



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# METODY KVANTIFIKACE VLIVU BIOUHLU NA PŮDNÍ RESPIRACI

QUANTIFICATION OF THE INFLUENCE OF BIOCHAR ON SOIL RESPIRATION

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Anežka Losová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Michal Kalina, Ph.D.

BRNO 2023

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1833/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Anežka Losová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Metody kvantifikace vlivu biouhlu na půdní respiraci

### Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracovat literární rešerši zaměřenou na definování metodik využitelných pro posouzení vlivu biouhlu na půdní mikrobiální aktivitu prostřednictvím měření půdní respirace.
- 2) Na základě literární rešerše zvolit a optimalizovat vlastní nastavení experimentů využitelných pro posouzení vlivu aplikace biouhlu na míru aktivity půdních mikroorganismů prostřednictvím měření půdní respirace.
- 3) Realizace laboratorních experimentů, na jejichž základě bude možné posoudit vliv vybraných půdních doplňků (biouhel, NPK...) na mikrobiální aktivitu zvoleného reprezentativního vzorku půd.
- 4) Kritické zhodnocení získaných výsledků s ohledem na praktické využití biouhlu jakožto půdního kondicionéru v zemědělství. Korelace získaných dat se základními fyzikálně–chemickými charakteristikami zvolených půd.

### Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Anežka Losová  
studentka

Ing. Michal Kalina, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá studiem metod pro posouzení vlivu biouhlu a hnojiva NPK na aktivitu mikroorganismů v půdě prostřednictvím měření půdní respirace. Teoretická část formuluje charakteristiku půdy, vlastnosti a proces výroby biouhlu. Dále je literární rešerše zaměřená na definování a optimalizaci různých metodik využitelných k měření půdní respirace. Experimentální část popisuje nejdříve zvolené fyzikálně-chemické charakteristiky půdy a biouhlu (pH, konduktivita výluhu, kapacita zadržování vody). Pomocí termogravimetrie a elementární analýzy bylo následně pro vzorky půd a biouhlu naměřeno množství organického, anorganického podílu a složení organických prvků (C, H, O, a N). Z provedené literární rešerše byl zvolen dynamický inkubační systém pro posouzení vlivu aplikace biouhlu na míru aktivity půdních mikroorganismů prostřednictvím měření půdní respirace. Vznikající oxid uhličitý se během inkubace sorboval do hydroxidu sodného a následně se jeho množství stanovilo pomocí titrační a konduktometrické metody. Naměřené výsledky obou metod navzájem korelovaly a obě tyto metody jsou tedy vhodné ke stanovení míry půdní respirace. Z experimentálních dat vyplývá, že biouhel má pozitivní účinky na rychlost produkce oxidu uhličitého půdní respirací. Kombinací biouhlu a hnojiva NPK nedošlo k výraznému navýšení účinnosti biouhlu. S ohledem na získané výsledky lze však usoudit, že biouhel, jakožto půdní kondicionér v zemědělství, má velký potenciál podpořit celkovou míru půdní respirace.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

biouhel, NPK, respirace půdy, oxid uhličitý, konduktivita, titrace, půdní organická hmota

## **ABSTRACT**

This master's thesis is focused on the investigation of methods for evaluating the effect of biochar and NPK fertilizer on the activity of soil microorganisms by measuring soil respiration. The theoretical part describes the characteristics of soil, the properties of biochar and its production process. Furthermore, the literature research was focused on the definition and optimization of the various methodologies that can be used to measure soil respiration. The experimental part describes selected physicochemical characteristics of soil and biochar (pH, conductivity, water retention capacity). Thermogravimetric analysis and elemental analysis were used for measuring of the amount of organic and inorganic content and the composition of organic elements (C, H, O and N) in the soil and biochar samples. From the literature research, a dynamic incubation system was chosen for monitoring of the influence of biochar application on the microbial activity of soil microorganisms through the measurement of soil respiration. The produced carbon dioxide was sorbed into sodium hydroxide solution during the incubation and the released amount was determined by titration and conductometric method. The measured results of both methods correlated with each other, and both of these methods are suitable for determining the rate of soil respiration. Experimental data showed that biochar had positive effects on the rate of carbon dioxide production by soil respiration. The combined application of biochar and NPK fertilizer did not significantly increase the efficiency of biochar. In summary, biochar as a soil conditioner in agriculture has great potential to act and to support the level of soil respiration.

## **KEYWORDS**

biochar, NPK, soil respiration, carbon dioxide, conductivity, titration, soil organic matter

LOSOVÁ, Anežka. Metody kvantifikace vlivu biouhlu na půdní respiraci. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148050>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Michal Kalina.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité literární zdroje správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu své diplomové práce Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D. za ochotu, cenné rady a odborné vedení práce, které mi usnadnilo vypracování diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za trpělivost, zázemí a podporu během celého studia.

## **OBSAH**

1	ÚVOD .....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1	Půda .....	11
2.1.1	Půdní organická hmota .....	11
2.1.2	Půdní biodiverzita.....	12
2.1.3	Půdní respirace .....	12
2.1.4	Skleníkové plyny .....	13
2.2	Biouhel.....	15
2.2.1	Charakteristika.....	15
2.2.2	Fyzikální vlastnosti .....	15
2.2.3	Chemické vlastnosti.....	16
2.2.4	Pyrolýza.....	16
2.2.5	Aplikace biouhlu.....	17
2.2.6	Praktické dopady aplikace biouhlu.....	18
2.3	Metody měření půdní respirace .....	20
2.3.1	Metoda mikrotitračních destiček .....	21
2.3.2	Kolorimetrická detekce.....	22
2.3.3	Radioaktivní detekční systém.....	23
2.3.4	Komorové metody .....	23
2.3.5	Dynamický inkubační systém.....	24
2.3.6	Systém vířivé kovariance.....	25
2.3.7	Respirometry .....	25
2.3.8	Měření půdní respirace pomocí plynové chromatografie.....	27
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	29
4	CÍLE PRÁCE .....	32
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33

5.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie.....	33
5.1.1	Použité chemikálie.....	33
5.1.2	Použité přístroje.....	33
5.2	Charakteristika biouhlu a použité půdy .....	33
5.3	Příprava roztoků pro následné experimenty .....	34
5.4	Předpříprava půdy pro charakterizaci půdní respirace .....	34
5.5	Charakterizace vzorků půd a biouhlu .....	34
5.5.1	Kapacita zadržování vody .....	34
5.5.2	Vodivost a pH vodného extraktu .....	34
5.5.3	Termogravimetrie .....	34
5.5.4	Elementární analýza .....	35
5.6	Metody stanovení půdní respirace .....	35
5.6.1	Půdní respirace metodou v uzavřených nádobách.....	35
5.6.2	Dynamická metoda měření půdní respirace .....	35
5.7	Stanovení množství uvolněného CO <sub>2</sub> .....	36
5.7.1	Konduktometrické stanovení.....	36
5.7.2	Titrační stanovení .....	37
5.7.3	Kolorimetrické stanovení .....	37
6	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	39
6.1	Fyzikálně–chemická charakterizace půdy a biouhlu .....	39
6.1.1	Kapacita zadržování vody .....	39
6.1.2	Stanovení pH a konduktivity .....	40
6.1.3	Elementární analýza a termogravimetrie.....	40
6.2	Metody stanovení půdní respirace .....	41
6.2.1	Kolorimetrická metoda .....	42
6.2.2	Kalibrační závislost konduktometrické metody .....	44
6.2.3	Půdní respirace metodou uzavřených nádob .....	45

6.2.4	Dynamický inkubační systém.....	46
6.2.5	Shrnutí dat z respiračních experimentů .....	51
6.3	Charakteristika půdy s přidavkem biouhlu po ukončení inkubačního experimentu .	52
6.3.1	Stanovení pH .....	52
6.3.2	Stanovení konduktivity .....	52
6.3.3	Termogravimetrická analýza (TGA) .....	53
7	ZÁVĚR.....	54
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	56
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	66



# 1 ÚVOD

V dnešní době je problém s emisí skleníkových plynů stále častěji diskutované téma, a tak je potřeba zamyslet se nad zmírnění dopadů globálního oteplování a environmentálních problémů s ním souvisejících. Významnou roli zde hraje půdní respirace a celkový přístup k hospodaření s půdou.

Oxid uhličitý jakožto produkt půdního dýchání je jedním ze skleníkových plynů emitovaných z půdy. Skleníkové plyny adsorbují záření vyzařované ze Země do vesmíru, čímž Zemi ohřívají v efektu běžně nazývaném „skleníkový efekt“. Tento proces sice pomáhá udržovat klima planety na vhodné teplotě, ale pokud je koncentrace skleníkových plynů v atmosféře příliš vysoká, má tento proces za následek zvyšování průměrné globální teploty a změny klimatu [1]. Spalování fosilních paliv, obdělávání půdy a další lidské činnosti změnily přirozenou rovnováhu tak, že nyní každý rok uvolňujeme do atmosféry větší množství uhlíku a dusíku. Půda je důležitý prostředek pro zmírnění změn klimatu a vzniku skleníkových plynů. Mikroorganismy v půdě spotřebovávají organickou hmotu a svým dýcháním uvolňují oxid uhličitý do atmosféry. Aktivní mikroorganismy řídí biogeochemické procesy a jejich fungování přispívá k celkové mikrobiální aktivitě. Správná mikrobiální činnost tedy přispívá k vyšší úrodnosti půdy, cyklizaci živin a zároveň hraje jedinečnou roli při detoxikaci znečištěného půdního prostředí [2].

Jedním z možných způsobů řešení problematiky zmírnění emise oxidu uhličitého do atmosféry je sekvestrace uhlíku půdou. Sekvestrace půdního uhlíku je přenos atmosférického oxidu uhličitého do půdy prostřednictvím rostlin, čímž dochází ke zmírnění změn klimatu. Aplikace biouhlu do půdy nabízí možnost zvýšit obsah organické hmoty v půdě a má tudíž schopnost snížit emise skleníkových plynů. Zároveň je díky jeho dlouhodobé stabilitě vhodným prostředkem k sekvestraci uhlíku a jeho vysoká pórovitost poskytuje útočiště pro mikroorganismy [3]. Půdní dýchání je uvolňování oxidu uhličitého ze všech živých organismů v půdě včetně bakterií, hub, protistů, žížal, kořenů rostlin atd. Měření půdního dýchání lze použít k posouzení zdravotního stavu půdy, přičemž vyšší frekvence dýchání ukazuje na aktivnější, a tedy zdravější mikrobiální komunitu. Rychlost dýchání může být ovlivněna také kvalitou substrátu, který půdní mikroby spotřebovávají [4].

Klesající kvalita půdy a ztráta rozlohy půdy na obyvatele si vyžádaly zvýšení používání anorganických hnojiv. Použití chemických nebo anorganických hnojiv pro zlepšení zemědělského výnosu a úrodnosti půdy však není udržitelným přístupem. Nadměrné používání anorganických hnojiv, zejména dusíku, způsobuje nitrifikaci půdního prostředí a může také vést k mineralizaci organické hmoty [5]. Proto je důležité obnovit kontaminovaná místa používáním organických hnojiv a jiných půdních pomocných látek. Použití biouhlu se stalo zcela novým přístupem ke zvýšení zemědělského výnosu, úrodnosti rostlin, kvality a zdraví půdy. Jeho aplikace má tedy velký potenciál s pozitivními přínosy pro životní prostředí i zemědělství v delším časovém horizontu [6].

Jelikož jsou rostliny vyživovány z organické hmoty a minerálů nacházejících se v půdě, je zdraví půdy základem energického a udržitelného potravinového systému. Vzhledem k tomu, že přirozené zásoby nejdůležitějších živin pro růst rostlin v půdě klesají, rychlost růstu plodin je inhibována. Nejrozšířenějším řešením tohoto vyčerpání je aplikace půdních kondicionérů na organické bázi nebo jiných půdních doplňků (např. biouhel). Biouhel, pevný materiál získaný karbonizací biomasy pyrolýzou, je potenciálním prostředkem pro úpravu půdy a sekvestraci uhlíku [7].

Využití biouhlu v zemědělství může být mimořádně užitečné pro zlepšení půdního organického uhlíku, kapacity zadržování vody, stimulace půdních mikrobů, aktivitu mikroorganismů v půdě a obsahu biomasy, snížení potřeby a vyplavování hnojiv, dostupnosti a retence živin, provzdušnění půdy, zlepšení růstu a výnosu plodin [8].

Pozitivní vliv biouhlu na růst rostlin a kvalitu půdy naznačuje, že používání biouhlu je dobrý způsob, jak překonat nedostatek živin v půdě a podpořit mikrobiální procesy probíhající v půdě. Proto je tato diplomová práce věnována způsobům a metodám, jak měřit míru půdní respirace s přidavkem biouhlu, a rovněž hnojiva NPK (minerální hnojivo s vysokým obsahem dusíku – N, fosforu – P a draslíku – K).

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Půda

Půda je komplexní vícefázový systém tvořený pevnou, kapalnou a plynnou složkou. Pevné částice o velikosti písku, bahna a jílu jsou obvykle spojeny dohromady jako strukturní jednotky nazývané agregáty. Jednotlivý půdní agregát lze definovat jako přirozeně se vyskytující shluk nebo skupinu půdních částic, ve kterých jsou síly držící částice pohromadě mnohem silnější než síly mezi sousedními agregáty. Distribuce velikosti agregátů, jejich stabilita, množství a rozložení velikosti pórového prostoru mezi agregáty charakterizují strukturu půdy. Hlavním faktorem pro produktivitu rostlin je vhodný poměr mezi pevnou, kapalnou a plynnou fází [9].

V současné době je půda lidskou společností využívána ve velkém měřítku zejména pro produkci plodin, a proto je důležité dbát na její kvalitu, aby nedocházelo ke kontaminaci podzemních vod, erozi a dezertifikaci, snižování schopnosti zadržovat vodu a znehodnocování půdy různými škůdci. Tyto negativní vlivy mohou ve výsledku vést ke snížení celkové úrodnosti půdy. Kvalitu půdy lze definovat jako schopnost půdy fungovat jako životně důležitý systém v rámci ekosystémových hranic, udržovat zdraví a produktivitu rostlin a rovněž zlepšovat kvalitu ovzduší, vodního prostředí a tím podporovat lidské zdraví [10].

Jedním z hlavních indikátorů kvality půdy jsou půdní mikroorganismy, které vykazují velmi odlišné formy života od autotrofních, litotrofních až po heterotrofní, přičemž heterotrofní forma života přeměňuje největší množství uhlíku v půdě. Mikroorganismy mají klíčové funkce při rozkladu organické hmoty, koloběhu živin a udržování struktury půdy, rovněž slouží jako potrava mnoha dalším půdním organismům a tvoří největší část celkové biomasy v půdě [11].

#### 2.1.1 Půdní organická hmota

Půdní organická hmota představuje nepostradatelnou součást půdy a je tvořena neživou a živou částí. Živou část organického podílu půdy tvoří kořeny rostlin a edafon (mikroedafon, mesoedafon a makroedafon), zatímco mezi neživou složku patří primární organická hmota a humusové látky. Obě tyto půdní části ovlivňují biologii půdy, mineralizační a imobilizační proces, a zároveň se navzájem podmiňují a podílí na transformaci organických látek v půdě [12].

Půdní organická hmota hraje významnou roli zejména při tvorbě a stabilizaci půdních agregátů a zároveň poskytuje značné množství rostlinných živin, chrání kvalitu vody a ovzduší tím, že snižuje erozi půdy a sekvestruje skleníkové plyny. Organická část půdy obsahuje základní prvky jako dusík, fosfor a síru, které pozitivně působí jak na úrodnost půdy, tak i na růst rostlin [13]. Zároveň je však tvořena především z organického uhlíku, který pochází z odumřelých rostlinných zbytků, nebo se nachází v půdních mikroorganismech a fauně. Rostlinné zbytky jsou rozkládány těmito mikroorganismy a značná část organického uhlíku se uvolňuje do atmosféry ve formě oxidu uhličitého. Půdní organická hmota je složkou biosféry, která jednak usnadňuje růst a produkci zemědělských plodin a jiné bioty, a také podporuje aktivitu půdních mikroorganismů a fauny. Produktivita rostlin je přímo spojená s obsahem půdní organické hmoty v půdě a koloběhem živin mikrobiální aktivitou [14].

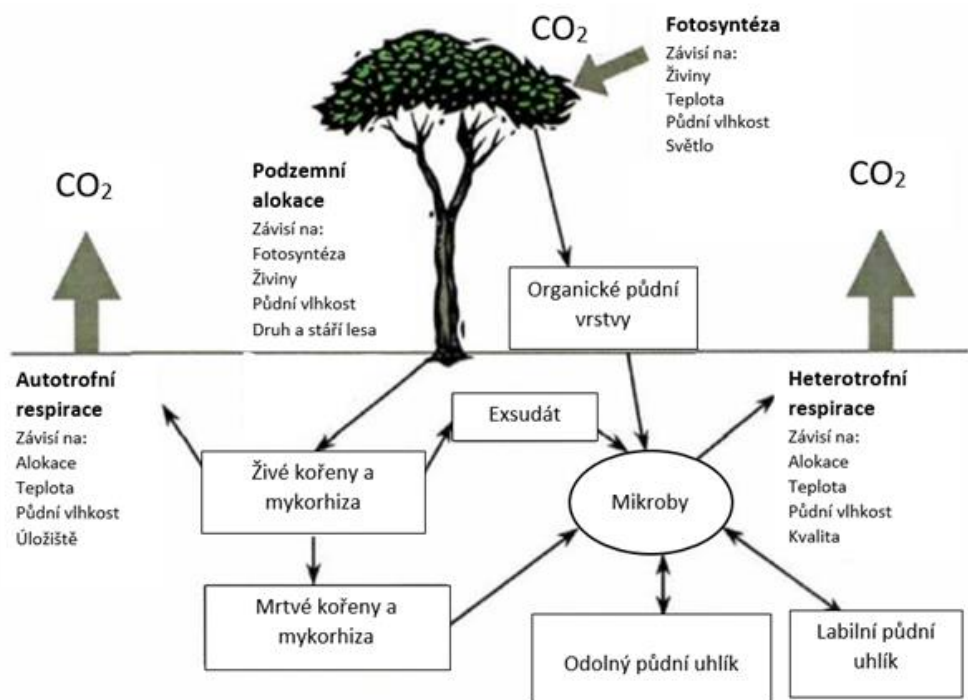
### 2.1.2 Půdní biodiverzita

Živá půda je pro člověka životně důležitá, jelikož biologická rozmanitost půdy spolu s funkcí půdních organismů poskytuje nejen kontrolu nad nemocemi, ale také ovlivňuje množství a kvalitu potravy, kterou přijímáme, vzduch, který dýcháme a vodu, kterou pijeme [15]. Biologická rozmanitost půdy je významná pro celou funkci ekosystému. Odhaduje se, že zhruba 1 g půdy obsahuje až 1 miliardu bakteriálních buněk sestávajících se z desítek tisíc taxonů a širokého spektra hub, roztočů a členovců [16]. Tato značná rozmanitost přispívá k celkové biomase a je úzce spojena s nadzemní biodiverzitou. Snížená biologická rozmanitost v půdách může výrazně narušit celkovou funkci ekosystému, jako například získávání živin rostlinami a cyklování zdrojů mezi nadzemními a podzemními částmi půdy [17].

Diverzita půdních organismů je regulována hierarchií abiotických a biotických faktorů. Hlavními abiotickými faktory jsou klima, zahrnující teplotu a vlhkost, texturu a strukturu půdy, salinitu a pH. Celkově klima ovlivňuje fyziologii půdních organismů tak, že jejich aktivita a růst se zvyšuje při vyšších teplotách a vlhkosti půdy. Textura a struktura půdy také radikálně ovlivňuje aktivitu půdní bioty. Například hlinité a jílovité půdy podporují mikrobiální aktivitu a aktivitu půdních živočichů (např. žížal), zatímco písčité půdy s nižším potenciálem zadržování vody jsou méně příznivé na aktivitu půdních mikroorganismů [18]. Salinita půdy může způsobit silný stres pro půdní organismy, což vede k jejich rychlému vysychání. Citlivost vůči salinitě se však u jednotlivých druhů liší a její zvýšená hodnota může mít rovněž pozitivní účinky, jelikož dokáže zpřístupnit více organické hmoty. Podobně mohou změny pH půdy ovlivnit metabolismus půdních druhů ovlivněním aktivity enzymů, což má dopad na dostupnost živin půdním organismům [19].

### 2.1.3 Půdní respirace

Půdní dýchání (respirace) je komplikovaný proces, který ovlivňují zejména biologické a abiotické aspekty. Půdní autotrofní dýchání bezprostředně závisí na fotosyntéze a množství organických sloučenin v půdě. Heterotrofní dýchání má vliv na chemické složení substrátu a na strukturu půdního biologického společenstva. Obrázek 1 uvádí hlavní biotické a abiotické faktory, které ovlivňují dýchání půdy [20]. Mezi abiotické procesy patří adsorpce  $\text{CO}_2$  na půdní minerály a rozpouštění  $\text{CO}_2$  v půdním roztoku. Ve většině ekosystémů je považován tento příspěvek na celkový tok  $\text{CO}_2$  v půdě jako méně významný v porovnání s biotickými procesy [21].



Obrázek 1: Faktory ovlivňující uvolňování CO<sub>2</sub> z půdy [20]

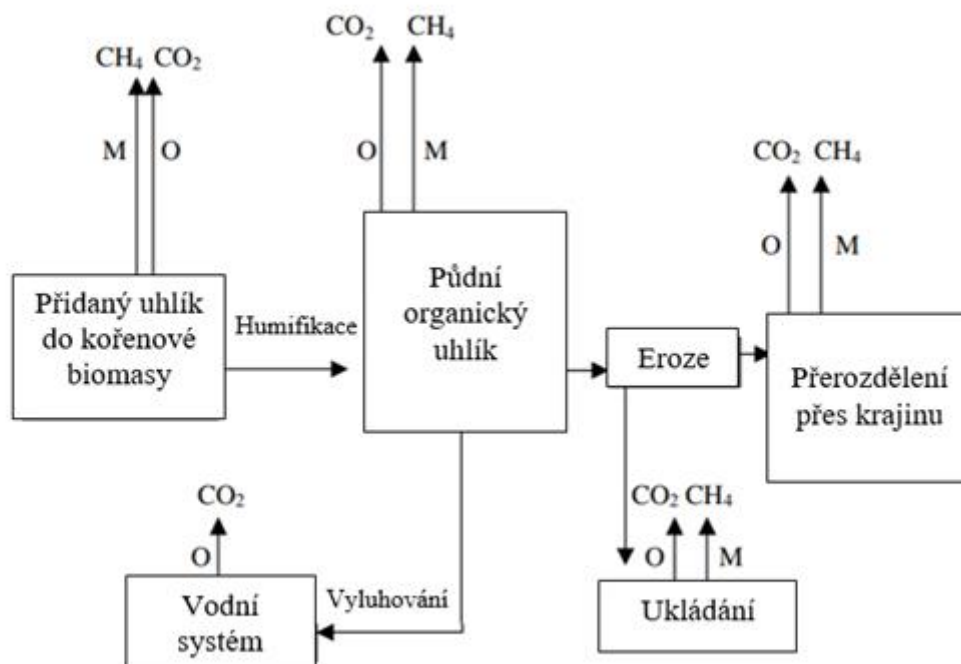
Půdní respirace je vzájemně propojena s nadzemní procesy, kdy fotosyntéza dodává uhlíkový substrát pro růst kořenů a jestliže se sníží množství substrátu, sníží se i míra půdního dýchání [20].

#### 2.1.4 Skleníkové plyny

Skleníkové plyny jsou tvořeny převážně oxidem uhličitým, metanem a oxidem dusným. Jejich zvýšený obsah v atmosféře významně přispívá ke zvýšení teploty a globálnímu oteplování. Rychle rostoucí koncentrace CO<sub>2</sub> na celém světě také vede ke vzniku nepravidelného klimatu a zvyšování hladiny moří [22].

Oxid uhličitý je důležitý skleníkový plyn, který tvoří zhruba 60 % celkového skleníkového efektu. Půda je hlavním zdrojem atmosférického CO<sub>2</sub>. V případě rostoucích hrozeb globálního oteplování v důsledku emisí skleníkových plynů má zásadní význam snížení emisí CO<sub>2</sub> sekvestrací uhlíku v půdě. Při sekvestraci uhlíku hrají důležitou roli zejména hospodaření s půdou, jako je zvýšení obsahu organického uhlíku v půdě, omezení zpracování půdy, hnojení, mikroagregace a zlepšení biologické rozmanitosti půdy [23].

Oxid uhličitý se z půdy uvolňuje půdním dýcháním, které zahrnuje tři biologické procesy, a to mikrobiální dýchání, kořenové dýchání a faunální dýchání především na povrchu půdy nebo v tenké horní vrstvě, kde se koncentruje většina rostlinných zbytků. Dále pak pomocí nebiologického procesu zvaný oxidace, která může nastat při vyšších teplotách. Procesy ovlivňující dynamiku půdního uhlíku ukazuje Obrázek 2. Na rozkladu organických látek za vzniku CO<sub>2</sub> se půdní mikroflóra podílí z 99 %, přičemž podíl půdní fauny je podstatně menší. Kořenové dýchání se podílí z 50 % na celkovém dýchání půdy [23].



Obrázek 2: Procesy ovlivňující dynamiku půdního uhlíku. M = methanogeneze; O = oxidace [23]

Metan je zodpovědný za asi 15 % zvýšeného skleníkového efektu, kdy největší vliv na emise metanu z půd má jednoznačně teplota [24]. Dalším důležitým aspektem je půdní vlhkost, která ovlivňuje výměnu metanu i kyslíku mezi půdou a atmosférou a tím řídí oxidaci metanu. Půdní vlhkost také ovlivňuje aktivita metanogenů a metanotrofů ovlivněním pH půdy a redoxního potenciálu půdy změnou půdních anaerobních podmínek [25]. Metan vzniká v půdě při mikrobiálním rozkladu organické hmoty za anaerobních podmínek. Vyšší obsah organického uhlíku a používání organických hnojiv zvyšuje emise metanu [26].

Z organických i anorganických hnojiv přijímá půda mimo jiné velké množství dusíku, což vede ke změně celkového množství dusíku v půdě, které ukládá. Dochází tak k výslednému uvolňování dusíkatých sloučenin do atmosféry ve formě skleníkového plynu (oxidu dusného) a do podzemních a povrchových vod ve formě dusičnanů. Zvýšení množství dusíku v půdě zvyšuje zásobu uhlíku, což způsobuje podporu růstu rostlin. Důležitou roli pro pokrok v zemědělství hraje přidavek materiálů bohatých na uhlík, jako jsou průmyslové vedlejší produkty, hnůj, ale i biouhel, jelikož mohou výrazně podpořit sekvestraci uhlíku v půdě [27]. Emise  $N_2O$  se výrazně zvyšují se zvyšující se teplotou, což je přičítáno nárůstu anaerobního objemového podílu, způsobeného zvýšeným respiračním nedostatkem kyslíku. Zvětšení prostoru pórů naplněných vodou má také za následek zvýšení anaerobního objemu; což opět vede k nárůstu emise  $N_2O$  [28].

## **2.2 Biouhel**

Biouhel vzniká při částečné nebo úplné nepřítomnosti kyslíku tepelným rozkladem biomasy (pyrolýzou), kdy se současně vytváří také hořlavé plyny (hlavně H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>), těkavé oleje, CO<sub>2</sub> a dehtové páry. Charakteristickým znakem biouhlu je to, že obsahuje převážně stabilní aromatické formy organického uhlíku [29].

### **2.2.1 Charakteristika**

Biouhel je černý, vysoce porézní, pevný produkt bohatý na uhlík, který se vyrábí pyrolýzou různého druhu biomasy [29]. Biouhel obsahuje biomasu ve stabilizované formě, pro kterou může půda poskytnout úložiště ve velmi velkém měřítku. S požadovanými fyzikálními a chemickými vlastnostmi by tyto formy uhlíku mohly stále nabízet potenciální hodnotu pro produktivitu plodin prostřednictvím dynamických nebo reverzibilních interakcí s živinami a půdními minerálními částicemi. Jakékoli zlepšení produktivity stávající zemědělské půdy má potenciál zmírnit tlak na biologicky rozmanité a často na uhlík bohaté přírodní ekosystémy. Právě v tomto kontextu se biouhel jeví jako vhodný materiál pro zmírňování změny klimatu a produkci potravin v celosvětovém měřítku [30].

### **2.2.2 Fyzikální vlastnosti**

#### **Povrch biouhlu**

Jedním z důležitých fyzikálních vlastností biouhlu je jeho povrch, který hraje významnou roli při jeho interakci s půdním prostředím. Čím větší povrch biouhlu, tím více chemických interakcí může probíhat [31]. Během zpracování biouhlu dochází k úbytku a smrštění organického materiálu, a proto technologie pyrolýzy a vstupní suroviny ovlivňují finální velikost částic stejně jako povrch biouhlu. Jestliže jsou vstupní suroviny na bázi dřeva, vzniká biouhel hrubší struktury, zatímco pokud je vstupní materiál ze zbytků plodin, jako například kukuřice nebo žito, vzniká biouhel jemnější struktury [32]. Obecně se povrch biouhlu zvětšuje se zvyšující se teplotou pyrolýzy [33].

#### **Pórovitost biouhlu**

Dalším důležitým aspektem je velikost pórů biouhlu, která závisí na druhu vstupního materiálu při pyrolýze, a která může přímo ovlivnit redoxní prostředí půdních mikroorganismů. Mikropóry, definované jako póry s průměrem <30 μm, slouží jako kapilární prostory, prostřednictvím kterých dokáže biouhel zadržovat vodu. Biouhel také obsahuje makropóry (průměr >75 μm), které mohou sloužit jako kanály pro výměnu plynů, čímž ovlivňují redoxní prostředí pro půdní biotu. Porézní struktura a rovněž hydrofobní povaha biouhlu slouží k sorpci hydrofobních organických sloučenin. Aplikace dalšího zdroje uhlíku do půdy může snížit rozpustné nebo volné fenolické sloučeniny [34]. Na velikost pórů má vliv teplota pyrolýzy, kdy zvýšená teplota urychluje degradaci nestabilních složek v biomase, jako je škrob, hemicelulóza a lignin, které mají tendenci se rozkládat na těkavé sloučeniny, což může být kyselina octová, dehet, methanol, CO<sub>2</sub>, CO a H<sub>2</sub>, kdy se vytváří poréznější struktura a nová aktivní místa. Navíc dochází ke kondenzaci grafenové vrstvy distribuované na biouhlu, což vede ke vzniku mikrokrystalických struktur [35].

## Hustota biouhlu

Lze studovat dva typy hustoty biouhlů, a to hustotu pevných částic a objemovou hustotu. Hustota pevných částic je hustota na molekulární úrovni, která zahrnuje pouze objem obsazený pevnými molekulami, zatímco objemová hustota zahrnuje strukturní objem a objem pórového prostoru. Hustota částic biouhlu je obvykle mezi 1,5–1,7 g/cm<sup>3</sup> a obecně se zvyšuje s teplotou pyrolýzy [36]. Hustota vstupní suroviny má velký vliv na výslednou hustotu biouhlu, jelikož čím vyšší je hustota výchozího materiálu, tím vyšší je hustota biouhlu po pyrolýze. Zvýšení hustoty je spojeno se zvýšením obsahu ligninu, což znamená vyšší výtěžek biouhlu. Lignin je bohatý na uhlík, a proto podporuje konverzi [37].

### 2.2.3 Chemické vlastnosti

Elementární složení biouhlu významně závisí na chemické struktuře biouhlu, s čímž souvisí zejména technologie přípravy. Hlavními složkami biouhlu jsou C, H, O a N, kdy obsah C je vyšší než 60 %. Mezi další složky patří P, Ca, Mg, K, S, Si, Fe a stopové prvky jako Mn, Zn a Cu. S rostoucí teplotou pyrolýzy se zvyšuje obsah uhlíku a snižuje se obsah vodíku a kyslíku. Formu uhlíku v biouhlu lze rozdělit na anorganický uhlík (uhličitan, hydrogenuhličitan) a organický uhlík (alifatický uhlík, aromatický uhlík). Anorganický uhlík v surovinách se během pyrolýzy přeměňuje z uhličitanových sloučenin na hydrogenuhličitan nebo je emitován ve formě CO<sub>2</sub> [38].

Kyslík v biouhlu zahrnuje především oxidy kovů, hydroxidy, iontové skupiny (uhličitan, sírany) a hydroxylové, karboxylové, karbonylové a esterové funkční skupiny. Druh funkční skupiny na povrchu biouhlu ovlivňuje jeho chemické vlastnosti jako jsou povrchové elektrické vlastnosti nebo kationtové výměnná kapacita. Funkční skupiny činí povrch biouhlu hydrofilním nebo hydrofobním, a tedy určují funkce biouhlu v půdě. Povrchové funkční skupiny biouhlu se mění s teplotou pyrolýzy, kdy při nižších teplotách dochází k výrazné redukci povrchových funkčních skupin biouhlu, protože esterifikace a dekarboxylace snižují obsah karboxylů, obsah hydroxylů se však zvyšuje. Při vysokých teplotách se aromatická struktura postupně zvyšuje a alkoholová skupina se přeměňuje na fenolické hydroxylové skupiny, čímž se zvyšuje celkový obsah povrchových funkčních skupin [38]. Mezi další funkční skupiny nacházející se v biouhlu patří epoxylové, etherové, sulfonové, alifatické, fenolické a aromatické skupiny, kdy vyšší obsah karboxylových a fenolických skupin způsobuje vyšší kapacitu výměny kationtů, a tak představuje vyšší možnost adsorbovat živiny [39].

### 2.2.4 Pyrolýza

Pyrolýza je termín používaný pro tepelnou depolymerizaci organické hmoty v nepřítomnosti kyslíku. Je to endotermická reakce, při které rychlé zahřívání biomasy v inertní atmosféře vede k produkci organické páry složené z fragmentů celulózy, hemicelulózy a polymerů ligninu, které se nacházejí v biomase. Tyto páry mohou být kondenzovány za vzniku volně proudící organické kapaliny, běžně známé jako bioolej. Nekondenzovatelné plyny opouštějí reakční systém a mohou být použity k poskytnutí tepla pro pyrolýzu. Zbývající materiál bohatý na uhlík je právě biouhel [40].



Výroba biouhlu je rovněž spojená s využitím průmyslových vedlejších produktů jako vstupních surovin. Výrobní proces často odráží rovněž výrobu dřevěného uhlí, avšak liší se skutečností, že záměrem výroby biouhlu je zejména jeho aplikace do půdy jako prostředek zlepšení produktivity půdy, ukládání uhlíku nebo filtrace prosakující půdní vody [41]. Často využívané zemědělské odpady jsou například skořápky ořechů, meruňkové a třešňové pecky, bagasa, dřev z kokosových ořechů, nať česneku, zbytky z hroznů, jutové tyčinky, olivový odpad, nať pepře nebo čajový odpad. Pro pyrolýzu se však také používají různé druhy biomasy na bázi dřeva, lignocelulózní biomasa, drůbeží podestýlka, tuhý komunální odpad nebo odpadní kaly [40].

### **Rychlá pyrolýza**

Rychlá pyrolýza je nepřetržitý proces, o který roste zájem zejména kvůli vysokým výtěžkům biooleje, jenž lze následně použít na výrobu kapalného paliva. Účelem rychlé pyrolýzy je zabránit vzniku produktů pyrolýzy na nekondenzovatelné sloučeniny. Primárním požadavkem rychlé pyrolýzy jsou vysoké rychlosti přenosu tepla, kterých lze dosáhnout jemným rozemletím vstupní biomasy. Nástrík se zahřívá na vysoké teploty, obvykle 450–600 °C po krátkou dobu zdržení, typicky méně než 2 sekundy. Při vysokých teplotách je dostatek energie pro rychlé štěpení glykosidických vazeb a odpařování produktů, což vede k příznivé tvorbě plynných produktů. Vzhledem k tomu, že reakce probíhá velmi krátkou dobu, hraje klíčovou roli při určování chemie produktu nejen chemická kinetika, ale také rychlost přenosu tepla a hmoty [40].

### **Pomalá pyrolýza**

Pomalá pyrolýza je vsádkový proces, který se provádí při teplotách 300–750 °C a pomalých rychlostech ohřevu při dlouhé době zdržení (hodiny až dny). Tento proces je většinou využíván pro výrobu pevného produktu (dřevěné uhlí, biouhel), lze však touto operací vyrábět i produkty kapalné (bioolej). Karbonizace je pomalá pyrolýza biomasy bez kondenzace produktů pyrolýzy. Jde o nejstarší techniku úpravy biomasy pro výrobu dřevěného uhlí a provádí se tam, kde je požadovaným produktem biouhel. Páry při této operaci obvykle nekondenzují, ale lze je využít k poskytnutí tepla pro provoz přímým nebo nepřímým ohřevem [41].

#### **2.2.5 Aplikace biouhlu**

Mezi hlavní čtyři environmentální výhody při použití biouhlu patří vylepšení vlastností půd, nakládání s odpady, zmírňování změn klimatu a výroba energie. Aplikací biouhlu do půdy lze snížit emise skleníkových plynů, obnovit úrodnost půdy, změnit její fyzikální vlastnosti (např. pH, strukturu pórů, obsah minerální hmoty), minimalizovat klimatické změny, zvýšit výnos plodin a rovněž snížit emise dusíku. Biouhel také může zmírnit salinitu zemědělských půd, zvýšit celkové množství uhlíku v organické hmotě a díky zadržování živin minerálních iontů ovlivňuje povrchový náboj půdy. Biouhel zlepšuje sorpční kapacitu polyaromatických uhlovodíků, pesticidů a herbicidů, a proto ovlivňuje toxicitu a transport těchto kontaminantů [42].

## 2.2.6 Praktické dopady aplikace biouhlu

Mezi praktickými aplikacemi biouhlu dominuje jeho využití v zemědělství jakožto půdního doplňku, zejména díky významnému vlivu biouhlu při sekvestraci uhlíku, cyklování dusíku nebo emisí skleníkových plynů [43]. Kromě potenciálu biouhlu sekvestrovat pevný atmosférický uhlík, jeho porézní struktura, velký povrch a afinita k nabitým částicím interagují s fyzikálními a biologickými složkami půdy, což může mít pozitivní účinky v celém ekosystému. K dalším výhodám využití biouhlu v zemědělství patří jeho pozitivní vliv na růst rostlin. Aplikace biouhlu do půdy tedy způsobuje zvýšenou produktivitu rostlin a zároveň snížení vyplavování živin, což je jedna z hlavních výhod jeho účinku. Pozitivní účinky na růst rostlin tvoří biouhel zejména díky zlepšení schopnosti půdy zadržovat vodu, snížení výskytu chorob v plodinách a omezení biologické dostupnosti těžkých kovů [44].

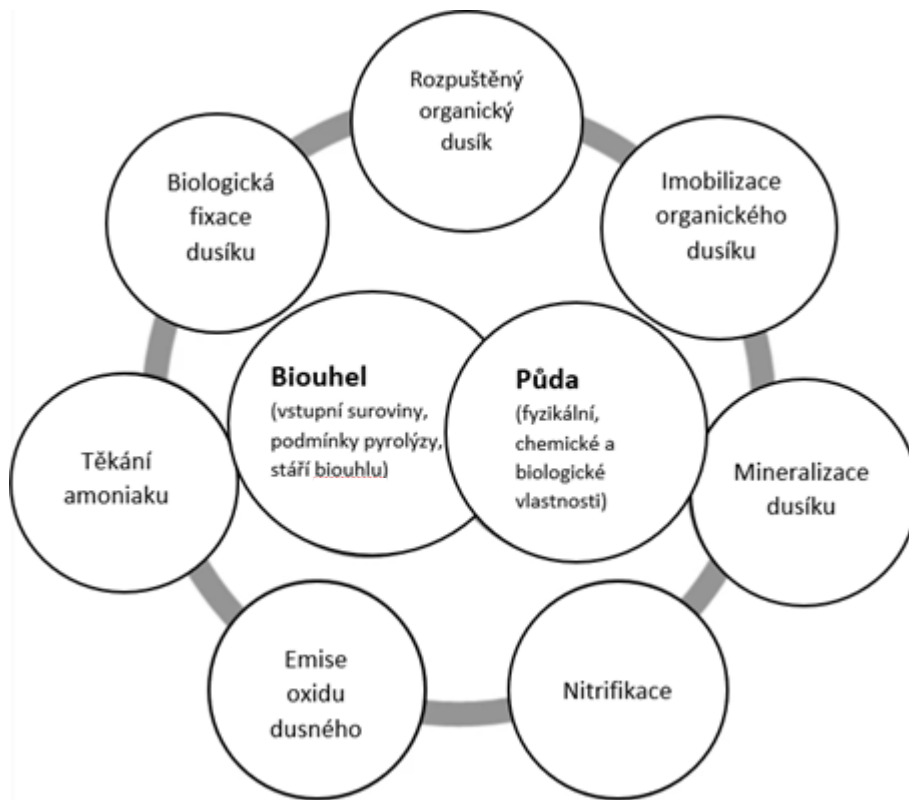
### Vliv biouhlu na organický uhlík

Obsah organického uhlíku v půdě je považován za významný ukazatel kvality půdy a produktivity rostlin, jelikož zlepšuje fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti půdy [45]. Aplikace biouhlu má různé účinky na půdní biotu, což může být spojeno s jeho dopady na koloběh uhlíku a dusíku. Biouhel zvyšuje půdní mikrobiální biomasu a mění strukturu mikrobiálních populací, což má za následek různé rozkladné procesy. Tyto účinky mohou být zprostředkovány změnami vlastností půdy, jako je pH, a změnou dostupností organické hmoty a živin, jakož i nepřímo prostřednictvím účinků na růst rostlin a následnou změnou kvality a množství rostlinných vstupů do půdy [46].

Biouhel inhibuje mineralizaci půdního organického uhlíku, kdy míra inhibice záleží na vstupní biomase při výrobě biouhlu. Ke snížení mineralizace uhlíku dochází vlivem uvolňování rozpustných fenolických materiálů z biouhlu, které se vážou na degradační enzymy a inhibují je; sorpce extracelulárních enzymů na biouhel vedoucí k jejich odstranění z míst přeměny organické hmoty; uvolnění rozpustného uhlíku z biouhlu, který působí jako preferenční zdroj uhlíku pro půdní mikroflóru, čímž se sníží využití půdního organického uhlíku, posun pH vyvolaný aplikací biouhlu, který mění strukturu mikrobiálního společenství; sorpce rozpuštěného organického uhlíku na biouhel, který ho chrání před rozkladem a zvýšená produkce mikrobiální biomasy, takže se uhlík spíše ukládá v mikrobiálních tkáních, než aby se mineralizoval [47].

### Vliv biouhlu na organický dusík

Přídavkem biouhlu do půdy dochází k ovlivnění cyklu organického dusíku (Obrázek 3). Biouhel tak ovlivňuje aktivní zásoby dusíku v půdě (rozpuštěný organický dusík, anorganický dusík), přeměny dusíku (mineralizace, imobilizace a nitrifikace), vstup dusíku (biologická fixace  $N_2$ ) a výstup dusíku (rostlinný příjem, těkání  $NH_3$  a emise  $N_2O$ ). Celý tento proces působení biouhlu na cyklus dusíku v půdě následně ovlivňuje produktivitu rostlin [48].



Obrázek 3: Vliv aplikace biouhlu na procesy zapojené do cyklu organického dusíku [39]

Biouhel má schopnost ovlivňovat cyklus dusíku v půdě změnou rychlosti transformace a přeměně sloučenin dusíku v půdě. Příznivé účinky přidávání biouhlu jsou výrazné pro vysoce zvětralé půdy, a tak vykazují pozitivní agronomické odezvy [49].

### Vliv biouhlu na makroprvky a mikroprvky

Biouhel má schopnost zadržovat makroprvky stejně tak jako mikroprvky za současného zvýšení iontové výměnné kapacity [50]. Mezi makroesenciální prvky, které tvoří biouhel, patří především uhlík, vodík, kyslík, dusík, fosfor a síra. Uhlík může dosahovat až 90 hm.% a tvoří v biouhlu aromatické struktury. Dusík se v biouhlu vyskytuje v množství maximálně do 4 hm.% a síra pod 1 hm.%. Mezi mikroesenciální prvky patří železo, měď, zinek, draslík, vápník, hořčík, mangan, molybden a sodík. Vodou extrahovatelné koncentrace všech makroživin a mikroživin se mění v závislosti na vstupní surovině. Koncentrace minerálních prvků, které jsou okamžitě k dispozici pro příjem rostlinami (vodou extrahovatelné), se značně liší v závislosti na surovině použité k výrobě biouhlu [51]

Biouhel získaný z rostlin má však menší množství živin než biouhel získaný z hnoje [52]. Původ biouhlu ovlivňuje množství mikroprvků, kdy biouhel vyroben ze zvířecího původu (kuřecí hnůj) zvyšuje obsah K, Mg, Na a P. Naopak biouhel rostlinného původu (borovicová kůra), způsobuje zvýšení K, ovšem u obsahu Mg, Na a P nedochází k významným změnám [53].

Biouhel bohatý na mikroživiny je při aplikaci do půdy důležitý zejména z toho důvodu, že v rámci intenzifikace zemědělství dochází k vyčerpávání půd, a mikroživiny se podílejí na většině metabolických a buněčných funkcí, jako je primární a sekundární metabolismus, energetický metabolismus nebo genová regulace [54].

Mezi možné přínosy biouhlu při aplikaci do půdy se považuje pomalé uvolňování rostlinných makroživin obsažených v biouhlu jako možnost snížení potřeby přidávání různých chemických hnojiv v zemědělství [55]. Ovšem se zvyšující se aplikací biouhlu v kombinaci s komerčními hnojivy se výrazně zlepšily agronomické parametry (výnos zrna, počet uzlů, počet odnože, počet listů, makroživiny a mikroživiny v rostlinném výhonku), fyzikální a chemické vlastnosti půdy (kapacita zadržování vody, dostupné N, P a K) a stejně tak i mikroživiny jako jsou B, Mo, Zn, Mn, Fe a další [56].

### **Vliv biouhlu na emise skleníkových plynů**

Emise skleníkových plynů ovlivňuje biouhel důsledkem zvyšování produkce plodin, mineralizace půdní organické hmoty, ale také změnou emise  $\text{CH}_4$  a  $\text{NO}_2$  [48]. Rozdíly závisí na typu a stavu půdy stejně jako na podmínkách pyrolýzy při výrobě biouhlu. Biouhel vytvořený při vyšších teplotách pyrolýzy více snižuje uvolňování  $\text{CO}_2$  ve srovnání s biouhly vyrobenými při nižších teplotách. Biouhel s menším obsahem dusíku způsobí snížení emise  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$ , což je však následně kompenzováno zvýšenými emisemi  $\text{N}_2\text{O}$  [57]. Oxid dusný jakožto skleníkový plyn nejvíce přispívá k celosvětovému poškozování ozónové vrstvy ve stratosféře. Většina  $\text{N}_2\text{O}$  se uvolňuje do atmosféry přirozenými mikrobiálními procesy nitrifikace a denitrifikace, ale rovněž pomocí lidské aktivity, jako je rozsáhlé používání dusíkatých hnojiv [58].

Ve většině případů však mohou půdy upravené biouhlem zvýšit emise  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$ , kdy počáteční nárůst v uvolňování  $\text{CO}_2$  z půd upravených biouhlem je způsoben biotickými i abiotickými procesy. Prvotní nárůst  $\text{CO}_2$  přidáním biouhlu je způsoben jak mineralizací uhlíku přidaného prostřednictvím biouhlu, tak i stimulací mikrobiální aktivity, a proto se očekává vyšší počáteční rozklad půdní organické hmoty [59].

### **2.3 Metody měření půdní respirace**

Půdní respiraci je obtížné přesně měřit zejména kvůli výrazné variabilitě půd a mnoha dalším faktorům prostředí, ve kterém k měření dochází. Pro měření dýchání půdy existuje řada různých metod, z nichž každá má své vlastní silné a slabé stránky. Proto se metodologické rozdíly mezi jednotlivými experimentálními přístupy mohou stát hlavním zdrojem nejistoty při odhadování cyklu uhlíku na lesní a globální úrovni [60].  $\text{CO}_2$  produkovaný na povrchu půdy je výsledkem několika respiračních procesů, což komplikuje modelování a interpretaci dat. Přibližně polovina půdního dýchání pochází z metabolické aktivity na podporu a růst kořenů a souvisejících mykorhiz. Většina ze zbytku je spojena s heterotrofní respirací z mikrobiálních komunit využívajících nedávno vyrobený organický materiál jako energetický substrát. Pouze malá část (10 %) půdního dýchání pochází z rozkladu starších, odolnějších sloučenin uhlíku. Podíl půdní respirace z autotrofních a heterotrofních příspěvků se může sezónně a mezi ekosystémy lišit [61].

Suchozemské ekosystémy se vyznačují svou výměnou uhlíku s atmosférou. Tyto ekosystémy mohou mít významný dopad na koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře, a tudíž mohou vést k velké zpětné vazbě mezi biosférou a atmosférou, následkem čehož lze pozorovat změny klimatu. Tok CO<sub>2</sub> na povrchu půdy je složité měřit hned z několika důvodů. Navrhované metody se mohou dopustit četných chyb kvůli velké prostorové a časové variabilitě v závislosti na mnoha faktorech prostředí a charakteristikách substrátu. Proto je nezbytné srovnání metod k měření tohoto důležitého toku [62].

### 2.3.1 Metoda mikrotitračních destiček

Test na mikrotitračních destičkách je velmi oblíbeným formátem pro klinické a environmentální analýzy. Umožňuje rychlé a reprodukovatelné testování 96 vzorků na běžných laboratorních miskách a 1536 vzorků na vysokokapacitních screeningových miskách. Mikrotitrační destičky (Obrázek 4) se obecně používají pro chemické a biologické experimenty, jako je detekce a sledování chemických nebo biologických reakcí, buněčného růstu a testy toxicity, ale lze je použít také v kombinatorické chemii [63]. Další možný způsob využití této metody může sloužit k posouzení ekotoxikologie kontaminantů v půdě, zejména ke kvantifikaci úrovně kontaminantů, které způsobují inhibiční účinky [64]. Mikrobiální testy poskytují možnost pro srovnání vzorků různých půd za laboratorních podmínek. Metoda mikrotitračních destiček nabízí způsob, jak měřit rychlost mikrobiálního dýchání indukovaného řadou zdrojů uhlíku. Množství přidaného uhlíku odráží množství mikrobiální biomasy schopné využít specifický zdroj uhlíku. Předpokládá se, že čím větší je diverzita mikrobiální komunity, tím širší je rozsah využití zdroje uhlíku [65].



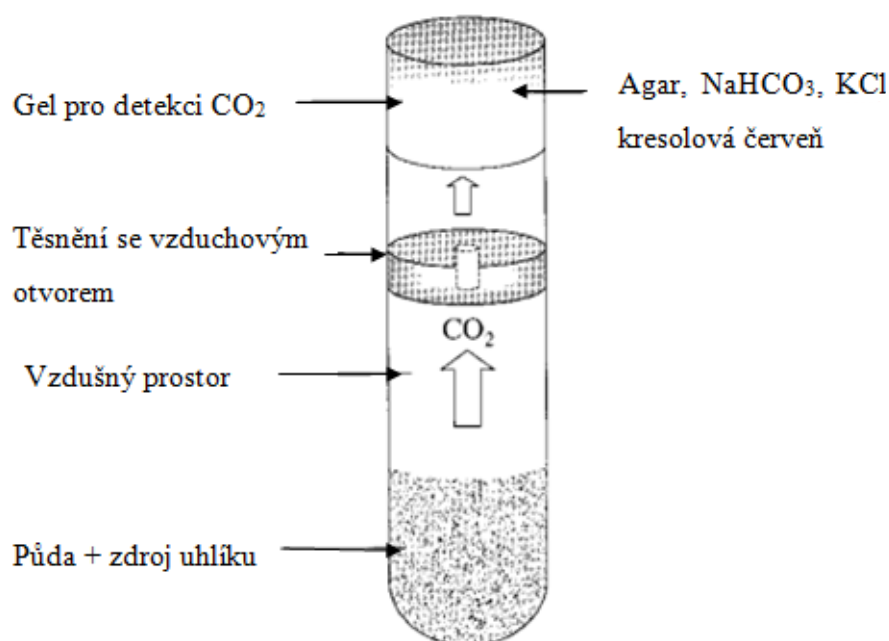
Obrázek 4: Mikrotitrační destička s hloubkovými jamkami [66]

Metoda mikrotitračních destiček slouží k měření oxidu uhličitého vzniklého z úprav uhlíkového substrátu k určení fyziologického profilu půdních mikrobiálních komunit. V této metodě se používají mikrotitrační detekční destičky, které jsou schopné měřit vývoj oxidu uhličitého z půdy během krátkých časových úseků a zároveň není potřeba extrakce a kultivace organismů. Tato technika je široce používána částečně proto, že je jednoduchá, jelikož se používá automatizovaný měřicí přístroj, který poskytuje velké množství informací o vlastnostech mikrobiálních komunit, a zároveň pojme mnoho vzorků [66].

### 2.3.2 Kolorimetrická detekce

Kolorimetrické detekční destičky slouží k posouzení mineralizace uhlíku uvolňováním oxidu uhličitého z půdy. Součástí bývá předinkubační fáze (cca 5 dnů), která vede k mineralizaci snadno dostupného půdního uhlíku a aktivuje mikrobiální komunitu před přidáním různých substrátů [64].

Detekční mikrorespirometrický systém (Obrázek 5) se skládá ze dvou mikrotitračních destiček umístěných k sobě. Jedna z těchto destiček obsahuje vzorky půdy s přidávanými zdroji uhlíku a druhá destička je systém pro detekci uvolněného oxidu uhličitého. Obě desky jsou utěsněny těsněním a propojeny otvory mezi jednotlivými jamkami. Systém drží pohromadě pomocí účelově navržené svorky. Obsah vlhkosti v prosévané půdě je nastaven na 60 hm.% sorpční kapacity půdy. Jednou z možných metod k detekci uvolněného oxidu uhličitého pro testování substrátu je právě tato kolorimetrická metoda, jelikož se opírá o změnu pH roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Jak se uvolňující oxid uhličitý absorbuje do alkálie, dochází ke změně pH indikátorového barviva v gelu a následně také ke změně barvy. Indikátorové barvivo (kresolová červeně), chlorid draselný a hydrogenuhličitan sodný se společně s agarem vloží do každé jamky detekční destičky. Po ztuhnutí se destičky ukládají do plastových sáčků s mokkými papírovými ručníky a natronovým vápnem, aby se nevysušovaly a nereagovaly s atmosférickým  $\text{CO}_2$  [66].



Obrázek 5: Schéma aparatury k detekci uvolněného  $\text{CO}_2$  z půdy [66]

Pro vyhodnocení množství uvolněného CO<sub>2</sub> je nejdříve potřeba sestavit kalibrační křivku závislosti absorpance na rovnovážné koncentraci CO<sub>2</sub>. Tato kalibrační křivka vznikne ekvilibrací roztoků barviv při různých koncentracích CO<sub>2</sub> připravených se standardními směsmi plynů nebo inkubací čtyř velmi odlišných půd v půdních nádobách s glukózou nebo bez glukózy [66].

### **2.3.3 Radioaktivní detekční systém**

V detekčním systému využívajícím radioizotopovou metodu se používají radioaktivní substráty, a uvolňovaný oxid uhličitý (<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>) je detekován zachycením do alkalického roztoku. V tomto případě není alkalický roztok zafixován v gelu, takže systém je sestaven dnem vzhůru [67]. Po přidání substrátu se inkubační a detekční destičky spojí a utěsní. Po odstranění detekční destičky se do každé jamky přidá scintilačního činidla a následně se koncentrace zachyceného <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> detekuje kapalinovým scintilačním počítačem na mikrodestičkách [68].

### **2.3.4 Komorové metody**

Měření emisí plynů do atmosféry lze stanovovat pomocí tzv. komorových metod, které mohou být statické, běžně nazývané jako uzavřená komora, nebo také průtokové (dynamické) komory, kde se sleduje nárůst koncentrace plynu ve výstupním proudu a porovnává se s nárůstem v přítokovém proudu. Tato metoda vyžaduje adekvátní měření průtoku a koncentrace plynu v proudu [69]. Komorové metody přímo detekují tok CO<sub>2</sub> na povrchu půdy v nádobě se známým povrchem. U dynamické metody v komoře dochází k cirkulaci vzduchu, zatímco u statické metody v komoře k cirkulaci nedochází. Dynamické metody umožňují cirkulaci vzduchu mezi komorou a senzorem, který měří koncentraci CO<sub>2</sub> během určitého časového období. Mezi těmito metodami je nejrozšířenější uzavřená dynamická komora, která pracuje ve zcela uzavřeném systému na povrchu půdy a koncentrace CO<sub>2</sub> se zaznamenává během krátkého časového intervalu [70].

#### **Metoda statické (uzavřené) komory**

Uzavřená statická komora znamená izolaci povrchu půdy od atmosféry na určité inkubační období, kdy dochází k záhytu CO<sub>2</sub> v alkalické směsi a následně stanovení uvolněného množství. Koncentraci CO<sub>2</sub> ze vzduchu lze určit extrakcí některých vzorků vzduchu na různé časové úseky a jejich analýzou v plynové chromatografii za použití některých senzorů v infračervené oblasti [70].

Metoda statické plynové komory zahrnuje především metodu absorpce statického louhu a metodu statické vzduchotěsné komory. První metoda stanovuje tok uhlíku pomocí louhu o určité koncentraci, kdy se zaznamenává absorbovaný CO<sub>2</sub> v nádobě pomocí alkálií nebo pevných alkalických částic a následně se vypočítá míra emise CO<sub>2</sub> během doby měření. Principem druhé metody je stanovení koncentrace CO<sub>2</sub> ve statické vzduchotěsné komoře pomocí plynové chromatografie a infračervené spektroskopie a výpočet míry emisí CO<sub>2</sub> z půdy pomocí zákona o časové variaci. Pro zlepšení přesnosti dat je proto nutné po monitorování doplňovat plyn, aby rychlost respirace půdy nebyla ovlivněna nadměrnou akumulací CO<sub>2</sub> v plynové komoře [71].

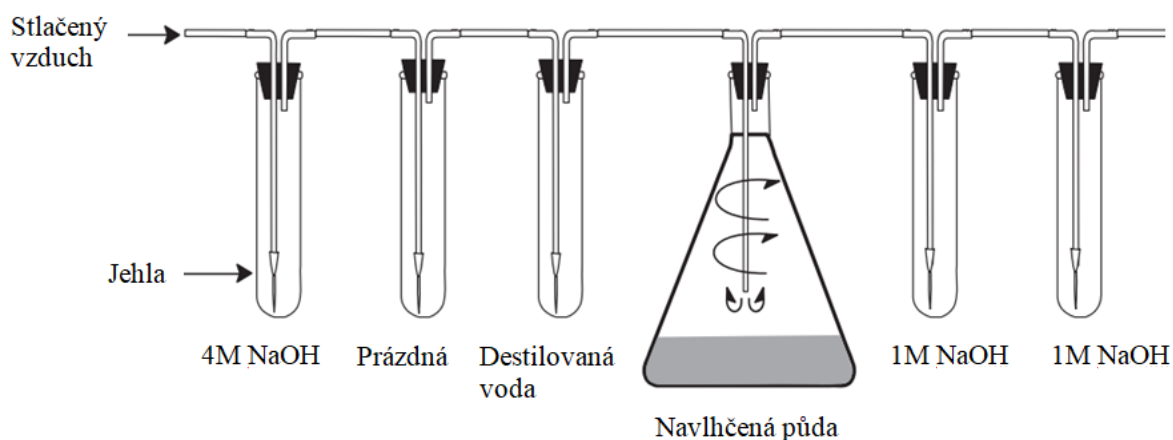
## Metoda průtokové (dynamické) komory

Otevřená dynamická komora pozoruje změny koncentrace  $\text{CO}_2$  mezi vzduchem proudícím do komory a vzduchem, který vychází ven. Systém má dvě důležité části, kterými jsou hlavní modul, kde se nachází operační systém a infračervené čidlo pro detekci  $\text{CO}_2$ . Druhou částí je čerpadlo, které zajišťuje proudění vzduchu, a monitor, kde lze pozorovat naměřené výsledky [70].

Metoda dynamické vzduchotěsné komory je v současnosti nejpoužívanější metodou monitorování. Metody pro zlepšení a kalibraci zahrnují omezení doby sledování, nastavení speciálních vzduchových komor a kalibraci vodní páry. Metoda dynamické vzduchotěsné komory zvažuje vliv plynové komory na gradient  $\text{CO}_2$  vypouštěného půdou. Proto se obecně doporučuje omezit dobu měření na 1 minutu a 30 sekund až 3 minuty, aby byla změna koncentrace  $\text{CO}_2$  v plynové komoře co nejmenší a minimalizoval se výše zmíněný dopad [71].

### 2.3.5 Dynamický inkubační systém

Dynamický inkubační systém funguje tak, že stlačený vzduch prochází řadou lapačů sestávajících ze skleněných zkumavek opatřených pryžovými zátkami (Obrázek 6). Plastová jednorázová pipeta se vloží do jednoho ze dvou otvorů v každé zátce a na konec pipety se nasadí jednorázová injekční jehla, přičemž hrot této jehly musí být blízko dna zkumavky. Druhým otvorem v zátce se vloží krátká plastová jednorázová pipeta. Skleněné zkumavky se pomocí plastových hadiček zapojí do série. Vzduch prochází třemi lapači před vstupem do Erlenmeyerovy baňky s půdou. První zkumavka obsahuje 4M NaOH k odstranění okolního  $\text{CO}_2$ ; druhá zkumavka je prázdná z důvodu zachycení vlhkosti a třetí zkumavka obsahuje deionizovanou vodu, ze které se veškerý  $\text{CO}_2$  odstraní probubláváním dusíku po dobu 30 minut a slouží ke zvlhčování proudu vzduchu, čímž se zabrání odpařování z komory. Vzduch pak prochází Erlenmeyerovou baňkou obsahující půdu a na závěr vzduch proudí přes dvě další po sobě jdoucí zkumavky obsahující 1M NaOH, než je vypuštěn do atmosféry. Tyto poslední dvě zkumavky se týdně vyměňují pro analýzu  $\text{CO}_2$  a okamžitě doplňují čerstvým NaOH, zatímco první zkumavka obsahující 4M NaOH se vyměňuje každé 3–4 týdny [72].



Obrázek 6: Aparatura inkubačního systému [72]



### 2.3.6 Systém vířivé kovariance

V terénních podmínkách se ke stanovení respirace půdy běžně využívá technika vířivé kovariance, která se skládá ze zvukového anemometru a infračerveného analyzátoru plynu. Systém stanovuje ve stejném bodě tři složky rychlosti větru a koncentraci CO<sub>2</sub> při vysoké frekvenci [73]. Následně lze z naměřených hodnot určit vertikální turbulentní tok CO<sub>2</sub>, který se rovná kovarianci (součinu) mezi okamžitými odchylkami nebo fluktuacemi vertikální rychlosti větru a hmotnostní hustotou CO<sub>2</sub> zprůměrované za určitý časový interval [74]. Mechanické rovnice tekutin ukazují, že se tento vertikální turbulentní tok v kterémkoli bodě nad ekosystémem může rovnat čistému množství CO<sub>2</sub> produkovaného nebo absorbovaného tímto ekosystémem. Základními předpoklady jsou horizontální homogenita ekosystému a relativně vysoká úroveň turbulence. Vířivé kovarianční systémy jsou často instalovány na věžích nad lesy, pastvinami a loukami [73]. Tuto metodu lze však využít rovněž pro měření městských emisí, kdy stěžejní výhodou této techniky je, že zahrnuje všechny hlavní i vedlejší přírodní a antropogenní zdroje a propady [74].

### 2.3.7 Respirometry

Respirometry jsou vhodné indikátory mikrobiální aktivity, a je tedy možné je aplikovat v široké škále technických a vědeckých oblastí [75]. Respirometrický senzorový systém slouží k analýze půdy při pozorování aerobní degradace na vzorkách půdy nebo kompostu. Z této analýzy, která může trvat dny až měsíce lze následně získat výsledky mikrobiální respirace půdy během mineralizace organických látek. Respirometr přenáší naměřená data přímo do počítače, kde se následně vyobrazí křivka analýzy v reálném čase [76].

#### Barthův respirometrický test

Tradiční metodou, která hodnotí míru mineralizace půdní organické hmoty je tzv. Barthova respirometrická zkouška. Jedná se o titrační metodu, která měří uvolněný CO<sub>2</sub> zachycený v silné zásadě po mineralizaci uhlíku mikrobiální komunitou přítomnou v systému. Tato metoda zahrnuje posouzení úplného biologického rozkladu ropných odpadů a organických hnojiv v půdě, jako jsou např. čistírenské kaly. Kinetika mineralizace hnojiv je klíčovým indikátorem uvolňování živin z přidaného hnojiva. Úpravou Barthova respirometrického testu lze měřit změny elektrické vodivosti alkálie po reakci s uvolněným CO<sub>2</sub>, jde však o nepřímou metodu, ve které se mineralizace organického uhlíku měří reakcí CO<sub>2</sub> s alkálií [75].

#### IRTH CO<sub>2</sub> respirometr

Respirometr slouží nejen k měření emise oxidu uhličitého, ale rovněž může měřit rychlost biologického rozkladu nebo rozkladu organických zbytků, jako jsou bioplasty, rostlinná podestýlka, směsný odpad, zbytky potravin a kompostové produkty. IRTH respirometr (Obrázek 7) obsahuje chytré víko, které je citlivé na teplotu a množství uvolněného CO<sub>2</sub> v jednotkách ppm (mg/kg) a využívá širokorozsahový infračervený buněčný senzor, který nepřetržitě monitoruje, na rozdíl od jiných testů. Respirometr nahrazuje komplikovanější, nákladnější zařízení a je flexibilní, aby umožnil sběr různých dat [77].



Obrázek 7: IRTH respirometr [77]

### Solvita respirační test

Respirační test Solvita je určen pro testování čerstvé, nenarušené půdy nezpracované v laboratoři. Tento gelový systém je nástroj pro efektivní a nákladově výhodné vyhodnocení rychlosti dýchání půdních mikrobů bez nutnosti manipulace s činidly a standardizace. Gel citlivý na pH je zapuštěn v jednodílném plastovém držáku, který se zužuje do špičky, takže jej lze zatlačit do půdy. Po uplynutí stanovené doby lze lopatku vyjmout z inkubační nádoby a analyzovat pomocí stupnice barev množství uvolněného CO<sub>2</sub> [78]. Gel obsahuje pH pufr a mění barvu podle koncentrace CO<sub>2</sub> v nádobce. Vyvíjející se oxid uhličitý uvnitř lahvičky difunduje do gelu, neutralizuje pufr a způsobuje pokles pH, který následně vyvolá změnu barvy gelu. Číslo barvy je určeno porovnáním barvy gelu s barvami na barevné kartě (Obrázek 8), která má čísla přiřazená barevné řadě, představující postup změny barvy v závislosti na zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub> v nádobě [79].



Obrázek 8: Respirační gelová sonda s barevnou tabulkou k interpretaci množství CO<sub>2</sub> [80]

Experimenty zahrnující běžně používaný komerční testovací systém půdní respirace Solvita slouží k měření uvolněného CO<sub>2</sub> a analýze kontinuální dynamiky emise CO<sub>2</sub> (tj. koncentrace CO<sub>2</sub> v okolí experimentálního zařízení na začátku a během testů) [81]. Průměrný emitovaný oxid uhličitý stanovený metodou Solvita lze měřit pomocí digitální čtečky barev [82].

### 2.3.8 Měření půdní respirace pomocí plynové chromatografie

Mikrobiální aktivita určena z pozorování rychlosti uvolňujícího se CO<sub>2</sub>, který se hromadí v nádobě obsahující vzorek půdy, lze stanovit pomocí plynové chromatografie. Plynová chromatografie (GC) je vhodnou metodou k pozorování míry půdní respirace díky její přesnosti a vysoké citlivosti detektorů, které umožní spolehlivě naměřit množství uvolněného CO<sub>2</sub>. Ve srovnání s metodami alkalické absorpce, které jsou časově náročné, méně přesné a neumožňují časté měření.[83].

Plynový chromatograf lze připojit k počítačovým vzorkovacím systémům pro časté měření respirace půd v laboratorních podmínkách. Metoda lze použít při třech různých experimentálních uspořádáních za využití otevřené komory, statické uzavřené komory a dynamické uzavřené komory. V systémech s otevřenou komorou okolní vzduch nepřetržitě prochází půdou nebo horním prostorem komory, a odtok půdního CO<sub>2</sub> se vypočítá pomocí rozdílu koncentrace CO<sub>2</sub> mezi vzduchem vstupujícím do komory a opouštějícím komoru. Takové systémy se ukázaly jako účinné, ale představují omezení v tom, že přesnost měření silně závisí na atmosférickém tlaku, vlhkosti vzduchu a rychlosti proudění vzduchu, a proto jsou citlivé na změny podmínek laboratorního prostředí. Proto tyto systémy potřebují přísnou kontrolu průtoku a nepřetržitou korekci na změny teploty a atmosférického tlaku. Kromě toho jsou systémy s otevřenými komorami obvykle drahé a jejich provoz je komplikovaný, což vyžaduje specifické dovednosti a dobře vyškolený personál. [84].

Statické systémy s uzavřenými komorami jsou obvykle levnější a jednodušší na provoz, ale představují omezení související s rozpouštěním CO<sub>2</sub> v půdním roztoku. Dynamický systém s uzavřenou komorou, ve kterém vzduch během měření cirkuluje v uzavřené smyčce mezi komorou a detektorem plynu, stanovuje množství CO<sub>2</sub> z půdy pomocí rozdílu v koncentraci mezi začátkem a koncem měření. Dynamické systémy s uzavřenými komorami se běžně používají pro měření dýchání půdy v terénu. Automatizovaný systém pro kontinuální odběr a analýzu plynů je připojený k mikro-plynovému chromatografu přes vícepolohové ventily. Mikro-plynový chromatograf je vybavena dvěma kapilárními kolonami, ve kterých tlak a teplotu hlavy lze elektronicky naprogramovat. Mikro-GC dokáže současně měřit CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> a N<sub>2</sub>O pomocí detektoru a je řízen specifickým softwarem, který pracuje synchronně se softwarem vícepolohových ventilů [85].

Využití plynovou chromatografii (GC) lze v kombinaci s řadou detekčních technik, kterou může být hmotnostní spektrometrie (MS). GC/MS lze využít pro detekci některých plynných metabolitů produkovaných mikroby a okolních plynů, které existují v nízkých koncentracích, jako je CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> a N<sub>2</sub>O. Tato metoda umožňuje kvantifikovat plyny velmi rychle, s vysokou citlivostí a širokým dynamickým rozsahem [86].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Zásadní výhodou biouhlu je jeho pozitivní vliv na fyzikálně-chemické charakteristiky půdy, a tudíž má velký potenciál při aplikaci do půdy. Autorů, kteří se zabývají aplikací biouhlu do půdy a jeho vlivem na půdní respiraci je celá řada a různé studie půdní respirace nejsou vždy v souladu, jelikož záleží nejen na druhu vstupní suroviny při výrobě biouhlu, ale rovněž na typu půdy, do které se biouhel aplikuje.

Pochopení dynamiky půdního uhlíku je důležitou výzvou pro vývoj přesných a spolehlivých modelů cyklování uhlíku, jehož výstup je modelován prostřednictvím rozkladu a respirace půdní organické hmoty. Půdní organická hmota se uvolňuje zpět do atmosféry jako oxid uhličitý prostřednictvím heterotrofního dýchání mikroorganismy v půdě. Tento proces rozkládá různé organické sloučeniny, které lze funkčně rozdělit na labilní část, která je snadno dostupná, rozpustná a lehce rozložitelná, a stabilní část, která je fyzikálně-chemicky chráněna před mikrobiálním rozkladem [87].

Při výrobě biouhlu se v důsledku pyrolýzy část biomasy přemění na vysoce aromatickou formu v závislosti na vstupní surovině a parametrech procesu. Změněné fyzikální a chemické vlastnosti přispívají k nízké rychlosti degradace a tím k relativně dlouhé době setrvání biouhlu v půdě. Zpomalená degradace organického uhlíku pocházejícího z biouhlu v půdě může významně zvýšit dlouhodobou sekvestraci uhlíku v agroekosystémech a zmírnit zvyšující se atmosférický oxid uhličitý [88].

Obecně může přidavek biouhlu do půdy zvýšit zásoby uhlíku a dusíku v půdě, a také přispět ke zvýšení toku oxidu uhličitého, kdy Smith a kol. [89] dokázali, že nárůsty produkce CO<sub>2</sub> jsou většinou značné během prvních několika dnů inkubace, a poté nejsou změny rychlosti produkce CO<sub>2</sub> výrazně patrné.

Míra emise oxidu uhličitého byla v prvních dnech inkubace vyšší rovněž ve studii, kterou provedli El-Mahrouky a kol. [90], kteří zjistili, že půda upravená dávkou biouhlu vykazovala významné zvýšení rychlosti emise oxidu uhličitého během prvních dnů inkubace ve srovnání s půdou bez přidaného biouhlu.

Významné zvýšení mikrobiální biomasy pozorovali Steiner a kol. [91], kdy se po přidání biouhlu rovněž navýšila aktivita mikroorganismů v půdě během prvních několika dnů inkubace. Tento počáteční výrazný nárůst lze připsat významnému zvýšení dostupnosti substrátu po aplikaci biouhlu do půdy. Zvýšenou mikrobiální biomasu v důsledku aplikace biouhlu do půdy lze vysvětlit dostupností snadno rozložitelné frakce biouhlu a zvýšeným množstvím půdní organické hmoty, zejména pokud je aplikovaný biouhel odolný vůči mikrobiálnímu rozkladu.

V této studii [92] byla prokázáno, že emise oxidu uhličitého z půdy s přidaným biouhlem byly významně vyšší než z půdy bez aplikace biouhlu během prvních tří dnů inkubace. Existuje několik důvodů, které jsou odpovědné za zvýšení emise oxidu uhličitého z půdy upravené biouhlem. Jedná se zejména o vnitřní mikroporéznost, přítomnost uhličitánů v popelu, přítomnost živin a abiotickou oxidaci biouhlu.

Součástí provedené rešerše bylo rovněž určit, zda pro nasimulování vhodného prostředí k určení vlivu biouhlu na půdní respiraci budou použity půdy vysušené a znovu navlhčené nebo čerstvě odebrané. Dostupnost vody je klíčovým regulátorem fungování ekosystému, neboť přímo řídí rostlinnou a půdní mikrobiální aktivitu. Mikrobiální reaktivace po opětovném navlhčení půdy je klíčovým momentem ve fungování ekosystému. Substrát se stává snadno dostupným pro půdní mikroorganismy a zvyšuje mikrobiální aktivitu, která podporuje půdní biogeochemické cykly, ovšem ne všechny mikroby reagují na opětovné navlhčování stejně [93].

S vysycháním půdy klesá celková aktivita mikroorganismů v půdě a míra půdní respirace. Pokles dýchání se však mění i podle množství půdní vlhkosti, jelikož dle nasycení půdy klesá mikrobiální aktivita kvůli omezení kyslíku. Linn & Doran ukázali, že mikrobiální aktivita byla maximální při 60 % prostoru porů vyplněných vodou; to je obsah vlhkosti, při kterém jsou mikropóry půdy naplněny vodou, zatímco makropóry jsou odvodňovány, čímž se vyrovnává zásoba substrátu proti účinnému provzdušňování půdy [94].

Již dlouho je známo, že opětovné navlhčení vysušené půdy způsobuje nárůst půdní respirace. Předpokládané mechanismy k tomu zahrnují uvolňování buněčných materiálů v důsledku rychlého nárůstu stresu vodního potenciálu a stimulaci přísunu uhlíku mikrobům prostřednictvím fyzikálních procesů [95]. Navíc pokud uhlík pochází z mikroorganismů zabitých z důvodu opětovného zvlhčení, může to naznačovat ztrátu mikrobiální aktivity, a tedy potenciální snížení množství uhlíku. Pokud je tedy uvolňování uhlíku primárně z mikrobiálních materiálů, může cyklování znovu navlhčené půdy snížit dlouhodobé ztráty uhlíku z půdy [96].

Miller a kol. [97] provedli experiment na opětovně navlhčené půdě po dobu 110 dnů a zjistili, že se uvolňuje téměř dvakrát více CO<sub>2</sub> než pro půdy inkubované při konstantní optimální vlhkosti. Uvolnilo se více uhlíku, než bylo původně přítomno v mikrobiální biomase, s výjimkou biomasy jako možného konečného zdroje CO<sub>2</sub>. V průběhu několika cyklů tedy mobilizovaný uhlík může nakonec pocházet ze stabilního půdního uhlíku, ale v každém cyklu pochází uhlík z mikrobiální biomasy.

Pravděpodobně nejznámějším dopadem předúpravy vzorků je to, co je známé jako Birchův efekt, což je impuls v mineralizaci a dýchání po opětovném navlhčení suchých půd. Podmínky předúpravy mohou vystavit půdní mikrobiální buňky stresu. Krátkodobé zvýšení mikrobiální mineralizace pozorované po opětovném zvlhčení lze vysvětlit vyplavením rozpuštěných látek v cytoplazmatické membráně z buněk zničených osmotickým šokem při vysychání. Sušení a opětovné navlhčení vzorku půdy před předinkubací mělo tendenci zvyšovat míru půdní respirace, ve srovnání s čerstvými půdami [98].

Lee a kol. [99] studovali dilema, jak nejlépe uchovávat vzorky půdy mezi odběrem a analýzou. Sušení a opětovné navlhčování půdy může mít totiž negativní dopad na mikrobiální vlastnosti půdy tím, že snižuje míru mikrobiální respirace a enzymové aktivity. Vysychání půdy způsobuje snížení vodního potenciálu a zvýšení osmotického potenciálu, o kterém je známo, že snižuje mikrobiální metabolismus a diverzitu. Výjimky ze snížení míry mikrobiální aktivity sušením a opětovným smáčením byly pozorovány u celulózy a kyselých fosfatázy, což může být

způsobeno indukci enzymů během smáčecího cyklu. Bylo také prokázáno, že půdy často vystavené vysychání a zpětnému navlhčování jsou lépe přizpůsobeny změnám vlhkosti a mohou být tímto ošetřením méně ovlivněny, tudíž nemusí docházet k obnově mikrobiální vlastnosti čerstvé půdy.

Studiem aktivity enzymů na čerstvě odebraných vzorcích půdy se zabývali Matthew a kol. [100] a zjistili, že v závislosti na typu půdy a enzymu může zmrazení i sušení významně změnit aktivitu enzymu. Analýzy rozptylu ukázaly, že sušení významně snížilo aktivitu enzymů ve srovnání s čerstvou půdou.

Problematiku spojenou s opětovným zvlhčováním vysušených půd vyplývající převážně z mikrobiologických účinků studovali Bartlett a kol. [101], kdy docházelo ke změně mikrobiální aktivity vlivem snížení množství Mn v půdě, zvýšení redukční schopnosti půdní organické hmoty a oxidaci rozpustné části organické hmoty půdy.

## **4 CÍLE PRÁCE**

Cílem této diplomové práce je definovat metodiky využitelné pro posouzení vlivu biouhlu na aktivitu půdních mikroorganismů prostřednictvím měření půdní respirace. Pro posouzení míry půdní respirace je nutné zvolit a optimalizovat vlastní nastavení experimentů využitelných pro posouzení vlivu aplikace biouhlu na aktivitu půdních mikroorganismů prostřednictvím měření půdní respirace. Na základě laboratorních experimentů je následně potřeba posoudit vliv vybraných půdních doplňků (biouhel, NPK) na aktivitu půdních mikroorganismů zvoleného reprezentativního vzorku půd. Účelem je ze získaných výsledků zhodnotit praktické využití biouhlu jakožto půdního kondicionéru v zemědělství.



## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

#### 5.1.1 Použité chemikálie

- Agaróza (Sigma Aldrich, Co., CAS: 9012-36-6)
- Biouhel (ZERA, a.s.)
- Chlorid barnatý (LACHEMA a.s.)
- Chlorid draselný (LACHEMA a.s.)
- Demineralizovaná a destilovaná voda
- Fenolftaleinový indikátorový roztok (Lach-Ner s.r.o.)
- Hnojivo NPK (Agro CS, a.s.)
- Hydrogenuhličitan sodný (Fichema s.r.o. CAS: 144-55-8)
- Hydroxid sodný (Mikrochem spol s.r.o, CAS: 1310-73-2)
- Kresolová červeň (Sigma Aldrich, Co., CAS: 1733-12-6)
- Kyselina chlorovodíková (PENTA s.r.o, CAS: 7647-01-0)
- Vzorky Fluvizemě odebrány v lokalitě Iváň

#### 5.1.2 Použité přístroje

- Běžné laboratorní sklo a vybavení
- Elementární analyzátor (EA3000, CHNS/O elementární analyzátor EuroVector)
- Inkubační aparatura (viz Obrázek 6)
- Konduktometr Metter Toledo
- Mikrostríkačka Hamilton (série 1700 s ostrým hrotem)
- pH metr, pH 50+ DHS, Giorgio Bormac
- Sušárna (Ecocell 55)
- Termogravimetrický analyzátor (Q5000, TA Instruments)
- Třepačka (Heidolph VIBRAMAX 100)
- UV-VIS spektrometr Hitachi U-3900 H (Hitachi Ltd.)
- Váhy d=0,01 g (Denver Instrument, Germany)
- Váhy, d=0,0001 g, (SCALTEC SBC 31)

### 5.2 Charakteristika biouhlu a použité půdy

Na experiment byla vybrána půda fluvizem/černice, která byla odebrána v lokalitě Iváň (48.921686°N,16.561494°E), jednalo se o lokalitu s trvalým porostem trávy. Při odběru půdy byla horní vrstva s kořeny trav odstraněna a půda byla odebrána z horního humusového horizontu při maximální hloubce odběru 20 cm. Odběry vzorků půdy byly provedeny 28. 5. 2020, 27. 11 2022 a 30. 1. 2023. Biouhel ZERA použitý pro experiment byl vyroben z kalů čistíren komunálních vod INTEKO při teplotě pyrolýzy 450 °C. Takto získaný biouhel byl následně homogenizován s biomasou získanou z běžných rostlinných organických odpadů ze zemědělské výroby (zbytky kukuřice, obilnin) a kompostován.

### **5.3 Příprava roztoků pro následné experimenty**

Pro potřeby experimentu uzavřených inkubačních nádob byly připraveny zásobní roztoky 1M NaOH, 1M BaCl<sub>2</sub>, 0,15M KCl, 0,0025M NaHCO<sub>3</sub> a 0,5M HCl. Pro dynamický inkubační systém byly potřebné zásobní roztoky 1M a 4M NaOH, 0,5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3M BaCl<sub>2</sub> a 0,5M HCl. Tyto roztoky byly následně využity v průběhu práce během sestavení kalibračních křivek a samotných respiračních experimentů ke kvantifikaci uvolněného CO<sub>2</sub>.

### **5.4 Předpříprava půdy pro charakterizaci půdní respirace**

Pro studium půdní respirace byla provedena předúprava půdy tak, že byla převedena přes síto s velikostí ok 2 mm a následně předsušena v sušárně na 50 °C po dobu 24 hodin. Takto upravená půda byla následně využita v experimentální části práce pro posouzení vlivu přidavku biouhlu a NPK na míru půdní respirace. Vzorky čerstvé půdy byly skladovány v lednici s využitím vždy maximálně do týdne. Vzorky byly navlhčeny na 60 hm.% kapacity zadržování vody (viz. kapitola 2.3.2) a byly charakterizovány pomocí TGA a EA (viz. kapitoly 5.5.3 a 5.5.4). Následně bylo rovněž určeno jejich pH a konduktivita (viz. kapitoly 5.5.2).

### **5.5 Charakterizace vzorků půd a biouhlu**

#### **5.5.1 Kapacita zadržování vody**

Ke stanovení kapacity zadržování vody byla vysušená půda umístěná na filtrační papír do Petriho misky a postupně se vlhčila destilovanou vodou až do dosažení bodu nasycení, kdy půda již nedokáže absorbovat další vodu. Přebytková voda se následně vysušila filtračním papírem. Měření bylo opakováno vždy třikrát pro každý vzorek půdy i biouhlu. Kapacita zadržování vody byla následně vypočtena z rozdílu hmotnosti mezi vlhkou půdou a půdou vysušenou v sušárně.

#### **5.5.2 Vodivost a pH vodného extraktu**

Vodivost a pH vodného extraktu byla stanovena jak pro vysušenou půdu a biouhel, tak i pro vzorky čerstvě odebrané půdy. Postup stanovení vychází ze standardního postupu měření pH a konduktivity výluhu z těchto materiálů [102]. Celkem byl navážen 1 g analyzovaného pevného vzorku ve třech opakováních a následně dispergován v 10 ml demineralizované vody. Po 1 hodině třepání na vibrační třepačce se změřilo pH 3x pro každý triplikát přímo v suspenzi. Vzorky z měření pH byly filtrovány přes 0,45 µm stříkačkové filtry (nylonová membrána) a v získaných filtrovaných filtrátech byla měřena vodivost, opět třikrát pro každý vzorek.

#### **5.5.3 Termogravimetrie**

Obsah vlhkosti, organické hmoty a anorganického popela v analyzovaných vzorcích byl stanoven termogravimetrickým analyzátozem Q5000 (TA Instruments, New Castel, DE, USA). Pro analýzu bylo naváženo přibližně 5 mg vzorku půdy a biouhlu do platinové misky. Následně se nastavila rychlost ohřevu na 10 °C/min a měření bylo prováděno od teploty okolí až do 800 °C při konstantním průtoku vzduchu 50 ml·min<sup>-1</sup>.

#### **5.5.4 Elementární analýza**

Pro analýzu obsahu základních organických prvků (C, O, H, N) v jednotlivých analyzovaných vzorcích byla použita elementární analýza pomocí CHNS/O analyzátoru EA 3000 (Euro Vector, Pavia, Itálie). Pro účely analýzy bylo naváženo 0,5–1,0 mg vzorku do cínové kapsle a zabaleno. Analýza byla provedena spalováním připravených cínových kapslí se vzorky při 980 °C v analyzátoru s použitím kyslíku jako spalovacího plynu a helia jako nosného plynu. Kalibrace uhlíku, vodíku, dusíku a síry byla provedena za použití sulfanilamidu jako standardního vzorku. Relativní obsah kyslíku byl vypočten ze zbytkové hořlavé hmoty a získaná data byla korigována na obsah vlhkosti a popela stanovených pomocí TGA analýzy. Měření byla provedena v triplicátech a jsou prezentována jako průměrné hodnoty  $\pm$  SD.

### **5.6 Metody stanovení půdní respirace**

#### **5.6.1 Půdní respirace metodou v uzavřených nádobách**

Do plastových nádob byla navážena půda, která byla navlhčena vodou na 60 hm.% její sorpční kapacity. Tento postup byl realizován navážením definovaného množství (40 g) vysušeného předpřipraveného vzorku půdy Fluvizem (viz. kapitola 5.4) do plastové nádoby o objemu 1 l a dále bylo pomocí stříčky přidáno definované množství destilované vody (pro dosažení požadované vlhkosti půdy). Na takto připravenou půdu byla položena skleněná vialka s 5 ml roztoku 1M NaOH. Stejným způsobem byl připraven čerstvě odebraný vzorek půdy Fluvizem. Takto připravené uzavřené nádoby se nechaly při konstantní laboratorní teplotě 5 dnů předinkubovat. Po 5 dnech byla vialka s roztokem NaOH vyjmuta a následně vložena vialka s novým roztokem 1M NaOH, která se nechala inkubovat 24 hod.

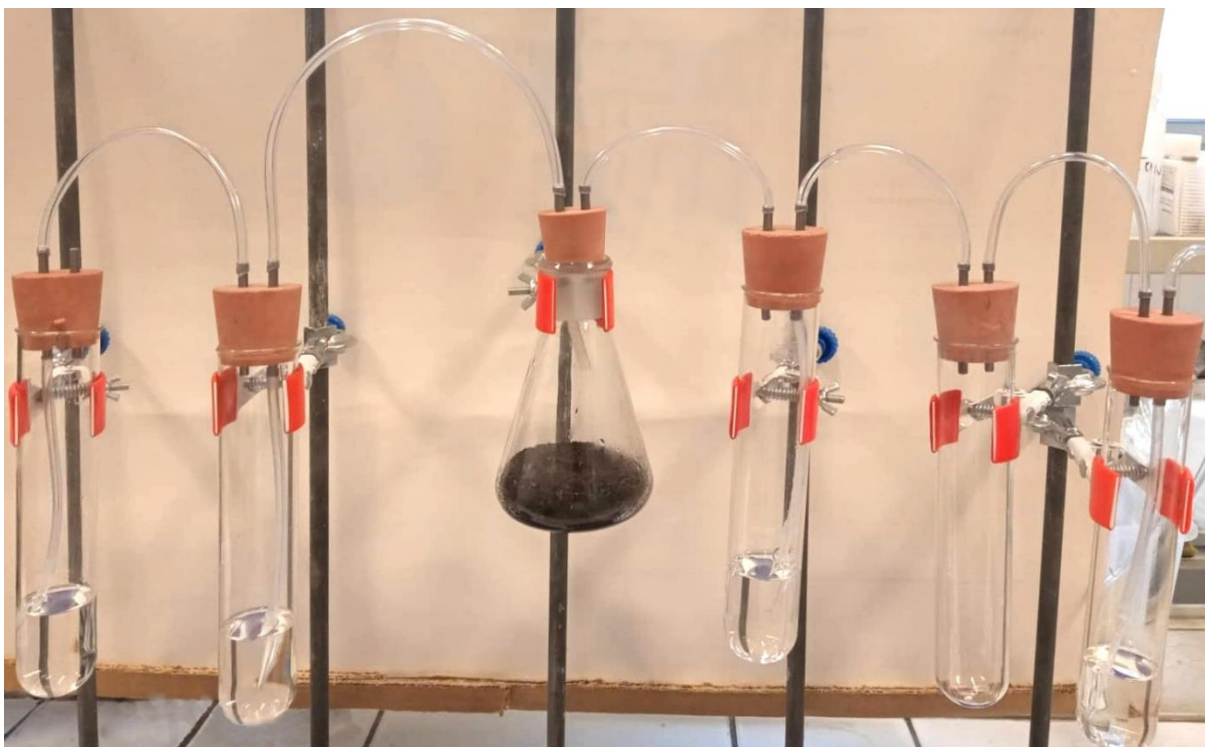
Tento proces se opakoval třikrát, tedy po dobu 3 dnů vždy po 24 hod. Poté se vialka nechala dvakrát inkubovat 48 hod a na závěr 168 hod, což činí od začátku experimentu 14 dnů. Po pětidenní předinkubaci byla z připravených nádob vždy vyjmuta vialka s roztokem NaOH, ke kterému byla přidána destilovaná voda, roztok BaCl<sub>2</sub> a 3–4 kapky fenolftaleinu. Následně probíhala titrace HCl do odbarvení roztoku. Ze stanoveného rozdílu v koncentraci použitého 1M NaOH, způsobeného absorbovaným CO<sub>2</sub>, bylo následně stanoveno množství CO<sub>2</sub> uvolněné z půdy v důsledku půdní respirace.

#### **5.6.2 Dynamická metoda měření půdní respirace**

Aparatura k měření uvolněného oxidu uhličitého (Obrázek 9) byla sestavena pomocí série skleněných zkumavek (200 ml), do kterých byly vloženy pryžové zátky s dvěma otvory propojeny plastovými hadičkami. Touto sérií za sebou zapojených zkumavek s jednotlivými činidly postupně procházel stlačený vzduch. Pořadí jednotlivých zkumavek bylo následující. První zkumavka obsahovala 4M NaOH k odstranění zbytkového CO<sub>2</sub> ze stlačeného vzduchu (na základě literární rešerše byl roztok vyměňován za čerstvý každé 3 týdny). Druhá zkumavka byla prázdná z důvodu zachycení vlhkosti a třetí zkumavka obsahovala deionizovanou vodu ke zvlhčování proudu vzduchu, aby se zabránilo odpařování z komory obsahující vzorek půdy.

Vzduch pak procházel Erlenmeyerovou baňkou s půdou a na závěr vzduch proudil přes dvě zkumavky obsahující 1M NaOH. Tyto poslední dvě zkumavky byly v definovaných časových intervalech vyměňovány za čerstvé roztoky pro stanovení CO<sub>2</sub> uvolněného v důsledku respirace související s mikrobiálními pochody v analyzovaném vzorku půdy. Nejdříve byl zkoumán vliv sušení a následné rehydratace půdy na míru půdní respirace. Pro tyto účely byl použit vzorek čerstvé půdy a rovněž vzorek půdy, která byla ve vysušeném stavu. V obou případech byly vzorky 100 g půdy v Erlenmeyerových baňkách navlhčeny na 60 % jejich sorpční kapacity. V navazujícím experimentu byl sledován vliv přídatku půdního kondicionéru biouhlu na míru půdní respirace, za použití dvojnásobné dávky (40 g/kg) v porovnání s konvenční dávkou biouhlu přidávaného v zemědělství, která činí 20 g/kg [103].

V poslední skupině experimentů byl stejným způsobem zkoumán vliv komerčního hnojiva NPK, které bylo přidáno k čerstvě odebrané půdě s přídatkem biouhlu (dávka biouhlu byla rovněž 40 g/kg). Navážka NPK byla vypočítána rovněž z využívaného konvenčního dávkování, které uvádí výrobce hnojiva v příbalovém letáku na 20 g/m<sup>2</sup>, což bylo přepočítáno na plochu půdy v rámci realizovaného experimentu v Erlenmeyerové baňce.



Obrázek 9: Sestavená aparatura pro dynamickou analýzu půdní respirace

## 5.7 Stanovení množství uvolněného CO<sub>2</sub>

### 5.7.1 Konduktometrické stanovení

Uvolněné množství CO<sub>2</sub> půdní respirací bylo stanoveno pomocí měření konduktivity 1M NaOH v obou posledních zkumavkách aparatury, vždy ve třech opakováních pro každý roztok. Z naměřené konduktivity bylo následně množství CO<sub>2</sub> vypočteno dle publikace [104] z Rovnice (1).

$$m_{CO_2} = V \cdot M \cdot 22 \cdot \frac{(c_1 - c_x)}{(c_1 - c_2)} \quad (1)$$

kde  $V$  představuje objem standardního roztoku 1M NaOH,  $M$  molární koncentraci NaOH v mol/l,  $c_1$ ,  $c_2$  a  $c_x$  jsou hodnoty konduktivit standardních roztoků 1M NaOH, 0,5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a příslušného vzorku.

### Kalibrační křivka pro konduktometrické stanovení

Pro konduktometrické stanovení bylo nejdříve potřeba sestavit kalibrační křivku. Z tohoto důvodu byly připraveny standardní roztoky Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a NaOH rozpuštěním požadované hmotnosti primární standardní soli v destilované vodě. Jednotlivé připravené kalibrační roztoky, které byly pro získání kalibrační křivky proměřeny, zobrazuje Tabulka 1.

Tabulka 1: Koncentrační řada roztoků NaOH a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pro sestavení konduktometrické kalibrační křivky pro stanovení míry půdní respirace

Číslo vzorku	1M NaOH (ml)	0,5M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (ml)
1	0	20
2	2	18
3	5	15
4	10	10
5	15	5
6	18	2
7	20	0

Kalibrační křivka byla sestavena na základě měření hodnot měrné vodivosti v různých poměrech standardních roztoků tak, aby byl vždy získán stejný konečný objem, v tomto případě 20 ml. Teoretická množství absorbovaného CO<sub>2</sub> byla následně vztažena k odpovídajícím hodnotám měrné vodivosti v mS/cm.

### 5.7.2 Titrační stanovení

Koncentrace CO<sub>2</sub> ve dvou posledních zkumavkách s 1M NaOH byla rovněž stanovena nepřímo titrací pomocí HCl. Z každého roztoku bylo odebráno 10 ml NaOH, ke kterému bylo přidáno BaCl<sub>2</sub> (3 ml, 3 M) k vysrážení uhličitanu sodného a 2–3 kapky fenolftaleinového indikátoru. Následně byl roztok titrován 0,5M HCl do odbarvení roztoku. Tato koncentrace byla stanovena vždy ve třech opakováních z každé zkumavky 2x týdně po dobu 8–12 týdnů dle průběhu získané respirační křivky půdy.

### 5.7.3 Kolorimetrické stanovení

Pro měření kolorimetrickou metodou (viz. kapitola 2.3.2), byl do plastových kyvet připraven gel obsahující chlorid draselný (0,15M), hydrogenuhličitan sodný (0,0025M), indikátorové barvivo kresolová červeň a agaróza (finální koncentrace agarózy v gelu – 1 hm.%). Takto připravené kyvety sloužily k sorpci uvolňujícího se CO<sub>2</sub> v metodě uzavřených nádob (kapitola 5.6.1) pro stanovení míry půdní respirace.

### **Kalibrační křivka pro kolorimetrické stanovení**

Pro UV-VIS spektrometrickou kvantifikaci množství uvolněného CO<sub>2</sub> bylo nejprve nutné sestavit kalibrační křivku pro přepočet barevné změny indikátoru (kresolová červeň) v použitém agarózovém hydrogelu. Do připravených kyvet s agarózovými gely (viz. postup přípravy kapitola 5.7.3) bylo pomocí mikrostříkačky Hamilton dávkováno 100–1000 µl CO<sub>2</sub>. Následně se čekalo, až přidaný CO<sub>2</sub> prostoupí gelem, aby se stal gel homogenním a mohla se proměřit jeho absorbance. Homogenní gely byly následně proměřeny na UV-VIS spektrometru k sestavení kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci CO<sub>2</sub>.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro studium aktivity mikroorganismů v půdě prostřednictvím měření půdní respirace bylo zapotřebí nejdříve charakterizovat zvolené materiály (viz. kapitola 6.1) z hlediska jejich fyzikálně-chemických vlastností (pH, konduktivita výluhu, obsah organické a anorganické hmoty, organického uhlíku, dusíku...). Navazující část diplomové práce (viz. kapitola 6.2) již byla zaměřena na posouzení vlivu přídatku biouhlu a NPK na mikrobiální pochody v půdě prostřednictvím měření míry půdní respirace. Pro tyto účely byla zvolena půda Fluvizem, komerční hnojivo NPK a biouhel Zera, s potenciálem možného využití v zemědělství jakožto půdní pomocné látky.

Na základě rešerše bylo pro následné experimenty zvoleno několik metod pro posouzení míry půdní respirace. Jednotlivé metody stanovení půdní respirace sledují změny v množství uvolněného CO<sub>2</sub> během inkubace po definovanou dobu experimentu, což souvisí s procesem mineralizace organické hmoty a činností mikroorganismů v půdě, při kterém dochází ke vzniku oxidu uhličitého.

Nejprve byla využita metoda uzavřených inkubačních nádob k zachytávání CO<sub>2</sub> pro porovnání vzorků půdy vysušené a čerstvě odebrané. Následně byla sestavena aparatura pro měření půdní respirace dynamickou metodou (viz Obrázek 9) vycházející z publikované práce [72]. Touto metodou se následně měřilo uvolňující se množství CO<sub>2</sub> vzniklého důsledkem mikrobiálních procesů probíhajících v půdě. Pro posouzení vlivu vybraných půdních doplňků (biouhel, NPK...) na půdní respiraci byly vybrány dva způsoby. První způsob stanovil koncentraci uvolněného CO<sub>2</sub> nepřímo pomocí titrační metody. Druhý způsob, na jehož základě bylo možné posoudit vliv biouhlu a NPK na aktivitu půdních mikroorganismů zvoleného reprezentativního vzorku půd, měří konduktivitu roztoku NaOH o definované původní koncentraci, do které se postupně absorbuje CO<sub>2</sub> uvolněný v důsledku půdní respirace.

### 6.1 Fyzikálně–chemická charakterizace půdy a biouhlu

#### 6.1.1 Kapacita zadržování vody

Důležitou součástí experimentální práce bylo určit jednu ze základních fyzikálně-chemických vlastností, kterou je kapacita zadržování půdy, pro možnost navlhčení modelové půdy na 60 hm.% sorpční kapacity v navazujících inkubačních experimentech. Výsledky shrnuje Tabulka 2, kdy čerstvě odebraná půda má výrazně nižší hodnotu kapacity zadržování půdy z důvodu vysokého obsahu vody již v ní zahrnuté. Z výsledné hodnoty kapacity zadržování vody vysušené půdy vyplývá, že se jedná dle literatury [105] o jemně písčitou hlínu. Tato půda je tedy vhodná pro pozorování mikrobiálních pochodů v půdě po aplikaci biouhlu.

Tabulka 2: Kapacita zadržování vody pro jednotlivé vzorky

	Kapacita zadržování vody (hm.%)
Půda vysušená	80,67 ± 0,12
Půda čerstvá	44,93 ± 0,04
Biouhel	89,83 ± 0,02

Kapacita zadržování vody biouhlu je značně vyšší než výsledná hodnota pro vysušenou půdu, s čímž souvisí potenciální pozitivní účinky na zadržování vody při jeho aplikaci do půdy. Biouhel použitý v publikované studii [106] zvyšuje kapacitu zadržování vody v hlinitopísčité půdě o přibližně 1,7 % hmotnosti na každé 1 % přidaného biouhlu. Z výsledků lze tedy usoudit, že aplikace biouhlu do půdy má potenciál pozitivně ovlivnit hospodaření půdy s vodou a případně zmírnit negativní účinky krátkého období sucha v hlinitopísčité půdě.

### 6.1.2 Stanovení pH a konduktivity

Měřením pH a konduktivity zvolených půd a biouhlu lze posoudit jejich základní fyzikálně-chemickou charakteristiku. Stanovení pH vodných extraktů vyjadřuje koncentraci vodíkových iontů, která je klíčová pro přijímání živin rostlinami a jejich růst. Tabulka 3 ukazuje hodnoty pH a konduktivity čerstvě odebrané půdy a půdy vysušené v sušárně. Naměřené hodnoty pH i konduktivity jsou pro oba vzorky půd téměř shodné dle očekávání. Výsledky pH půd jsou velmi blízké neutrálním hodnotám. pH půdy je ovlivněno kyselinotvornými kationty ( $H^+$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) a zásadotvornými kationty ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ). Průměrné hodnoty pH zemědělských půd se nachází v rozmezí 7–8 [107].

Tabulka 3: pH a konduktivita vzorků půd a biouhlu

	pH (-)	Konduktivita ( $\mu S/cm$ )
Půda vysušená	$7,224 \pm 0,002$	$19,12 \pm 0,03$
Půda čerstvá	$7,427 \pm 0,003$	$20,10 \pm 0,02$
Biouhel	$7,313 \pm 0,011$	$113,54 \pm 0,33$

Použitý vzorek biouhlu získaný od firmy Zera má z hlediska pH rovněž neutrální povahu a podobné hodnoty pH biouhlu s půdou značí, že přidaný biouhel nebude výrazně měnit charakteristiky pH půdy. Běžné biouhly vyráběné pyrolýzou při teplotách okolo 500 °C většinou vykazují spíše alkalické pH způsobené přítomností solí alkalických kovů [108]. Zde využitý biouhel byl ovšem po pyrolýze následně kompostován s rostlinnou biomasou, což způsobilo neutralizaci jeho vnitřního pH. Z hlediska fyzikálně-chemických charakteristik bude patrně větší roli hrát rozdíl v hodnotách konduktivit, které má použitý biouhel téměř 6× vyšší než použitý vzorek půdy. Zvýšená hodnota konduktivity pro biouhel znamená potenciální vyluhování makroživin i mikroživin obsažených v jeho struktuře, což krátce po aplikaci do půdy může vést k lepší úrodnosti rostlin, zdraví půdy a mikrobiální aktivitě. Konduktivita vodního výluhu půdy určuje míru zatížení půd solemi s možnými negativními účinky na růst rostlin. Hodnoty nižší než 30  $\mu S/cm$  značí normální intenzitu hnojení [109], což odpovídá i pro námi zvolené vzorky půd.

### 6.1.3 Elementární analýza a termogravimetrie

Výsledky termogravimetrické analýzy obsahu organického a anorganického podílu studovaných vzorků půd a biouhlu shrnuje Tabulka 4. Získané hodnoty organického podílu půdy, jsou dle očekávání nízké, většinou se hodnoty obsahu organické hmoty pohybují okolo 5 % hmotnosti půdy [110].



Tabulka 4: Výsledky termogravimetrické analýzy biouhlu a použitých půd

	Vlhkost (hm.%)	W <sub>org</sub> (hm.%)	W <sub>anorg</sub> (hm.%)
Půda vysušená	1,57	6,35	92,10
Půda čerstvá	1,68	6,37	91,95
Biouhel	3,28	33,17	63,56

Použitý biouhel obsahoval 33,17 hm% organické hmoty, což je téměř dvojnásobně více než obsah anorganického popela. V porovnání s literaturou [102] se jedná spíše o nižší obsah organické hmoty, což patrně souvisí s povahou zdrojové matrice použité při jeho výrobě a s použitými podmínkami pyrolýzy (biouhel pyrolyzován při teplotě 450 °C) a rovněž s post-pyrolýzním kompostováním vzorku s rostlinnými odpady a zbytky ze zemědělské výroby. Vysoký obsah anorganického popela v biouhlu je spojen s vyšší koncentrací kovů alkalických zemin (zejména Ca a Mg) a s nižším obsahem těkavých látek (alifatické skupiny). Biouhel získaný z menších částic surovin má obecně vyšší obsah popela, což odráží mikroporozitu výsledných biouhlů a větší specifický povrch. Mikroporéznost a specifický povrch jsou důležité faktory, které určují schopnost biouhlu absorbovat a vyměňovat ionty živin; proto biouhly s menší velikostí částic mohou vést k vyšší dostupnosti rostlinných živin [111].

Zastoupení základních organických prvků (C, H, O, a N) z elementární analýzy pro modelovou půdu Fluvizem a biouhel Zera shrnuje Tabulka 5. Zvolený reprezentativní vzorek biouhlu má spíše nižší obsah uhlíku (25,41 %) v porovnání s jinými druhy biouhlů [112], což lze opět vysvětlit jednak teplotou pyrolýzy 450 °C při výrobě a s druhem použité zdrojové biomasy. Obecně vyšší obsah dusíku (nad 2,54 %) vykazují biouhly vyrobené z více zdrojů nebo ze směsných surovin na bázi hnoje [112].

Tabulka 5: Výsledky stanovení obsahu základních organických prvků v použitém biouhlu a půdě elementární analýzou

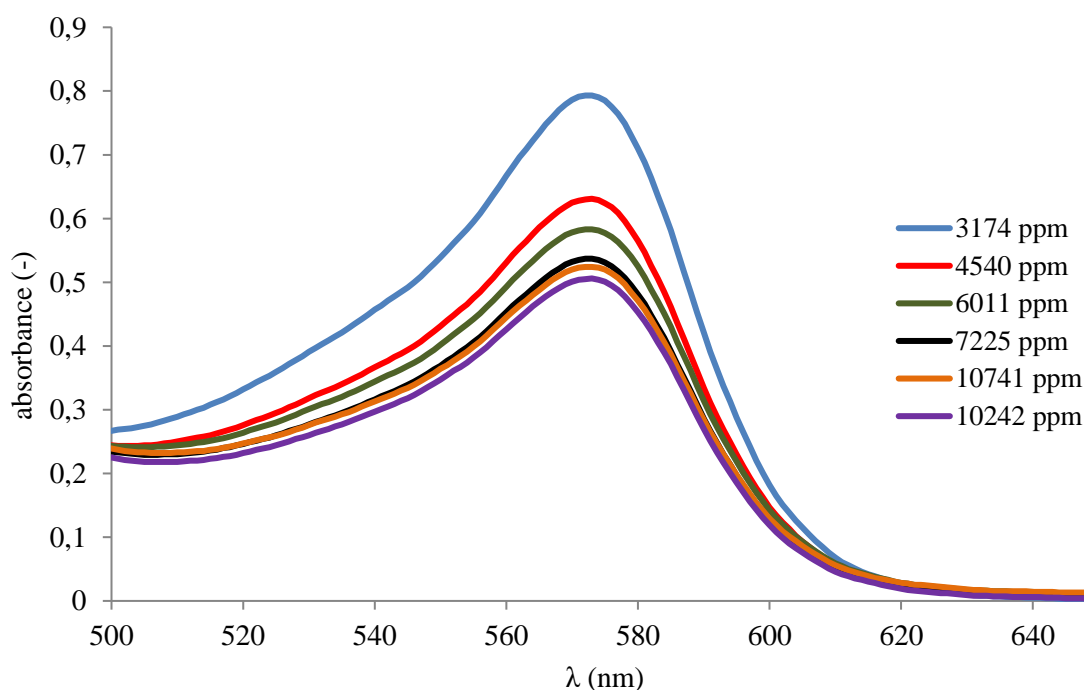
	C (hm.%)	N (hm.%)	H (hm.%)	O (hm.%)
Biouhel Zera	25,41 ± 0,43	2,63 ± 0,22	0,37 ± 0,10	2,79 ± 0,79
Půda Fluvizem	2,62 ± 0,24	0,31 ± 0,02	1,02 ± 0,09	1,55 ± 0,22

## 6.2 Metody stanovení půdní respirace

V experimentální části diplomové práce bylo hlavním cílem zkoumat aktivitu půdních mikroorganismů na základě detekce množství uvolněného CO<sub>2</sub> půdní respirací. Na základě literární rešerše tak byly porovnány různé metody detekce množství uvolněného CO<sub>2</sub>. Prvním uspořádáním experimentu byla metoda uzavřených inkubačních nádob, kdy se uvolněný oxid uhličitý sorbuje do NaOH ve vialkách a kvantifikace CO<sub>2</sub> probíhala titračním stanovením. Další možností je namísto vialky vložit do inkubačních nádob kyvetu s agarovým gelem a množství sorbovaného CO<sub>2</sub> stanovit kolorimetrickou metodou. Druhé využití uspořádání experimentu pro studium vlivu biouhlu a NPK na míru půdní respirace bylo sestavení dynamického inkubačního systému, kde docházelo ke kontinuálnímu průtoku tlakového vzduchu skrz aparaturu, a uvolněný CO<sub>2</sub> se rovněž sorboval do NaOH o definované počáteční koncentraci. Vyhodnocení probíhalo nepřímou titrační a konduktometrickou metodou.

### 6.2.1 Kolorimetrická metoda

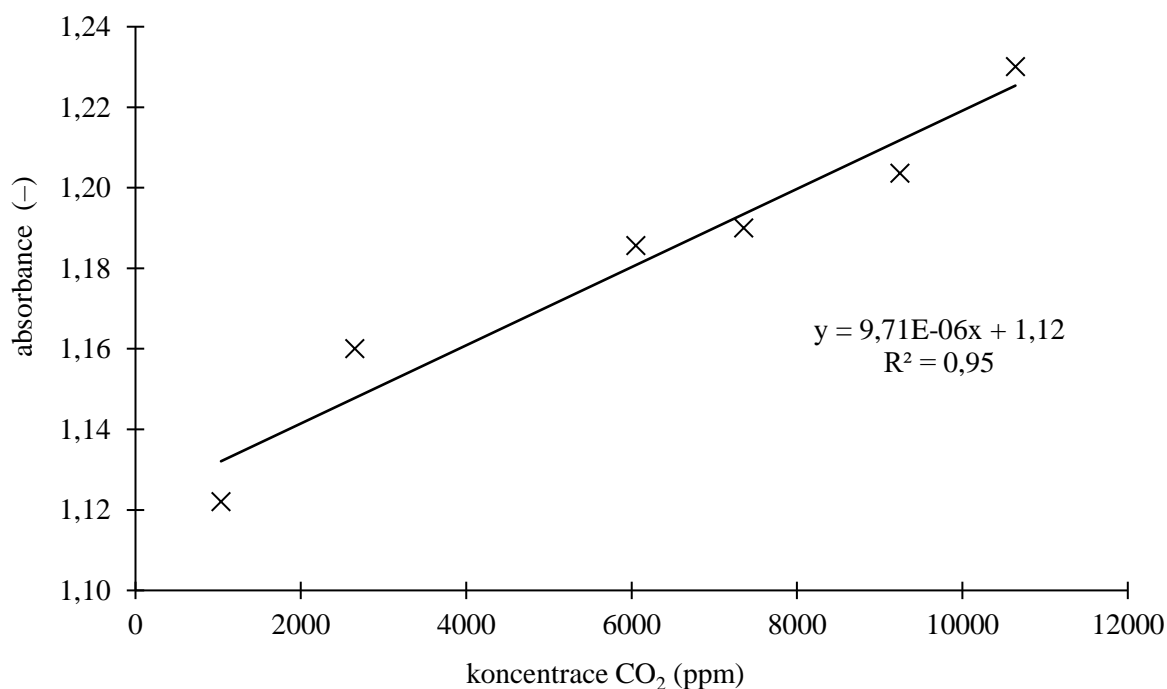
Kolorimetrická technika měření kvantifikuje půdní respiraci a fyziologické profily mikrobiální komunity pomocí barevné změny indikátorového barviva (kresolová červeně) v agarózovém gelu, který reaguje na změnu pH způsobenou zachycením CO<sub>2</sub> v hydrogelu. Určit míru půdní respirace pomocí kolorimetrické metody zahrnovalo proměření absorbance připravené sady gelů (100–1000 μl CO<sub>2</sub>) na UV–VIS spektrometru. Připravený růžový agarový gel (barva kresolové červeně v alkalickém prostředí) po absorpci CO<sub>2</sub> změnil svou barvu přes oranžovou až na výslednou žlutou barvu, což se projeví na měřené absorbanci. Absorpční spektrum ukazuje Obrázek 10, kde pozorujeme charakteristický absorpční vrchol při 572 nm a s rostoucím množstvím CO<sub>2</sub> (ppm) absorbance klesá.



Obrázek 10: Absorpční spektrum pro gely s různým množstvím CO<sub>2</sub>

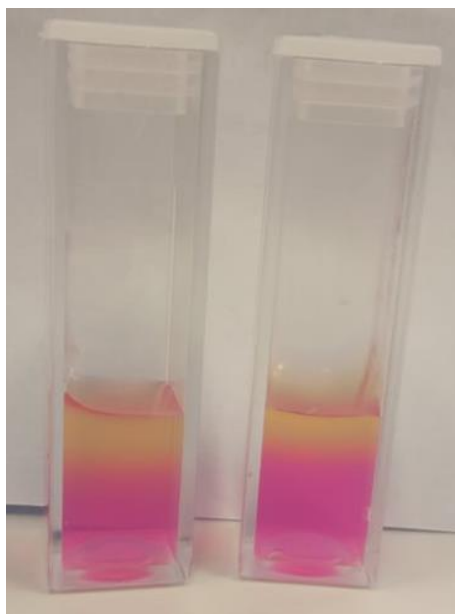
#### Kalibrační křivka kolorimetrické metody

K sestavení kalibrační křivky pro kolorimetrickou detekci byla proměřena sada gelů o koncentracích 100–1000 μl CO<sub>2</sub>, přidaného pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky do kyvet, které byly uzavřeny víčkem a utěsněny parafilmem. Proměřená absorbance na UV–VIS spektrometru sloužila k sestavení kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci CO<sub>2</sub> (Obrázek 10).



Obrázek 11: Kalibrační křivka závislosti absorpance na koncentraci CO<sub>2</sub>

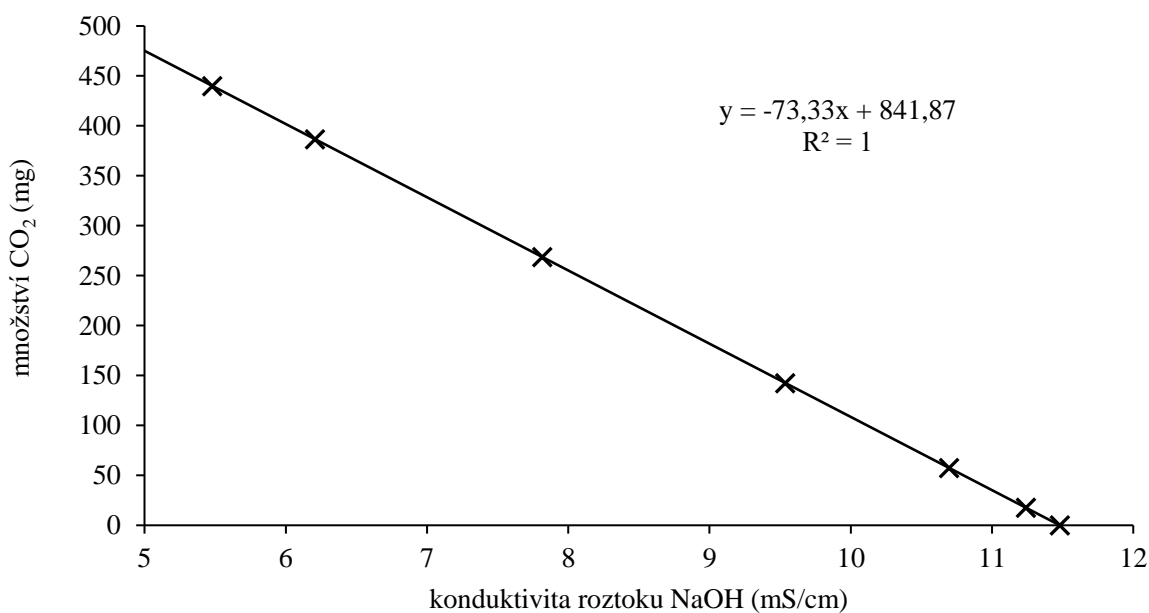
Naměřená data jednotlivých absorpací gelů o různých koncentracích CO<sub>2</sub> byla odlišná při opakovaném měření nebylo možné dosáhnout dobré opakovatelnosti přípravy kalibrační křivky. Příčinou mohla být nehomogenita samotných agarózových gelů, a také nehomogenita vzorků při prostupu CO<sub>2</sub> skrze celý gel v kyvetě (viz Obrázek 12). V čase totiž nedocházelo k probarvení celého gelu, ale vznikaly zde „zóny“, které plně změnily barvu na žlutou, a zároveň zůstávaly oblasti bez viditelné změny zbarvení z původního růžového odstínu. Lepšího probarvení a homogenity připravených indikátorových gelů by bylo patrně možné dosáhnout snížením koncentrace agarózy v použitém gelu (čímž by klesla viskozita použitého agarózového gelu) nebo realizací tohoto experimentu v tenké vrstvě, která by byla následně analyzována pomocí UV-VIS spektrometru. Z výše uvedených důvodů nebyla kolorimetrická metoda použita k dalšímu pozorování posouzení vlivu biouhlu na půdní respiraci, a v dalších experimentech bude využito pouze titrační a konduktometrické stanovení v dynamické inkubační aparatuře. I přes výše diskutované problémy lze konstatovat, že optimalizace této kolorimetrické metody představuje poměrně zajímavý námět pro navazující závěrečné práce.



Obrázek 12: Prostupující CO<sub>2</sub> kyvetami s agarózovým gelem

### 6.2.2 Kalibrační závislost konduktometrické metody

Při absorpci CO<sub>2</sub> do alkalického roztoku se spotřebovávají ionty OH<sup>-</sup> a vznikají ionty CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> s menší pohyblivostí, což způsobuje pokles měrné vodivosti roztoku [112]. Z tohoto důvodu je možné využít konduktometrickou metodu pro stanovení obsahu absorbovaného CO<sub>2</sub> v roztoku NaOH o přesné koncentraci. Před vlastním měřením bylo nejdříve potřeba změřit kalibrační závislost. Kalibrační křivka byla získána měřením měrné vodivosti v různých poměrech standardních roztoků 1M NaOH a 0,5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a vynesena do grafu (Obrázek 13). Pomocí naměřených hodnot vodivosti v mS/cm bylo následně stanoveno absorbované množství CO<sub>2</sub> v mg.

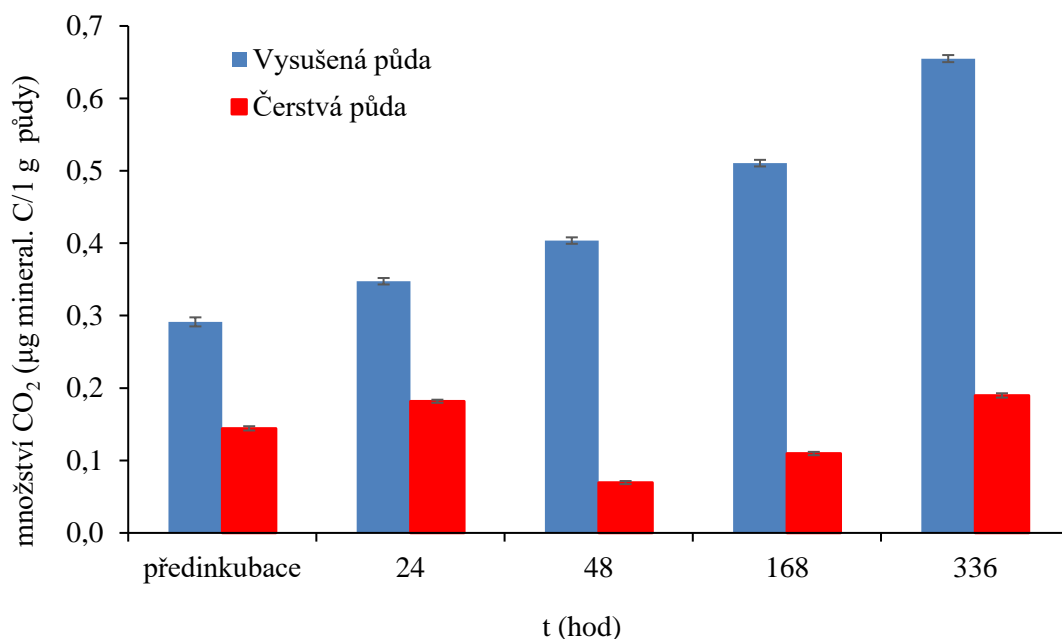


Obrázek 13: Graf závislosti uvolněného množství CO<sub>2</sub> na konduktivitě roztoku

### 6.2.3 Půdní respirace metodou uzavřených nádob

Půdní respirací dochází k uvolňování oxidu uhličitého, který v inkubační nádobě reaguje s hydroxidem sodným obsaženým ve vialce za vzniku uhličitanu sodného, čímž dochází k poklesu koncentrace NaOH. Při stanovení množství  $\text{CO}_2$  uvolněného v důsledku půdní respirace byl nejdříve vzniklý uhličitan sodný pomocí roztoku chloridu barnatého vysrážen na nerozpustný uhličitan barnatý. Zbytkový hydroxid sodný byl následně stanoven acidobazickou titrací pomocí roztoku kyseliny chlorovodíkové za současného použití fenolftaleinu jako acidobazického indikátoru. Hydroxid sodný se kromě reakce s oxidem uhličitým uvolněným půdním dýcháním může spotřebovat na reakci se vzdušným oxidem uhličitým, který je přítomný v uzavřené nádobě na počátku experimentu, a proto byl do experimentu zahrnut ještě tzv. slepý vzorek, kde je vynechána půda, u kterého látkové množství spotřebovaného hydroxidu pokrývá právě tento efekt.

K využití dynamické metody půdní respirace diskutované v kapitole 2.3.5 bylo nejdříve třeba ověřit vliv vysušení půdy v sušárně a její opětovné rehydratace na množství uvolněného  $\text{CO}_2$ , a tedy míru půdní respirace pomocí uzavřených inkubačních nádob. Tento experiment sloužil k posouzení, zda je možné porovnávat vzorky stejné půdy, které projdou procesem vysušení, a které se liší v době od jejich vzorkování. Množství vody v půdě je klíčové pro správné fungování mikroorganismů, a tudíž byly obě půdy navlhčeny vždy na 60 hm.% její sorpční kapacity. Z grafu (Obrázek 14) je patrné, že opětovné navlhčení vysušené půdy způsobuje značný nárůst půdní respirace oproti půdě čerstvě odebrané, což může být způsobeno nárůstem mikrobiální mineralizace díky vyplavení rozpuštěných látek v cytoplazmatické membráně z buněk zničených osmotickým šokem při vysychání [98].



Obrázek 14: Graf závislosti uvolněného množství  $\text{CO}_2$  na čase

U vysušené a opětovně rehydratované půdy se výrazně zvýšila míra mikrobiální aktivity (modré sloupce) v porovnání s čerstvě odebranou půdou, jelikož je nastartování mikrobiálních pochodů rehydratované půdy výraznější než pro čerstvou půdu, u které nedošlo k žádnému narušení mikroorganismů vysušením. Jestliže dojde k vysušení půdní vody, metabolická aktivita mikrobiálních druhů se sníží, ovšem po opětovné hydrataci půdy dochází k markantnímu nárůstu, což má za následek zvýšené půdní dýchání a mineralizaci živin. Sušení půdy navíc snižuje mobilitu rozpuštěných látek a enzymů. Následné převlhčení spouští dle literatury [114] kaskádu reakcí, mobilizuje uhlíkem fyzicky chráněné agregáty a zvyšuje metabolické a enzymatické aktivity, což vše zvyšuje mineralizaci půdní organické hmoty.

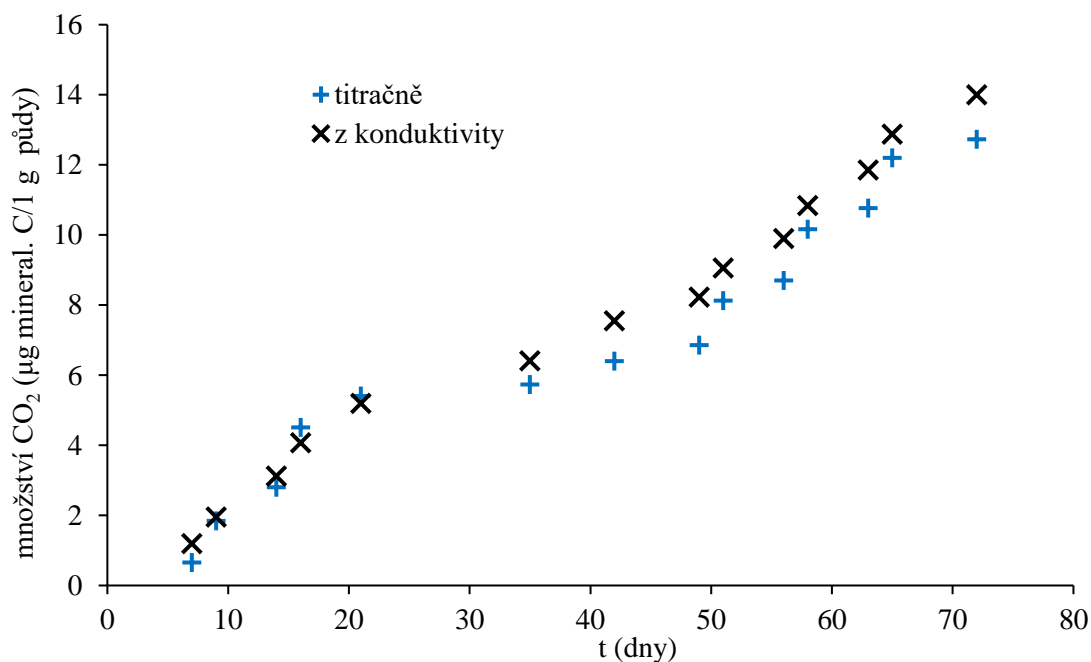
Tento trend je markantní v krátkodobém horizontu sledování půdní respirace, a proto lze předpokládat, že po delším časovém úseku bude čerstvá půda vykazovat vyšší aktivitu půdních mikroorganismů, jelikož pomine prvotní reakce na rehydrataci vysušené půdy. Z tohoto důvodu lze v delším časovém intervalu předpokládat lepší výsledky pro čerstvě odebranou půdu, a tudíž je tato půda vybrána pro následné respirační experimenty v dynamické inkubační aparatuře. Zároveň bude čerstvá půda vhodnější k simulaci reálných podmínek v zemědělské půdě a pro posouzení vlivu přídatku půdních kondicionérů na mikrobiální pochody v půdě.

#### **6.2.4 Dynamický inkubační systém**

Dynamický inkubační systém byl zvolen ke studiu míry půdní respirace a pro posouzení vlivu vybraných půdních doplňků (biouhel, NPK...), jelikož umožňuje realizovat experiment v delším časovém horizontu při konstantních okolních podmínkách. Množství uvolněného oxidu uhličitého, který byl během kultivačního experimentu sorbován do roztoku NaOH, bylo následně stanoveno pomocí titrační a konduktometrické metody, které byly na základě předchozích optimalizačních kroků zvoleny jako nejvhodnější detekční metody.

#### **Porovnání titrační a konduktometrické metody**

Výsledky kumulativních měření uvolněného množství  $\text{CO}_2$  (sestavěné za využití konduktometrické kalibrační křivky pomocí rovnice 1) pro čerstvě odebranou půdu ukazuje Obrázek 15. Z trendu je patrné, že s časem dochází k nárůstu množství  $\text{CO}_2$ , a tedy i míry půdní respirace. Pro titrační metodu je průběh téměř identický s metodou konduktometrickou.



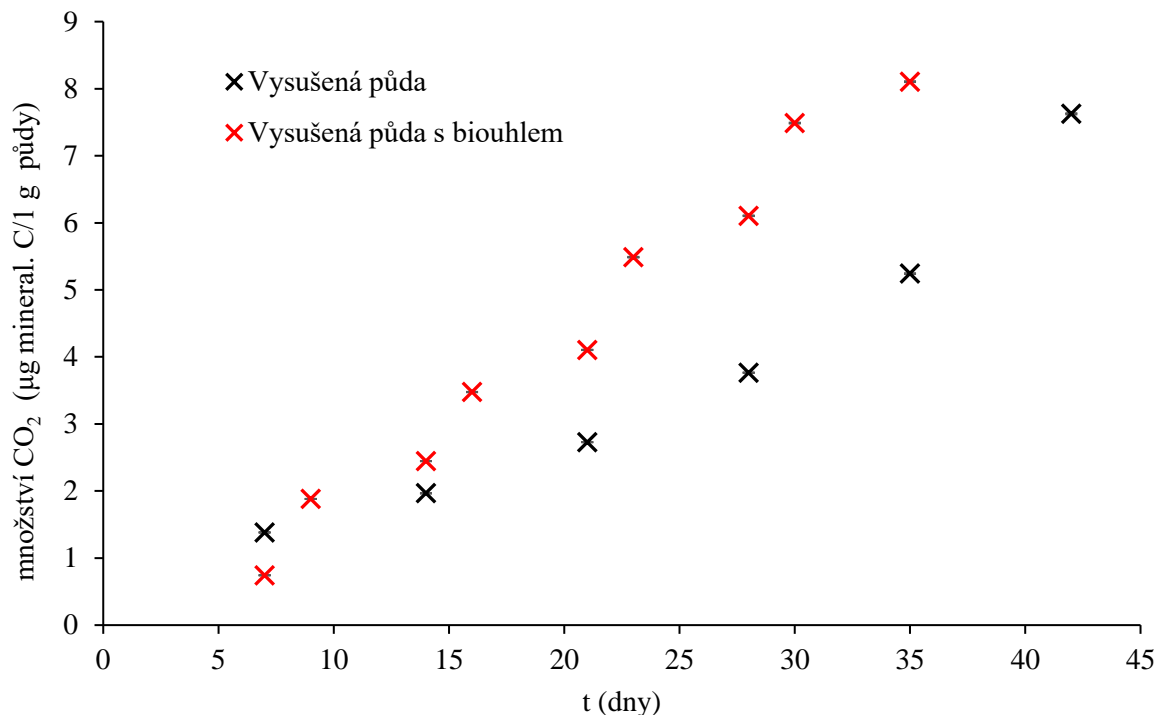
Obrázek 15: Závislost uvolněného množství CO<sub>2</sub> na čase pro čerstvou půdu

Množství oxidu uhličitého uvolněného z půdy během experimentu narůstá téměř lineárně. V důsledku delší prodlevy mezi měřeními v 5. a 7. týdnu lze pozorovat menší ustálení rostoucího trendu. Tento trend si lze vysvětlit tím, že po delší době dojde k nasycení hydroxidu sodného v aparatuře inkubačního systému a uvolňující se oxid uhličitý se již nesorbují v takovém měřítku, tudíž nedochází k lineárnímu nárůstu křivky, jak tomu je na začátku a na konci experimentu. Lineární rychlost bazálního dýchání půdy je podle literatury [115] spojená s rozkladem organického uhlíku, což odráží aktivní mikrobiální biomasu, která slouží jako indikátor půdní respirace.

Získaná data ukazují, že konduktometrická i titrační metoda poskytují obdobné výsledky při kvantifikaci půdní respirace, jsou tedy vhodné a snadno použitelné pro analýzu uvolněného CO<sub>2</sub> v půdě. Obě tyto metody tedy sloužily ke stanovení množství sorbovaného CO<sub>2</sub> v dynamickém inkubačním systému pro měření aktivity půdních mikroorganismů s přidavkem biouhlu a hnojiva NPK.

### Vliv přidavku biouhlu na respiraci rehydratované půdy

Nejdříve byl zkoumán vliv přidavku biouhlu na míru mineralizace organické hmoty pro půdu vysušenou v sušárně a opětovně navlhčenou. Obrázek 16 ukazuje navýšení rychlosti půdní respirace vlivem uvolňování CO<sub>2</sub> u půdy ošetřené biouhlem, jak je zřejmé z červených bodů.



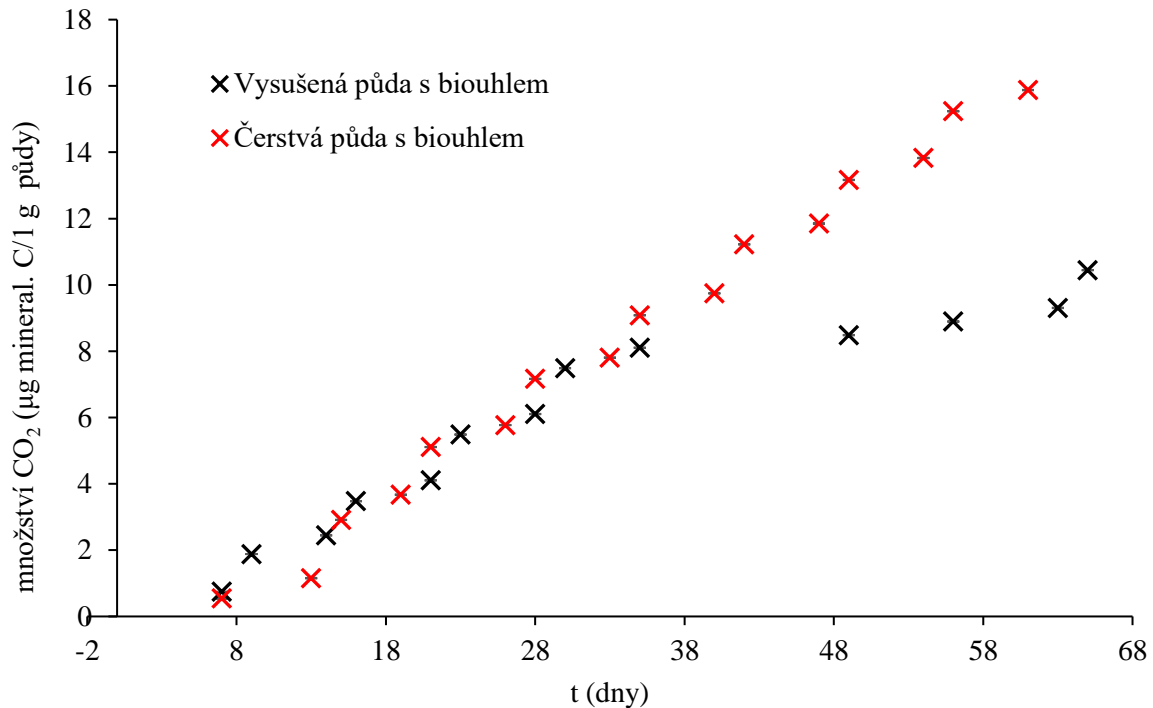
Obrázek 16: Rychlost půdní respirace pro vysušenou půdu a půdu s přidavkem biouhlu stanovená pomocí dynamického inkubačního systému titrační metodou

Vliv biouhlu je patrný již z počátku inkubačního experimentu a s přibývajícím časem se rozdíl prohlubuje. Dlouhodobá aplikace biouhlu může vést ke zvýšenému ukládání uhlíku v půdě, protože komplexní aromatické a alifatické sloučeniny jsou odolné vůči mikrobiální degradaci. Získaná data korelují s publikovanou literaturou [116], kdy vysoce porézní charakter biouhlu a jeho velká plocha poskytují útočiště pro půdní biotu a tyto vlastnosti rovněž souvisejí se zvýšenou kapacitou zadržování vody, čímž biouhel zvyšuje aktivitu půdních mikroorganismů a míru půdní respirace. Tato zjištění naznačují, že aplikace biouhlu má potenciál pozitivně ovlivnit aktivitu půdních mikroorganismů a může tak ovlivnit proces mineralizace uhlíku v půdě důsledkem změn jejich fyzikálně-chemických vlastností.

### Vliv rehydratace půdy

Zásadní roli při studiu vlivu biouhlu na mikrobiální pochody v půdě hraje vlhkost půdy, která byla pro experiment zvolena na 60 hm.% její sorpční kapacity. Byl však zkoumán dopad na míru půdní respirace pro půdu vysušenou v sušárně a opětovně navlhčenou, a pro půdu čerstvě odebranou. Obě tyto půdy byly ošetřeny dvojnásobnou dávkou (40 g/kg) biouhlu v porovnání s konvenční dávkou biouhlu přidávaného v zemědělství, která činí 20 g/kg.





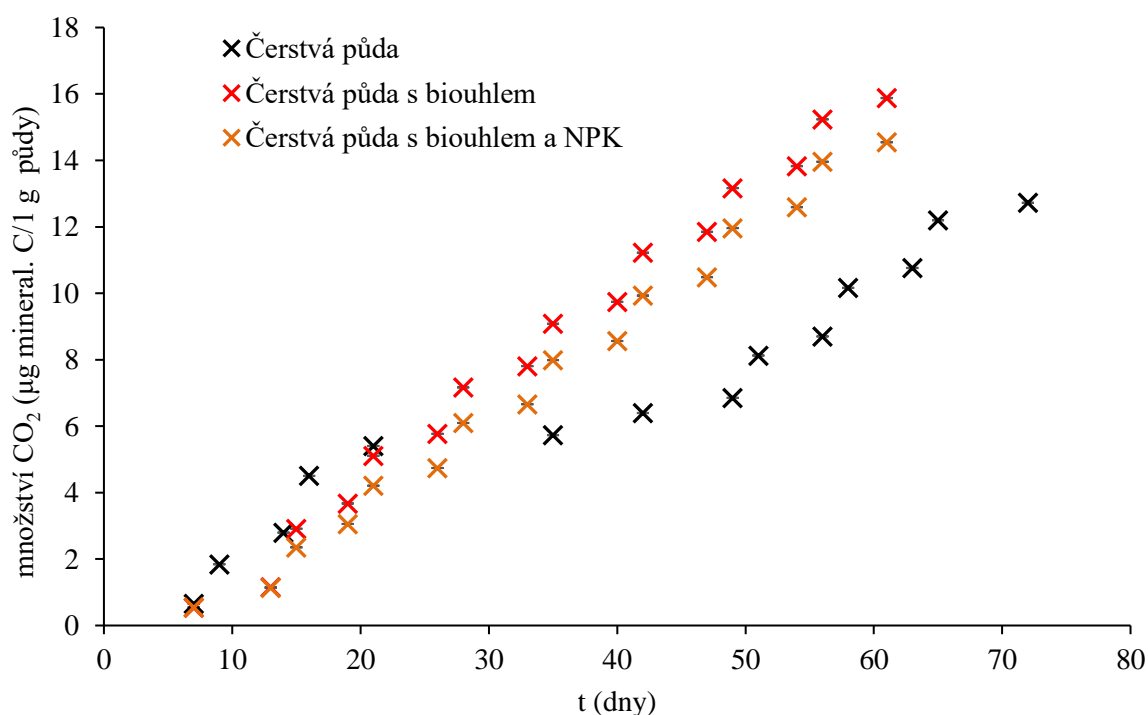
Obrázek 17: Rychlost půdní respirace pro vysušenou a čerstvou půdu s přidavkem biouhlu stanovená pomocí dynamického inkubačního systému titrační metodou

Obrázek 17 dokazuje, že čerstvá půda uvolňovala v průběhu experimentu větší množství oxidu uhličitého v porovnání s půdou vysušenou. U vysušené půdy z krátkodobého hlediska na počátku experimentu pozorujeme, že mikrobiální dýchání indikované emisemi  $\text{CO}_2$  je obdobné (nebo i mírně vyšší) jako u čerstvé půdy, což je přičítáno zvýšenému množství snadno dostupného uhlíku pro mikroorganismy jako krátkodobého zdroje energie (počáteční fáze inkubace). V dlouhodobém časovém měřítku tedy pozorujeme jisté ustálení uvolňujícího se  $\text{CO}_2$ , zatímco u půdy čerstvé dochází nadále k růstu emise  $\text{CO}_2$ . S tímto jevem může souviset zkoumaný fakt [96], že opětovné navlhčení půdy způsobí mobilizaci stabilního půdního uhlíku a snižuje dlouhodobé ukládání půdního uhlíku.

Účinky prosévání, sušení a opětovného navlhčování půdy mohou vyvolat významné změny aktivity půdních mikroorganismů a ovlivnit složení mikrobiální biomasy. Ve vysušených půdách může dojít v důsledku náhlých změn vlhkosti ke snížení půdní respirace. Navzdory tomu se ve dříve provedeném experimentu [117] ukázalo, že opětovné zavlažování půdy vykazuje minimální účinky na mikrobiální komunity. S touto studií korespondují námi získané výsledky při pohledu na půdní respiraci do 35. dne (Obrázek 17), kdy jsou rozdíly mezi čerstvou a vysušenou půdou téměř zanedbatelné. Po delším časovém úseku již pozorujeme markantní rozdíl, jelikož míra půdní respirace pro čerstvou půdu ošetřenou biouhlem neustále lineárně narůstá, zatímco vysušená půda vykazuje mírnou stabilizaci mikrobiálních procesů v půdě. Stejný trend vycházel rovněž pro stanovení konduktometrickou metodou, jehož graf se nachází v příloze (Příloha 1).

## Vliv přidavku biouhlu a kombinace biouhlu s NPK

Následně byla sledována míra půdní respirace ovlivněná definovaným přidavkem biouhlu (40 g/kg) a rovněž kombinací biouhlu s hnojivem NPK (konvenční množství 20 g/m<sup>2</sup>) na aktivitu půdních mikroorganismů zvoleného vzorku půdy. Konvenční hnojivo NPK, které se obvykle využívá v zemědělství, má stejně jako biouhel za úkol napomáhat půdní respiraci a zvýšit aktivitu mikrobiálních pochodů v půdě v důsledku navýšení obsahu půdních živin. Naměřená data byla pro srovnání vložena do grafu s půdou bez přidavku biouhlu (Obrázek 18). Z grafické závislosti je patrný značný nárůst množství CO<sub>2</sub> půdní respirací v obou případech půdy, která byla ošetřena těmito půdními doplňky (biouhel, NPK).



Obrázek 18: Rychlost půdní respirace pro samotnou čerstvou půdu, s přidavkem biouhlu a kombinace biouhlu s NPK stanovená pomocí dynamického inkubačního systému titrační metodou

Půda ošetřená pouze biouhlem a v kombinaci s hnojivem NPK vykazuje lineární trend v produkci uvolňování CO<sub>2</sub>, zatímco u půdy bez přidavku půdních doplňků dochází k mírnému ustálení emise CO<sub>2</sub> již po 20. dnu inkubačního experimentu. Přídavek biouhlu společně s hnojivem NPK nevykazuje očekávaný synergický efekt (Obrázek 18), ovšem stejně tak jako pro půdu s přidavkem samotného biouhlu se projevuje značný nárůst množství uvolněného CO<sub>2</sub>. Výsledky jsou v souladu s dříve pozorovaným zjištěním [118], že povrch biouhlu poskytuje vhodné útočiště pro mikroorganismy a dostupné živiny vyvolávají změny mikrobiálního složení v půdě, s čímž souvisí nárůst rychlosti půdní respirace. Graf stejné závislosti pro konduktometrickou metodu se nachází v příloze (Příloha 2), pro který platí tentýž výsledek se shodnými závěry, jako u zde komentované titrační metody.

### 6.2.5 Shrnutí dat z respiračních experimentů

Pomocí metody nejmenších čtverců byla určena kinetika titrační a konduktometrické metody pro srovnání naměřených dat z inkubačního experimentu. Přímá konduktometrická metoda vykazuje zejména při aplikaci biouhlu výrazně vyšší kinetiku v porovnání s nepřímou titrační metodou, jak znázorňuje Tabulka 6.

Tabulka 6: Míra kinetiky titrační a konduktometrické metody

Vzorek	Titračně	Konduktometricky
Vysušená půda	$0,179 \pm 0,017$	–
Vysušená půda + biouhel	$0,155 \pm 0,009$	$0,185 \pm 0,005$
Čerstvá půda	$0,238 \pm 0,023$	$0,232 \pm 0,015$
Čerstvá půda + biouhel	$0,296 \pm 0,006$	$0,502 \pm 0,005$
Čerstvá půda + biouhel a NPK	$0,276 \pm 0,006$	$0,464 \pm 0,008$

V rámci shrnutí naměřených výsledků byla experimentální data dle publikace [119] proložena kinetickým mocninným modelem („power law“), aby bylo možné porovnat kinetiku půdní respirace na základě definované rychlostní konstanty procesu. Čím vyšší rychlostní konstanta ( $K$ ), tím rychlejší proces mineralizace půdní organické hmoty a vyšší míra půdní respirace. Vypočítané hodnoty rychlostních konstant (a rovněž druhého parametru  $m$  použitého teoretického modelu) pro titrační i konduktometrické stanovení shrnuje Tabulka 7. Kinetické parametry vypočtené pomocí mocninného modelu („power law“) pro titrační stanovení ukazují nejvyšší hodnoty rychlostní konstanty pro čerstvou půdu s přidávkou biouhlu, což vypovídá o nejvyšší aktivitě mikroorganismů v půdě. Pro tuto půdu byly nejvyšší hodnoty vypočítány rovněž pro konduktometrickou metodu, a tedy přidavek biouhlu do čerstvé půdy znamená nejvyšší míru mineralizace půdní organické hmoty.

U titrační metody byla dle rychlostní konstanty vyšší produkce  $\text{CO}_2$  pro rehydratovanou půdu s přidávkou biouhlu než u metody konduktometrické. Metoda konduktometrická vykazovala naopak vyšší míru mineralizace půdní organické hmoty pro čerstvou půdu s přidáním biouhlu a hnojiva NPK než metoda titrační, což se opět projevilo na vyšších hodnotách rychlostních konstant. Vysvětlením pozorované vyšší rychlosti půdní respirace u půdy ošetřené dávkou biouhlu a NPK může být ovlivnění fyzikálně-chemických vlastností půdy, které mohou mít dopad na činnost mikroorganismů v půdě.

Tabulka 7: Rychlostní konstanty titrační a konduktometrické metody

Vzorek	Titračně		Konduktometricky	
	$K$ ( $\text{den}^{-1}$ )	$m$ (–)	$K$ ( $\text{den}^{-1}$ )	$m$ (–)
Vysušená půda	$0,054 \pm 0,022$	$1,303 \pm 0,112$	–	
Vysušená půda + biouhel	$0,189 \pm 0,063$	$0,828 \pm 0,042$	$0,307 \pm 0,032$	$0,894 \pm 0,042$
Čerstvá půda	$0,123 \pm 0,066$	$0,939 \pm 0,074$	$0,236 \pm 0,056$	$0,943 \pm 0,074$
Čerstvá půda + biouhel	$0,223 \pm 0,021$	$1,190 \pm 0,044$	$0,429 \pm 0,026$	$1,034 \pm 0,044$
Čerstvá půda + biouhel a NPK	$0,180 \pm 0,0131$	$1,275 \pm 0,042$	$0,367 \pm 0,020$	$1,125 \pm 0,042$

Výsledky obou metod vykazují podstatné rozdíly v hodnotách rychlostních konstant, kdy konduktometrická metoda má výsledné rychlostní konstanty až dvojnásobně vyšší než metoda titrační. Tyto rozdíly mohly být zapříčiněny odlišnými postupy při kalibraci nepřímé titrační metody a přímé konduktometrické metody. Přídavek biouhlu však u obou metod zapříčinil zvýšení uvolňování CO<sub>2</sub>, což vedlo k vyšší rychlosti mineralizace půdní organické hmoty. Kinetický model vysoce koreluje s daty získanými metodou nejmenších čtverců, kde rovněž aplikace definovaného množství biouhlu nejvíce navýšila produkci CO<sub>2</sub>, a tedy lze předpokládat, že má biouhel potenciál pozitivně ovlivnit míru půdní respirace a zvýšit aktivitu půdních mikroorganismů.

### 6.3 Charakteristika půdy s přidavkem biouhlu po ukončení inkubačního experimentu

Měření půdní respirace v dynamické aparatuře trvalo 10 týdnů. V rámci této části experimentů bylo cílem posoudit, jestli došlo v průběhu experimentu k ovlivnění základních fyzikálně-chemických charakteristik modelové půdy Fluvizemě. Z tohoto důvodu bylo po ukončení inkubačního experimentu opět změřeno pH a konduktivita z výluhů půdy po inkubaci. Následně byl rovněž pomocí termogravimetrické analýzy určen obsah organického podílu a popela vzorků půd a výsledky byly porovnány s půdou na počátku experimentu.

#### 6.3.1 Stanovení pH

Naměřené pH půdy na začátku experimentu bylo následně pro porovnání změřeno i na konci inkubačního experimentu (Tabulka 8), jelikož mohlo v průběhu inkubace v sestavené dynamické aparatuře dojít ke změně charakteristik půdy.

Tabulka 8: Naměřené hodnoty pH čerstvé půdy před a po inkubačním experimentu

Vzorek	pH (-)
Fluvizem před inkubací	7,427 ± 0,003
Fluvizem + biouhel po inkubaci	7,417 ± 0,012
Fluvizem +biouhel + NPK po inkubaci	7,517 ± 0,006

Hodnoty pH půd před a po inkubačním experimentu se téměř nezměnily a vyznačují se nadále neutrální povahou. S tím souvisí fakt, že vzorek biouhlu nezměnil charakteristiky pH půdy po aplikaci, a tedy z tohoto hlediska nevykazuje výrazné dopady na aktivitu půdních mikroorganismů. Kombinace biouhlu s hnojivem NPK rovněž výrazně nezměnila hodnoty pH půdy v průběhu inkubace, a tedy nelze v rámci této charakterizace předpokládat zesílení účinku působením hnojiva NPK.

#### 6.3.2 Stanovení konduktivity

Značné rozdíly v rámci měření konduktivity vykazují výsledné hodnoty konduktivity půd (Tabulka 9), kdy se významně navýšila původní konduktivita půdy zhruba 4×. Tyto výsledky naznačují výrazný dopad aplikace biouhlu na obsah nízkomolekulárních látek v půdě (půdní salinitu) na mikrobiální procesy v půdě, a s tím spojenou půdní respiraci.

Přídavek hnojiva NPK v kombinaci s biouhlem způsobil rovněž podstatnou změnu, kdy nárůst konduktivity je více než 7× větší než pro samotnou půdu. Tento výrazný nárůst naznačuje vyšší obsah rozpustných živin v půdě po aplikaci hnojiva NPK, což může mít v delším časovém horizontu pozitivní vliv na míru půdní respirace, a v kombinaci s biouhlem by mohlo dojít k očekávanému synergickému efektu, kterého se v této práci nepodařilo dosáhnout pravděpodobně z důvodu kratšího časového intervalu.

Tabulka 9: Naměřené hodnoty konduktivit půdy před a po inkubačním experimentu

Vzorek	Konduktivita ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
Fluvizem před inkubací	20,10 $\pm$ 0,02
Fluvizem + biouhel po inkubaci	80,22 $\pm$ 0,08
Fluvizem +biouhel + NPK po inkubaci	146,92 $\pm$ 0,21

### 6.3.3 Termogravimetrická analýza (TGA)

V rámci charakteristiky půdy Fluvizem využitě pro inkubační experiment byla provedena termogravimetrická analýza k porovnání obsahu organického podílu před inkubací bez přídavku biouhlu, po kultivaci s přídavkem definovaného množství biouhlu a následně kombinace biouhlu s hnojivem NPK.

Tabulka 10: Naměřené hodnoty TGA pro půdu před a po inkubačním experimentu

Vzorek	Obsah vlhkosti (hm.%)	Organický podíl (hm.%)	Obsah popela (hm.%)
Fluvizem před inkubací	1,21	4,54	94,24
Fluvizem + biouhel po inkubaci	1,24	5,31	93,46
Fluvizem + biouhel + NPK po inkubaci	1,20	5,45	93,35

Výsledky zobrazuje Tabulka 10, kde lze pozorovat nepatrný nárůst organické hmoty v půdě obohacené o biouhel oproti původní půdě, zapříčiněný aplikací biouhlu a jeho schopností zvyšovat půdní organickou hmotu. Nelze ovšem potvrdit ani vyvrátit, zda dochází k úbytku půdní organické složky v důsledku půdní respirace. Lze ovšem předpokládat, že takový proces by se projevil až v delším časovém horizontu, ve kterém by bylo možné teprve pozitivní účinky spojené s aplikací biouhlu posoudit. Rozdíl v podílu organické části mezi půdou s biouhlem a půdou s kombinací biouhlu a hnojiva NPK po inkubaci je minimální, stejně tak jako obsah popela. Z těchto výsledků tedy nelze jednoznačně určit zesílení míry půdní respirace přidáním hnojiva NPK k biouhlu.

## 7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat vhodnou metodiku využitelnou pro posouzení vlivu aplikace biouhlu na aktivitu půdních mikroorganismů prostřednictvím měření půdní respirace. Tato metodika v kombinaci s inkubačními experimenty byla využita pro posouzení vlivu vybraných půdních doplňků (biouhel, NPK) na aktivitu půdních mikroorganismů zvolené modelové půdy (Fluvizem).

Prvotním záměrem bylo proměřit základní fyzikálně-chemické charakteristiky vybrané reprezentativní půdy (Fluvizem) a biouhlu (Zera) před vlastním inkubačním experimentem. Z výluhů půdy a biouhlu bylo měřeno nejdříve pH. Neutrální povaha půdy i biouhlu znamená, že aplikace použitého kompostovaného biouhlu do půdy nebude měnit výsledné pH půdy. Následně byla měřena měrná vodivost, kde již byly výraznější rozdíly mezi biouhlem a půdou. Naměřené hodnoty konduktivity biouhlu byly téměř 6× vyšší než pro vzorky půdy, z čehož vyplývá možnost vyluhování potřebných živin do půdy a v důsledku pozitivní vliv na úrodnost rostlin, zdraví půdy a aktivitu půdních mikroorganismů. Pomocí termogravimetrické a elementární analýzy bylo následně naměřeno množství organického, anorganického podílu a složení organických prvků (C, H, O, a N) pro modelovou půdu i vzorek biouhlu. Výsledky ukazují spíše na nižší obsah organického podílu (33,17 %) biouhlu, stejně tak jako obsah uhlíku (25,41 %), což může souviset s druhem vstupní biomasy, podmínkami pyrolýzy při výrobě biouhlu a zejména post-pyrolýzním kompostováním vyrobeného vzorku biouhlu s rostlinnou biomasou. Po jeho aplikaci do půdy a ukončení inkubačního experimentu však byly všechny fyzikálně-chemické charakteristiky znovu proměřeny a ukázalo se, že biouhel téměř nezměnil výsledné pH půdy ani celkový obsah organického podílu. Došlo však k výraznějšímu nárůstu konduktivity (téměř 4×) a v kombinaci s hnojivem NPK byl nárůst ještě markantnější (téměř 7×), s čím souvisí schopnost biouhlu vyluhovat potřebné makroživiny i mikroživiny obsažené v jeho struktuře po aplikaci do půdy.

Půdní respirace je jedním z nejvíce využívaných parametrů pro stanovení úrovně aktivity půdních mikroorganismů, a tudíž lze z měření vývoje CO<sub>2</sub> posoudit celkové zdraví a kvalitu půdy. Z těchto důvodů bylo v rámci experimentální části měřeno množství CO<sub>2</sub> v inkubačních experimentech, nejdříve pomocí metody uzavřených nádob. Zde byl zkoumán vliv opětovného navlhčení vysušené půdy a porovnáván s půdou čerstvě odebranou. Z nádobových experimentů byl určen důsledek rehydratace vysušené půdy, který vykazoval v rámci krátkého časového intervalu (14 dnů) značný nárůst produkce CO<sub>2</sub>. Opětovným navlhčením vysušené půdy dochází k výraznému nastartování mikrobiálních pochodů v půdě. V delším časovém horizontu byla však v navazujícím experimentu zjištěna postupná stabilizace aktivity půdních mikroorganismů.

Pro navazující laboratorní experiment byla sestavena dynamická inkubační aparatura, kde byla rychlost emise CO<sub>2</sub> spojená s mikrobiálním rozkladem půdní organické hmoty měřena pomocí dvou různých metod. Obě tyto metody jsou založené na absorpci uvolňujícího se CO<sub>2</sub> půdní respirací do roztoku NaOH v sestavené aparatuře. Metody se liší způsobem kvantifikace absorbovaného CO<sub>2</sub>, které bylo stanoveno nepřímou titračně a konduktometricky.

Výsledky vzájemného srovnání obou metod realizované nejdříve na čerstvé půdě při délce experimentu 72 dnů ukázaly, že techniky absorpce CO<sub>2</sub> titrační nebo konduktometrickou cestou poskytly prakticky stejné informace a výsledky obou těchto měření spolu vysoce korelovaly. V případě delšího trvání experimentu, respektive při vyšších uvolněných množstvích CO<sub>2</sub>, již bylo konduktometrickou metodou detekováno větší množství CO<sub>2</sub>, což patrně souvisí s posunem v kalibrační křivce u této metody a stává se tak námětem pro navazující výzkum.

Na základě realizace těchto laboratorních experimentů byl posuzován vliv přídatku samotného biouhlu a biouhlu v kombinaci s hnojivem NPK na aktivitu půdních mikroorganismů. Získané výsledky potvrzují pozitivní vliv aplikace biouhlu na míru půdní respirace, což může být zapříčiněno jeho pórovitou strukturou a vysokou stabilitou, čímž je odolnější vůči mikrobiálnímu rozkladu, a zvyšuje ukládání organického uhlíku v půdě. Pro zesílení efektivity aplikace biouhlu bylo následně přidáno rovněž konvenční množství hnojiva NPK. Naměřená data byla téměř identická a nedocházelo k nárůstu produkce CO<sub>2</sub> půdní respirací ve spojení NPK s biouhlem. V obou případech se však ukázalo, že přídatek biouhlu napomáhá půdní respiraci, a tím dokáže zlepšit kvalitu půdy a dlouhodobou sekvestraci půdního uhlíku, což bylo prokázáno rovněž proložením experimentálních dat kinetickým mocninným modelem.

Závěrem je nutné podotknout, že je mnoho aspektů ovlivňující měření uvolňujícího se CO<sub>2</sub> půdní respirací za laboratorních podmínek. Jen málo ze studií této problematiky bylo provedeno v terénu, kde obvykle interaguje větší množství faktorů ve srovnání s laboratorními podmínkami. Téma jednoznačně vyžaduje další výzkumy, které je třeba provést s ohledem na specifické typy biouhlu a druhy půd. Dalším aspektem, který je třeba zvážit, je doba trvání účinku biouhlu a jeho aplikační dávka. Celkově však byl prokázán pozitivní vliv aplikace biouhlu na míru půdní respirace a aktivitu mikroorganismů v půdě.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MOORBERG, Colby J. a David A. CROUSE. Soils Laboratory Manual. K-State Edition, Version 2.0. Kansas State University Libraries, Manhattan, Kansas: New Prairie Press, 2021. ISBN 978-1-944548-41-4.
- [2] SMITH, Pete, Jichang HAN, Yan XU, et al. Soils and climate change: Gas Fluxes and Soil Processes. *Current Opinion in Environmental Sustainability*. 2012, 4(5), 539-544. ISSN 18773435.
- [3] GUO, Zhen, Jichang HAN, Yan XU, et al. The mineralization characteristics of organic carbon and particle composition analysis in reconstructed soil with different proportions of soft rock and sand. *PeerJ*. 2019, 7(3-4), 173-180. ISSN 2167-8359.
- [4] BOLLAG, Jean-Marc, Tawna MERTZ, Lewis OTJEN, et al. Role of Microorganisms in Soil Bioremediation: Critical review of estimation criteria and approaches. *Bioremediation through Rhizosphere Technology*. Washington, DC: American Chemical Society, 1994, 1994-08-12, 67(15-16), 2-10. ACS Symposium Series. ISBN 9780841229426. ISSN 00380717.
- [5] LIU, Enke, Changrong YAN, Xurong MEI, et al. Long-term effect of chemical fertilizer, straw, and manure on soil chemical and biological properties in northwest China. *Geoderma*. 2010, 158(3-4), 173-180. ISSN 00167061.
- [6] REHMAN, Hafiz Abdur a Rohma RAZZAQ. Benefits of Biochar on the Agriculture and Environment - A Review. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2017, 04(03). ISSN 23802391.
- [7] FILIBERTO, David a John GAUNT. Practicality of Biochar Additions to Enhance Soil and Crop Productivity. *Agriculture*. 2013, 3(4), 715-725. ISSN 2077-0472
- [8] VACCARI, F.P., S. BARONTI, E. LUGATO, L. GENESIO, S. CASTALDI, F. FORNASIER a F. MIGLIETTA. Biochar as a strategy to sequester carbon and increase yield in durum wheat. *European Journal of Agronomy*. 2011, 34(4), 231-238. ISSN 11610301.
- [9] WARD, Chesworth, ed. *ENCYCLOPEDIA OF SOIL SCIENCE*. 2. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008. ISBN 978-1-4020-3994-2.
- [10] WINDING, Anne, Kerstin HUND-RINKE, Michiel RUTGERS a Marcel G. A. VAN DER HEIJDEN. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2005, 62(2), 230-248. ISSN 01476513.
- [11] BLOEM, J., A. J. SCHOUTEN, S. J. SØRENSEN, M. RUTGERS, A. van der WERF a A. M. BREURE. Monitoring and evaluating soil quality. *Microbiological methods for assessing soil quality*. UK: CABI Publishing, 2005, 2005-01-20, 23-49. ISBN 9780851990989.
- [12] VANĚK, Václav, KOLÁŘ, Ladislav, PAVLÍKOVÁ, Daniela: Úloha organické hmoty v půdě. Racionální použití hnojiv-sborník z konference, ISBN 978-80-213-2006-2
- [13] MCVAY, K. A., J. A. BUDDE, K. FABRIZZI, et al. Management Effects on Soil Physical Properties in Long-Term Tillage Studies in Kansas. *Soil Science Society of America Journal*. 2006, 70(2), 434-438. ISSN 0361-5995.
- [14] RICE, Charles, Paul WHITE a Karina FABRIZZI. Benefits of Soil Organic Carbon to Physical, Chemical, and Biological Properties of Soil. *Soil Carbon Management*. CRC Press, 2007, 2007-05-21, 155-162. ISBN 978-1-4200-4407-2.



- [15] WALL, Diana H., Uffe N. NIELSEN, Johan SIX a Marcel G. A. VAN DER HEIJDEN. Soil biodiversity and human health. *Nature*. 2015, 2011-09-02, 528(7580), 69-76. ISSN 0028-0836.
- [16] WAGG, Cameron, S. Franz BENDER, Franco WIDMER a Marcel G. A. VAN DER HEIJDEN. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014, 111(14), 5266-5270. ISSN 0027-8424.
- [17] WARDLE, David A., Richard D. BARDGETT, John N. KLIRONOMOS, Heikki SETÄLÄ, Wim H. VAN DER PUTTEN a Diana H. WALL. Ecological Linkages Between Aboveground and Belowground Biota. *Science*. 2004, 304(5677), 1629-1633. ISSN 0036-8075.
- [18] MUDGAL, Shailendra, Anne TURBÉ, Arianna DE TONI, Perrine LAVELLE a Patricia BENITO. *Soil biodiversity: functions, threats and tools for policy makers*. Parijs: Bio Intelligence Service, 2010. ISBN 978-92-79-20668-9.
- [19] WONG, Vanessa N. L., Ram C. DALAL, Richard S. B. GREENE, et al. Salinity and sodicity effects on respiration and microbial biomass of soil. *Biology and Fertility of Soils*. 2008, 44(7), 943-953. ISSN 0178-2762.
- [20] *Biogeochemistry*. 73. 2005. ISSN 0168-2563. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10533-004-5167-7>
- [21] SAGI, Nevo, Moshe ZAGURI a Dror HAWLENA. Soil CO<sub>2</sub> influx in drylands: A conceptual framework and empirical examination. *Soil Biology and Biochemistry*. 2021, 156. ISSN 00380717.
- [22] JEFFRY, Luqman, Mei Yin ONG, Saifuddin NOMANBHAY, M. MOFIJUR, Muhammad MUBASHIR a Pau Loke SHOW. Greenhouse gases utilization: A review. *Fuel*. 2021, 301. ISSN 00162361.
- [23] RASTOGI, Monika, Shalini SINGH a H. PATHAK. Current Science. In: *Current Science: Emission of carbon dioxide from soil*. No.5. Current Science Association, 2002, s. 510-517.
- [24] VAN HULZEN, J.B., R. SEGERS, P.M. VAN BODEGOM a P.A. LEFFELAAR. Temperature effects on soil methane production: an explanation for observed variability. *Soil Biology and Biochemistry*. 1999, 31(14), 1919-1929. ISSN 00380717.
- [25] YU, Liuqian, Jia TANG, Renduo ZHANG, Qunhe WU a Mimi GONG. Effects of biochar application on soil methane emission at different soil moisture levels: an explanation for observed variability. *Biology and Fertility of Soils*. 2013, 49(2), 119-128. ISSN 0178-2762.
- [26] PATHAK H, Bhatia A, Jain N and Aggarwal PK (2010) Greenhouse Gas Emission and Mitigation in Indian Agriculture – A Review, In *ING Bulletins on Regional Assessment of Reactive Nitrogen*, Bulletin No. 19, ISBN 81-85992-32-0
- [27] BREVIK, E. C., A. CERDÀ, J. MATAIX-SOLERA, L. PEREG, J. N. QUINTON, J. SIX a K. VAN OOST. *SOIL*. 2015, 1(1), 117-129. ISSN 2199-398X.
- [28] SMITH, K. A., T. BALL, F. CONEN, K. E. DOBBIE, J. MASSHEDER a A. REY. Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *European Journal of Soil Science*. 2003, 54(4), 779-791. ISSN 13510754.

- [29] SOHI, S.P., E. KRULL, E. LOPEZ-CAPEL a R. BOL. *A Review of Biochar and Its Use and Function in Soil*. Elsevier, 2010, 2010, 47-82. *Advances in Agronomy*. ISBN 9780123810236.
- [30] NOVOTNY, Etelvino Henrique, Claudia Maria Branco de Freitas MAIA, Márcia Thais de Melo CARVALHO a Beáta Emöke MADARI. BIOCHAR: PYROGENIC CARBON FOR AGRICULTURAL USE - A CRITICAL REVIEW. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2015, 39(2), 321-344. ISSN 0100-0683.
- [31] DOWNIE, Adriana; CROSKY, A.; MUNROE, P., Physical Properties of Biochar. In *Biochar for Environmental Management Science and Technology*, Lehmann, J.; Joseph, S., Eds. Earthscan: London, 2009.
- [32] VERHEIJEN, Franciscus, S. JEFFERY, A.C. BASTOS, M. van der VELDE a I. DIAFAS. *Biochar Application to Soils: A Critical Scientific Review of Effects on Soil Properties, Processes and Functions*. EUR. Scientific and technical research series. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2010. ISBN 978-92-79-14293-2.
- [33] KALINA, Michal, Sarka SOVOVA, Jiri SVEC, Monika TRUDICOVA, Jan HAJZLER, Leona KUBIKOVA a Vojtech ENEV. The Effect of Pyrolysis Temperature and the Source Biomass on the Properties of Biochar Produced for the Agronomical Applications as the Soil Conditioner: PYROGENIC CARBON FOR AGRICULTURAL USE - A CRITICAL REVIEW. *Materials*. 2022, 15(24), 321-344. ISSN 1996-1944.
- [34] DELUCA, Thomas H., M. Derek MACKENZIE a Michael J. UNDALE. Biochar effects on soil nutrient transformations. In: LEHMANN, Joseph a Stephen JOSEPH. *Biochar for Environmental Management: Science, Technology and Implementation*. 2nd Edition. New York: Routledge, 2015, s. 420-424. ISBN 9780203762264.
- [35] TAN, Xue-Fei, Shi-Shu ZHU, Ru-Peng WANG, Yi-Di CHEN, Pau-Loke SHOW, Feng-Fa ZHANG, Shih-Hsin HO a Claudio MONDINI. Role of biochar surface characteristics in the adsorption of aromatic compounds: Pore structure and functional groups. *Chinese Chemical Letters*. 2021, 32(10), 2939-2946. ISSN 10018417.
- [36] BREWER, Catherine E., Klaus SCHMIDT-ROHR, Justinus A. SATRIO, et al. Characterization of biochar from fast pyrolysis and gasification systems: Introduction. *Journal of Environmental Quality*. 2009, 28(3), 386-396. ISSN 19447442.
- [37] FERREIRA MENDES, Kassio, Ananias FRANCISCO DIAS JÚNIOR, Vanessa TAKESHITA, Ana PAULA JUSTINIANO RÉGO, Valdemar LUIZ TORNISIELO, Feng-Fa ZHANG, Shih-Hsin HO a Claudio MONDINI. Effect of Biochar Amendments on the Sorption and Desorption Herbicides in Agricultural Soil: Pore structure and functional groups. *Advanced Sorption Process Applications*. IntechOpen, 2019, 2019-2-20, 32(10), 2939-2946. ISBN 978-1-78984-818-2. ISSN 10018417.
- [38] ZHANG, Yafu, Jinman WANG a Yu FENG. The effects of biochar addition on soil physicochemical properties: A review. *CATENA*. CRC Press, 2021, 2007-05-21, 202, 695-716. ISBN 978-1-4200-4407-2. ISSN 03418162.
- [39] JINDO, Keiji, Yuki AUDETTE, Fábio Satoshi HIGASHIKAWA, Carlos Alberto SILVA, Kinya AKASHI, Giovanni MASTROLONARDO, Miguel Angel SÁNCHEZ-MONEDERO a Claudio MONDINI. Role of biochar in promoting circular economy in the agriculture sector. Part 1: A review of the biochar roles in soil N, P and K

- cycles. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2020, 7(1). ISSN 2196-5641.
- [40] DHYANI, Vaibhav, Thallada BHASKAR a Karina FABRIZZI. A comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Renewable Energy*. CRC Press, 2018, 2007-05-21, 129, 695-716. ISBN 978-1-4200-4407-2. ISSN 09601481.
- [41] RONSSE, Frederik, Sven VAN HECKE, Dane DICKINSON a Wolter PRINS. Production and characterization of slow pyrolysis biochar: influence of feedstock type and pyrolysis conditions. *GCB Bioenergy*. 2013, 5(2), 104-115. ISSN 17571693.
- [42] AMIN, Farrukh Raza, Yan HUANG, Yanfeng HE, Ruihong ZHANG, Guangqing LIU a Chang CHEN. Biochar applications and modern techniques for characterization. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 2016, 18(5), 1457-1473. ISSN 1618-954X.
- [43] ANYANWU, Ihuoma N., Moses N. ALO, Amos M. ONYEKWERE, et al. Influence of biochar aged in acidic soil on ecosystem engineers and two tropical agricultural plants: its potential benefits and threats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018, 153(1), 116-126. ISSN 01476513.
- [44] BIEDERMAN, Lori A. a W. Stanley HARPOLE. Biochar and its effects on plant productivity and nutrient cycling: a meta-analysis. *GCB Bioenergy*. 2013, 5(2), 202-214. ISSN 17571693. Dostupné z: doi:10.1111/gcbb.12037
- [45] PAN, Shu-Yuan, Cheng-Di DONG, Jenn-Fang SU, et al. The Role of Biochar in Regulating the Carbon, Phosphorus, and Nitrogen Cycles Exemplified by Soil Systems: Introduction. *Sustainability*. 2021, 13(10), 1218-1223. ISSN 2071-1050.
- [46] LEHMANN, Johannes a Stephen JOSEPH. *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*. US and USA: Earthscan, 2009. ISBN 978-1-84407-658-1.
- [47] PRAYOGO, Cahyo, Julie E. JONES, Jan BAEYENS a Gary D. BENDING. Impact of biochar on mineralisation of C and N from soil and willow litter and its relationship with microbial community biomass and structure. *Biology and Fertility of Soils*. 2014, 50(4), 695-702. ISSN 0178-2762.
- [48] LIU, Qi, Yanhui ZHANG, Benjuan LIU, James E. AMONETTE, Zhibin LIN, Gang LIU, Per AMBUS a Zubin XIE. How does biochar influence soil N cycle? A meta-analysis: A review of the biochar roles in soil N, P and K cycles. *Plant and Soil*. Cambridge University Press, 2018, 2010-1-7, 426(1-2), 211-225. ISBN 9780521865616. ISSN 0032-079X.
- [49] CLOUGH, Tim J., Leo M. CONDRON, Jenn-Fang SU, et al. Biochar and the Nitrogen Cycle: Introduction. *Journal of Environmental Quality*. 2010, 39(4), 1218-1223. ISSN 00472425.
- [50] OK, Y. S., S. M. UCHIMIYA, S.X. CHANG a N. BOLAN. *Biochar: Production, Characterization, and Applications*. CRC Press, 2015. ISBN 9781482242300.
- [51] EVANS, Michael R., Brian E. JACKSON, Michael POPP a Sammy SADAKA. Chemical Properties of Biochar Materials Manufactured from Agricultural Products Common to the Southeast United States. *HortTechnology*. 2017, 27(1), 16-23. ISSN 1063-0198.
- [52] EMBRANDIRI, Asha, Rajeev P. SINGH, Hakimi M. IBRAHIM a Azhani A. RAMLI. Land application of biomass residue generated from palm oil processing: its potential benefits and threats. *The Environmentalist*. 2012, 32(1), 111-117. ISSN 0251-1088.

- [53] OUSTRIERE, Nadège, Lilian MARCHAND, William GALLAND, Lunel GABBON, Nathalie LOTTIER, Mikael MOTELICA a Michel MENCH. Influence of biochars, compost and iron grit, alone and in combination, on copper solubility and phytotoxicity in a Cu-contaminated soil from a wood preservation site. *Science of The Total Environment*. 2016, 566-567, 816-825. ISSN 00489697.
- [54] SKRZYPCZAK, Dawid, Daniel SZOPA, Katarzyna MIKULA, et al. Land application of biomass residue generated from palm oil processing: its potential benefits and threats. *Chemosphere*. 2022, 294(1), 111-117. ISSN 00456535.
- [55] SALIM, Bahaa Badry Mosa. Influence of biochar and seaweed extract applications on growth, yield and mineral composition of wheat (*Triticum aestivum* L.) under sandy soil conditions. *Annals of Agricultural Sciences*. 2016, 61(2), 257-265. ISSN 05701783.
- [56] AHMAD, N., M. Imran, M.W.R. Marral, M. Mubashir and B. Butt. 2016. Influence of biochar on soil quality and yield related attributes of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Environmental & Agricultural Sciences*. 7: 68-72
- [57] IPPOLITO, James A., David A. LAIRD, Warren J. BUSSCHER, Ruihong ZHANG, Guangqing LIU a Chang CHEN. Environmental Benefits of Biochar. *Journal of Environmental Quality*. 2012, 41(4), 967-972. ISSN 00472425.
- [58] COWAN, N. J., D. FAMULARI, P. E. LEVY, M. ANDERSON, M. J. BELL, R. M. REES, D. S. REAY a U. M. SKIBA. An improved method for measuring soil N<sub>2</sub>O fluxes using a quantum cascade laser with a dynamic chamber. *European Journal of Soil Science*. 2014, 65(5), 643-652. ISSN 13510754.
- [59] MUKHERJEE, Atanu a Rattan LAL. Biochar Impacts on Soil Physical Properties and Greenhouse Gas Emissions. *Agronomy*. 2013, 3(2), 313-339. ISSN 2073-4395.
- [60] *Forest Ecology and Management*. 170. 2002. ISSN 03781127. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378112701007733>
- [61] RYAN, Michael G., Beverly E. LAW, Kaneyuki NAKANE, et al. Interpreting, measuring, and modeling soil respiration: a static alkali absorption method and two dynamic closed chamber methods. *Biogeochemistry*. 2005, 73(1), 3-27. ISSN 0168-2563.
- [62] NORMAN, J. M., C. J. KUCHARIK, S. T. GOWER, D. D. BALDOCCHI, P. M. CRILL, M. RAYMENT, K. SAVAGE a R. G. STRIEGL. A comparison of six methods for measuring soil-surface carbon dioxide fluxes. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*. 1997, 102(D24), 28771-28777. ISSN 01480227.
- [63] PILETSKA, Elena V., Stanislav S. PILETSKY, Michael J. WHITCOMBE, Iva CHIANELLA, Sergey A. PILETSKY a A. M. BREURE. Development of a New Microtiter Plate Format for Clinically Relevant Assays. *Analytical Chemistry*. UK: CABI Publishing, 2012, 2005-01-20, 84(4), 2038-2043. ISBN 9780851990989. ISSN 0003-2700.
- [64] WAKELIN, Steven, Enzo LOMBI, Erica DONNER, Lynne MACDONALD, Amanda BLACK a Maureen O'CALLAGHAN. Application of MicroResp™ for soil ecotoxicology. *Environmental Pollution*. UK: CABI Publishing, 2013, 2005-01-20, 179(4), 177-184. ISBN 9780851990989. ISSN 02697491.
- [65] CREAMER, R.E., D. STONE, P. BERRY, I. KUIPER, Amanda BLACK a Maureen O'CALLAGHAN. Measuring respiration profiles of soil microbial communities across Europe using MicroResp™ method. *Applied Soil Ecology*. UK: CABI Publishing, 2016, 2005-01-20, 97(4), 36-43. ISBN 9780851990989. ISSN 09291393.

- [66] CAMPBELL, Colin D., Stephen J. CHAPMAN, Clare M. CAMERON, Mitchell S. DAVIDSON a Jacqueline M. POTTS. A Rapid Microtiter Plate Method To Measure Carbon Dioxide Evolved from Carbon Substrate Amendments so as To Determine the Physiological Profiles of Soil Microbial Communities by Using Whole Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. Elsevier, 2003, 2010, 69(6), 3593-3599. Advances in Agronomy.
- [67] KAUFMANN, Karin, Stephen J. CHAPMAN, Colin D. CAMPBELL, Hauke HARMS, Patrick HÖHENER a Maureen O'CALLAGHAN. Miniaturized test system for soil respiration induced by volatile pollutants. *Environmental Pollution*. UK: CABI Publishing, 2006, 2005-01-20, 140(2), 269-278. ISBN 9780851990989. ISSN 02697491.
- [68] ZABALOY, M, R LEHMAN, S FREY a J GARLAND. Optimization of an oxygen-based approach for community-level physiological profiling of soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008, 40(12), 2960-2969. ISSN 00380717.
- [69] YU, Kewei, April HISCOX, Ronald D. DELAUNE, Hauke HARMS, Patrick HÖHENER a Maureen O'CALLAGHAN. Greenhouse Gas Emission by Static Chamber and Eddy Flux Methods. *Methods in Biogeochemistry of Wetlands*. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, 2013, 2015-10-26, 140(2), 427-437. SSSA Book Series. ISBN 9780891189619. ISSN 02697491.
- [70] SANDOR, M. *Soil Respiration: Concept and Measurement Methods*. Cluj-Napoca, Romania: Bioflux, 2010. ISSN 1844-6698.
- [71] WANG, Xueting, Junguo HU, Clare M. CAMERON, Mitchell S. DAVIDSON a Jacqueline M. POTTS. Study on Principles of Soil Respiration Monitoring and Calibration Improvement Methods. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020, 446(3), 3593-3599. ISSN 1755-1307.
- [72] DORAN, Gregory a Alek ZANDER. An improved method for measuring soil microbial activity by gas phase flow injection analysis. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2012, 36(2), 349-357. ISSN 0100-0683.
- [73] PUMPANEN, Jukka, Bernard LONGDOZ, Werner L. KUTSCH, M. ANDERSON, M. J. BELL, R. M. REES, D. S. REAY a U. M. SKIBA. Field measurements of soil respiration: principles and constraints, potentials and limitations of different methods. *Soil Carbon Dynamics*. Cambridge University Press, 2010, 2010-1-7, 73(1), 16-33. ISBN 9780521865616. ISSN 0168-2563.
- [74] VELASCO, Erik, Matthias ROTH, Werner L. KUTSCH, M. ANDERSON, M. J. BELL, R. M. REES, D. S. REAY a U. M. SKIBA. Cities as Net Sources of CO<sub>2</sub>: Review of Atmospheric CO<sub>2</sub> Exchange in Urban Environments Measured by Eddy Covariance Technique. *Geography Compass*. Cambridge University Press, 2010, 2010-1-7, 4(9), 1238-1259. ISBN 9780521865616. ISSN 17498198.
- [75] PITOMBO, Leonardo M., Juliana C. RAMOS, Helio D. QUEVEDO, Karina P. DO CARMO, Jane M.F. PAIVA, Elisabete A. PEREIRA a Janaina B. DO CARMO. Methodology for soil respirometric assays: Step by step and guidelines to measure fluxes of trace gases using microcosms. *MethodsX*. 2018, 5, 656-668. ISSN 22150161.
- [76] RESPIROMETRIC Sensor System 6 for Soil Analysis. VELP Scientifica [online]. 2023 [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: <https://www.velp.com/en-ww/respirometric-sensor-system-for-soil-analysis.aspx>.

- [77] IRTH CO<sub>2</sub> Respirometer: Investigate Solutions for Soil Carbon Cycling. Solvita [online]. Maine Hosting, 2022 [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: <https://solvita.com/irth/>
- [78] HANEY, R.L., W.F. BRINTON a E. EVANS. Soil CO<sub>2</sub> respiration: Comparison of chemical titration, CO<sub>2</sub> IRGA analysis and the Solvita gel system. *Renewable Agriculture and Food Systems*. 2008, 23(2), 171-176. ISSN 1742-1705.
- [79] S. CHITRAKAR, Catherine E., Klaus C. J. BERN, Justinus A. D. S. SHRESTHA, et al. QUANTIFYING CORN DETERIORATION DUE TO FUNGAL GROWTH BY USE OF CO<sub>2</sub>-SENSITIVE GEL: Introduction. *Applied Engineering in Agriculture*. 2006, 22(1), 81-86. ISSN 1943-7838.
- [80] Solvita Field Soil Test: Natural Soil Respiration: The Original Basal Soil Test Method [online]. Maine Hosting, 2022 [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: <https://solvita.com/fieldtest/>
- [81] DJERDJ, Tamara, Vesna PERŠIĆ, Davorka K. HACKENBERGER, Domagoj K. HACKENBERGER a Branimir K. HACKENBERGER. A low-cost versatile system for continuous real-time respiratory activity measurement as a tool in environmental research. *Measurement*. 2021, 184. ISSN 02632241
- [82] MCGOWEN, Eric B., Sumit SHARMA, Shiping DENG, Hailin ZHANG a Jason G. WARREN. An Automated Laboratory Method for Measuring CO<sub>2</sub> Emissions from Soils. *Measurement*. 2018, 3(1). ISSN 2471-9625
- [83] ORCHARD, Valerie A. a F.J. COOK. Relationship between soil respiration and soil moisture. *Soil Biology and Biochemistry*. 1983, 15(4), 447-453. ISSN 00380717.
- [84] VAN CLEVE, Keith, Patrick I. COYNE, Enid GOODWIN, Craig JOHNSON a Marilyn KELLEY. A comparison of four methods for measuring respiration in organic material. *Soil Biology and Biochemistry*. 1979, 11(3), 237-246. ISSN 00380717.
- [85] MONDINI, Claudio, Tania SINICCO, Maria Luz CAYUELA, Miguel Angel SANCHEZ-MONEDERO a Marilyn KELLEY. A simple automated system for measuring soil respiration by gas chromatography. *Talanta*. 2010, 81(3), 849-855. ISSN 00399140.
- [86] ISOBE, Kazuo, Keisuke KOKA, Shingo UEDA, Keishi SENOO, Shigeaki HARAYAMA a Yuichi SUWA. A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites. *Journal of Microbiological Methods*. 2011, 84(1), 46-51. ISSN 01677012.
- [87] NUMA, Kristyn B., Jasmine M. ROBINSON, Vickery L. ARCUS a Louis A. SCHIPPER. Separating the temperature response of soil respiration derived from soil organic matter and added labile carbon compounds: Effects of Drought on Soil Microbial Communities and Processes. *Geoderma*. 2021, 400(9), 2281-2289. ISSN 00167061.
- [88] COOPER, Jennifer, Isabel GREENBERG, Bernard LUDWIG, Laura HIPPICH, Daniel FISCHER, Bruno GLASER a Michael KAISER. Effect of biochar and compost on soil properties and organic matter in aggregate size fractions under field conditions. 2020, 295. ISSN 01678809.
- [89] SMITH, Jeffrey L., Harold P. COLLINS, Vanessa L. BAILEY, Lunel GABBON, Nathalie LOTTIER, Mikael MOTELICA a Michel MENCH. The effect of young biochar on soil respiration. *Soil Biology and Biochemistry*. 2010, 42(12), 2345-2347. ISSN 00380717.

- [90] EL-MAHROUKY, Mohamed, Ahmed Hamdy EL-NAGGAR, Adel Rabie USMAN, Mohammad AL-WABEL, Monika TRUDICOVA, Jiri SMILEK a Vojtech ENEV. Dynamics of CO<sub>2</sub> Emission and Biochemical Properties of a Sandy Calcareous Soil Amended with Conocarpus Waste and Biochar. *Pedosphere*. 2015, 25(1), 46-56. ISSN 10020160.
- [91] STEINER, Christoph, Keshav C. DAS, Marcos GARCIA, Bernhard FÖRSTER a Wolfgang ZECH. Charcoal and smoke extract stimulate the soil microbial community in a highly weathered xanthic Ferralsol. *Pedobiologia*. 2008, 51(5-6), 359-366. ISSN 00314056
- [92] CHENG, Chih-Hsin, Johannes LEHMANN, Janice E. THIES, Sarah D. BURTON a Mark H. ENGELHARD. Oxidation of black carbon by biotic and abiotic processes. *Organic Geochemistry*. 2006, 37(11), 1477-1488. ISSN 01466380.
- [93] ENGELHARDT, Ilonka C., Amy WELTY, Steven J. BLAZEWCZ, et al. Depth matters: effects of precipitation regime on soil microbial activity upon rewetting of a plant-soil system. *The ISME Journal*. 2018, 12(4), 1061-1071. ISSN 1751-7362.
- [94] LINN, D. M. a J. W. DORAN. Effect of Water-Filled Pore Space on Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Production in Tilled and Nontilled Soils. *Soil Science Society of America Journal*. 1984, 48(6), 1267-1272. ISSN 03615995.
- [95] XIANG, Shu-Rong, Allen DOYLE, Patricia A. HOLDEN a Joshua P. SCHIMEL. Drying and rewetting effects on C and N mineralization and microbial activity in surface and subsurface California grassland soils: Effects of Drought on Soil Microbial Communities and Processes. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008, 40(9), 2281-2289. ISSN 00380717.
- [96] SCHIMEL, Joshua P. Life in Dry Soils: Effects of Drought on Soil Microbial Communities and Processes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2018, 49(1), 409-432. ISSN 1543-592X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-ecolsys-110617-062614.
- [97] MILLER, A, J SCHIMEL, T MEIXNER, J SICKMAN a J MELACK. Episodic rewetting enhances carbon and nitrogen release from chaparral soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 2005, 37(12), 2195-2204. ISSN 00380717.
- [98] SCHROEDER, Julia, Lisa KAMMANN, Mirjam HELFRICH, Christoph C. TEBBE a Christopher POEPLAU. Impact of common sample pre-treatments on key soil microbial properties. *Soil Biology and Biochemistry*. 2021, 160. ISSN 00380717.
- [99] LEE, Yong Bok, Nicola LORENZ, Linda Kincaid DICK, Richard P. DICK a Christopher POEPLAU. Cold Storage and Pretreatment Incubation Effects on Soil Microbial Properties. *Soil Science Society of America Journal*. 2007, 71(4), 1299-1305. ISSN 03615995.
- [100] *Applied Soil Ecology*. 62. 2012. ISSN 09291393. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929139312001837>
- [101] BARTLETT, Richmond, Bruce JAMES, Linda Kincaid DICK, Richard P. DICK a Christopher POEPLAU. Studying Dried, Stored Soil Samples - Some Pitfalls. *Soil Science Society of America Journal*. 1980, 44(4), 721-724. ISSN 03615995.
- [102] KALINA, Michal, Sarka SOVOVA, Jan HAJZLER, Leona KUBIKOVA, Monika TRUDICOVA, Jiri SMILEK a Vojtech ENEV. Biochar Texture—A Parameter Influencing Physicochemical Properties, Morphology, and Agronomical Potential. *Agronomy*. 2022, 12(8). ISSN 2073-4395.

- [103] SOVOVA, Sarka, Voitech ENEV, Jiri SMILEK, Leona KUBIKOVA, Monika TRUDICOVA, Jan HAJZLER a Michal KALINA. The effect of biochar application on soil properties and growth of the model plant *Zea mays*. *Ecocycles*. 2021, 46-54. ISSN 24162140.
- [104] RODELLA, A.A a L.V SABOYA. Calibration for conductimetric determination of carbon dioxide. *Soil Biology and Biochemistry*. 1999, 31(14), 2059-2060. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/S0038-0717(99)00046-2.
- [105] SCHWANKL, L.J. and T. Prichard. 2009. University of California Drought Management Web Site. <http://UCManageDrought.ucdavis.edu>. Viewed Aug. 13, 2009.
- [106] YU, Ok-youn; RAICHLE, Brian; SINK, Sam. Impact of biochar on the water holding capacity of loamy sand soil. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 2013, 4.1: 1.
- [107] MCCAULEY, Ann; JONES, Clain; JACOBSEN, Jeff. Soil pH and organic matter. *Nutrient management module*, 2009, 8.2: 1-12.
- [108] NAEEM, Muhammad Asif, Muhammad KHALID, Zahoor AHMAD a Muhammad NAVEED. Low Pyrolysis Temperature Biochar Improves Growth and Nutrient Availability of Maize on Typic Calcic Argisol. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2015, 47(1), 41-51. ISSN 0010-3624.
- [109] POKORNÝ, Eduard, Bořivoj ŠARAPATKA a Květuše HEJÁTKOVÁ, 2007. Hodnocení kvality půdy v ekologicky hospodařícím podniku. Náměšť nad Oslavou: ZERA – Zemědělská a ekologická regionální agentura, o.s. ISBN 80–903548–5–8.
- [110] ŠANTRŮČKOVÁ, Hana, Eva KAŠTOVSKÁ, Jiří BÁRTA, Ladislav MIKO a Karel TAJOVSKÝ. *Ekologie půdy*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2018. ISBN 978-80-7394-695-1.
- [111] XIE, Tao, Krishna R. REDDY, Chengwen WANG, Erin YARGICOGU, Kurt SPOKAS a Yuichi SUWA. Characteristics and Applications of Biochar for Environmental Remediation: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2015, 45(9), 939-969. ISSN 1064-3389
- [112] BIRD, Michael; KEITEL, Claudia; MEREDITH, William. Analysis of biochars for C, H, N, O and S by elemental analyser. *Biochar: a guide to analytical methods*. CSIRO Publishing, Melbourne, VIC, Australia, 2017, 39-50.
- [113] BAYLISS, Leonard Ernest. A Conductivity Method for the Determination of Carbon Dioxide. *Biochemical Journal*. 1927, 21(3), 662-664. ISSN 0306-3283.
- [114] MANZONI, Stefano, Joshua P. SCHIMEL a Amilcare PORPORATO. Responses of soil microbial communities to water stress: results from a meta-analysis. *Ecology*. 2012, 93(4), 930-938. ISSN 0012-9658.
- [115] HANEY, R. L., W. H. BRINTON a Eric EVANS. Estimating Soil Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Mineralization from Short-Term Carbon Dioxide Respiration: results from a meta-analysis. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2008, 39(17-18), 2706-2720. ISSN 0010-3624.
- [116] PALANSOORIYA, Kumuduni Niroshika, James Tsz Fung WONG, Yohey HASHIMOTO, et al. Response of microbial communities to biochar-amended soils: a critical review. *Biochar*. 2019, 1(1), 3-22. ISSN 2524-7972.
- [117] *FEMS Microbiology Ecology*. 43. 2003. ISSN 01686496. Dostupné také z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0168-6496\(02\)00400-2](http://doi.wiley.com/10.1016/S0168-6496(02)00400-2)

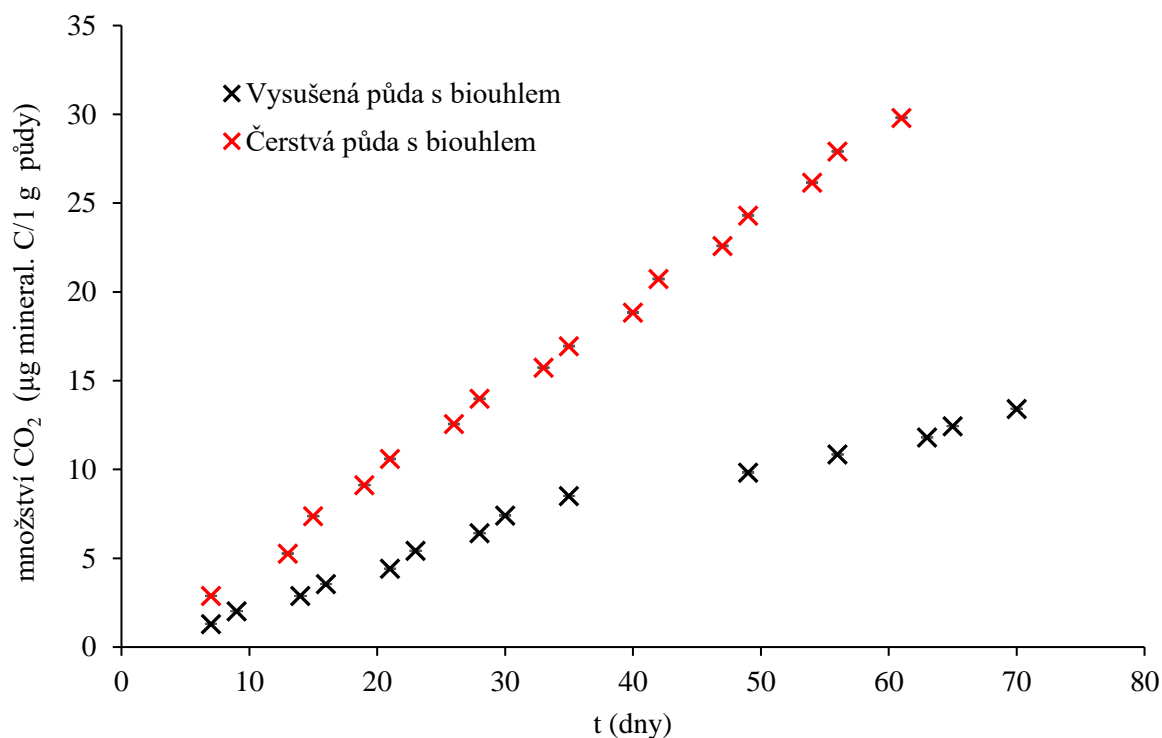


- [118] ANDERSON, Craig R., Leo M. CONDRON, Tim J. CLOUGH, Mark FIERS, Alison STEWART, Robert A. HILL a Robert R. SHERLOCK. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. *Pedobiologia*. 2011, 54(5-6), 309-320. ISSN 00314056.
- [119] ZACHÁRY, Dóra, Tibor FILEP, Gergely JAKAB, György VARGA, Marianna RINGER a Zoltán SZALAI. Kinetic parameters of soil organic matter decomposition in soils under forest in Hungary. *Geoderma Regional*. 2018, 14. ISSN 23520094.

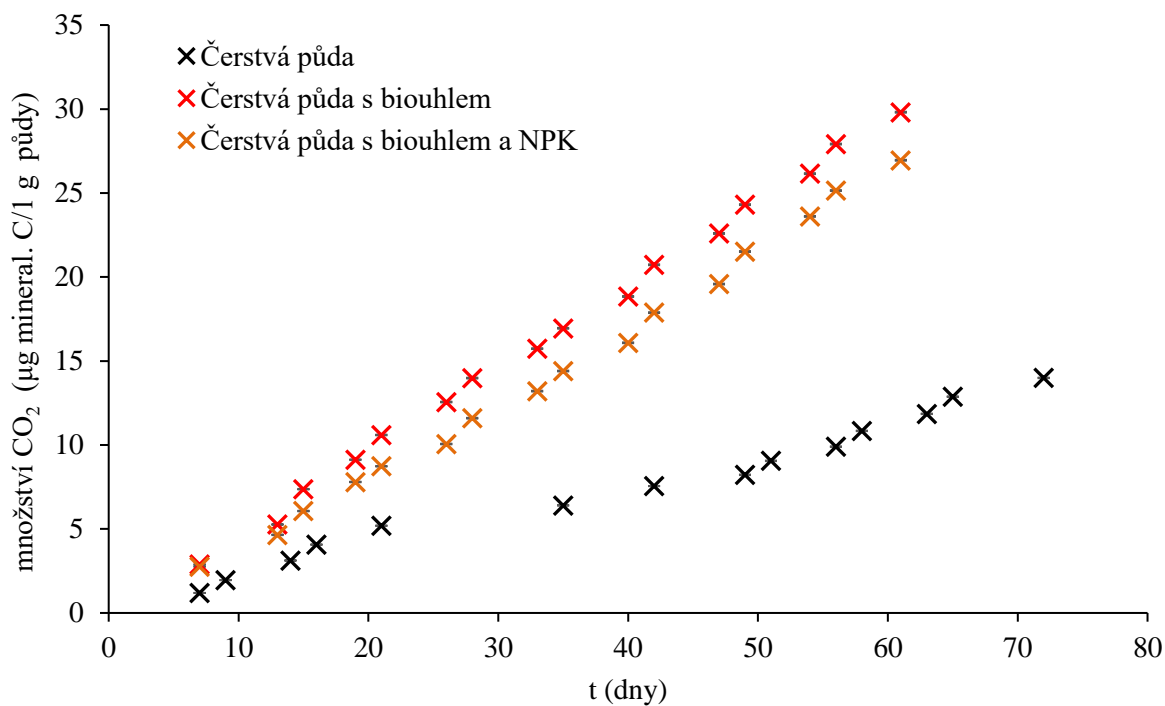
## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<b>Zkratka</b>	<b>Význam</b>
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
hm. %	hmotnostní procenta
K	Kelvin
MS	hmotnostní spektrometrie (molecular spectroscopy)
NPK	hnojivo obsahující anorganické sloučeniny s obsahem dusíku, fosforu a draslíku
μm	mikrometr
pH	potenciál vodíku
s.r.o.	společnost s ručením omezeným
TGA	termogravimetrická analýza
ZERA	zemědělská ekologická regionální agentura

## PŘÍLOHY



Příloha 1: Rychlost půdní respirace pro vysušenou a čerstvou půdu s přidavkem biouhlu stanovená pomocí dynamického inkubačního systému konduktometrickou metodou



Příloha 2: Rychlost půdní respirace pro samotnou čerstvou půdu, s přidavkem biouhlu a kombinace biouhlu s NPK stanovená pomocí dynamického inkubačního systému konduktometrickou metodou