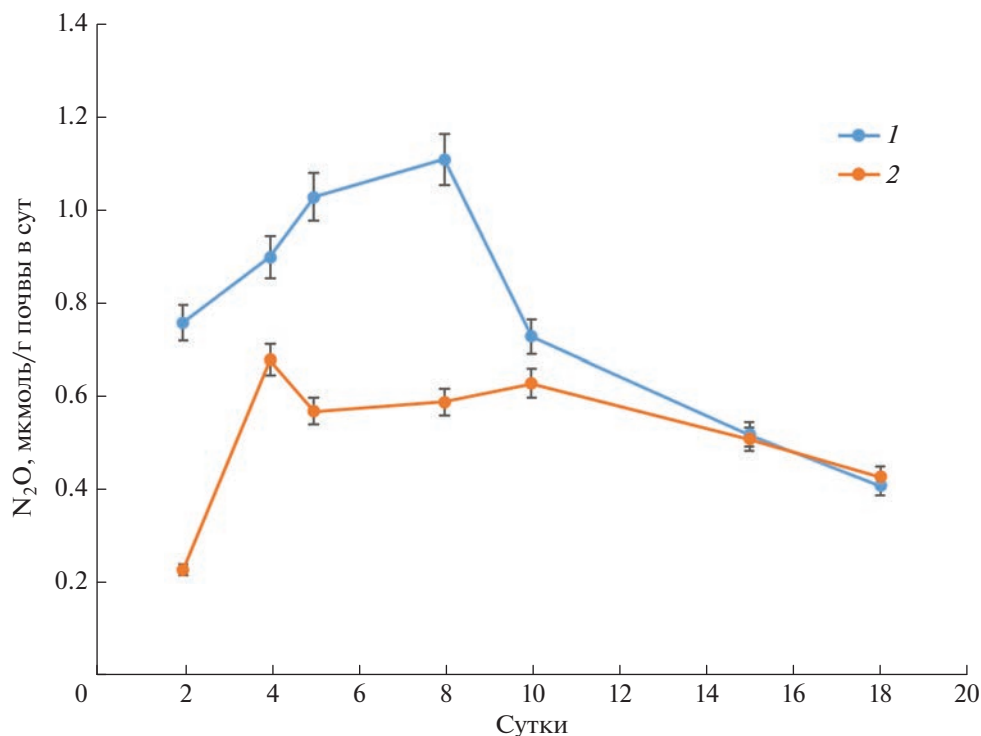


Рис. 2. Влияние хлорида калия на эмиссию N_2O , мкмоль/г почвы в сутки: 1 — NP, 2 — NP + KCl.

няли, занимала промежуточное положение по интенсивности микробного дыхания по сравнению с вариантами NP и NP + KCl. Внесение хлорида калия в почву приводило к подавлению микробиологической активности по сравнению с контрольным образцом, что указывает на проявление токсического эффекта соли в отношении активности микробного сообщества.

На вариантах с внесением хлорида калия сокращение эмиссии углекислого газа наблюдалось в течение двух лет и постепенно нивелировалось к пятому году сукцессии. Отмеченная особенность может быть связана с субстратным ингибированием, то есть более быстрым уменьшением содержания доступного углерода в почве на вариантах с более интенсивным дыханием и, следовательно, постепенным его выравниванием.

Почва с вариантов, где вносили NP и NPK спустя год протестирована на активность процесса денитрификации (рис. 2).

За первую неделю сукцессии, инициированной увлажнением, эмиссия N_2O под влиянием хлорида калия уменьшилась практически в 2 раза. Абсолютные величины эмиссии закиси азота, как и значения эмиссии углекислого газа, показали почти двукратное сокращение активности денитрификации на варианте с применением хлорида калия. Отмеченные особенности в эмиссии газов указывают на схожие закономерности, определяемые микробиологической активностью почвы и

требуют более подробного непосредственного изучения микробного сообщества почвы.

Дальнейшая характеристика микробного сообщества охватывает его метаболически активный прокариотный компонент, поскольку именно эта часть сообщества считается наиболее приспособленной к условиям пониженной влажности, в условиях которой и проходил поставленный эксперимент.

На вариантах с применением азотно-фосфорных удобрений отмечено возрастание численности и биомассы метаболически активных представителей прокариотного комплекса микроорганизмов по сравнению с контролем. По результатам исследований других авторов известно, что увеличение обеспеченности почвы органическим углеродом и общим азотом приводит к закономерному постепенному росту количества метаболически активных клеток как архей, так и бактерий. При этом отклик численности бактерий на увеличение содержания $C_{орг}$ и $N_{общ}$ в 5 раз выше, чем архей [12].

Однако добавление хлорида по фону азотно-фосфорных удобрений имело негативное действие, что наиболее контрастно отразили микробиологические показатели (табл. 2).

Применение хлорида калия значительно уменьшило содержание биомассы метаболически активного прокариотного комплекса, что подтвер-

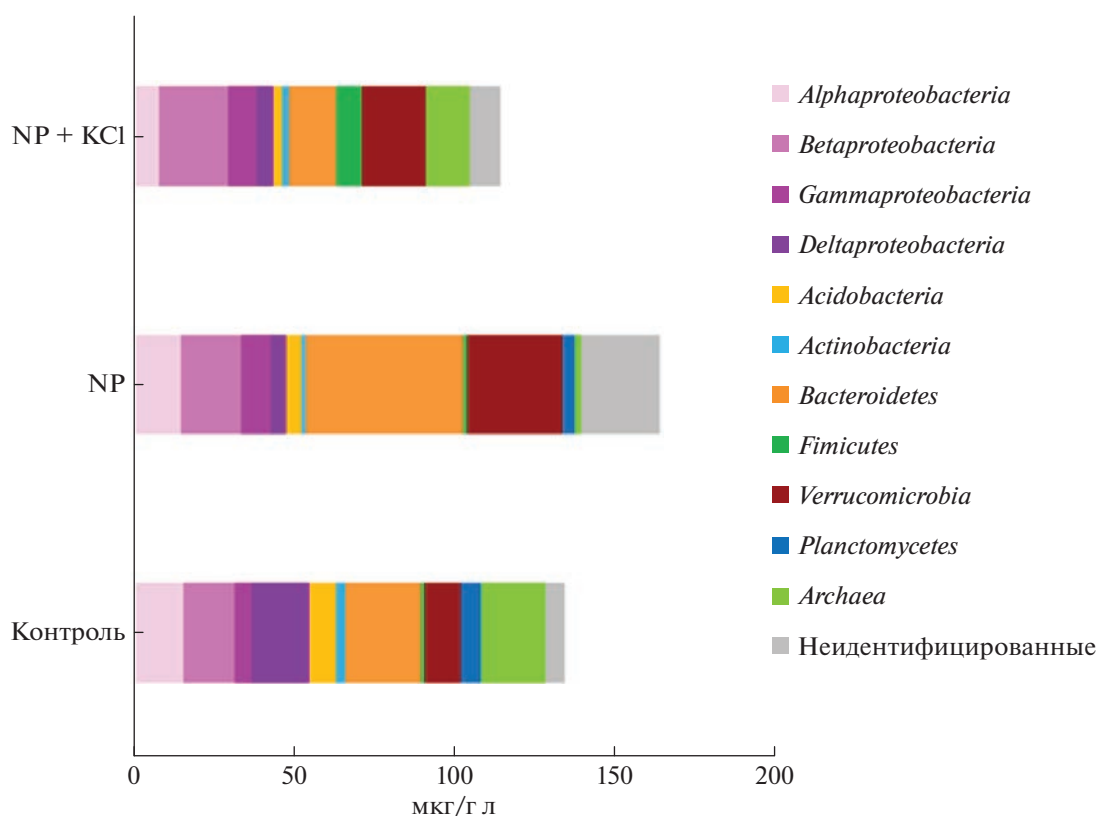


Рис. 3. Структура прокариотного сообщества.

ждает результаты, полученные по эмиссии CO_2 и N_2O и также указывает на токсический эффект от внесения хлоридов (рис. 3). Другими словами, токсическое влияние хлорида выражается в существенном уменьшении позитивного действия азотно-фосфорных удобрений. Отмеченная закономерность хорошо прослеживается на примере численности представителей филогенетической группы *Bacteroidetes*, которая хорошо коррелирует

с общей численностью микроорганизмов. По сравнению с другими филогенетическими группами домена *Bacteria*, численность метаболически активных представителей *Bacteroidetes* наиболее резко возрастает при внесении в почву азотно-фосфорных удобрений и микробное сообщество становится доминирующим. С применением хлоридов на фоне азотно-фосфорных удобрений отмеченная закономерность не наблюдается.

Таблица 2. Доминантные группы прокариотного сообщества

Показатель	Контроль	NP	NP + KCl	HCP _{0.05}
Общая биомасса, мкг/г почвы	134.1	163.9	114.3	48.6
Биомасса метаболически активных прокариот, мкг/г почвы	128.3	139.4	104.6	32.4
Выявлено влияние удобрений				
<i>Gammaproteobacteria</i>	5.3	9.2	8.8	2.8
<i>Deltaproteobacteria</i>	18.2	5.0	5.3	8.5
<i>Acidobacteria</i>	8.4	4.8	2.6	2.8
Выявлено влияние хлоридов				
<i>Alphaproteobacteria</i>	15.5	15.0	7.9	5.6
<i>Bacteroidetes</i>	23.4	49.1	14.8	12.7
<i>Firmicutes</i>	1.3	1.3	7.9	5.7

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внесение хлорида калия на фоне азотно-фосфорных удобрений снижает активность почвенного микробного сообщества, что выражается в значимом сокращении дыхания (эмиссии CO_2) и нитратного дыхания (эмиссии N_2O) из почвенных образцов чернозема, отобранных из вегетационного опыта и компостировавшихся при чередовании увлажнения и высушивания почвы. Уменьшение интенсивности дыхания было устойчивым в течение двух лет последствия удобрений, постепенно нивелируясь к пятому году наблюдения.

Негативный эффект хлорида калия на микробиологические свойства плодородного чернозема проявляется при отсутствии засоления почвы, то есть при содержании в почве как общего количества легкорастворимых солей, так и хлоридов, существенно ниже градации, установленной для слабозасоленных почв.

При долгосрочном компостировании хлорида калия совместно с азотно-фосфорными удобрениями, установлено снижение численности и биомассы метаболически активного прокариотного комплекса чернозема, что подтверждает закономерности, полученные по эмиссии CO_2 и N_2O . Определены устойчивые и чувствительные представители прокариотного комплекса к повышенному содержанию хлоридов и нитратов в почве.

В результате длительного компостирования в образцах плодородного чернозема под действием хлорида калия произошло снижение численности и биомассы метаболически активного прокариотного комплекса, что подтверждает его токсическое действие на микробное сообщество почвы. Определены устойчивые и чувствительные представители прокариотного комплекса к повышенному содержанию хлоридов и нитратов в почве. Среди представителей домена Bacteria практически все группы оказались чувствительными за исключением представителей двух групп *Firmicutes* и *Verucomicrobia*. Для некоторых представителей филогенетической группы *Actinobacteria* чувствительность к ионам хлора подтверждается на родовом уровне (*Streptomyces* и *Micromonospora*). Для домена Archaea представители филума *Euryarchaeota* выявляются как наиболее устойчивые к наличию ионов хлора.

Таким образом, полученные результаты подтверждают гипотезу о снижении микробиологической активности чернозема под действием хлоридов на фоне внесения азотно-фосфорных удобрений и объясняют полученные ранее данные об уменьшении доступности питательных элементов для растений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Микробиологические исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00076). Агрохимические эксперименты и анализы водной вытяжки и электропроводности получены в рамках темы НИР “Разработка и оценка комплекса инновационных агрохимических средств, мелиорантов и регуляторов роста в условиях агро-, техногенеза и городской среды” (ЦИТИС: 121041300098-7).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта научных интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Благовещенская Г.Г., Духанина Т.М. Микробные сообщества почв и их функционирование в условиях применения средств химизации // Агрохимия. 2004. № 2. С. 80–88.
2. Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
3. Манучарова Н.А., Власенко А.Н., Менько Е.В., Звягинцев Д.Г. Специфика хитинолитического микробного комплекса в почвах, инкубируемых при различных температурах // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 219–229.
4. Манучарова Н.А., Ксенофонтова Н.А., Каримов Т.Д., Власова А.П., Зенова Г.М., Степанов А.Л. Изменение филогенетической структуры метаболически активного прокариотного комплекса почв под влиянием нефтяного загрязнения // Микробиология. 2020. Т. 89. № 2. С. 222–234. <https://doi.org/10.31857/S0026365620020093>
5. Манучарова Н.А., Степанов А.Л., Умаров М.М. Особенности микробной трансформации азота в водно-прочных агрегатах почв разных типов // Почвоведение. 2001. № 10. С. 1261–1267.
6. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 304 с.
7. Мякина Н.Б., Аринушкина Е.В. Методическое пособие для чтения результатов химического анализа почв. М.: Изд-во МГУ, 1979. 62 с.
8. Павлов К.В. Оптимизация калийного питания ячменя при локальном внесении калийных удобрений // Агрохимия. 2009. № 2. С. 28–34.
9. Павлов К.В., Кleshканова Е.В., Новиков М.М., Манучарова Н.А. Влияние хлористого калия на эмиссию диоксида углерода из чернозема // Вестник Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. 2015. № 2. С. 49–52.
10. Павлов К.В., Новиков М.М. Влияние локального внесения калийных удобрений в чернозем на урожайность ячменя // Агрохимия. 2013. № 4. С. 48–54.
11. Практикум по агрохимии / Под ред. В.Г. Минеева. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2001. 689 с.
12. Семенов М.В., Манучарова Н.А., Краснов Г.С., Никитин Д.А., Степанов А.Л. Биомасса и таксономическая структура микробных сообществ в почвах

- правобережья р. Оки // Почвоведение. 2019. № 8. С. 974–985.
<https://doi.org/10.1134/S0032180X19080124>
13. Bar Y., Apelbaum A., Kafkafi U. *et al.* Relationship between chloride and nitrate and its effect on growth and mineral composition of avocado and citrus plants // J. Plant Nutrition. 1997. № 20. P. 715–731.
 14. Chabra R., Ringoet A., Lamberts D. Kinetics and Interaction of Chloride and Phosphate Absorption by Intact Tomato Plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) from a Dilute Nutrient Solution // Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 1976. V. 78. № 3. P. 253–261.
 15. Ibekwe A.M., Poss J.A., Grattan S.R., Grieve C.M., Suarez D. Bacterial diversity in cucumber (*Cucumis sativus*) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron // Soil Biology and Biochemistry. 2010. V. 42. № 4. P. 567–575.
 16. Massa D., Mattson N.S., Lieth H.J. Effects of saline root environment (NaCl) on nitrate and potassium uptake kinetics for rose plants: a Michaelis–Menten modelling approach // Plant Soil. 2009. № 318. P. 101–115.
<https://doi.org/10.1007/s11104-008-9821-z>
 17. Miklos E. *et al.* Nitrate and chloride transport interaction in grapevine // Acta Horticulturae. 2000. № 526. P. 249–254.
 18. Wen Z., Tyerman S.D., Dechorgnat J., Ovchinnikova E., Dhugga K.S., Kaiser B.N. Maize NPF6 proteins are homologs of Arabidopsis CHL1 that are selective for both nitrate and chloride // Plant Cell. 2017. V. 29. P. 2581–2596.
<https://doi.org/10.1105/tpc.16.00724>

Microbiological Activity of Chernozem in the Combined Use of Potassium Chloride with Nitrogen Fertilizers

K. V. Pavlov¹, E. V. Morachevskaya¹, *, A. P. Vlasova¹, and N. A. Manucharova¹

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: agrosoil@mail.ru

In order to assess the possible toxic effect of potassium chloride used in conjunction with mineral nitrogen fertilizers the authors studied the structural and functional components of the microbial complex of chernozem, in particular, its prokaryotic component. The object of research was soil samples of typical chernozem, selected from the vegetation experience with variants with the introduction of nitrogen-phosphorus and nitrogen-phosphorus-potassium fertilizers. To obtain a stable effect of easily soluble salts on the microbial community of the soil, long-term composting of soil samples was carried out with alternating cycles of moistening and drying of the soil. During the first two years of composting, the researches detected the suppression of carbon dioxide emissions; however the suppression leveled out only 5 years later. The initial reduction in carbon dioxide emissions, as well as denitrification activity, reached twofold values. The negative effect was manifested when the content of chlorides and nitrates in the soil was significantly lower than the gradation established for slightly saline soils. Prolonged composting of samples of fertile chernozem under the action of potassium chloride led to a decrease in the number and biomass of the metabolically active prokaryotic complex, which confirms its toxic effect on the microbial community of the soil. The representatives of the prokaryotic complex that are resistant and sensitive to the increased content of chlorides and nitrates in the soil have been identified. Among the representatives of the Bacteria domain, almost all were sensitive, with the exception of two phylum *Firmicutes* and *Verrucomicrobia*. For some representatives of the phylogenetic group *Actinobacteria*, sensitivity to chlorine ions is confirmed at the generic level (*Streptomyces* and *Micromonospora*). For the Archaea domain, representatives of the *Euryarchaeota* phylum are identified as the most resistant to the presence of chlorides. Thus, the suppression of the microbiological activity of chernozem during the introduction of potassium chloride explains the previously identified decrease in the availability of nutrients for plants.

Keywords: Kamennaya step', prokaryotic complex, mineral fertilizers, carbon dioxide emission, denitrification activity, Voronic Chernozem