

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Biouhel a jeho vliv na vybrané půdní mikrobiální
charakteristiky**

Bakalářská práce

Autor práce: Pavla Vojtová

Obor studia: Udržitelné využívání přírodních zdrojů

Vedoucí práce: Ing. Barbora Šlapáková

©2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Biouhel a jeho vliv na vybrané půdní mikrobiální charakteristiky" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 4. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Barboře Šlapákové za odborné vedení a vstřícný přístup kdykoli jsem potřebovala. Dále paní Ing. Petře Huislové za svolení odebírat vzorky na pokusném poli VÚMOP a panu Káňovi za dodání biouhlu. Velký dík patří také mé rodině a blízkým, bez jejichž velké podpory by studium nikdy nebylo možné.

Biouhel a jeho vliv na vybrané půdní mikrobiální charakteristiky

Souhrn

Podle zadání bakalářské práce byla provedena měření na vzorcích půdy z pokusného pole v obci Třebsín za účelem zjistit, jaký vliv má přídavek biouhlu do půdy na vybrané mikrobiální charakteristiky. Tato práce se zabývá hodnocením měření aktivity enzymů dehydrogenázy a nitrifikace. K porovnání byly použity vždy 4 druhy vzorků, které byly rozdílně hnojeny: hnojem (1), konvenčně (2), biouhlem (3) a kontrolou (4), která hnojena nebyla. Měření byla prováděna opakovaně.

Testovaná půda byla v průběhu půl roku několikrát odebírána, vzorky byly upraveny pro potřeby měření (homogenizovány a stabilizovány).

Aktivita enzymů dehydrogenázy v půdě byla stanovena fotometricky měřením uvolněného trifenylformazanu (TPF). TPF byl extrahován na základě reakce s 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridu (TTC), přidávaného k půdním vzorkům, a mikroorganismů tvořících enzymy dehydrogenázy během inkubace.

Ke stanovení nitrifikace byly použity 3 typy testů – měření aktuálního obsahu dusičnanů, měření po osmidenní inkubaci a měření potenciálního obsahu dusičnanů po přidání síranu amonného. Množství dusičnanových iontů bylo měřeno iontově selektivní elektrodou.

Na základě provedených měření bylo zjištěno, že přídavek biouhlu do půdy má jistý vliv na nitrifikaci a aktivitu enzymů dehydrogenázy. V porovnání s konvenčními postupy ovšem nevykazuje zásadní rozdíly. Měření bylo také zjištěno, že hnojení organickými hnojivy, v případě této práce hnojem, má velký vliv na obě mikrobiální charakteristiky. Vzorky s takto hnojenou půdou vykazovaly nejvyšší hodnoty ve všech případech, tedy jak u nitrifikace, tak u aktivity enzymů dehydrogenázy.

Klíčová slova: půda, biouhel, mikrobiom, nitrifikace, aktivita dehydrogenáz

The effect of biochar on selected microbial properties

Summary

According to the assignment of the thesis, tests have been conducted of soil samples taken from the field in the Třebšín. The objective was to clarify the influence of adding biochar into soil by observance of selected microbial characteristics: the activity of dehydrogenase enzymes and nitrification. Each part of the experimental field, where the sample was taken, was cultivate differently: manure (1), conventional fertilizer (2), biochar (3), and the last sample was left unfertilized lie as a fallow (4).

The samples have been collected several times during the year and were treated to measure up to the needs of testing (the soil was homogenised and stabilised).

The activity of dehydrogenase enzymes photometrically by analysing the released triphenyl formazane (TPF). TPF was extracted by adding (2, 3, 5) - triphenyl tetrazolium chloride (TTC) to the soil samples for a certain incubation period, in which TTC reacted with the dehydrogenase enzymes produced by the microorganisms in the soil.

In order to determine the value of nitrification 3 different tests were used - the actual content of nitrates, the nitrate content after eight days of incubation and the potential content of nitrates after ammonium sulfate had been added. To determine the amount of nitrate ions a ion-selective electrode was used.

It has been conducted by the measurement that the addition of biochar to the soil had an influence on the soil nitrification and activity of dehydrogenase enzymes. Compared to conventional soil cultivation, there are no major differences. The results also showed importance of the organic fertilizers, in this case, manure, has an important effect on both microbial characteristics. Soil sample with manure showed the highest values by both tests, nitrification and enzyme dehydrogenase in all cases.

Keywords: soil, biochar, microbiome, nitrification, dehydrogenase activity

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce a hypotézy	2
2.1	Cíl práce	2
2.2	Hypotézy práce.....	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Způsoby zlepšování kvality půdy.....	3
3.1.1	Hnojiva	3
3.1.2	Pomocné půdní látky	3
3.1.3	Půdní kondicionéry	4
3.2	Biouhel.....	4
3.2.1	Využití biouhlu	5
3.2.2	Výroba biouhlu.....	5
3.2.2.1	Pyrolýza	5
3.2.2.2	Hydrotermální karbonizace	6
3.2.2.3	Zplynování	6
3.3	Půda.....	7
3.3.1	Struktura půdy	8
3.3.2	Funkce půdy.....	9
3.3.2.1	Degradace půdy.....	9
3.3.3	Druhy půd	10
3.3.4	Typy půd.....	10
3.3.4.1	Kambizem	11
3.4	Mikroorganismy v půdě.....	12
3.4.1	Viry	13
3.4.2	Bakterie.....	13
3.4.2.1	Aktinomycety (Aktinobakterie).....	14
3.4.3	Houby.....	15
3.5	Nitrifikace.....	16
3.6	Enzymy v půdě	18
4	Praktická část.....	19
4.1	Pokusné pole.....	19
4.2	Metodika měření aktivity enzymů dehydrogenázy.....	20
4.2.1	Příprava roztoků.....	21
4.2.2	Výpočet stanovení množství TPF ve filtrátech.....	22

4.3	Metodika měření nitrifikace	22
4.3.1	Kalibrační řada	23
4.3.2	Chemikálie.....	23
4.3.3	Výpočet	23
4.4	Výsledky	24
4.4.1	Aktivita enzymů dehydrogenázy.....	24
4.4.2	Nitrifikace.....	26
4.4.2.1	Aktuální nitrifikace.....	26
4.4.2.2	Potenciální nitrifikace	27
4.4.2.3	Inkubovaná nitrifikace	28
4.4.3	Sušina	28
4.4.4	Půdní reakce	29
4.5	Diskuze.....	31
4.5.1	Aktivita enzymů dehydrogenázy.....	31
4.5.2	Nitrifikace.....	32
4.6	Závěr	33
5	Použité zdroje	34
6	Přílohy.....	40
7	Seznam	42
7.1	Seznam tabulek	42
7.2	Seznam grafů.....	42
7.3	Seznam obrázků	42
7.4	Seznam rovnic	42
7.5	Seznam příloh.....	43

1 Úvod

Půda je jednou ze základních podmínek života na Zemi. Již od pradávna je zdrojem lidské obživy pro její schopnost poskytovat dobré podmínky pro pěstování plodin, a to jak plodin jedlých, tak plodin k materiálnímu využití. Je tedy více než potřeba se o půdu starat, chránit ji a přispívat k její úrodnosti všemi možnými prostředky.

Jednou z možností, jak přispívat k úrodnosti půdy je přidáváním tzv. pomocných půdních látek, které definuje zákon č. 156/1998 Sb. (Zákon o hnojivech). Mezi pomocné půdní látky se řadí např. upravené čistírenské kaly apod. Od dne 13. 2. 2017 se mezi PPL řadí i biouhel pod názvem AGROUHEL.

Biouhel vzhledem ke své přírodní povaze nijak negativně nenarušuje přirozené vlastnosti půdy, naopak přispívá ke zlepšení její kvality. Ovlivňuje strukturu půdy, tedy i životní prostředí pro mikroorganismy.

Využití zbytkové biomasy ze zemědělství a z agroprůmyslu k výrobě biouhlu je ekonomické a efektivní řešení využití odpadů těchto odvětví, který se jinak používá neefektivně (Parmar et al., 2014).

2 Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Práce si klade za cíl zjistit, zda nastanou změny v aktivitě dehydrogenáz a nitrifikaci po přidavku biouhlu do půdy. Vliv biouhlu zhodnotit na základě porovnání vzorků, na něž byl opakovaně aplikován biouhel a vzorků, které byly hnojeny hnojem, konvenčně a nehnojeny.

2.2 Hypotézy práce

- 1) Přídavek biouhlu ovlivní vybrané půdní mikrobiální charakteristiky.
- 2) Biouhel má vliv na nitrifikační aktivitu půdy.
- 3) Aktivita enzymů dehydrogenázy je ovlivněna působením biouhlu.

3 Literární rešerše

3.1 Způsoby zlepšování kvality půdy

K úrodnosti půdy se již řadu let používají, mimo jiné, nejrůznější chemické i biologické přípravky, aby výnosy plodin byly co nejvyšší. Nicméně až v posledních letech se začíná dbát i na ochranu půdy a její udržitelnou úrodnost. Je snaha využívat takové látky, které negativně neovlivňují půdu, ani plodiny na ní vypěstované. K těmto účelům se využívá zejména hnojiv (minerálních, organických, statkových apod.) pomocných půdních látek a půdních kondicionérů. Zařazení do zákonného užívání takových látek upravuje zákon České republiky, a to zákon č. 156/1998 Sb. (Zákon o hnojivech). Dále se samozřejmě využívají také šetrnější techniky a způsoby obhospodařování půdy.

3.1.1 Hnojiva

Zákon č. 156/1998 Sb. (Zákon o hnojivech) definuje hnojiva jako látky způsobilé poskytnout účinné množství živin pro výživu kulturních rostlin a lesních dřevin, pro udržení nebo zlepšení půdní úrodnosti a pro příznivé ovlivnění výnosu či kvality produktu.

Dělí se do tří základních kategorií:

1. Organické
2. Syntetické
3. Minerální

Do organických hnojiv spadá například digestát, což je zbytek z anaerobní fermentace biomasy při výrobě bioplynu (Garlapalli et al., 2016). Digestát se dále může mechanicky separovat na tuhou a kapalnou část, kde tuhá část se nazývá separát a kapalná část fugát (ANONYM, 2016).

3.1.2 Pomocné půdní látky

Pomocné půdní látky jsou dle zákona č. 156/1998 Sb. (Zákon o hnojivech) látky, které nemají účinné množství živin, půdu biologicky, chemicky nebo fyzikálně neovlivňují, zlepšují její stav nebo zvyšují účinnost hnojiv.

Dělí se do dvou kategorií:

1. Umělé
2. Přírodní

3.1.3 Půdní kondicionéry

Půdní kondicionery (PK) jsou přírodní nebo syntetické látky, které mimo základních živin obsahují i jiné prospěšné příměsi (např. stimulatory, vitamíny, fytohormony, stopové prvky a hydrogely), tím zlepšují chemické, fyzikální a biologické vlastnosti půd, čímž podporují růst a výnos rostlin, a to zejména na extrémních stanovištích (Bulíř, 2008).

3.2 Biouhel

Biouhel je spíše znám pod anglickým názvem biochar. Pro účel této práce je zvolen výraz biouhel, který nejlépe vystihuje jeho vlastnosti.

Biouhel je pevný materiál získaný z termochemické konverze biomasy v prostředí s omezeným obsahem kyslíku. Může být použit jako samotný výrobek nebo jako složka ve směsném výrobku, lze ho použít jako činidlo pro zlepšení vlastností půdy, k efektivnějšímu využití přírodních zdrojů, k sanaci a ochraně proti určitému znečištění životního prostředí a k snížení množství skleníkových plynů (Jirka et Tomlinson, 2014).

Hydrouhel je pevný produkt hydrotermální karbonizace (HTK, angl. HTC) nebo zkapalnění (někdy označován jako HTC materiál) a liší se od klasického biouhlu výrobním procesem a vlastnostmi (Libra et al., 2011).

Biouhly a jim podobné látky tvoří hlavní složku pro výrobu přípravků s vysokými sorpčními vlastnostmi. Tyto přípravky se využívají v zemědělství, zejména ve formě tzv. pomocných půdních přípravků (Ust'ak et Muñoz, 2012). Proto je snaha zařadit samotný biouhel do legislativy k již zmiňovaným pomocným půdním přípravkům.

Velký zájem o biouhel pramení z výzkumů Amazonských černozeří neboli tzv. Terra Preta. Jde o typ antropogenní půdy se zvýšeným obsahem pyrogenní organické hmoty (Case et al., 2012). Tyto černozeří bohaté na uhlík jsou, v porovnání se sousední půdou v této oblasti, která obsahuje málo uhlíku, velice mikrobiálně rozmanité. Jsou tedy důkazem, že množství uhlíku má vliv na úrodnost půdy (Garlapalli et al., 2016).

3.2.1 Využití biouhlu

Využití biouhlu představuje mnoho výhod a to jak z hlediska agronomického, tak environmentálního řízení. Vzhledem k vysoké stabilitě biouhlu je možné ho použít pro snižování CO₂ z ovzduší. Vyrábí se z odpadních materiálů (jako je chlévská mrva a zelený odpad), z materiálů, které mohou produkovat skleníkové plyny (CH₄, N₂O). Při jeho výrobě dochází k uvolňování energeticky bohatých látek, které lze využít např. k vytápění budov (bioplynové stanice). Přidáním do půdy se může zvýšit úrodnost a schopnost zadržovat agrochemikálie (Lehmann, 2009).

Parmar et al. (2014) uvádí, že může přispět ke zmírnění změny klimatu, zvýšit produktivitu rostlin a může být využit při sanaci kontaminovaných lokalit. Biouhel dále zvyšuje retenci vody v půdě, snižuje průnik dusíku a fosforu z hnojiv do podzemních vod, také podporuje přeměnu dusíku v půdě (Pohořelý et al., 2016).

3.2.2 Výroba biouhlu

Biouhel lze vyrábět několika způsoby, a to pyrolytickou konverzí, zplynováním a vysokotlakou hydrotermální úpravou biomasy. Nejčastěji je vyráběn pyrolytickou konverzí libovolné organické suroviny (Reza et al., 2014; Lehmann et Joseph, 2015)

K výrobě se mohou využívat různé suroviny, včetně upravených čistírenských kalů.

3.2.2.1 Pyrolýza

Pyrolýza (suchá pyrolýza) je fyzikálně-chemický děj, který probíhá za nepřístupu kyslíku a teplotou vyšší než 400°C. Při tomto procesu je surovina (biomasa, čistírenské kaly apod.) rozložena na nízkomolekulární látky a na tuhý zbytek (uhel) (Cornelissen et al., 2009; Lehmann et Joseph, 2015). Tento proces je technicky využíván více než 80 let. Důležitým úkolem těchto technologií využívajících zmiňovaný proces, je mimo jiné, snaha zpracovat komunální odpad a čistírenské kaly k výrobě elektrické energie a tepla a to na základě využití energie, která se v těchto surovinách ještě nachází (Jílková et al., 2012).

Vlastnosti produktů pyrolýzy, ale také jejich množství, závisí na podmínkách, při kterých se děj odehrává, a to na rychlosti ohřevu, teplotě, tlaku, konstrukci reaktoru, ale i jak dlouho se dané produkty nacházejí v reakčním prostoru (Carrier et al., 2011).

3.2.2.2 Hydrotermální karbonizace

Hydrotermální karbonizace (HTK; angl. zkratka HTC) je název pro vysokotlakou hydrotermální úpravu biomasy (příp. bioodpadů), která probíhá bez přístupu kyslíku, v uzavřeném systému, často s využitím katalyzátorů (Usťak et Muñoz, 2012). Někdy je tato metoda nazývána mokrou pyrolýzou (Funke et Ziegler, 2010). Je to termo-chemický proces, během něhož se organická hmota přetváří na produkty bohaté na uhlík, které se nazývají hydrouhel. Proces probíhá při vysokém tlaku v rozmezí od 2 do 10 MPa, při teplotě v rozmezí od 180 do 250 °C a za přítomnosti vody jako reakčního media (Parmar et al., 2014).

Toto zpracování biomasy je energeticky příznivější oproti klasické (suché) pyrolýze. Suroviny nepotřebují předchozí sušení, proces je exotermický, proto šetří energii potřebnou k dokončení procesu a to tím, že touto energií přispívají k dokončení samotného procesu. K dalším výhodám HTK se řadí menší ztráty uhlíku a minimální produkce dehtů a škodlivých emisí (Libra et al. 2011; Titirici et al. 2012).

Technologie výroby bioplynu, hydrotermální karbonizace (HTK, mokrá pyrolýza) nabízí výhody v možnosti využití zbytků potravy v potravinářském průmyslu vyznačujících se vysokou vlhkostí a nízkou výhřevností. HTK je energeticky účinnější kvůli nízkým teplotám a vyšším rychlostem obnovy bioplynů až o 90% (Parmar et al., 2014).

3.2.2.3 Zplynování

Ke zplynování (parciální oxidaci) dochází při teplotách vyšších než 500 °C s omezeným přístupem kyslíku, během něhož se vytváří generátorový plyn, složený zejména z CO, CH₄ a H₂. Tento plyn se využívá k výrobě elektrické energie a tepla. Dále tímto způsobem vzniká biouhel, jako tuhý vedlejší produkt tohoto procesu (Funke et Ziegler, 2010; Pohořelý et al., 2012). Zplynováním se vyrobí nejmenší množství biouhlu, nicméně stále se řadí do způsobů výroby.

Ukazatel	Jednotka	Komunální BPS ¹ kombinovaná s MBÚ ²		Komunální BPS		Zemědělská BPS	
		Surovina	Digestát	Surovina	Digestát	Surovina	Digestát
Obsah sušiny	%	10,2	4,55	8,35	3,36	12,2	3,32
Spalitelné látky	% sušiny	79,3	56,8	74,5	52,8	87,6	62,2
Obsah popele 550 °C	% sušiny	20,7	43,2	25,5	47,2	12,4	37,8
Celkový uhlík	% sušiny	39,7	28,4	37,3	26,4	43,8	31,1
Celkový dusík	% sušiny	5,12	4,69	2,54	2,22	3,75	2,92
Poměr C:N	-	7,7	6,1	14,7	11,9	11,7	10,7
PH suspenze	Jednotky pH	5,30	7,95	4,80	8,46	4,45	8,20
Obsah ligninu	% sušiny	14,9	31,7	10,8	25,4	8,75	28,6
Obsah celulózy	% sušiny	8,52	9,64	7,30	8,10	13,2	17,5
Obsah hemicelulózy	% sušiny	3,20	5,30	2,50	4,90	5,84	1,60

Tabulka 1: Základní rozbor složek biomasy- %sušiny (Ušák et Muňoz, 2012)

Vlastnosti biouhlu se liší v závislosti na zvoleném způsobu výroby, průběhu daného procesu, ale i na vstupních surovinách.

3.3 Půda

Půda je samostatný přírodní útvar, který je součástí geosféry, přesněji jejího abiotického systému. Vznikl z organických zbytků a z povrchových zvětralin zemské kůry (Fazekašová et Fazekaš, 2014; Mendelova univerzita v Brně, n.d.). Stavba a složení půdy je následkem působení půdotvorných faktorů (Mendelova univerzita v Brně, n.d.). Tvoří životní prostředí pro půdní organismy. Je to dynamický živý systém, který se stále vyvíjí (Ministerstvo životního prostředí, 2017). Probíhají zde důležité procesy jako přeměny energie a látek. Půda se vyznačuje svou schopností vyrovnávat se se změnami vnějších faktorů. Jedná se tedy o otevřený, dynamický a trojfázový heterogenní systém (Fazekašová et Fazekaš, 2014).

¹ BPS=bioplynová stanice

² MBÚ=mechanicko-biologická úprava odpadu

3.3.1 Struktura půdy

Organizace částic v půdě se nazývá půdní struktura. (Hillel, 2013) Struktura půdy je fyzikální vlastnost půd, která popisuje hmotnost a objem obsazených pevnými částicemi, vodou a plynem (Whalen et Sampedro, 2010).

Podle procesů podílejících se na vzniku agregátů se dělí na:

1. Elementární struktura: Částice půdy nejsou stmeleny v agregáty. V suchém stavu je zemina sypká (písky).
2. Koherentní struktura: Částice půdy jsou stmeleny do relativně pevných a souvislých útvarů. Stmelovacím pojídlem bývá např.: kyselina křemičitá, hydroxidy Al, Fe, jíly.
3. Agregátová struktura: Částice půdy jsou stmelené vlivem jílu, humusových látek a organo-minerálních sloučenin.

(Šarapatka 2014; Hillel 2013)

Půdní agregáty jsou skupina půdních částic, které k sobě vzájemně přilnou silněji, než k okolním částicím (Follett et al., 2008). Půdní hmota je složena ze dvou skupin agregátů. Agregáty přirozené povahy, ty se nazývají pedy a „umělé“ povahy tzv. hrudek, které jsou vytvářeny obděláváním půdy a jinou manipulací s půdou (Whalen et Sampedro, 2010). Struktura půdy ovlivňuje mikrobiální aktivitu, průběh infiltrace vody do půdy a odvod z ní. Tím také ovlivňuje produkci a výměnu plynů mezi půdou a atmosférou (Whalen a Sampedro 2010; Ball 2013).

Se strukturou půdy souvisí také pojem agregátní stabilita. Tento pojem se týká schopnosti půdních agregátů odolat rozkladu. Změny agregátní stability mohou sloužit jako včasné ukazatele obnovy nebo degradace půd. Agregátní stabilita může být indikátorem obsahu organických látek, biologické aktivity a koloběhu živin v půdě (USDA, 2009).

Typy struktury podle tvaru

1. Deskovitá: Tenké ploché půdní desky, které leží vodorovně. Obvykle se nacházejí v kompaktní půdě.
2. Sloupkovitá: Svislé sloupy půdy, které mají na vrcholu bílé slané povlaky, tzv. čepice. Nacházejí se v půdách suchých klimatických podmínek.
3. Prismatická: Vertikální sloupky půdy, které mohou mít délku několika centimetrů. Obvykle se nacházejí v nižších půdních horizontech.
4. Polyedrická: Nepravidelné bloky, které mají obvykle průměr 1,5 až 5 cm.

5. Kulovitá: Připomíná drobký pečiva, obvykle jsou menší než 0,5 cm v průměru. Běžně se vyskytuje v povrchových půdních horizontech, kde rostou kořeny.

(A GLOBE, 2014; Šarapatka, 2014)

V některých případech nemusí mít půda žádnou strukturu. V tom případě ji lze klasifikovat jako elementární stav nebo nevyvinutá struktura:

1. Elementární stav: Půda je rozdělena na jednotlivé částice, které nedrží pospolu.
2. Nevyvinutá struktura: Půda nemá žádnou viditelnou strukturu (př.: spraš).

(A GLOBE, 2014)

3.3.2 Funkce půdy

Půda je nepostradatelnou částí životního prostředí. Má široký rozsah funkcí. Mezi tyto funkce patří: kulturní, environmentální a užitkové (produkční).

Kulturní funkce je myšlena ve smyslu prostoru pro aktivitu lidí (sport, rekreace a další) (Ministerstvo zemědělství, 2015).

Užitkové (produkční) funkce zahrnují úlohu půdy jako základního výrobního prostředku (v zemědělství i v lesnictví), tedy jako medium pro růst rostlin (Plant and Soil Sciences eLibrary, 2017). Slouží k ukotvení zemědělských i lesních plodin v půdě, lze z ní dobývat suroviny jako je písek, štěrk a rašelina. Dále se do této funkce řadí i funkce hospodářská, tedy prostor, který slouží jako základ k výstavbě budov apod., tedy terénní a inženýrské medium (Ministerstvo zemědělství 2015; Plant and Soil Sciences eLibrary 2017).

Mezi funkcí environmentální (ekologickou) patří funkce filtrační, retenční, akumulační, pufrální, transportní, asanační a transformační. Půda je také genovou rezervou a prostředím pro mikroorganismy i makroorganismy, obecně tedy pro půdní organismy (Ministerstvo zemědělství, 2015; Plant and Soil Sciences eLibrary, 2017).

Všechny funkce půdy na sebe vzájemně navazují a jsou spolu úzce spojené. Půda jakožto část životního prostředí je zranitelnou složkou a často dochází k její degradaci.

(Ministerstvo zemědělství, 2015)

3.3.2.1 Degradace půdy

Degradace půdy je jedním ze závažných problémů současného světa, České republiky nevyjímaje. Kořenem tohoto problému je její přeceňování, pramenící z pocitu, že půda může vydržet narušení, které způsobuje lidská činnost (Whalen et Sampedro, 2010). Proces

degradace je pomalý, nicméně svými důsledky může vést k omezení až úplnému zničení cenných produkčních i mimoprodukčních funkcí půdy (Ministerstvo zemědělství, 2015).

Degradace je způsobena převážně lidskou činností. Historická a kulturní rozhodnutí lidské civilizace ohledně nakládání s pozemky vedla k současnému stavu krajiny. Tento jev byl dále podpořen růstem společnosti a vývojem mechanizace.

Převážně proto je půda v současné době náchylná k degradaci v důsledku eroze půdy, salinizace, acidifikace, zhutnění, ztráty půdní organické hmoty, znečištění organickými a anorganickými látkami (Whalen et Sampedro, 2010; Šarapatka, 2014).

3.3.3 Druhy půd

Půdní druh se určuje na základě zastoupení zrnitostních frakcí. Základní zrnitostní kategorie jsou: písek, prach, jíl (Šarapatka, 2014).

V České republice nejrozšířenější klasifikační systém je dle Nováka, který klasifikuje půdy podle procenta obsahu částic menších než 0,01 mm.

Druhy půd dle Nováka (v ČR nejrozšířenější klasifikační systém):

1. Písčité: 0-10 %
2. Hlinitopísčité: 10-20 %
3. Písčitohlinité: 20-30 %
4. Hlinité: 30-45 %
5. Jílovitohlinité: 45-60 %
6. Jílovité: 60-75 %
7. Jíl: >75 %

(Němeček et al. 2011; Šarapatka 2014)

Druhy půdy dle zpracovatelnosti (využíváno hlavně v zemědělské výrobě):

1. Lehké: písčité, hlinitopísčité
2. Střední: písčitohlinité, hlinité
3. Těžké: jílovitohlinité, jílovité, jíly

(Kozák et Němeček, 2009; Němeček et al., 2011)

3.3.4 Typy půd

Půda se dělí na půdní typy na základě určitých diagnostických horizontů, jejich řazením nebo diagnostickými znaky, název nekončí na –sol. Proti tomu referenční třídy charakterizují skupiny půd, které vystupují v klasifikačních systémech v zahraničí (převážně WRB). České

půdy s nimi korelují, pouze název končí na –sol. Tyto velké skupiny jsou určovány podle hlavních rysů jejich geneze (Šarapatka, 2014).

Referenční třídy na základě Taxonomického klasifikačního systému půd ČR:

- | | |
|-----------------|----------------|
| 1. Lesptosoly | 2. Regosoly |
| 3. Fluvisoly | 4. Vertisoly |
| 5. Černosoly | 6. Luvisoly |
| 7. Kambisoly | 8. Andosoly |
| 9. Podzoly | 10. Stagnosoly |
| 11. Glejosoly | 12. Salisoly |
| 13. Natrisoly | 14. Organosoly |
| 15. Antroposoly | |

(Němeček et al., 2011)

Do jednotlivých referenčních tříd lze zařadit půdní typy. Vzhledem k tomu, že vzorky půdy určené k této práci se řadí do referenční třídy kambisoly, potažmo typu kambizem, bude blíže specifikována pouze tato skupina půd.

Referenční skupina kambisoly se vytváří v souvrství svahovin z přemístění zvětralin a to pevných nebo zpevněných hornin. Mají široký rozsah zrnitosti, acidifikace a vyluhování. Diagnostický horizont je výrazně braunifikován, nebo je pelitický. Řadí se sem kambizem a pelozem (Němeček et al. 2011; Šarapatka 2014).

3.3.4.1 Kambizem

Tento typ je charakteristický svou přítomností tzv. kambického hnědého horizontu Bv. Horizont se nachází pod horizontem A (humózní nebo lesní horizont), pod horizontem B (kambickým horizontem) se nachází půdotvorný substrát C (Němeček et al., 2011).

Kambizemě jsou nejrozšířenějším typem půdy v ČR. Nacházejí se v různých nadmořských výškách, na základě čehož se rozdělují na kambizemě vyšších (>600 m n. m.) a nižších poloh (300-600 m n. m.). V nižších polohách bývá snížený obsah humusu, což je způsobeno vyšší mineralizací (Šarapatka, 2014). Kvalita humusu této nižší kambizemě bývá vyšší než u kambizemě ve vyšších polohách. A také sorpční komplex je většinou nasycenější. Nasycenost půdního komplexu je způsobena druhem substrátu a klimatickými podmínkami. Pro kambizemě je typická skeletnatost. Půdní reakce jsou většinou řazeny do slabě kyselých až kyselých.

Stratigrafie kambizemí: O - Ah či Ap (horizont vytvořený orbou) - Bv (kambický hnědý horizont) - B/C (přechodný horizont) - C (půdotvorný substrát) (Kozák et Němeček, 2009; Šarapatka, 2014).

3.4 Mikroorganismy v půdě

Půda obsahuje mnoho organismů, které je možno dělit na základě velikosti (Tabulka 2) z řad mikroflory, mikrofauny, mesofauny a makrofauny (Dar, 2010). Organismy, které jsou alespoň část životního cyklu vázány na půdu, se souhrnně nazývají edafon. Ten se rozděluje na fytoedafon a zooedafon (Šarapatka, 2014). Nicméně pro účely této práce bude zmiňováno pouze o mikroflóře a mikrofauně. Půdní mikroorganismy zahrnují především bakterie, houby, archea, řasy, viry a aktinomycety, které se řadí mezi mikrofloru (Dar, 2010; Whalen et Sampedro, 2010).

Skupina	Velikost	Organismy
Mikroflora	<10 µm	Bakterie, houby, řasy, aktinomycety s viry
Mikrofauna	10-100 µm	Prvoci, hlístice
Mesofauna	0,1-0,2 mm	Termiti, chvostoskoci
Makrofauna	0,2-20 mm	Roztoči, červy, pavouci, moly, stonožky,...

Tabulka 2: Řazení půdních organismů podle velikosti (Dar, 2010)

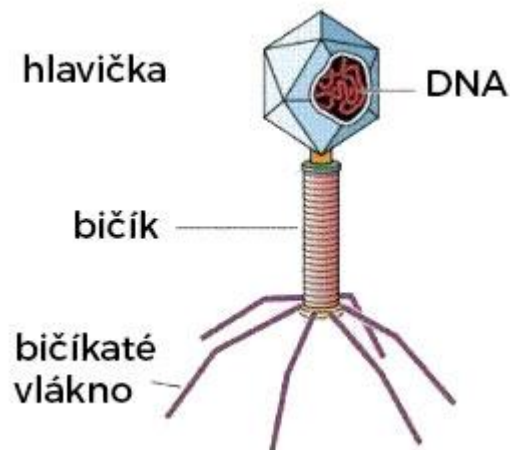
Pro srovnání dalšího dělení (zařazení, zařazování) edafonu (flory a fauny) dle velikosti, je přiložena (Příloha 1) tabulka p. Šantrůčkové (2001) v upravení p. Šarapatky (2002).

Všechny půdní mikroorganismy ovlivňují vlastnosti půdy a fungování většího ekosystému. Každý mikrob má zvláštní schopnosti, které mu umožňují přežít i v prostředí ovlivněném stresovými faktory. Obecně tyto organismy vykazují vysoký stupeň přizpůsobivosti prostředí. Primární úlohu v půdních metabolických aktivitách má mikroflora, zejména houby, aktinomycety a bakterie, ty díky svým biochemickým procesům dávají hlavní transformaci organické hmoty a pomáhají udržovat zdravý stav půdy. Mikro- a mezo-fauna postrádá aktivity enzymů, které jsou ve skupině mikroflory běžné (Dar, 2010).

Whalen a Sampedro (2010) uvádí jako nejdůležitější skupiny půdních mikroorganismů: bakterie, houby, archea a řasy, k nimž lze řadit i viry vzhledem ke své velikosti a interakci s půdními mikroorganismy.

3.4.1 Viry

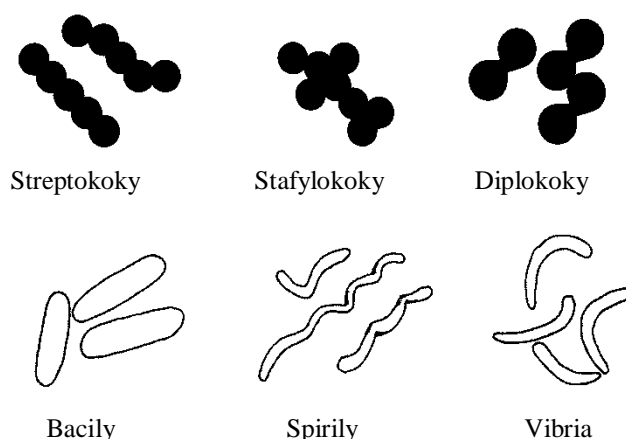
Velikost půdních virů bývá 0,02-0,3 μm (Dar, 2010). Mají acelulární strukturu, která se skládá z jádra z centrální nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) pokryté bílkoviny (Whalen et Sampedro, 2010). Částice jsou metabolicky inertní, nenesou žádné biosyntetické nebo respirační funkce (Dar, 2010). Viry nejsou aktivní mimo živý organismus, jsou to tedy inertní parazité rostlin, živočichů, hub a bakterií (Whalen et Sampedro, 2010). Některé viry jsou však schopné ve stabilní fázi přetrvávat v půdě, dokud nenarazí na příhodného živého hostitele. Ve většině případů jsou to patogeny (Dar, 2010; Whalen et Sampedro, 2010). Existují také viry, které parazitují na bakteriích, aktinomycetách, houbách, řasách atd. Na základě toho, na čem parazitují, se nazývají bakteriofágové, aktinofágové atd. (Dar, 2010). Základní struktura bakteriofága dokládá Obrázek 1.



Obrázek 1: Základní struktura bakteriofága
Dostupné z: <https://biopedia.sk/virusy-a-bakterie/bakteriofagy-pozieraci-bakterii>

3.4.2 Bakterie

Jedná se o jednobuněčné organismy, řadí se mezi nejjednodušší a nejmenší formy života. Řadí se do skupiny prvoků stejně jako viry (Dar, 2010). Velikost nebývá větší než 4-5 μm (Šarapatka, 2014). Bakterie jsou v půdě nejčastěji přítomné organismy. Tvoří až 25% celkové mikrobiální biomasy s životaschopnými populacemi (Dar, 2010). Složení bakterií v půdě může být použito jako indikátor chemických a fyzikálních charakteristik půdy (Šarapatka, 2014). Morfologie půdních bakterií je různorodá, od koků až po tyčinkové bacily a spirální formy (Obrázek 2) (Whalen et Sampedro, 2010).



Obrázek 2: Různorodost tvarů půdních bakterií (Whalen et Sampedro, 2010)

Dále lze bakterie dělit podle získávání energie na heterotrofní a autotrofní a podle prostředí, kde přežívají na aerobní a anaerobní (Šarapatka, 2014). Bližší dělení bakterií dle výživy, kterou bakterie využívají pro svůj růst, vysvětluje Tabulka 3 (Whalen et Sampedro, 2010). Bakterie se také dělí podle barvitelnosti organickými barvivy na grampozitivní (fialové zbarvení) a gramnegativní (červené zbarvení), což se nazývá Gramova reakce. Zastoupení druhů bakterií v půdě je ovlivňováno vzdušným a vodním režimem, typem organických látek a jejich přístupností, způsob využívání půdy, typem vegetace apod. (Šarapatka, 2014).

Výživová skupina	Zdroj energie	Zdroj uhlíku	Dárci elektronů	Příklady
Fotoautotrofové	Světlo	CO ₂	H ₂ S, SO ₃ ⁻	Cyanobakterie, červené a zelené sírné bakterie
Fotoheterotrofové	Světlo	Organické sloučeniny	H ₂ , S ₂ ⁻	Červení nesírné bakterie <i>Chloroflexi</i>
Chemolitoautotrofové	Anorganické sloučeniny	CO ₂	NH ₄ ⁺ , NO ₂ ⁻ , S ₂ ⁻ , Fe ₂ ⁺	<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Ferrobacillus</i>
Chemolithoheterotrofové	Organické sloučeniny	Organické sloučeniny	H ₂ O, organické sloučeniny	Většina půdních bakterií (rovněž houby a živočichové)

Tabulka 3: Výživové skupiny půdních bakterií (Whalen et Sampedro, 2010)

3.4.2.1 Aktinomyceety (Aktinobakterie)

Aktinomyceety mají stejnou velikost i strukturu jako Gram-pozitivní bakterie, které mají jednu buněčnou membránu a tlustou buněčnou stěnu z peptidoglykanových vrstev (Whalen et Sampedro, 2010). Morfologií se ovšem podobají houbám, jelikož se jejich buňky částečně nebo úplně větví a tyto rozvětvené buňky u některých rodů tvoří mycelium (Šarapatka, 2014). Na základě toho se až do nedávné doby řadily k houbám, nikoli k bakteriím (Dar, 2010).

Některé pravé aktinomycety vyskytující se hlavně v půdě se reprodukují pomocí spor. Počty aktinomycet tvoří průměrně desetinu celkového množství bakterií v půdě (Šarapatka, 2014). Nejprůzlivější podmínky pro růst aktinomycet jsou v rozsahu teploty 25-30°C a u pH 6,5-8,5. Mají schopnost odolat vysoušení (Dar, 2010). Podílejí se na rozkladných procesech organických látek, které jsou pro jiné organismy nerozložitelné (Šarapatka, 2014). Produkují tedy extracelulární hydrolytické a oxidační enzymy, kterými jsou např.: celulózy, xylázy a protézy. Tyto enzymy degradují celulózu, hemicelulózu a proteiny, které pocházejí z rostlinných zbytků (Dar, 2010). Průběh rozkladu je nejintenzivnější při vyšším pH. Čím nižší pH, tím více dominují v rozkladných procesech bakterie a houby (Šarapatka, 2014). Aktinomycety, které jsou termotolerantní vůči vysokým teplotám, hrají důležitou roli při rozkladných procesech během kompostování, kde může teplota dosáhnout až 50°C (Dar, 2010). Produkce řady aromatických látek některých aktinomycet, určuje vůni půdy a některé rody také produkují antibiotika (streptomycin) a vitaminy jako sekundární metabolity (Dar, 2010; Šarapatka, 2014).

3.4.3 Houby

Houby tvoří velice rozmanitou skupinu organismů. Nachází se v každé ekologické lokalitě (Dar, 2010). V půdě tvoří početně dominantní skupinu organismů (Whalen et Sampedro, 2010). Jsou to eukaryotické organismy, které mají složitější stavbu stélky než Aktinomycety (Whalen et Sampedro, 2010; Šarapatka, 2014). Jejich výživa je heterotrofní a to saprofytická nebo parazitická (Šarapatka, 2014).

Mikroskopická vlákna, ze kterých se stélka hub skládá, se nazývají hyfy. Skupina těchto hyf se potom nazývá mycelium (Whalen et Sampedro, 2010; Šarapatka, 2014). Velikost hyf je v průmětu od 2 do 10µm (Whalen et Sampedro, 2010). Houby rozkládají složitější organické látky za pomoci různých enzymů (Šarapatka, 2014).

Whalen a Sampedro (2010) dělí houby (Eumycota) na:

1. Zygomycota
2. Basidiomycota
3. Ascomycota
4. Deuteromycota

Šarapatka (2014) dělí houby na:

1. Myxomycota
2. Chitridiomycota
3. Oomycota
4. Eumycota

Dělení dle dle Whalena a Sampedra (2010) blíže specifikuje Tabulka 4.

Skupina	Rozlišující vlastnosti	Nepohlavní rozmnožování	Pohlavní rozmnožování	Příklady
Zygomycota (Houby spájivé)	Mnohobuněčné, coenocytická mycelia	Nepohlavní spory vyvinuté ve sporangiích na špičkách vzdušných hyf (výtrusy z výtrusnic)	Pohlavní spory (zygospor) jsou perzistentní v životním prostředí	Mykorhizní houby a mukorovité (např: <i>Mucor</i>)
Basidiomycota (Houby stopkovýtrusné)	Mnohobuněčná neindukovaná mycelia	Obecně chybí	Pohlavní spory (bazidiospory) se nacházejí na struku špičky hyf	Hnědá a bílá hniloba (<i>Fomes</i> , <i>Polysporus</i> , ...)
Ascomycota (Houby vřeckovýtrusné)	Jednobuněčná a mnohobuněčná s dělicí přehrádkou v hyfě	Pučení, konidiofory	Asko-formy na specializovaných strukturách	Sliznaté formy hub (<i>Physarum</i> , <i>Dictyostelium</i> , ...)
Deuteromycota (Houby nedokonalé)	Jednobuněčná nebo mnohobuněčná, dělicí přehrádka v hyfě	Pučení	Chybí	Houby nedokonalé (<i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , ...)

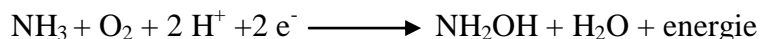
Tabulka 4: Rozdělení půdních hub

3.5 Nitrifikace

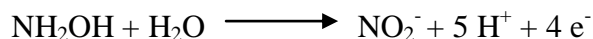
Nitrifikace je definována jako přeměna nejvíce redukované formy dusíku (NH_3) na nejvíce oxidovanou formu (NO_3^-). Tento proces, proces nitrifikace je úzce spojen s dalšími procesy, kterými jsou amonifikace a ztráta amoniaku (Cáceres et al., 2018).

Během nitrifikace dochází ke třem klíčovým reakcím. Tyto reakce se nazývají: oxidace amoniaku, oxidace hydroxylaminu a oxidace dusitanu na dusičnan. Reakce je možno vidět v Rovnice 1 (Whalen et Sampedro, 2010).

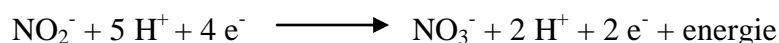
Reakce č. 1: Oxidace amoniaku



Reakce č. 2: Oxidace hydroxylaminu



Reakce č. 3: Oxidace dusitanu na dusičnan



Rovnice 1: Základní reakce během procesu nitrifikace

Tyto biochemické reakce jsou zprostředkovány chemo-autotrofními mikroorganismy, které získávají energii z reakce pro stavbu buněčných komponent (Whalen et Sampedro, 2010). Chemo-autotrofové jsou organismy, které získávají uhlík z oxidu uhličitého a vytvářejí si z něj stavební látky. energii potřebnou k syntéze těchto stavebních látek získávají z látek anorganických (Prescott et al., 1998). Mikroorganismy účastníci se nitrifikace se dělí do dvou skupin: oxidující amoniak a nitrifikátory.

Bakterie oxidující amoniak převádí amoniak na dusitan. Neznámější bakterie této skupiny se nazývá *Nitrosomonas*.

Nitrifikátory mění dusitan na dusičnan. Typickým zástupcem této skupiny je *Nitrobacter* (Whalen et Sampedro, 2010). Do obou skupin lze samozřejmě zařadit mnohem více mikroorganismů viz. Tabulka 5.

Příklady mikroorganismů katalyzujících oxidaci amoniaku/oxidaci hydroxylaminu		Příklady mikroorganismů katalyzujících oxidaci dusitanů	
Autotrofické bakterie		Autotrofické bakterie	
<i>Nitrosomonas europaea</i>	Obligátní chemoautotrof	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	Obligátní chemoautotrof
<i>Nitrosococcus nitrosus</i>	Obligátní chemoautotrof	<i>Nitrospina gracilis</i>	Obligátní chemoautotrof
<i>Nitrosolobus multiformis</i>	Obligátní chemoautotrof	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Obligátní chemoautotrof
<i>Nitrosospira briensis</i>	Obligátní chemoautotrof	<i>Nitrosospira marina</i>	Obligátní chemoautotrof
<i>Nitrosovibrio tenuis</i>	Obligátní chemoautotrof	Heterotrofické bakterie	
Archea		<i>Alcaligenes spp.</i>	Fakultativní aerob
<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	Chemolito-autotrof	<i>Arthrobacter spp.</i>	Obligátní aerob
<i>Crenarchaeota</i> (neidentifikované)	_____	<i>Bacillus badius</i>	
Heterotrofické bakterie		<i>Burkholderia cepacia</i>	
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Fakultativní aerob	Heterotrofické houby	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Obligátní aerob	<i>Aspergillus wentii</i>	Obligátní aerob s heterotrofním metabolismem
<i>Pseudomonas putida</i>	Obligátní aerob	<i>Penicillium spp.</i>	Obligátní aerob s heterotrofním metabolismem

Tabulka 5: Příklady mikroorganismů katalyzujících oxidaci amoniaku/oxidaci hydroxylaminu/oxidaci dusitanů (Adaptováno z: Myrold 1998; Hayatsu et al. 2008)

3.6 Enzymy v půdě

V půdě se nachází velké množství enzymů. Patří mezi ně např.: hydrolázy, oxidoreduktázy, isomerázy apod. (Gu et al., 2009). Všechny půdní enzymy jsou důležité pro katalyzování velkého množství reakcí, které jsou nezbytné pro životní procesy mikroorganismů v půdě, cyklování živin, rozklad organických zbytků, tvorbu organické hmoty a strukturu půdy (Dahm et al., 2011).

Vzhledem k povaze páce se kapitola zabývá primárně enzymy dehydrogenáz.

Půdní dehydrogenázy patří mezi hlavní zástupce z třídy enzymů oxidoreduktáz (Gu et al., 2009). Jako ukazatel celkové mikrobiální aktivity se používají právě dehydrogenázy, které se i řadí mezi jedny z nejdůležitějších půdních enzymů (Gu et al., 2009; Salazar et al., 2011).

Enzymy dehydrogenázy jsou většinou produkovány anaerobními mikroorganismy, přestože mohou využít kyslík a jiné elektronové akceptory. Půdní aktivita dehydrogenáz se tedy silně zvyšuje za anaerobních podmínek (Wolińska et Stępniewska, 2012). Aktivita dehydrogenáz se také zvyšuje s rostoucím množstvím populací mikrobů, které se mění, mimo jiné, na základě změn živin v půdě. Organické materiály obsahující zbytky plodin, živočišné výkaly apod., které se aplikují do půdy, aktivitu mikroorganismů a půdní biomasu obvykle zvyšují (Subhani et al., 2001).

Mezi faktory, které pozitivně ovlivňují aktivitu enzymů dehydrogenáz dle Wolińskiej a Stępniewské (2012) patří: vlhkost půdy, provzdušnění půdy, obsah organické hmoty, pH půdy, teplota, roční období.

Faktory inhibující aktivitu enzymů dehydrogenáz dle Wolińskiej a Stępniewské (2012) patří: hloubka půdního profilu, přídavky hnojiv a pesticidů, přítomnost těžkých kovů.

4 Praktická část

4.1 Pokusné pole

Měřené vzorky půdy byly odebrány z pokusného pole v obci Krňany v obecní části Třebsín. Obecní část Třebsín se nachází v okrese Benešov (Obec Krňany, 2012). Poloha Třebsína je vidět na Obrázek 3.



Obrázek 3: Umístění obecní části Třebsín.
Dostupné z: <https://www.google.com/maps/>

Pokusné pole patří k pozemkům Výzkumného ústavu meliorací a ochrany půdy (VÚMOP). Dne 1. 6. 2015 byl na tomto pozemku založen pokus, jehož cílem je ohodnotit, jaký vliv má biouhel na půdu na sklonitém pozemku. Biouhel byl aplikován ručně na plochu o velikosti 3 x 30 m a to v množství 4 t/m². Zapravení biouhlu do půdy proběhlo rotačními branami (Huislová et Čechmánková, 2015).

Půda v dané lokalitě byla zařazena do půdního typu kambizemě. Pokusné pole bylo rozčleněno na 4 samostatné pokusné parcely (pracovně nazvaná - Biouhel, Úhor, Hnůj, Konvence), kde byly pěstovány stejné plodiny - kukuřice (mimo pokusné parcely Úhor, kde nebylo pěstováno nic), ale půda byla rozdílně hnojena. Do půdy pokusné parcely Biouhel, byl přidáván biouhel. Do půdy pokusné parcely Úhor nebylo přidáváno nic, byl nechán tzv.

ladem. Půda pokusné parcely Hnůj byla obohacována hnojem a půda pokusné parcely Konvence byla hnojena minerálními hnojivy. (Huislová et Čechmánková, 2015)

Z každé pokusné parcely byly v průběhu roku čtyřikrát odebírány vzorky půdy. První odběr byl proveden 1. 5. 2017, druhý 30. 5. 2017, třetí 18. 7. 2017 a poslední, čtvrtý 8. 9. 2017 (v grafech jsou pro zjednodušení uvedena pouze čísla odběru). Vždy bylo odebíráno na několika místech, aby došlo k promísení půdy a nedošlo k zavádějícím výsledkům.

Během měření byl pozorován vliv různého způsobu hnojení na dvě vybrané mikrobiální charakteristiky (aktivita enzymů dehydrogenázy a nitrifikace). Všechny naměřené výsledky jsou uvedeny v kapitole Výsledky.

Odběry byly prováděny pomocí sondýrky Eijkelkamp Edelmanovým vrtákem do hloubky zhruba 20 cm. Odebrané vzorky půdy byly promíchány, homogenizovány, uloženy do čistých uzavíratelných nádob a popsány, následně ponechány 3-4 týdny v lednici (4°C) stabilizovat.

4.2 Metodika měření aktivity enzymů dehydrogenázy

Měření bylo prováděno dle upravené metodiky Thalmanna (1968).

Do pěti testovacích lahvíček bylo naváženo po 5 g testované půdy z každého vzorku (Biouhel, Úhor, Hnůj, Konvence), dohromady tedy 20 lahvíček. Do prvních tří z nich byl k půdě přidán substrátový roztok (TTC) po 5 ml a do zbylých dvou lahvíček tris pufr, také po 5 ml (příprava jednotlivých roztoků popsána níže). Lahvičky s čistým tris pufrem byly použity jako kontrola (blank). Lahvičky byly uzavřeny a uloženy na 16 hodin do termostatu ($29,5 \pm 1$ °C).

Po 16 hodinách bylo k jednotlivým vzorkům přidáno 25 ml acetonu. Aceton byl přidán proto, aby došlo k uvolnění triphenyl formazánu (TPF). Po přidání acetonu byly lahvičky znovu uzavřeny a dány na 2 hodiny třepat do termostatu. Práce s TPF a TTC byla prováděna za šera, protože jsou obě látky citlivé na světlo.

Během třepání byly vytvořeny roztoky pro kalibrační řadu, kde roztoky obsahovaly TPF o koncentraci 0 µg, 100 µg, 200 µg, 500 µg a 1000 µg a následně byly vzorky kalibrační řady spektrofotometricky proměřeny při vlnové délce 546 nm (příprava roztoků kalibrační řady popsána níže).

Po dvou hodinách byly vzorky slity přes skládaný filtrační papír do kádinek. Vzorky byly spektrofotometricky proměřeny při stejné vlnové délce jako kalibrační řada. Již ze zbarvení vzorků bylo možno odvodit, zdali bylo obsaženo velké množství rozpuštěného TPF či nikoliv. Čím více byl roztok zbarven do červena, tím vyšší byla aktivita enzymů, tedy i větší množství

extrahovaného TPF. Toto tvrzení bylo potvrzeno proměření ve spektrofotometru. Vyhodnocení proběhlo graficky a výpočtem.

4.2.1 Příprava roztoků

Tris pufr

Do kádinky bylo naváženo 12,11 g tris (hydroxymethyl)aminometanu, který byl následně rozmíchán v 600 ml destilované vody. Roztok byl promíchán a zředěn 1M kyselinou chlorovodíkovou na pH kolem 7,8. Kontrolu pH lze provádět lakmusovým papírkem nebo pH metrem. Po upravení pH byl roztok zředěn na objem 1l destilovanou vodou.

Substrátový roztok

Potřebné množství 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridu bylo rozpouštěno v tris pufru (optimální koncentrace v rozmezí 0,1-2 %).

Standard

Množství 0,5 g triphenyl formazánu bylo rozpuštěno v 50 ml acetonu a protřepáno.

Pracovní standard

Bylo napipetováno 0,5 ml standardu a doplněno na 50 ml acetonem. Dobře promícháno.

Kalibrační roztoky určené k měření

Do 5 kádinek bylo nepipetováno 0 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml a 10 ml pracovního standardu. Kádinky byly doplněny acetonem do množství 30 ml. Jak bylo výše zmíněno, kádinky obsahovaly množství rozpuštěného TPF o koncentraci 0 µg, 100 µg, 200 µg, 500 µg a 1000 µg. Všechny roztoky byly proměřeny ve spektrofotometru. Následně vytvořen graf kalibrační řady.

4.2.2 Výpočet stanovení množství TPF ve filtrátech

Rovnice 2: Stanovení TPF ve filtrátech pomocí kalibrační křivky:

$$\left(\frac{(S - C) \cdot 100}{5 \cdot \% \text{ dm}} \right) : 16 = \mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm} \cdot \text{h}^{-1}$$

S	průměr vzorků ($\mu\text{g TPF}$)
C	kontrola ($\mu\text{g TPF}$)
5	počáteční váha půdy (g)
$100 \cdot \%^{-1} \text{ dm}$	faktor pro sušinu půdy

4.3 Metodika měření nitrifikace

Každý odebraný vzorek (Biouhel, Úhor, Hnůj, Konvence) byl pro každý typ testu navážen ve 3 opakování po 10 g do uzavíratelných sklenic. Byly prováděny 3 typy testů, a to měření aktuálního množství dusičnanů (aktuální nitrifikace - A), měření množství dusičnanů po 8 denní inkubaci (inkubovaná nitrifikace - I) a měření potenciálního obsahu dusičnanů po 8 denní inkubaci (potenciální nitrifikace - P).

Aktuální obsah dusičnanů (aktuální nitrifikace – A):

K navážce bylo přidáno 50 ml 1 % roztoku síranu draselného. Po přidání byly vzorky třepány po dobu 30 minut, poté byly ponechány v klidu, aby došlo k usazení půdního vzorku na dně sklenice. Dále byly vzorky filtrovány přes skládaný filtrační papír do PVC lahvíček.

Dusičnany po 8 denní inkubaci (inkubovaná nitrifikace – I):

K navážce byl přidán 1 ml destilované vody, sklenice zavíčkované a po 8 dní inkubovány v komorovém termostatu. Po inkubaci bylo přilito 50 ml 1 % roztoku síranu draselného, protřepáno, ponecháno sedimentovat a přes skládaný filtrační papír filtrováno do PVC lahvíček.

Potenciální obsah dusičnanů (potenciální nitrifikace – P):

K naváženému množství vzorku půdy byl rovnoměrně přidán 1 ml roztoku síranu amonného a ponecháno 8 dní inkubovat v komorovém termostatu. Poté zalito 50 ml 1 % roztoku síranu draselného, protřepáno, necháno sedimentovat a přes skládaný filtrační papír filtrováno do PVC lahvíček.

Všechny filtráty byly posléze měřeny iontově selektivní elektrodou. Před samotným měřením filtrátů byly naměřeny hodnoty kalibračních roztoků (ředění roztoků popsáno níže).

Z kalibračních roztoků i filtrátů bylo odměřeno 25 ml do kádinek. Do každé kádinky byly přikápnuty 2 ml roztoku síranu stříbrného jako pufru (7, 775 g / 1 l roztoku).

Po proměření kalibrační křivky se přistoupilo k měření vlastních filtrátů. Kalibrační roztoky bylo potřeba proměřit před každou sadou (A, I, P). Z přístroje byl odečítán potenciál v mV a to v závislosti na koncentraci nitrátů na mV-metru. Vyhodnocení proběhlo graficky a výpočtem jako počítačové zpracování.

4.3.1 Kalibrační řada

Kalibrační řada byla míchána za pomoci standardů (KNO₃) od 0,1 do 100 mg N / 500 ml. Roztok standardu byl napipetován a doplněn 1 % roztokem síranu draselného na objem 25 ml. Ředění standardu probíhalo dle Tabulka 6.

mg N / 500 ml	0,1	1	10	50	100
Pipetovaný roztoku v μ l	5	50	500	2500	5000

Tabulka 6: Ředění standardu pro kalibrační řadu

4.3.2 Chemikálie

Pro měření byly použity tyto chemikálie: roztok síranu amonného (1,8047 g / 250 ml, 1 mg N v 1 ml roztoku), destilovaná voda, 1 % roztok síranu draselného (10 g K₂SO₄ / 1 l destilované vody), roztok síranu amonného (zásobní roztok ředěn v poměru 1:1) a síran stříbrný.

4.3.3 Výpočet

Rovnice 3: Výpočet kalibrační řady:

$$\ln y = Bx \ln A$$

$$y = A \cdot e^{Bx}$$

A, B	konstanty rovnice
x	mg N / 500 ml v kalibračním roztoku
y	naměřené hodnoty kalibračních roztoků (mV)

Rovnice 4: Přepočet na mg N - NO₃⁻ / 100 g suché zeminy:

$$N = \left(\frac{C}{S}\right) \cdot 100$$

C koncentrace N – NO₃⁻ ve 100 g čerstvé zeminy v mg
S sušina (%)

4.4 Výsledky

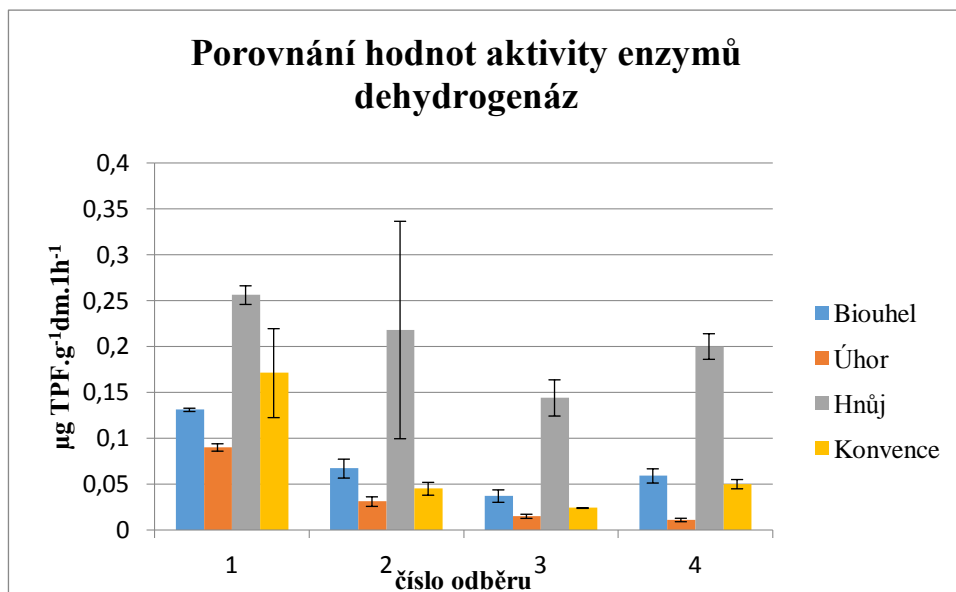
K měření aktivity enzymů dehydrogenázy byl používán spektrofotometr. Výsledky byly zaznamenávány a následně zpracovány v programu MS Excel, kde byly provedeny výpočty a vytvořeny grafy.

K měření všech druhů nitrifikace byla použita iontově selektivní elektroda. Výstupy ze zaznamenaných hodnot byly zpracovány též v programu MS Excel (výpočty i grafy).

Výchozí tabulky ke grafům jsou k dispozici v Příloze.

4.4.1 Aktivita enzymů dehydrogenázy

Měření bylo vždy prováděno ve třech opakováních pro každý odběr. Tato opakování byla průměrována a následně vytvořeny tabulky, z nichž vychází grafy. K potřebným výpočtům byla využita rovnice z kapitoly Výpočet množství TPF ve filtrátech. Do této rovnice bylo použito hodnot zastoupení sušiny. Tabulka k těmto hodnotám již přepočtena na procenta se nachází v kapitole Sušina. Výsledné hodnoty měření aktivity enzymů dehydrogenázy byly přepočteny na $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \text{dm} \cdot \text{1h}^{-1}$.



Graf 1: Porovnání hodnot aktivity enzymů dehydrogenázy

Z Graf 1 je patrné, že hodnoty uvolněného TPF byly v průběhu roku značně rozkolísány.

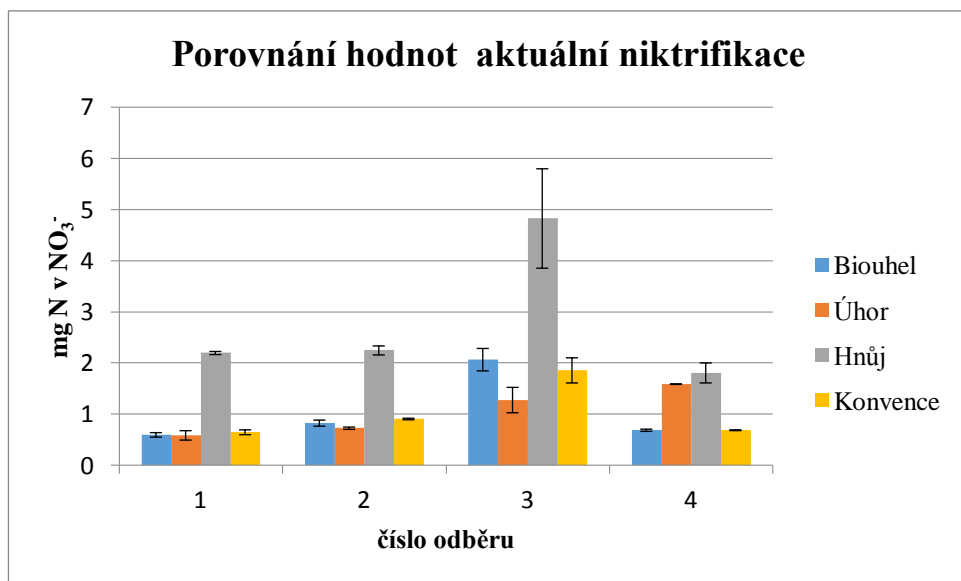
Vzorky z pokusné parcely Hnůj měly naměřeny nejvyšší hodnoty - v průměru všech měření $0,205 \pm 0,040 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{1h}^{-1}$. Nejvyšší hodnota byla naměřena u prvního odběru - $0,256 \pm 0,010 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{1h}^{-1}$.

Naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny u pokusné parcely Úhor, kde průměr všech odběrů činil $0,037 \pm 0,032 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{1h}^{-1}$. Naměřené hodnoty měly u Úhoru sestupný charakter, tedy u prvního odběru bylo naměřeno nejvíce uvolněného TPF - $0,090 \pm 0,004 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{1h}^{-1}$ a nejméně u čtvrtého odběru - $0,011 \pm 0,002 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{1h}^{-1}$.

U Biouhlu byly naměřeny obdobné hodnoty jako u Konvence. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u prvního odběru - $0,131 \pm 0,002 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{1h}^{-1}$, kde u Konvence bylo dosaženo hodnot $0,171 \pm 0,048 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{1h}^{-1}$. Jak Biouhel, tak Konvence měly naměřeny nejnižší hodnoty u třetího odběru. V průměru roku bylo u pokusné parcely Biouhlu dosaženo hodnot - $0,074 \pm 0,035 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{1h}^{-1}$. U pokusné parcely Konvence byl zaznamenán průměr ze všech odběrů zanedbatelně nižší $0,073 \pm 0,058 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{1h}^{-1}$.

4.4.2 Nitrifikace

4.4.2.1 Aktuální nitrifikace



Graf 2: Porovnání hodnot aktuální nitrifikace

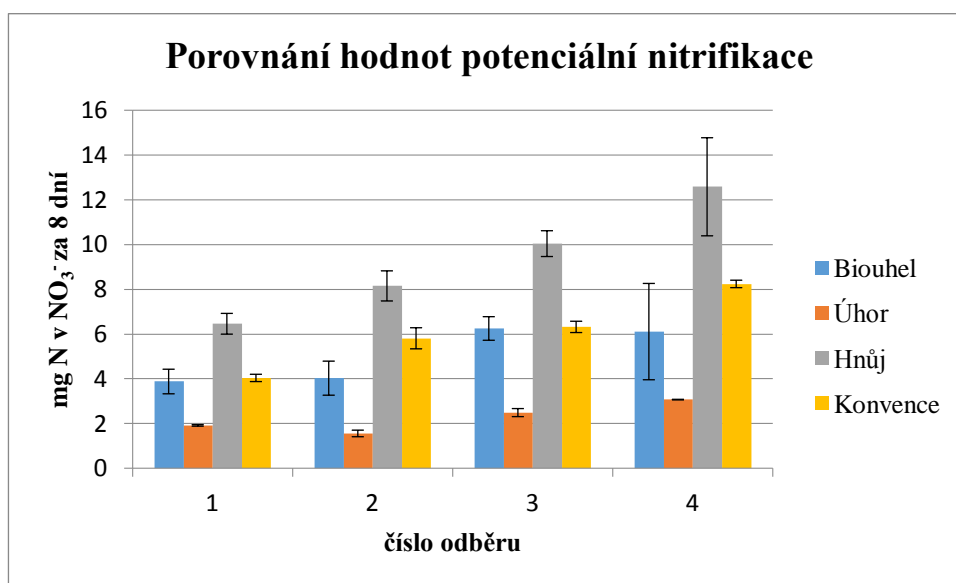
Nejvyšší hodnoty aktuálního obsahu dusičnanů (aktuální nitrifikace), byly naměřeny u pokusné parcely Hnůj. Zde bylo dosaženo nejvyšších hodnot u třetího měření: $4,83 \pm 0,97$ mg N-NO₃⁻. Naopak nejnižších hodnot bylo dosaženo u čtvrtého měření: $1,81 \pm 0,20$ mg N-NO₃⁻. Průměr ze všech odběrů byl spočítán na $2,77 \pm 1,20$ mg N-NO₃⁻.

U pokusných parcel Biouhel, Úhor a Konvence bylo dosaženo srovnatelných výsledků. Nicméně nejnižší hodnoty byly zaznamenány u pokusné parcely Úhor. Zde byl naměřen průměr ze všech odběrů $1,05 \pm 0,41$ mg N-NO₃⁻. Nejnižší naměřené hodnoty byly zjištěny u prvního odběru: $0,59 \pm 0,09$ mg N-NO₃⁻, nejvyšší u odběru čtvrtého: $1,59 \pm 0,01$ mg N-NO₃⁻.

Na pokusné parcele Biouhel byly nejvyšší hodnoty naměřeny při třetím odběru: $2,07 \pm 0,22$ mg N-NO₃⁻ a nejnižší u prvního odběru: $0,59 \pm 0,09$ mg N-NO₃⁻. Průměr všech odběrů pro Biouhel tak činil $1,05 \pm 0,60$ mg N-NO₃⁻.

U Konvence, stejně jako u Biouhlu a Hnoje bylo dosaženo nejvyšších výsledků ve třetím odběru: $1,86 \pm 0,25$ mg N-NO₃⁻. Naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny v odběru prvním: $0,65 \pm 0,05$ mg N-NO₃⁻.

4.4.2.2 Potenciální nitrifikace



Graf 3: Porovnání hodnot potenciální nitrifikace

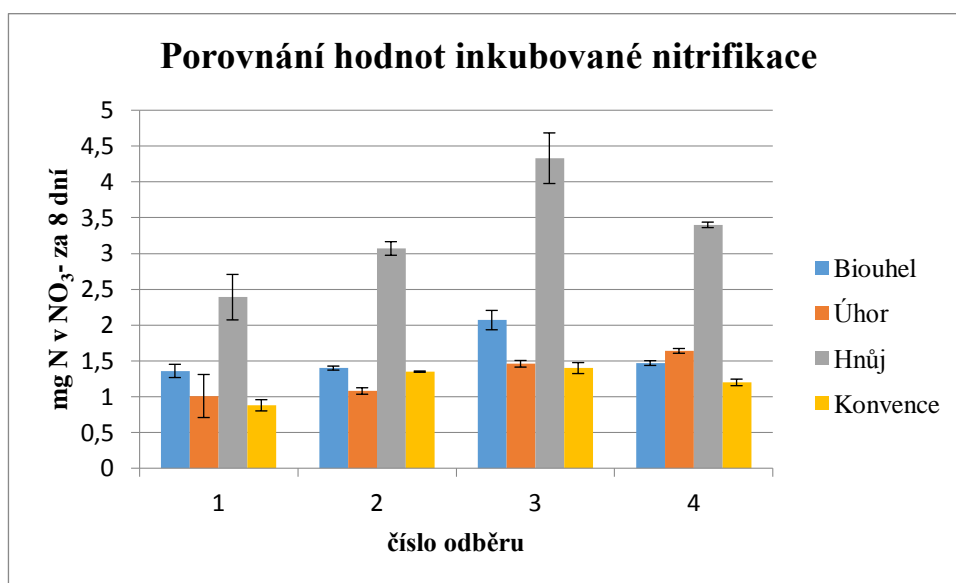
Po dodaném NH_4^+ bylo nejvyšších hodnot dosaženo opět u pokusné parcely Hnůj. Z Graf 3 je patrné, že Hnůj měl vzestupnou tendenci. Nejvyšších hodnot bylo naměřeno u čtvrtého odběru: $12,58 \pm 2,19$ mg N v NO_3^- za 8 dní a nejnižších u prvního odběru: $6,46 \pm 0,46$ mg N v NO_3^- za 8 dní.

U pokusné parcely Biouhel byly naměřeny poměrně vysoké hodnoty u všech odběrů. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u třetího odběru: $6,25 \pm 0,53$ mg N v NO_3^- za 8 dní a nejnižší u odběru prvního: $6,46 \pm 0,46$ mg N v NO_3^- za 8 dní.

U Konvence podobně jako Hnoje byl zaznamenán vzestupný charakter v průřezu všech odběrů. Nejnižších hodnot bylo dosaženo u prvního odběru: $4,04 \pm 0,16$ mg N v NO_3^- za 8 dní a nejvyšších u odběru čtvrtého: $8,24 \pm 0,17$ mg N v NO_3^- za 8 dní.

U pokusné parcely Úhor byly nejnižší hodnoty naměřeny u druhého odběru: $1,56 \pm 0,15$ mg N v NO_3^- za 8 dní a nejvyšší u čtvrtého odběru: $3,07 \pm 0,01$ mg N v NO_3^- za 8 dní. Průměr všech odběrů byl spočítán takto: $2,26 \pm 0,57$ mg N v NO_3^- za 8 dní.

4.4.2.3 Inkubovaná nitrifikace



Graf 4: Porovnání hodnot inkubované nitrifikace

Na Graf 4 je patrné, že i u inkubované nitrifikace bylo nejvyšších hodnot dosaženo u Hnoje. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u třetího odběru: $4,33 \pm 0,35$ mg N v NO_3^- za 8 dní a nejnižší u prvního odběru: $2,39 \pm 0,32$ mg N v NO_3^- za 8 dní.

Výsledky Úhoru a Konvence byly poměrně vyrovnané. U Konvence bylo dosaženo nejvyšších výsledků ve třetím odběru: $2,07 \pm 0,14$ mg N v NO_3^- za 8 dní u Úhoru ve čtvrtém: $1,64 \pm 0,03$ mg N v NO_3^- za 8 dní. Nejnižší hodnoty u obou pokusných parcel (Konvence, Úhor) byly naměřeny u prvního měření.

U Biouhlu bylo nejvyšších výsledků dosaženo u třetího odběru: $2,07 \pm 0,14$ mg N v NO_3^- za 8 dní. Naopak nejnižších hodnot bylo dosaženo u prvního odběru: $1,36 \pm 0,09$ mg N v NO_3^- za 8 dní.

4.4.3 Sušina

K potřebným výpočtům byly použity hodnoty sušiny z Tabulka 7.

	1. odběr [%]	2. odběr [%]	3. odběr [%]	4. odběr [%]	Průměr všech odběrů [%]
Biouhel	82,81	85,77	85,85	85,41	84,96
Úhor	82,89	87,76	87,41	85,99	86,01
Hnůj	79,45	80,59	83,20	82,88	81,53
Konvence	82,72	79,32	86,33	85,85	83,56
Průměr za odběr [%]	81,97	83,36	85,70	85,03	

Tabulka 7: Množství sušiny v %

Z tabulky je patrné, že nejvyšší zastoupení sušiny, tedy nejvíce suchá půda byla naměřena na pokusném poli při třetím odběru, kdy průměrná hodnota činila 85,70 % a nejnižší podíl sušiny, tedy nejvíce vlhká půda byla zjištěna při prvním odběru 81,97 %.

Co se týče hodnot jednotlivých pokusných parcel, nejnižší vlhkosti bylo dosaženo u Úhoru – 86,01 %. Nejvyšší vlhkost byla zaznamenána u Hnoje 81,53 %.

4.4.4 Půdní reakce

V rámci pokusu byly také na Katedře pedologie a ochrany půd změřeny hodnoty půdních reakcí: výměnná reakce (pH_{KCl}) a aktivní reakce ($\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$). K měření byl využit pH-metr. Hodnoty pH byly změřeny u dvou odběrů: 1. 5. 2017 (Tabulka 8) a 30. 5. 2017 (Tabulka 9). K vyhodnocení byla použita Tabulka 10, která byla převzata z Vyhlášky č. 275/1998 Sb. Ministerstva zemědělství.

1. 5. 2017	$\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$	Hodnocení reakce	pH_{KCl}	Hodnocení reakce
Biouhel	6,80	Slabě kyselá	6,37	Slabě kyselá
Úhor	5,72	Kyselá	4,64	Kyselá
Hnůj	7,27	Slabě alkalická	6,70	Neutrální
Konvence	7,56	Slabě alkalická	6,86	Neutrální

Tabulka 8: Výsledky půdních reakcí - 1. 5. 2017

30.5.2017	$\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$	Hodnocení reakce	pH_{KCl}	Hodnocení reakce
Biouhel	7,06	Neutrální	6,47	Slabě kyselá
Úhor	5,53	Kyselá	4,73	Kyselá
Hnůj	7,55	Slabě alkalická	6,76	Neutrální
Konvence	7,77	Slabě alkalická	6,85	Neutrální

Tabulka 9: Výsledky půdních reakcí - 30. 5. 2017

Hodnocení	$\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$	Hodnocení	pH_{KCl}
Silně kyselá	< 4,9	Silně kyselá	< 4,5
Kyselá	4,9 – 5,9	Kyselá	4,5 – 5,5
Slabě kyselá	5,9 – 6,9	Slabě kyselá	5,5 – 6,5
Neutrální	6,9 – 7,1	Neutrální	6,5 – 7,2
Slabě alkalická	7,1 – 8,0	Alkalická	> 7,2
Alkalická	8,0 – 9,4		
Silně alkalická	> 9,4		

Tabulka 10: Vyhodnocovací tabulka půdních reakcí

Z tabulek je patrné, že během měření z 1. 5. 2017 byla u výměnné reakce nejkyselější půda na pokusné parcele Úhor (kyselá), Biouhel vykazoval pouze slabě kyselou. Nejkyselější aktivní půdní reakce byla naměřena opět u Úhoru (kyselá), Biouhel dosahoval slabě kyselých hodnot. U Hnoje a Konvence byly naměřeny hodnoty neutrální u výměnné reakce a u půdní reakce aktivní slabě alkalická.

Během druhého měření ze dne 30. 5. 2017 byl v obou případech (aktivní i výměnná reakce) naměřeny nejkyselější hodnoty u pokusné parcely Úhor. Biouhel měl hodnoty u výměnné reakce slabě kyselých a u aktivní neutrální. Výsledky Hnoje a Konvence byly u výměnné půdní reakce opět zařazeny do kategorie neutrální a u aktivní půdní reakce do kategorie slabě alkalické.

4.5 Diskuze

4.5.1 Aktivita enzymů dehydrogenázy

Aktivita enzymů dehydrogenáz po přidavku biouhlu měla v průřezu všech odběrů klesající tendenci vyjma posledního odběru, který proběhl v září. Tento jev mohl být způsoben vyšší teplotou při posledním odběru, než při odběru červencovém. Podle Wolińské a Stępniewské (2012) se vzrůstající teplotou dochází i ke zvýšené rychlosti katalýzy enzymů a to až do nepříznivé teploty (cca 70 °C), pak je enzym denaturován a tedy se jeho aktivita snižuje. Dále enzymy dehydrogenázy patří mezi enzymy, které vykazují velké kolísání v aktivitě, které je způsobeno sezonou roku/ročním obdobím.

Mimo jiné důležitou roli hraje také provlhčení půdy, zdali přšlo či nikoli. Se vzrůstající vlhkostí se zvyšuje i aktivita enzymů (Kumar et al., 2013). Měřením obsahu sušiny (Tabulka 7) bylo zjištěno, že nejvlhčí půda byla v průměru všech odběrů u Hnoje. Výsledky aktivity vykazuje jako nejvyšší právě Hnůj.

Také pH ovlivňuje aktivitu enzymů, které v daném období mohlo kolísat vlivem např.: smyvů z okolního terénu během deště apod.

Vliv pH má vliv na hladinu půdních enzymů ve třech různých úrovních:

- Změní trojrozměrný tvar enzymu.
- Změní iontové formy aktivních míst na enzymu. Ty posléze ovlivní rychlost enzymatické reakce, což znamená celou aktivitu enzymů.
- Ovlivní afinitu substrátu k enzymu.

Neutrální pH je pro aktivitu enzymů nejideálnější.

(Shuler et al., 2017)

Na základě měření, která proběhla na Katedře pedologie a ochrany půd, je patrné, že v průběhu prvních dvou odběrů pH nekolísalo. Vzhledem k tomu, že toto měření proběhlo pouze v měsíci květnu, nelze vyloučit případné změny pH v dalších měsících.

Výsledek, že Úhor nikterak nepřispívá aktivitě enzymů a přidavek hnoje naopak silně ovlivňuje aktivitu enzymů dehydrogenázy, není překvapivý. Měřením se pouze potvrdil předpoklad, který je obecně znám.

Přidáním biouhlu do půdy bylo dosaženo vyšších hodnot než u Úhoru, ale dosahuje srovnatelných výsledků s konvečními postupy. Ovšem nedosahuje takových výsledků jako hnojení organickými hnojivy, což lze vidět na grafech s výsledky, kdy Hnůj dosahoval vyšších hodnot než biouhel.

4.5.2 Nitrifikace

Nitrifikace je procesem, který je velice citlivý na podmínky prostředí. Mezi různé faktory, které ji ovlivňují, patří převážně: vlhkost půdy, aerace, druh půdní hmoty, teplota a pH (Sahrawat, 2008). Také existují biologické i chemické substráty, které ovlivňují aktivitu nitrifikačních bakterií (Subbarao et al., 2009).

Porovnáním grafů je vidět, že aktuální nitrifikace je nejnižší ze všech způsobů měření. Tato nitrifikace určuje obsah nitrátů v daný čas odběru a slouží k porovnání hodnot s potenciální nitrifikací a inkubovanou kontrolou (inkubovanou nitrifikací), proto byl tento výsledek očekávaný. Nejvyšších hodnot naopak dosahuje nitrifikace potenciální. Ta dokládá, jak jsou nitrifikační bakterie schopny reagovat na dodatečný přísun NH_4^+ , který byl přidán v podobě $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Výsledky ukazují, že nitrifikační bakterie na přísun zareagovaly. Tedy nitrifikační bakterie byly aktivní a nedošlo k zastavení jejich metabolických funkcí vlivem např.: nepříznivého pH, teploty a nevhodnými substráty v půdě.

Na grafech s výsledky je patrné, že nejvyšších hodnot dosahoval hnůj. Nitrifikace byla nejvyšší z důvodu vyššího obsahu snadno rozložitelných organických látek, což podporuje vyšší mineralizaci dusíku v půdě a vyšší množství těchto mikroorganismů. Biouhel obsahuje organický uhlík v obtížněji rozložitelné formě. Nitrifikace u půdy s obsahem biouhlu byla tedy nižší než u přídatku hnoje, a nebyla vyšší než u Konvence.

Přídavek biouhlu do půdy má vliv na rychlost nitrifikace a to zejména na kyselějších půdách, kde pH neutralizuje (Clough et al., 2013). Nitrifikace v kyselých půdách totiž probíhá jen velmi málo (Li et al., 2018). Vzhledem k obecně vysoké nitrifikaci v zemědělských ekosystémech, kde často dochází k dlouhodobé kultivaci a hnojení, není efekt biouhlu tolik patrný, jako u např.: u lesních ekosystémů, které bývají i kyselější (DeLuca et al., 2006; Zhao et al., 2014). Porovnáním Biouhlu s Konvencí není rozdíl vlivu zásadně dynamický, oba způsoby vykazují pozitivní vliv na aktivitu nitrifikačních bakterií s lehkou převahou vlivu biouhlu.

Ve všech případech nejvyšší přeměny dusíku byly patrné během třetího a čtvrtého odběru vyjma aktuální nitrifikace. Tento jev mohl být způsoben příznivými podmínkami teploty a vlhkostí v daném období.

Některé chyby mohly být vytvořeny chybou měření, chybou v postupu, případně špatnou kalibrací přístroje. Každé měření probíhalo v několika opakováních, aby byla chyba v měření, co nejvíce eliminována.

4.6 Závěr

K vyhodnocení všech částí hypotézy byl použit program Excel. V němž došlo ke zpracování dat a následnému grafickému výstupu.

Hypotézy, které měly být potvrzeny nebo vyvráceny, zní:

- 1) Přídavek biouhlu ovlivní vybrané půdní mikrobiální charakteristiky.
- 2) Biouhel má vliv na nitrifikační aktivitu půdy.
- 3) Aktivita enzymů dehydrogenázy je ovlivněna působením biouhlu.

První část hypotézy nebyla vyvrácena. Biouhel ovlivnil zkoumané mikrobiální aktivity. Přispěl k obohacení půdy o potřebné živiny, které mikroorganismy využily pro svůj prospěch, tedy byly kladně ovlivněny.

Druhá část hypotézy nebyla vyvrácena. Přídavkem biouhlu došlo k navýšení aktivity nitrifikačních bakterií.

Třetí část hypotézy též nebyla vyvrácena. Působením biouhlu byla ovlivněna aktivita enzymů dehydrogenázy. Došlo k navýšení aktivity.

Všechny části hypotézy tedy vyvráceny nebyly. Biouhel má jistý vliv na mikroorganismy v půdě.

Na základě výsledků ovšem nelze říci, že biouhel má větší vliv na nitrifikaci a aktivitu enzymů dehydrogenáz než konvenční postupy. Co říci lze, že hnojení organickými hnojivy (v případě pokusu této práce - hnojem) má velký vliv na zmíněné dvě mikrobiální charakteristiky.

5 Použité zdroje

- A GLOBE 2014. Soil Characterization Protocol -1 Soil (Pedosphere). . Retrieved December 21, 2017, from <<https://www.globe.gov/documents/352961/353769/Soil+Characterization+protocol/e5d46e27-2ac0-4a34-8fbf-7a871c66a4be>>
- ANONYM 2016. Agricultural Biogas Station Bořetice. Citováno 30. listopadu, 2017, z: <<http://www.agrikomp.com/cs/>>
- Ball, B. C. 2013. Soil structure and greenhouse gas emissions: a synthesis of 20 years of experimentation. *European Journal of Soil Science*. 64 (3). 357–373.
- Bulíř, P. 2008. Půdní kondicionery a lesnické rekultivace devastovaných ploch. *Lesnická Práce*. 87 . 22–23.
- Cáceres, R., Malińska, K., Marfà, O. 2018. Nitrification within composting: A review. *Waste Management*. 72 . 119–137.
- Carrier, M., Hugo, T., Gorgens, J., Knoetze, H. 2011. Comparison of slow and vacuum pyrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 90 (1). 18–26.
- Case, S. D. C., McNamara, N. P., Reay, D. S., Whitaker, J. 2012. The effect of biochar addition on N₂O and CO₂ emissions from a sandy loam soil – The role of soil aeration. *Soil Biology and Biochemistry*. 51 (n/a). 125–134.
- Clough, T. J., Condon, L. M., Kammann, C., Müller, C. 2013. A Review of Biochar and Soil Nitrogen Dynamics. *Agronomy*. 3 (2). 275–293.
- Cornelissen, T., Jans, M., Stals, M., Kuppens, T., Thewys, T., Janssens, G. K., Pastijn, H., Yperman, J., Reggers, G., Schreurs, S., Carleer, R. 2009. Flash co-pyrolysis of biomass: The influence of biopolymers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 85 (1–2). 87–97.
- Dahm, H., Szajdak, L., Golinska, P. 2011. Soil enzymes. In: *Research Methods in Plant Science Volume 1: Allelochemicals*. p. 115–134. Huston. Studium Press LLC. ISBN: 1933699655. Retrieved February 23, 2018 from

<https://www.researchgate.net/publication/262697689_soil_enzymes>

- Dar, G. H. 2010. Soil Microbiology and Biochemistry. Pitam Pura. New India Publishing Agency. p. 526. ISBN: 9789380235134.
- DeLuca, T. H., MacKenzie, M. D., Gundale, M. J., Holben, W. E. 2006. Wildfire-Produced Charcoal Directly Influences Nitrogen Cycling in Ponderosa Pine Forests. Soil Science Society of America Journal. 70 (2). 448.
- Fazekašová, D., Fazekaš, J. 2014. Chemické a environmentálne aspekty zložiek životného prostredia a krajiny. Prešov. Prešovská univerzita v Prešove. p. 257. ISBN: 9788081650819.
- Follett, R. F., Varvel, G. E., Kimble, J. M., Vogel, K. P. 2008. No-Till Corn after Bromegrass: Effect on Soil Carbon and Soil Aggregates. Agronomy Journal. 101 (2). 261–268.
- Funke, A., Ziegler, F. 2010. Hydrothermal carbonization of biomass: A summary and discussion of chemical mechanisms for process engineering. Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 4 (2). 160–177.
- Garlapalli, R. K., Wirth, B., Reza, M. T. 2016. Pyrolysis of hydrochar from digestate: Effect of hydrothermal carbonization and pyrolysis temperatures on pyrochar formation. Bioresource Technology. 220 . 168–174.
- Gu, Y., Wang, P., Kong, C. H. 2009. Urease, invertase, dehydrogenase and polyphenoloxidase activities in paddy soil influenced by allelopathic rice variety. European Journal of Soil Biology. 45 (5–6). 436–441.
- Hillel, D. 2013. Introduction to Soil Physics. 1st ed. Academic press. p. 392. ISBN: 9780080918693.
- Huislová, P., Čechmánková, J. 2015. Ověření vlivu zuhelnatělé biomasy – materiálu biouhel - na kvalitu půdy. . Citováno 20. března, 2018 z: <<http://biouhel.cz/wp-content/uploads/2016/04/VUMOP-Overeni-vlivu-biouhlu-na-kvalitu-pudy.pdf>>
- Jílková, L., Ciahotný, K., Černý, R. 2012. Technologie pro pyrolýzu paliv a odpadů. Paliva. 4 . 74–80.

- Jirka, S., Tomlinson, T. 2014. State of the Biochar Industry 2013 - A Survey of Commercial Activity in the Biochar Field. International Biochar Initiative (IBI). (March). 1–61. doi: 10.13140/2.1.3807.1369.
- Kozák, J., Němeček, J. 2009. Atlas půd České republiky. Praha. ČZU Praha. p. 149. ISBN: 9788021320086.
- Kumar, S., Chaudhuri, S., Maiti, S. K. 2013. Soil Dehydrogenase Enzyme Activity in Natural and Mine Soil -A Review. Middle-East Journal of Scientific Research. 13 (7). 898–906.
- Lehmann, J. 2009. Biochar for sustainable carbon sequestration and global soil enhancement. . Washington. Retrieved December 3, 2017 from: <http://biouhel.cz/wp-content/uploads/2014/01/Lehman_cz.pdf>
- Lehmann, J., Joseph, S. 2015. Biochar for environmental management : science, technology and implementation. 2nd ed. London. Routledge. p. 976. ISBN: 0415704154.
- Li, Y., Chapman, S. J., Nicol, G. W., Yao, H. 2018. Nitrification and nitrifiers in acidic soils. Soil Biology and Biochemistry. 116 (October 2017). 290–301.
- Libra, J. A., Ro, K. S., Kammann, C., Funke, A., Berge, N. D., Neubauer, Y., Titirici, M.-M., Fühner, C., Bens, O., Kern, J., Emmerich, K. H. 2011. Hydrothermal carbonization of biomass residuals: a comparative review of the chemistry, processes and applications of wet and dry pyrolysis. Biofuels. 2 (1). 71–106.
- Mendelova univerzita v Brně (n.d.) Weblet Importer. Citováno 27. prosince, 2017, z: <https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=55088>
- Ministerstvo zemědělství 2015. Situační a výhledová zpráva půda [Report on current and anticipated state of soil]. ISBN: 9788074342523.
- Ministerstvo životního prostředí 2017. Definice, význam a funkce půdy. Citováno 10. ledna, 2018 z: <http://www.mzp.cz/cz/definice_pudy>
- Němeček, J., Muhlhanšlová, M., Macků, J., Vokoun, J., Vavříček, D., Novák, P. 2011. Taxonomický klasifikační systém půd České republiky. 2. uprav. Praha. Česká zemědělská univerzita. p. 94. ISBN: 9788021321557 (brož.).

- Obec Krňany 2012. Obec Krňany. Citováno 27. března, 2018, z: < <https://www.krňany.cz/>>
- Parmar, A., Nema, P. K., Agarwal, T. 2014. Biochar production from agro-food industry residues: A sustainable approach for soil and environmental management. *Current Science*. 107 (10). 1673–1682.
- Plant and Soil Sciences eLibrary 2017. Plant and Soil Sciences eLibrary. . Retrieved December 27, 2017, from: <<http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=1130447033&topicorder=3&maxto=7>>
- Pohořelý, M., Jeremiáš, M., Kameníková, P., Skoblia, S., Svoboda, K., Punčochář, M. 2012. Biomass Gasification. *Chemické Listy*. 106 . 264–274.
- Pohořelý, M., Michal, Š., Svoboda, K., Kruml, M., Moško, J., Zach, B., Durda, T., Skoblia, S. 2016. Recyklace fosforu ze stabilizovaného čistírenského kalu Možnosti recyklace fosforu I Možnosti recyklace fosforu II.
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D. 1998. *Microbiology*. WCB/McGraw-Hill. ISBN: 9780072325140.
- Reza, M. T., Andert, J., Wirth, B., Busch, D., Pielert, J., Lynam, J. G., Mumme, J. 2014. Hydrothermal carbonization of biomass for energy and crop production. *Applied Bioenergy*. 1 . 11–29.
- Sahrawat, K. L. 2008. Communications in Soil Science and Plant Analysis Factors Affecting Nitrification in Soils Factors Affecting Nitrification in Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 39 . 9–10.
- Salazar, S., Sánchez, L. E., Alvarez, J., Valverde, A., Galindo, P., Igual, J. M., Peix, A., Santa-Regina, I. 2011. Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. *Ecological Engineering*. 37 (8). 1123–1131.
- Shuler, M. L., Kargi, F., DeLisa, M. 2017. *Bioprocess Engineering: Basic concepts*. 3rd ed. Prentice Hall. p. 640. ISBN: 0132901412.
- Subbarao, G. V., Nakahara, K., Hurtado, M. P., Ono, H., Moreta, D. E., Salcedo, A. F., Yoshihashi, A. T., Ishikawa, T., Ishitani, M., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M.,

- Rondon, M., Rao, I. M., Lascano, C. E., Berry, W. L., Ito, O. 2009. Evidence for biological nitrification inhibition in Brachiaria pastures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106 (41). 17302–17307.
- Subhani, A., Changyong, H., Zhengmiao, X., Min, L., El-ghamry, a. M. 2001. Impact of Soil Environment and Agronomic Practices on Microbial/Dehydrogenase Enzyme Activity in Soil. A Review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 4 (3). 333–338.
- Šarapatka, B. 2014. *Pedologie a ochrana půdy*. Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN: 9788024437361.
- Titirici, M.-M., White, R. J., Falco, C., Sevilla, M., Oates, J. T., Clark, J. H., Maier, J., Kundu, T. K., Xing, G., Li, S., Zhao, Y. 2012. Black perspectives for a green future: hydrothermal carbons for environment protection and energy storage. *Energy & Environmental Science*. 5 (5). 6796.
- USDA 2009. *Soil Quality Indicators*. Natural Resources Conservation Service. (January). 2. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.07.020.
- Ust'ak, S., Muňoz, J. 2012. Vliv základních technologických parametrů hydrotermální úpravy vybraných bioodpadů na užité vlastnosti výstupních produktů influence of basic. *Agritech Science*. Citováno 18. listopadu, 2017 z: < <http://www.agritech.cz/clanky/2012-2-7.pdf>>
- Whalen, J. K., Sampedro, L. 2010. *Soil Ecology and Management*. Oxford. Oxford University Press. p. 296. ISBN: 9781845935634.
- Wolińska, A., Stępniewska, Z. 2012. Dehydrogenase Activity in the Soil Environment. In: R. A. Canuto (Ed.). *Dehydrogenases*. Rijeka. InTech. p. 368. ISBN 9789533070193
- Zhao, X., Wang, S., Xing, G. 2014. Nitrification, acidification, and nitrogen leaching from subtropical cropland soils as affected by rice straw-based biochar: laboratory incubation and column leaching studies. *Journal of Soils and Sediments*. 14 (3). 471–482.

Legislativní dokumenty:

- Česko. Zákon č. 156 ze dne 12. června 1998 o hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích a substrátech a o agrochemickém zkoušení

zemědělských půd (Zákon o hnojivech). In: Sbírka zákonů České republiky. 1998. Částka 54. 6709. Dostupné také z: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_zakon-1998-156-hnojiva.html>.

Česko. Vyhláška č. 275 ze dne 30. listopadu 1998 o agrochemickém zkoušení zemědělských půd a zjišťování půdních vlastností lesních pozemků. In: Sbírka zákonů České republiky. 1998. Částka 97. 8337. Dostupné také z: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_Vyhlaska-1998-275-rostlinnekomodity.html >

6 Přílohy

Skupiny	Organismy	Funkce v půdě
Mikroedafon	Bakterie	Dekompozice organické hmoty, její mineralizace, fixace N, úloha v kolobězích živin, některé jsou patogenní
	Aktinomycety	Dekompozice, fixace N, tvorba agregátů, některé jsou patogenní
	Houby	Dekompozice, mykorrhiza, tvorba agregátů, některé jsou patogenní
	Řasy a sinice	Primární produkce, vliv na strukturu, fixace N
	Prvoci	Mikrofágové, dravci, parazité, dekompozice organické hmoty
Mezoedafon	Hlístice	Mikrofágové, omnifágové, dravci, parazité, vliv na mikroflóru a kořeny rostlin, podíl na rozkladu organické hmoty
	Roztoči	Koprofágové, fytofágové, mikrofágové, detritofágové, dravci, fragmentace organické hmoty
	Chvostokoci	Mikrofágové, detritofágové, fragmentace organické hmoty
Makroedafon	Roupice	Detritofágové, mikrofágové, fragmentace organické hmoty, vliv na strukturu
	Larvy much a brouků	Detritofágové, fytofágové, dravci, rozmělnování a trávení organické hmoty
	Mnohonožky a stonožky	Detritofágové, mikrofágové, dravci, rozmělnování a trávení organické hmoty, vliv na aktivitu mikroorganismů, stabilizace organické hmoty
	Stejnonožci	Detritofágové, koprofágové, rozmělnování organické hmoty
Megaedafon	Žížaly	Detritofágové, fragmentace a úprava organické hmoty, její trávení, promíchávání s minerálním podílem půdy, obohacení enzymy, úprava struktury, vliv na aktivitu mikroorganismů

Příloha 1: Rozřazení edafonu

$\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{lh}^{-1}$	1	2	3	4
Biouhel	0,131 ± 0,002	0,067 ± 0,010	0,037 ± 0,007	0,059 ± 0,008
Úhor	0,090 ± 0,004	0,031 ± 0,005	0,015 ± 0,002	0,011 ± 0,002
Hněj	0,256 ± 0,010	0,218 ± 0,118	0,144 ± 0,020	0,200 ± 0,014
Konvence	0,171 ± 0,048	0,045 ± 0,007	0,024 ± 0,001	0,050 ± 0,005

Příloha 2: Výchozí hodnoty pro Graf 1

A mg N v NO₃⁻	1	2	3	4
Biouhel	0,60 ± 0,04	0,83 ± 0,06	2,07 ± 0,22	0,69 ± 0,02
Úhor	0,59 ± 0,09	0,73 ± 0,02	1,28 ± 0,25	1,59 ± 0,01
Hnůj	2,20 ± 0,03	2,25 ± 0,09	4,83 ± 0,97	1,81 ± 0,20
Konvence	0,65 ± 0,05	0,91 ± 0,02	1,86 ± 0,25	0,69 ± 0,01

Příloha 3: Výchozí hodnoty pro Graf 2

P mg N v NO₃⁻ za 8 dní	1	2	3	4
Biouhel	3,88 ± 0,55	4,03 ± 0,76	6,25 ± 0,53	6,11 ± 2,15
Úhor	1,92 ± 0,04	1,56 ± 0,15	2,49 ± 0,18	3,07 ± 0,01
Hnůj	6,46 ± 0,46	8,15 ± 0,67	10,04 ± 0,58	12,58 ± 2,19
Konvence	4,04 ± 0,16	5,81 ± 0,47	6,32 ± 0,25	8,24 ± 0,17

Příloha 4: Výchozí hodnoty pro Graf 3

I mg N v NO₃⁻ za 8 dní	1	2	3	4
Biouhel	1,36 ± 0,09	1,40 ± 0,03	2,07 ± 0,14	1,47 ± 0,03
Úhor	1,01 ± 0,30	1,08 ± 0,05	1,46 ± 0,05	1,64 ± 0,03
Hnůj	2,39 ± 0,32	3,07 ± 0,09	4,33 ± 0,35	3,40 ± 0,04
Konvence	0,88 ± 0,08	1,35 ± 0,01	1,40 ± 0,08	1,20 ± 0,05

Příloha 5: Výchozí hodnoty pro Graf 4

μg TPF.g⁻¹dm.1h⁻¹	Průměr ze všech 4 měření
Biouhel	0,074 ± 0,035
Úhor	0,037 ± 0,032
Hnůj	0,205 ± 0,040
Konvence	0,073 ± 0,058

Příloha 6: Průměr ze všech 4 měření

- aktivita enzymů dehydrogenázy

mg N v NO₃⁻ za 8 dní	Průměr ze všech 4 měření
Biouhel	5,07 ± 1,11
Úhor	2,26 ± 0,57
Hnůj	9,31 ± 2,27
Konvence	6,10 ± 1,50

Příloha 8: Průměr ze všech 4 měření - potenciální nitrifikace

mg N v NO₃⁻	Průměr ze všech 4 měření
Biouhel	1,05 ± 0,60
Úhor	1,05 ± 0,41
Hnůj	2,77 ± 1,20
Konvence	1,03 ± 0,49

Příloha 7: Průměr ze všech 4 měření - aktuální nitrifikace

mg N v NO₃⁻ za 8 dní	Průměr ze všech 4 měření
Biouhel	1,58 ± 0,29
Úhor	1,30 ± 0,26
Hnůj	3,30 ± 0,70
Konvence	1,21 ± 0,20

Příloha 9: Průměr ze všech 4 měření - inkubovaná nitrifikace

7 Seznam

7.1 Seznam tabulek

Tabulka 1: Základní rozbor složek biomasy- %sušiny (Ust'ak a Muňoz 2012)	7
Tabulka 2: Řazení půdních organismů podle velikosti (Dar 2009).....	12
Tabulka 3: Výživové skupiny půdních bakterií (Whalen a Sampedro 2010).....	14
Tabulka 4: Rozdělení půdních hub	16
Tabulka 5: Příklady mikroorganismů katalyzujících oxidaci amoniaku/oxidaci hydroxylaminu/oxidaci dusitanů (Adaptováno z: Myrold 1998; Hayatsu et al. 2008)	17
Tabulka 6: Ředění standardu pro kalibrační řadu	23
Tabulka 7: Množství sušiny v %.....	28
Tabulka 8: Výsledky půdních reakcí - 1. 5. 2017	29
Tabulka 9: Výsledky půdních reakcí - 30. 5. 2017	29
Tabulka 10: Vyhodnocovací tabulka půdních reakcí	29

7.2 Seznam grafů

Graf 1: Porovnání hodnot aktivity enzymů dehydrogenázy	25
Graf 2: Porovnání hodnot aktuální nitrifikace	26
Graf 3: Porovnání hodnot potenciální nitrifikace	27
Graf 4: Porovnání hodnot inkubované nitrifikace	28

7.3 Seznam obrázků

Obrázek 1: Základní struktura bakteriofága	13
Obrázek 2: Různorodost tvarů půdních bakterií (Whalen a Sampedro 2010).....	14
Obrázek 3: Umístění obecní části Třebsín.	19

7.4 Seznam rovnic

Rovnice 1: Základní reakce během procesu nitrifikace.....	16
---	----

Rovnice 2: Stanovení TPF ve filtrátech pomocí kalibrační křivky:	22
Rovnice 3: Výpočet kalibrační řady:	23
Rovnice 4: Přepočet na mg N - NO ₃ ⁻ / 100 g suché zeminy:	24

7.5 Seznam příloh

Příloha 1: Rozřazení edafonu.....	40
Příloha 2: Výchozí hodnoty pro Graf 1	40
Příloha 3: Výchozí hodnoty pro Graf 2	41
Příloha 4: Výchozí hodnoty pro Graf 3	41
Příloha 5: Výchozí hodnoty pro Graf 4	41
Příloha 6: Průměr ze všech 4 měření – aktivita enzymů dehydrogenázy.....	41
Příloha 7: Průměr ze všech 4 měření – aktuální nitrifikace	41
Příloha 8: Průměr ze všech 4 měření – potenciální nitrifikace	41
Příloha 9: Průměr ze všech 4 měření – inkubovaná nitrifikace	41