

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



**Interakce kořenů rostlin a žížal při přeměnách a
stabilizaci půdní organické hmoty**

Bakalářská práce

Anna Cibulková

Vedoucí práce: doc. Mgr. Eva Kaštovská, Ph.D.

České Budějovice 2024

Cibulková, A., 2024: Interakce kořenů rostlin a žížal při přeměnách a stabilizaci půdní organické hmoty. [The interaction between plant roots and earthworms in the transformations and stabilization of soil organic matter, Bc. Thesis, in Czech] – 61 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace:

Bakalářská práce se zabývá vlivem endogeických žížal na růst, prvkové složení biomasy rostlin a podmínky v rhizosféře, včetně dostupnosti živin, a dále interakcí žížal a rostlinných rhizodepozic při přeměnách a stabilizaci půdní organické hmoty.

Annotation:

The bachelor thesis deals with the influence of endogeic earthworms on growth, elemental composition of plant biomass and conditions in the rhizosphere, including nutrient availability. Furthermore, it investigates the interaction between earthworms and plant rhizodeposits in the processes of transformation and stabilization of soil organic matter.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 12.4.2024

Anna Cibulková

Poděkování

Tímto bych chtěla velice poděkovat své školitelce doc. Mgr. Evě Kaštovské, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, podporu a čas, který mi věnovala. Velký dík patří také půdní skupině z Katedry biologie ekosystémů, jmenovitě Katce Kučerové, Ondrovi Žampachovi, Lence Čapkové, Petru Čapkovi a Michalu Chomovi za chemické analýzy mých vzorků a veškerou pomoc při jejich zpracování. Dále děkuji Dr. rer. nat. Gerritu Angstovi, Ph.D. z ÚPB BC AV ČR za poskytnutí prostoru a materiálu pro provedení metody hustotní frakcionace a zdejšímu kolektivu za vstřícný přístup. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě během celého studia podporovali.

Obsah

1 Úvod	1
2 Literární rešerše	4
2.1 Půda	4
2.1.1 Půda a její složení.....	4
2.1.2 Ekologické funkce a ekosystémové služby poskytované půdou.....	4
2.2 Půdní organická hmota (POH)	5
2.2.1 POH a její role v půdě.....	5
2.2.2 Přeměny POH.....	5
2.3 Stabilizace půdní organické hmoty v půdě	7
2.3.1 Tvorba agregátů a jejich podíl na stabilizaci POH.....	8
2.3.2 Stabilizace POH vazbou na jílové minerály	9
2.3.3 Frakce POH dle mobility a stability – koncept tvorby stabilizované POH.....	9
2.3.4 Separace frakcí POH	12
2.4 Rostlinné vstupy jako hlavní zdroj POH	12
2.5 Rhizosféra a rhizosférní procesy	13
2.5.1 Rhizodepozice	14
2.5.2 Kompetice mikroorganismů s rostlinami o živiny a priming efekt.....	15
2.5.3 Role rhizodepozice při tvorbě stabilní OH a její destabilizaci.....	16
2.5.4 Využití stabilních izotopů C při sledování rhizosférních procesů a tvorby MAOM	17
2.6 Role žížal v půdě a v přeměnách OH	18
3 Cíle práce a hypotézy	20
4 Metodika	21
4.1 Založení pokusu	21

4.2 Zpracování půdy, rostlin a žížal	22
4.3 Hustotní frakcionace půd – oddělení frakce písku, POM a MAOM	23
4.4 Stanovení koncentrace C, N a P a izotopového složení C v pomletých vzorcích půdy, půdních frakcí, rostlinné biomasy a žížal	24
4.5 Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy.....	24
4.5.1 Půdní vodní výluh a aktivní pH.....	24
4.5.2 Analýza stability agregátů	25
4.6 Půdní mikrobiální biomasa a půdní procesy	25
4.6.1 Množství C, N a P vázané v půdní mikrobiální biomase	25
4.6.2 Stanovení rychlosti respirace půdních organismů a priming efektu	27
4.6.3 Měření potenciální aktivity hydrolytických a oxidativních extracelulárních enzymů	27
4.7 Výpočty podílu a množství nového C (z kukuřice) ve vybraných frakcích POH29	29
4.8 Statistické zpracování dat	30
5 Výsledky	30
5.1 Rostlinná biomasa	30
5.2 Půdní parametry	31
5.2.1 Půdní aktivní pH a obsahy C, N, P v půdě a vodném výluhu	31
5.2.2 Množství C a C/N poměry v POM, MAOM.....	33
5.2.3 Stabilita agregátů.....	35
5.3 Mikrobiální biomasa a aktivita	36
5.3.1 Mikrobiální biomasa	36
5.3.2 Rychlost respirace a priming efekt.....	37
5.3.3 Enzymatická aktivita	38
6 Diskuse.....	39
6.1 Přítomnost žížal měla pozitivní vliv na růst rostlin	39
6.2 Mechanismus lepší dusíkové výživy rostliny v přítomnosti žížal	40

6.3 Mechanismus zhoršené výživy rostlin fosforem v přítomnosti žížal	41
6.4 Osud rhizodepozic v půdě a jejich vliv na cyklus uhlíku	43
6.5 Stabilizace POH v přítomnosti žížal a rostlin	46
7 Závěr	48
Seznam literatury	49

1 Úvod

Půdní organická hmota (POH) je nepostradatelnou složkou půdy, bez které by půda nemohla poskytovat své důležité ekosystémové služby pro život na Zemi. POH představuje významný zdroj energie a stavebních látek pro půdní organismy, váže živiny v mobilních formách, omezuje jejich ztráty vyplavováním a umožňuje jejich příjem rostlinami, přispívá k retenci vody v krajině, zlepšuje strukturu půdy a její aeraci (Björklund & Mello, 2012; Cotrufo & Lavallee, 2022). Navíc změny v zásobách POH, představující největší terestrický zásobník uhlíku, mají vliv na globální cyklus C a koncentrace CO₂ v atmosféře (Jobbágy & Jackson, 2000). A vzhledem ke globálním změnám klimatu a potřebě udržení či zlepšování stavu a úrodnosti půd je třeba věnovat zvýšenou pozornost přeměnám POH a její stabilizaci v půdě (Lal, 2004). Pro lepší porozumění procesům tvorby a rozkladu půdní organické hmoty se POH rozděluje na jednotlivé frakce, jakými jsou rozpuštěná organická hmota (DOM, dissolved organic matter), partikulovaná organická hmota (POM, particulate organic matter) a organická hmota vázaná na jemné minerální částice (MAOM či MOM, mineral associated organic matter) (Lavallee et al., 2020).

Hlavním zdrojem organické hmoty v půdě je rostlinný materiál vstupující do půdy především v pevné formě jako nadzemní či podzemní opad, který je zdrojem POM, nebo se jako většina látek vylučovaných kořeny a výluh z listového opadu stává součástí DOM. Stabilita POM se odvíjí od chemické rekalcitrance strukturních látek, které ji tvoří, případně může být zvýšena uzavřením do agregátů, čímž vzniká tzv. oPOM (occluded organic matter), nicméně za nejstabilnější frakci POH je považována MAOM, která může být chráněna před rozkladem navíc taktéž uzavřením v agregátech. MAOM se vytváří postupnými mikrobiálními přeměnami OH a její vazbou na minerální částice, případně může vznikat přímou vazbou DOM rostlinného původu na povrchy minerálů (Angst et al., 2021; Cotrufo & Lavallee, 2022; Lavallee et al., 2020; Villarino et al., 2021). Ukazuje se, že pro tvorbu stabilních frakcí POH, a tedy lepší stabilizaci C v půdě je podzemní vstup rostlinného materiálu významnější než nadzemní (Jackson et al., 2017; Rasse et al., 2005). Důležitý podzemní vstup vedle kořenového opadu tvořeného především komplexními strukturními látkami představují rostlinné rhizodepozice, tedy živými kořeny vylučované látky do půdy, jakými jsou buněčné lyzáty a buňky kořenové čepičky, epidermis a primární kůry, polymerní slizové sekrece (mucigel), nízkomolekulární ve vodě rozpustné exudáty, těkavé organické látky a uhlík z mykorhizních symbiontů (Jones et al., 2009). Tyto organické látky vstupující

do půdy prakticky během celé vegetační sezony představují okolo 10-40 % asimilovaného C a významným způsobem ovlivňují procesy v půdě v okolí kořenů, tzv. rhizosféře, která je místem složitých interakcí mezi rostlinou, půdními organismy a fyzikálně chemickými podmínkami prostředí (Canarini et al., 2019; Hartmann et al., 2009; Hütsch et al., 2002; Kuzyakov & Razavi, 2019). Rhizodepozice mají mnoho funkcí, slouží jako signální molekuly, látky s antimikrobiálním či alelopatickým účinkem, ovlivňují lokální dostupnost živin a představují zdroj energie a uhlíku pro mikroorganismy, se kterými si rostliny o dostupné živiny konkurují (Kuzyakov & Razavi, 2019; Kuzyakov & Xu, 2013). Nízkomolekulární snadno dostupné látky z rhizodepozic stimulují aktivitu a růst mikrobiálního společenstva, kterému poskytují energii k tvorbě extracelulárních enzymů pro štěpení POH a zpřístupnění dalších uhlíkatých látek a živin pro další růst a obracející se mikrobiální biomasa slouží jako další substrát pro zbylé mikroorganismy. Toto urychlení rozkladu původní POH způsobené vstupem organického substrátu do půdy se označuje termínem pozitivní priming efekt (Canarini et al., 2019; Kuzyakov, 2010; Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015). Rhizodepozice skrz priming efekt či přímým působením některých látek vylučovaných kořeny stimulují rozklad původní POH (Jilling et al., 2021; Li et al., 2021), na druhou stranu přispívají k tvorbě stabilních agregátů a MAOM, tedy stabilizaci OH v půdě, ať už přímo, tak i nepřímo přes zvýšený obrát mikrobiální biomasy (Baumert et al., 2018; Jones et al., 2009; Villarino et al., 2021).

Na podzemní procesy v půdě mají velký vliv žížaly označované za ekosystémové inženýry. Skrz jejich pohyb půdou, potravní aktivitu a produkci exkrementů, tzv. casts podstatným způsobem ovlivňují přeměny POH (Frouz, 2018; Šimek, 2019; Six et al., 2004). V minulosti byl zkoumán především jejich význam při stabilizaci OH a přeměnách rostlinného opadu v půdě (Kellerová et al., 2024; Vidal et al., 2019; Zhang et al., 2013), nicméně jejich vliv na procesy v rhizosféře a osud rhizodepozic je nedostatečně prozkoumaný a pro lepší porozumění obrátu POH v přirozených ekosystémech je tato znalost nezbytná. Žížaly mohou stimulovat produkci rhizodepozic a následnou stabilizaci či destabilizaci POH díky podpoře růstu rostlin (Scheu, 2003; Van Groenigen et al., 2014), mohou také ovlivňovat mikrobiální společenstvo v rhizosféře přímo jeho konzumací a trávením (Huang et al., 2015; Ostle et al., 2007) nebo/a nepřímo skrz změnu fyzikálních a chemických vlastností půdy jako je porozita, stabilita agregátů (Bossuyt et al., 2005; Six et al., 2004), pH a dostupnost živin (Van Groenigen et al., 2014). Vedle požíráání mikroorganismů využívajících rhizodepozice mohou žížaly přijímat uhlík z živých kořenů i jeho přímou konzumací a následně ovlivňovat jeho osud

v půdě (Gilbert et al., 2014). Ve výsledku může společná aktivita živých kořenů a žížal podpořit akumulaci stabilizovaného uhlíku v půdě, nebo naopak může jejich společným působením docházet k destabilizaci POH a zvýšeným ztrátám C z půdy její mineralizací.

Cílem mé práce bylo zjistit, jak žížaly ovlivňují růst rostlin a podmínky v rhizosféře, včetně dostupnosti živin, cyklu uhlíku a jeho stabilizaci. Proto jsem provedla osmitýdenní laboratorní pokus v rhizoboxech s použitím žížal druhu *Aporrectodea caliginosa* a kukuřic *Zea mays* jako C₄ rostlin s izotopovým složením uhlíku odlišným od půdní organické hmoty, což mi umožnilo sledovat osud rhizodepozic v půdě. Jelikož jsem potřebovala sledovat také vliv rostlin a žížal na půdní prostředí odděleně, vedle rostlinných rhizoboxů s žížalami byla část rhizoboxů pouze s kukuřicemi a část pouze s žížalami, zbytek rhizoboxů obsahoval jen půdu a sloužil jako kontrola. Na konci pokusu jsem změřila rostlinou biomasu a její obsah živin, obsah C, N, P v půdě (včetně vodného výluhu) a mikrobiální biomase, mikrobiální respiraci a potenciální aktivitu hydrolytických a oxidativních enzymů, dále stabilitu agregátů a pomocí hustotní frakcionace jsem zjistila množství partikulované organické hmoty (POM) a organické hmoty vázané na jemné minerální částice (MAOM), u kterých jsem jakožto důležitých zásobníků C v půdě stanovila obsah a izotopové složení C pro zjištění jejich obratu. Izotopové složení jsem také zjistila u vyrespirovaného CO₂, abych mohla rozlišit množství vydýchaného C pocházejícího z původní POH od C z rhizodepozic, a tedy stanovila velikost priming efektu pro zjištění uhlíkové bilance rostlinných variant.

2 Literární rešerše

2.1 Půda

2.1.1 Půda a její složení

Půda je složitým přírodním útvarem propojujícím atmosféru, litosféru, hydrosféru a biosféru, který se utváří během dlouhodobého a komplexního procesu pedogeneze. Nejprve dochází ke zvětrávání matečné horniny a v závislosti na půdotvorných faktorech (geologické podloží, klima, vegetační kryt, edafon, člověk) a půdotvorných podmínkách (čas a reliéf) se postupně vyvíjí půda (Miko, 2019; Šantrůčková et al., 2018).

Zhruba 50 % objemu půdy je tvořeno pevnou složkou a druhá polovina půdními póry, které jsou zaplněny půdním vzduchem a z části půdní vodou (přesněji půdním roztokem), jejichž složení a dostupnost ovlivňují rychlost půdních procesů. Pevná fáze se skládá v průměru z 94 % z minerálních částic různé velikosti, tvaru a chemického složení a zbylých 6 % pevné fáze tvoří organická složka. Dle zastoupení jednotlivých velikostních kategorií minerálních částic se určuje textura půdy, od které se odvíjí pórovitost půdy, její provzdušnění a schopnost poutat živiny a vodu (Miko, 2019; Šantrůčková et al., 2018). Minerální frakce větší než 2 mm se označuje jako skelet a jemná frakce půdy s velikostí zrn pod 2 mm se dělí podle Taxonomického klasifikačního systému půd ČR na písek (2-0,05 mm), prach (0,05-0,002 mm) a jílu (<0,002 mm) (Šimek, 2019). Organický podíl je složen převážně (cca 84 %) z neživé složky tvořené mrtvou organickou hmotou a ze složky živé, která zahrnuje živé kořeny (cca 9 %) a půdní edafon (cca 7 %) (Miko, 2019). Všechny tyto složky půdní organické hmoty jsou nutné pro správnou funkci a dobrou kvalitu půd.

2.1.2 Ekologické funkce a ekosystémové služby poskytované půdou

Především díky přítomnosti organické složky půda poskytuje nepostradatelné ekologické funkce a ekosystémové služby pro život na souši. Významným způsobem ovlivňuje primární produkci, jelikož z ní rostliny, dominantní primární producenti suchozemských ekosystémů, pomocí kořenů čerpají živiny a vodu. Reguluje vodní režim krajiny, je schopna vodu zadržovat a ovlivňovat její kvalitu. Půda představuje největší rezervoár uhlíku v suchozemském ekosystému obsahující větší množství uhlíku než atmosféra a rostlinná biomasa dohromady (Jackson et al., 2017; Sokol, Sanderman, et al., 2019). Je v ní uloženo okolo 1550 Gt organického a 950 Gt anorganického uhlíku (Lal, 2004), nicméně odhady různých autorů se dosti liší a jsou uváděny s velkými odchylkami (Scharlemann et al., 2014). Například dle

Jobbágy & Jackson (2000) je v půdních organických látkách vázáno ve svrchních 3 m půdy dohromady 2344 Gt C, z toho nejvíce, 1500 Gt C, do hloubky 1 m. Tímto rezervoárem, tvořeným půdní organickou hmotou, ročně prochází asi 60 Gt C, které vstupují převážně ve formě rostlinných zbytků a látek vylučovaných kořeny (rhizodepozice) a půdu opouští především ve formě CO₂ (Pausch & Kuzyakov, 2018). Půda tak významným způsobem ovlivňuje globální cyklus uhlíku a spolupůsobí na globální klima. V půdní organické hmotě se spolu s uhlíkem ukládají a při procesech dekompozice a mineralizace recyklují živiny. Půda je proto klíčovým místem i pro cykly dalších důležitých biogenních prvků, jako je dusík, fosfor a síra. Také funguje jako zdroj biodiverzity, neboť vytváří životní prostředí pro mnoho druhů organismů, jejichž přítomnost a aktivita je potřebná pro správnou funkci půdy. V neposlední řadě slouží k uchování historie (paleontologických a archeologických nálezů) a jako zdroj stavebních materiálů (Miko, 2019; Weil & Brady, 2017; Wiesmeier et al., 2019).

2.2 Půdní organická hmota (POH)

2.2.1 POH a její role v půdě

Půdní organická hmota globálně poutá asi 1500-3000 Gt C (Scharlemann et al., 2014). POH je směsí různorodých organických látek rostlinného, živočišného a mikrobiálního původu, které podléhají postupnému rozkladu a přeměnám (Lehmann & Kleber, 2015). POH jako významný zásobník uhlíku a živin ovlivňuje biomasu, aktivitu a složení společenstva půdních organismů, pro které je zdrojem energie a stavebních látek. Jakožto součást půdních koloidů (částic menších než 1 μm s velkým specifickým povrchem, nesoucích polární i nepolární funkční skupiny) zvyšuje schopnost půdy zadržovat živiny a zabraňuje jejich ztrátám z půdy vyplavováním, ovlivňuje pufrací kapacitu půd a přispívá k retenci vody v krajině. POH je také nezbytná pro tvorbu a stabilizaci půdních agregátů, a zlepšuje tak strukturu půdy a její aeraci. S množstvím organické hmoty v půdě mimo jiné také souvisí barva půdy, což má dále vliv na její teplotu a rychlost půdních procesů (Björklund & Mello, 2012; Šantrůčková et al., 2018).

2.2.2 Přeměny POH

Množství POH v daném systému závisí na poměru mezi vstupy organické hmoty do půdy (primárně rostlinnými) a jejími výstupy. Ke ztrátám organického C z půdy dochází především ve formě CO₂ při mineralizaci POH během katabolických reakcí v tělech půdních organismů, hlavně mikroorganismů, případně ve formě CH₄ při anaerobním procesu a v menší míře

vyplavováním v podobě rozpuštěných organických látek (Björklund & Mello, 2012; Cotrufo & Lavalley, 2022).

Organický materiál vstupující do půdy v pevné formě je během procesu dekompozice mechanicky fragmentován činností půdní makro- a mesofauny a postupně chemicky rozkládán na jednodušší látky pomocí extracelulárních enzymů produkovaných půdními mikroorganismy (Miko, 2019). Po fragmentaci může být část organického materiálu jako tzv. partikulovaná organická hmota (particulate organic matter, POM) v půdě přechodně stabilizována uzavřením v agregátech. S postupným dalším zmenšováním organických fragmentů a jejich oxidací se stávají tyto látky snadněji rozpustné ve vodě a mohou být společně s dalšími látkami rozpuštěnými v půdním roztoku (tzv. dissolved organic matter, DOM) stabilizovány před dalším rozkladem navázáním na minerální částice, nebo jsou asimilovány mikroorganismy (Cotrufo & Lavalley, 2022; Lehmann & Kleber, 2015). Mikroorganismy využívají nízkomolekulární látky jako zdroj C (nebo N) pro tvorbu biomasy a dalších metabolitů a získání energie, při čemž část C uvolňují ve formě CO₂. Když mikrobiální buňky zemřou, vzniká mikrobiální nekromasa, jejíž kvantita a kvalita závisí na způsobu mikrobiální smrti. Ta může být zapříčiněna odumíráním starších buněk (u hub), programovanou buněčnou smrtí ve stresových a limitujících podmínkách, predací půdní (mikro)faunou případně predátorskými druhy bakterií, napadením viry, kompeticí či antropogenními vlivy (např. znečišťováním půdy) (Camenzind et al., 2023). Během obratu mikrobiální biomasy a postupného odumírání mikrobiálních buněk je vždy část uhlíku mineralizována na CO₂, část zůstává v půdě jako neživá organická hmota, která může být stabilizována a část zůstává v živé biomase a koluje dál v potravním řetězci, přičemž i nově vzniklá biomasa je postupně a opakovaně přeměňována stejnou cestou (Miltner et al., 2012). Většina živin z buněk se recykluje v rámci biomasy živých půdních organismů, aby došlo k pokrytí jejich potřeb z pohledu udržování homeostatického poměru C/N/P. Jen pokud je v okolní půdě nadbytek živin, či při predaci vyšší trofickou úrovní (půdní faunou) s nižšími nároky především na N, dochází k uvolnění živin v jejich minerální formě do půdy (Camenzind et al., 2023). Během tvorby mikrobiální nekromasy dochází postupně k úbytku snadno rozložitelných látek a většinou v ní přibývá komplexních fragmentů buněčných stěn. Takto přeměněná organická hmota zůstává v půdě a vytváří velkou část mrtvé POH, někdy označované jako humus. Zbylou část neživé organické hmoty (humusu) představuje částečně fragmentovaný či nijak netransformovaný rostlinný materiál (Miltner et al., 2012).

Rychlost dekompozice a mineralizace závisí především na klimatických podmínkách (na teplotě a dostupnosti vody) a kvalitě rostlinných vstupů a dalších substrátů využívaných mikroorganismy. S klesající teplotou, nedostatkem vody v půdě nebo naopak v převlhčené půdě, a také se zhoršující se kvalitou organických substrátů (živinami chudé organické materiály s vysokým podílem ligninu a dalších těžko rozložitelných látek) dochází ke zpomalování obou zmíněných procesů, což vede k hromadění nepřeměněné nebo jen částečně rozložené organické hmoty v půdě. Naopak při vyšších teplotách, optimální půdní vlhkosti a přítomnosti rostlinného materiálu příznivějšího složení pro rozklad (živinami bohatý organický materiál s vysokým podílem dostupných, energeticky bohatých látek) probíhá dekompozice a mineralizace rychleji. Proto mají například půdy tropických lesů i přes velkou čistou primární produkci, tedy velké vstupy rostlinných zbytků po půdy, obsah POH nižší než boreální lesy, tundry či mokřady a rašeliniště, ve kterých je dekompozice a mineralizace omezena nepříznivými podmínkami pro mikrobiální aktivitu (Paul, 2016; Wiesmeier et al., 2019).

2.3 Stabilizace půdní organické hmoty v půdě

Vedle obsahu (zásob) POH je důležitá také její stabilita, která zajišťuje delší zadržení C v půdě. Nestabilizovaná frakce POH, tzv. volná POH (anglicky free POM, fPOM), je náchylnější ke ztrátám z půdy urychlenou mineralizací například vlivem globálního oteplování či vlivem některých způsobů hospodaření, ku příkladu při zvýšení teploty půdy (např. odkrytím povrchu půdy) nebo při zvýšení její aerace (např. orbou, odvodněním) (Wiesmeier et al., 2019). Je možné zmínit také zvýšené ztráty POH z půdy větrnou i vodní erozí či při požárech (Cotrufo & Lavalley, 2022).

Ke stabilizaci organické hmoty v půdě dochází především uzavřením malých pevných částic POH uvnitř půdních agregátů (fyzikální stabilizace) a vazbou organických látek na jílové částice (stabilizace fyzikálně-chemická). Kapacita půdy stabilizovat POH těmito dvěma mechanismy je omezená. Přímou závisí na obsahu jemných částic a jejich mineralogickém složení, a na klimatu určujícím velikost a kvalitu organických vstupů do půdy (Jackson et al., 2017). Třetím mechanismem zajišťujícím delší setrvání organických látek v půdě je biochemická rekalitrance, tedy odolnost vůči rozkladu daná samotnou strukturou a složením organické látky. Biochemická rekalitrance může být primární, tedy když má již samotná látka vstupující do půdy komplexní strukturu, jako například lignin. Nebo může být sekundární,

pokud dojde ke spontánní enzymaticky katalyzované případně neenzymatické reakci organických zbytků (polykondenzace, vzájemné propojování proteinů atd.) za vzniku nových komplexních molekul (De Nobili et al., 2020). Nicméně biochemická rekalcitrace je považována spíše za okrajový mechanismus stabilizace POH, s menším významem z dlouhodobého hlediska při probíhajících změnách klimatu (Angst et al., 2021).

2.3.1 Tvorba agregátů a jejich podíl na stabilizaci POH

Půdní agregáty jsou směsí především jemných, jílových a prachových minerálních částic a organické hmoty, s póry uvnitř. Jejich množství, tvar, velikost (mikro a makroagregáty s velikostní hranicí 250 μm), vzájemné uspořádání a stabilita určují strukturu půdy, jednu ze základních půdních charakteristik. Stabilita agregátů vyjadřuje jejich schopnost odolávat procesům smršťování a bobtnání půdy, rozbití při vystavení vnějším silám, jako je pomalé či prudké zvlhčení po dešti, eroze a orba (Papadopoulos, 2011). Půdy s dobrou strukturou, a tedy dostatkem stabilních makroagregátů, mají větší zastoupení kapilárních pórů a makropórů, které jsou prostorem pro vodu (půdní roztok), vzduch, kořeny a půdní organismy. Naopak půdy se špatnou strukturou, tedy s malým podílem makroagregátů a převahou malých pórů, nevytváří vhodné prostředí pro život edafonu a rostlin, jsou nedostatečně provzdušněné, lehce se slévají a utužují (Bossuyt et al., 2005). Agregáty tedy kromě stabilizace POH ovlivňují také aktivitu půdních organismů, dostupnost kyslíku, vody a živin v půdě, či náchylnost půdy k erozi a ztrátám živin (Six et al., 2004).

K tvorbě stabilních agregátů je třeba vstup čerstvé organické hmoty s dostatečným množstvím dobře rozložitelných látek a aktivita půdních organismů. Pomocí polysacharidů a glykoproteinů vylučovaných kořeny rostlin a aktivitou edafonu (především mikroorganismů při tvorbě ochranných slizových pouzder a biofilmů, či žížal) dochází k postupnému „slepování“ minerálních a organických částic a tvorbě mikroagregátů (<250 μm). K tvorbě mikroagregátů mohou přispívat také oxidy železa a hliníku (Fe a Al oxyhydroxidy), které na svém povrchu váží organické látky, spojují se s jílovými minerály, nebo propojují primární a sekundární jíly (Six et al., 2004). Mikroagregáty jsou dále navzájem propojovány hyfami hub a kořínky rostlin do makroagregátů (>250 μm). Makroagregáty jsou vysoce náchylné k rozpadu vlivem změn teploty a vlhkosti či vlivem mechanických zásahů v půdě a představují tak poměrně málo stabilní ochranu POH (vypočítaná doba obratu makroagregátů vs. mikroagregátů činí 30 vs. 88 dní, respektive (De Gryze et al., 2006)). Postupnými přeměnami organické hmoty uvnitř makroagregátů dochází ke vzniku dalších mikroagregátů, které se po rozkladu propojovacího organického materiálu (kořínky, hyfy) uvolní a jsou k dispozici pro

tvorbu dalších makroagregátů (Six et al., 2000). Makroagregáty jsou tedy významné pro tvorbu stabilnějších mikroagregátů a většina stabilních mikroagregátů vzniká právě uvnitř makroagregátů. Obecným mechanismem dočasné stabilizace POH uzavřením v agregátech je tedy její ochrana před dekompozicí fyzickou izolací od okolní půdy a zároveň omezenou aktivitou mikroorganismů obývajících menší póry uvnitř agregátů vlivem snížené koncentrace kyslíku (Wiesmeier et al., 2019).

2.3.2 Stabilizace POH vazbou na jílové minerály

Zásadním mechanismem stabilizace POH v půdě je vazba na minerální částice (jíl, prach a oxyhydroxidy), čímž dochází k tvorbě vysoce stabilních organominerálních komplexů. Takto vázaná organická hmota se v literatuře označuje jako tzv. MAOM nebo MOM (mineral associated organic matter) (Angst et al., 2021; Sokol, Sanderman, et al., 2019). Čím je vazba organické hmoty na minerály silnější, například při výměně ligandů, tím je, vzhledem k enzymatické náročnosti a nízké enzymatické účinnosti, rozklad organických látek v MAOM pro mikroorganismy obtížnější v porovnání s látkami vázanými slabými vazebnými interakcemi (van der Waalsovými silami a vodíkovými můstky) (Gunina & Kuzyakov, 2022; Jackson et al., 2017). Kapacita půdy tvořit MAOM je omezená. Závisí na textuře půdy, tedy na dostupnosti minerálních reaktivních povrchů, ale také na jejich typu (mineralogii). Například významné množství OH se váže na vrstevnaté jílové minerály typu 2:1 (např. smektit a vermikulit) s velkým aktivním vnějším i vnitřním povrchem (Jackson et al., 2017; Wiesmeier et al., 2019). Obecně má půda určitou omezenou schopnost stabilizovat C, která může být definována asymptotickým vztahem mezi obsahem POH (s kumulativním chováním stabilizovaných frakcí C, tedy MAOM a POM uzavřené v agregátech) a vstupy C. Pokud jsou všechny reaktivní minerální povrchy obsazeny vazbami s organickými látkami a půda má výbornou strukturu, označuje se jako satureovaná C. Čím více reaktivních povrchů je volných, tím je půda méně nasycená C, tzn. má vysoký saturační deficit, a tím také roste její schopnost stabilizovat C a naopak. Pro tvorbu MAOM je tedy zásadní přítomnost dostupných reaktivních povrchů minerálů a při dosažení saturace může být další POH stabilizována již jen jako POM uzavřením v agregátech nebo setrvat déle díky chemické rekalcitranci (Cotrufo & Lavelle, 2022; Stewart et al., 2007).

2.3.3 Frakce POH dle mobility a stability – koncept tvorby stabilizované POH

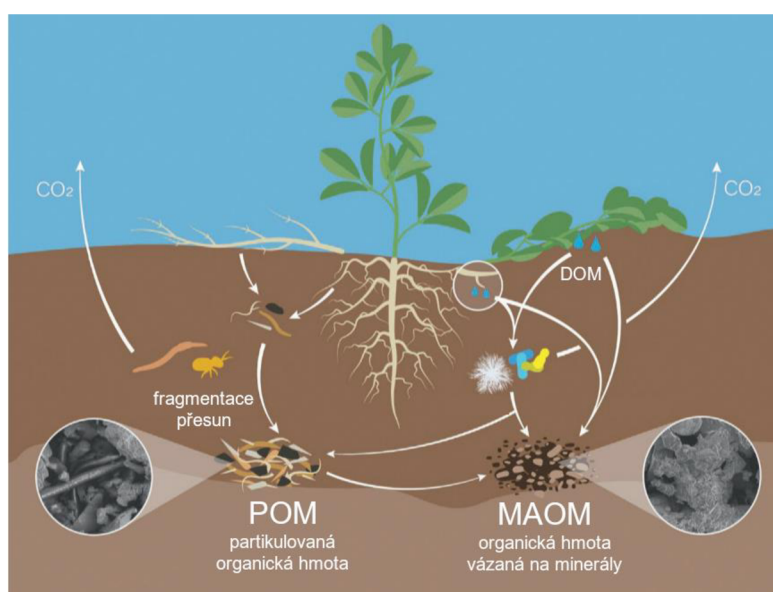
Nejmobilnější/nejlabilnější složku POH představuje rozpuštěná organická hmota (DOM, dissolved organic matter), která je velmi dynamická a tvoří jen malou část POH (1-2 %)

(Lavallee et al., 2020). DOM se vyznačuje velikostí do 0,45 μm , rozpustností ve vodě a je důležitá pro přenos živin (především N a P) a C a jeho následnou stabilizaci v půdě (viz dále). Malá část DOM se z půdy vyplavuje do vodních ekosystémů (Kaiser & Kalbitz, 2012; Qualls, 2000). Zdroji DOM mohou být látky pocházející z rostlinného opadu, exudátů, mikrobiální biomasy i přeměněné půdní organické hmoty (humusu) (Kalbitz et al., 2000). Proto je DOM velmi heterogenní frakcí, a ačkoli představuje dostupný substrát (zdroj živin a C) pro mikroorganismy, rychlost jejího obratu se může značně lišit dle původu (od nízkomolekulárních exudátů a jednoduše rozložitelného DOM z čerstvého opadu po hůře a pomaleji rozložitelný DOM ze starší POH) (Mastný et al., 2018; von Lützow et al., 2007).

Organické látky o větší molekulové velikosti než DOM, rozpustné i nerozpustné ve vodě, lze dále dělit podle velikosti a hustoty. A to na lehkou frakci neboli partikulovanou organickou hmotu (POM, particulate organic matter) s hustotou menší než 1,6 g cm^{-3} a velikostí větší než 20-63 μm a těžkou frakci, tvořenou na minerály vázanou organickou hmotu (MAOM, MOM) s hustotou větší než 1,6-1,85 g cm^{-3} a velikostí menší než 50-63 μm (Lavallee et al., 2020). POM je tvořena čerstvými nebo jen částečně rozloženými fragmenty rostlinných zbytků nadzemního i podzemního opadu. Z velké části je tvořena komplexními látkami jako jsou polysacharidy, lignin, fenolické látky, vosky, které jsou obecně živinami chudé relativně k obsahu C. Většina těchto látek je těžko rozložitelných – rekalitrantních, přesto se ale postupně rozkládají (lignin se rozkládá aktivitou oxidativních enzymů a úplné mineralizace jsou schopny houby bílé hniloby) a jsou tak zdrojem látek, které mohou tvořit stabilnější MAOM. POM tak může v půdě setrvat řádově i roky až desetiletí, ale i vzhledem k náchylnosti k rychlým ztrátám po disturbancích nebo změně environmentálních podmínek není považována za stabilní frakci POH. Stabilita POM se zvyšuje fyzickou ochranou po uzavření jejích fragmentů v agregátech (Grandy & Neff, 2008; Miltner et al., 2012; Paul, 2016). POM uzavřená v agregátech se v literatuře označuje jako oPOM či iPOM (occluded POM či intra-aggregate POM) a má mírně delší dobu setrvání než volná POM, nijak nechráněná před enzymatickým štěpením (Cotrufo & Lavallee, 2022; Lavallee et al., 2020; Six et al., 2004).

Proces tvorby jednotlivých frakcí POH z rostlinných vstupů do půdy je znázorněn na obrázku (Obr. 1). Rozpustné látky mohou být z rostlinného materiálu vymyty a stávají se součástí DOM. Přímou do DOM vstupuje i většina látek vylučovaných kořeny rostlin (např. exudáty, enzymy, sekundární metabolity). Naprostá většina rostlinného materiálu ale

vstupuje do půdy v pevné formě a tvoří POM, která je postupně fragmentována a přemísťována půdní faunou a dále rozkládána činností extracelulárních enzymů. Větší a méně rozložené fragmenty (POM) zůstávají v půdě jako fPOM a jsou dále rozkládány, čímž se produkuje další DOM, nebo mohou být uzavřeny v agregátech (oPOM), kde se jejich rozklad zpomalí (o 50 % i více), nicméně i zde jsou postupně dále rozkládány. Látky přítomné v DOM se mohou vázat přímo na povrch minerálů, čímž vzniká MAOM, nebo jsou asimilovány mikroorganismy a postupně přeměněny v další mikrobiální produkty a nekromasu, která následně přispívá k další tvorbě MAOM navázáním na minerální povrchy. MAOM tedy může být mikrobiálního i rostlinného původu. Některé nízkomolekulární látky rostlinného původu (z opadu či exudátů) se mohou vázat na minerální povrchy rovnou, případně po depolymeraci komplexnějších látek exoenzymy a tvorbě DOM, aniž by byly asimilovány mikroorganismy. Jiné prochází mikrobiální přeměnou a stávají se součástí MAOM po vyloučení z buňky nebo až po její smrti (Angst et al., 2021; Sokol, Sanderman, et al., 2019). Zejména díky příspěvku mikrobiálně přeměněných látek v MAOM převažují látky s vyšším podílem N než v POM. MAOM má tedy celkově nižší poměr C/N (blíže k poměru v mikrobiální biomase vzhledem k přeměnám této OH) a k jejímu rozkladu je třeba nižší aktivační energie. MAOM je však vzhledem k vazbě na minerály málo dostupná mikroorganismům a jejich exoenzymům a zároveň může být chráněna před rozkladem i uzavřením v agregátech. Na rozdíl od POM setrvává v půdě až staletí a jedná se tak o nejstabilnější pool C v půdě (Cotrufo et al., 2021; Jilling et al., 2021).



Obr. 1: Tvorba DOM, POM a MAOM z nadzemních a podzemních rostlinných vstupů. Podle Cotrufo & Lavallee (2022)

2.3.4 Separace frakcí POH

Jednotlivé frakce POH lze vzhledem k jejich odlišným fyzikálním a chemickým vlastnostem oddělit pomocí různých separačních metod. Patří k nim fyzikální způsoby frakcionace, které umožňují rozdělit POH na frakce dle velikosti, hustoty a chování v magnetickém poli, nebo chemická frakcionace rozdělující POH na frakce dle rozpustnosti, hydrolyzovatelnosti, náchylnosti k oxidaci a pomocí narušení vazeb mezi OH a minerály (von Lützow et al., 2007). Za chemickou frakcionaci lze považovat například i stanovení množství C v mikrobiální biomase pomocí fumigačně-extrakční metody nebo extrakci ve vodě rozpustné DOM. Při velikostní (fyzikální) frakcionaci, které většinou předchází rozbití agregátů (např. pomocí ultrazvuku), se nejčastěji pomocí mokrého setí a sedimentace rozděluje půda na frakce písku, prachu a jílu, které se liší velikostí a schopností vázat OH (od minimální vazby OH na písčité částice po hojně a silné vazby na částice jílu). V současnosti nejdoporučovanější a nejčastěji používanou metodou je metoda hustotní frakcionace oddělující lehkou frakci s hustotou $< 1,6 - 2 \text{ g cm}^{-3}$, která není pevně vázána na minerály (odpovídající POM), a na frakci těžkou, tedy OH tvořící organominerální komplexy (MAOM). Tyto frakce se významně liší délkou setrvání v půdě (viz výše), což je velmi podstatná charakteristika při výzkumu sekvestrace stabilního C v půdách. K oddělení lehké a těžké frakce se nejčastěji používá polytungstát sodný (SPT, sodium polytungstate), $\text{Na}_6(\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40})$, který není toxický a umožňuje připravit roztoky o různé hustotě (Moni et al., 2012; von Lützow et al., 2007). Tato metoda se používá v kombinaci s velikostní frakcionací a slouží tak k rozdělení půdy na frakce POM, MAOM a písek (se zanedbatelnou schopností vázat OH).

2.4 Rostlinné vstupy jako hlavní zdroj POH

Biomasa vyšších rostlin představuje hlavní zdroj organické hmoty v půdě. Rostliny během fotosyntézy vytváří z asimilovaného CO_2 organické látky, z nichž část uvolní zpět do atmosféry ve formě CO_2 při vlastním energetickém metabolismu a část použijí pro tvorbu biomasy (čistá primární produkce, NPP) (Šantrůčková et al., 2018). V rostlinné biomase je vázáno cca 400-600 Gt C, přičemž roční hrubá primární produkce (množství asimilovaného C fotosyntézou) je kolem 120 Gt C, z toho se zhruba polovina vrací zpět do atmosféry autotrofní respirací a cca 60 Gt C vstupuje ročně do půdy (Lehmann & Kleber, 2015). Velikost rostlinných vstupů do půdy se odvíjí od klimatu, půdního typu a způsobu využívání půdy. Vstupy lze rozdělit na nadzemní (nadzemní opad) a podzemní (podzemní opad a

rhizodepozice), přičemž rozložení mezi nadzemní a podzemní produkci závisí na ekosystému. Například obiloviny investují do tvorby podzemní biomasy méně asimilovaného C než traviny (20-30 % vs. 30-50 %, respektive) (Paul, 2016). Z tohoto C transportovaného pod zem je asi polovina zachována v biomase kořenů (cca 19 % fixovaného C), zhruba třetina se ztrácí rhizosférní respirací, tedy respirací kořenů a mikroorganismů v rhizosféře (cca 12 % asimilovaného C) a malá část zůstává v půdě jako POH (cca 5 % asimilovaného C) (Kuzyakov & Domanski, 2000).

Alokace C mezi nadzemní a podzemní biomasu ovlivňuje následnou tvorbu POH (Jackson et al., 2017). Nadzemní opad se hromadí a rozkládá převážně na povrchu půdy a vytváří zde opadový horizont. Je reprezentovaný z naprosté většiny volnou fPOM, vystavenou UV záření a kolísání teplot a vlhkosti, v přímém dosahu půdního edafonu a s minimálním kontaktem s minerálními povrchy částic. Do podpovrchových půdních horizontů se z ní mohou vymývat nízkomolekulární látky a půdní živočichové mohou transportovat do půdy fragmenty POM, buď volné nebo v exkrementech. Tyto látky pak mohou přispívat k tvorbě stabilizovaných frakcí POH. V porovnání s tím, podzemní biomasa rostlin přispívá k tvorbě stabilních frakcí POH v průměru 2x více než nadzemní, což je dáno jejím chemickým složením (kořeny obsahují větší podíl ligninu a vylučují významné množství labilních organických látek) a také přímým kontaktem s půdními minerály, mikroorganismy a agregáty (Jackson et al., 2017; Rasse et al., 2005). Právě kořeny a jejich aktivita tak významně ovlivňují tvorbu, stabilizaci a obrát POH.

2.5 Rhizosféra a rhizosférní procesy

Koncept rhizosféry byl poprvé definován Lorenzem Hiltnerem v roce 1904 (Hartmann et al., 2008). Jedná se o zónu půdy v bezprostředním okolí kořenů rostlin, která je jimi přímo ovlivňována (Kuzyakov & Razavi, 2019; Šimek, 2019). Rhizosféra je komplexní a dynamické prostředí, ve kterém na sebe vzájemně působí rostlina, půdní organismy a fyzikálně chemické podmínky půdy (Hartmann et al., 2009). K těmto interakcím může docházet v rámci (1) endorhizosféry, kterou je označována oblast uvnitř kořenů, (2) povrchu kořenů, rhizoplánu, a (3) ektorhizosféry, tedy půdy v blízkosti kořenů (Weil & Brady, 2017). Každá tato část rhizosféry je kolonizována specifickými mikroorganismy, které mohou v oblasti endorhizosféry penetrovat až dovnitř buněk kořenového kortexu jako tzv. endofyty (Lavelle

& Spain, 2001; Šimek, 2019). Rhizosféra zasahuje do vzdáleností zhruba 0.5-4 mm, tento rozsah však není ostře vymezen a některé procesy tuto hranici přesahují (Kuzyakov & Razavi, 2019). Navíc může být tato zóna rozšířena pomocí hyf mykorhizních symbiontů rostlin, takže se děje probíhající v rhizosféře rozšíří až do oblasti tzv. mykorhizosféry (Canarini et al., 2019).

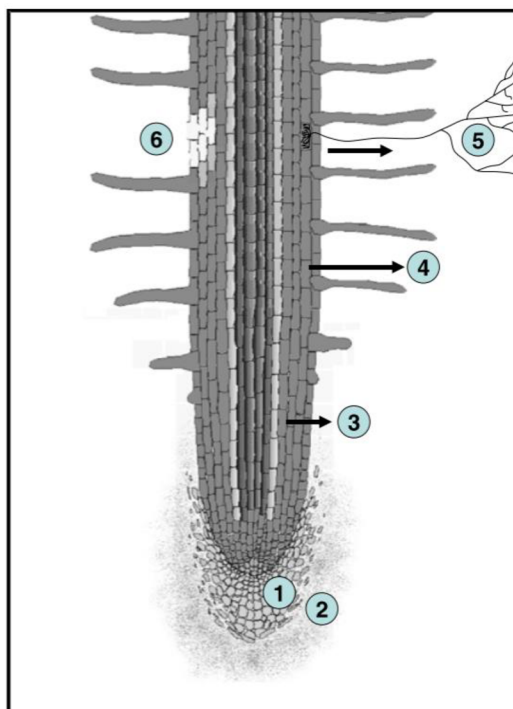
V porovnání s okolní půdou má rhizosféra odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti (Šimek, 2019). Vlivem mikrobiální aktivity a respirace kořenů dochází směrem ke kořenům k nárůstu koncentrace CO_2 a poklesu koncentrace O_2 a tím k tvorbě gradientu v redoxním potenciálu (Hartmann et al., 2009; Kuzyakov & Razavi, 2019). Rostlina také mění pH v rhizosféře v závislosti na pH okolní půdy, aby si zachovala elektrochemický potenciál v rhizoplánu a indukovala tak příjem kationtů či aniontů (Kuzyakov & Razavi, 2019; Lavelle & Spain, 2001). Absorpcí kationtů z půdy (např. NH_4^+), uvolňováním CO_2 respirací a sekrecí organických kyselin rostliny okolí kořenů okyselují, naopak při příjmu aniontů (např. NO_3^-) přispívají k nárůstu pH v této oblasti (Kuzyakov & Razavi, 2019; Lavelle & Spain, 2001). Kořeny významně ovlivňují množství dostupných živin v rhizosféře. Na jednu stranu odčerpávají vodu a v ní rozpuštěné minerální živiny, na stranu druhou do svého okolí vylučují řadu organických a anorganických látek, označovaných jako rhizodepozice (Šantrůčková et al., 2018; Weil & Brady, 2017). Jedná se o významný způsob, jak rostliny působí na své okolní prostředí včetně organismů v něm se vyskytujících (Šantrůček et al., 2018).

2.5.1 Rhizodepozice

Ke vstupu rhizodepozic do půdy dochází následujícími cestami: 1) ztrátou buněk kořenové čepičky a epidermis, 2) exkrecí polymerních látek slizového charakteru (polysacharidy, proteiny, glykoproteiny), tzv. mucigelu, který chrání rostoucí špičku kořene 3) uvolňováním kořenových exudátů, 4) vypouštěním těkavých organických látek, 5) uvolňováním uhlíku do půdy skrz symbionty (např. přes hyfy mykorhizních hub) a 6) ztrátou materiálu z buněk epidermis či kořenového kortexu po jejich smrti a lyzi (Obr. 2) (Jones et al., 2009).

K uvolňování rhizodepozic do půdy dochází během celého vegetačního období a jejich složení a množství se odvíjí od typu ekosystému, druhu a stáří rostliny, přičemž množství produkovaných rhizodepozic (relativně k množství fotosynteticky fixovaného C) s rostoucím věkem rostliny klesá, zatímco ve stresových podmínkách většinou stoupá (Hartmann et al., 2009; Jones et al., 2009; Weil & Brady, 2017). Rostliny skrz rhizodepozice a jejich interakce s půdou a specifickými společenstvy mikroorganismů v rhizosféře ovlivňují lokální

dostupnost živin, zlepšují půdní strukturu, komunikují s okolními rostlinami a mikroorganismy či se brání proti patogenům (Kuzyakov & Razavi, 2019).



Obr. 2: Vstupující rhizodepozice z rostoucího kořene do půdy: 1. buňky kořenné čepičky a epidermis, 2. mucigel, 3. kořenné exudáty, 4. těkavé organické látky, 5. uhlík z kořenových symbiontů, 6. materiál z odumřelých buněk epidermis a primární kůry. Podle Jones et al. (2009)

2.5.2 Kompetice mikroorganismů s rostlinami o živiny a priming efekt

Rostlinami uvolňované kořenné exudáty, zejména primární metabolity (především cukry, aminokyseliny, organické kyseliny), představují lehce dostupný zdroj uhlíku a energie pro půdní mikroorganismy (Kuzyakov & Xu, 2013; Šantrůčková et al., 2018). Rhizosféra je proto prostředím s velkou mikrobiální biomasou, v němž procesy probíhají vysokou rychlostí oproti okolní neovlivněné půdě – představuje jeden z hotspotů mikrobiální aktivity v půdě. Rostliny mohou v podobě rhizodepozic vyloučit 10-40 % asimilovaného C, přičemž exudáty představují okolo 5-10 % fixovaného C (Canarini et al., 2019; Hütsch et al., 2002; Lei et al., 2023). Aktivita a početnost mikroorganismů i abundance na ně vázaných organismů vyšších trofických úrovní se směrem ke kořenům výrazně zvyšuje, ale mikrobiální diverzita klesá (Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015; Šantrůčková et al., 2018). Rychle rostoucí rhizosférní mikrobiom potřebuje kromě uhlíkem bohatých exudátů také velké množství dalších biogenních živin (např. N a P) (Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015). V rhizosféře proto dochází k silné kompetici mezi rostlinami a mikroorganismy o dostupné živiny (Kuzyakov & Xu, 2013). Ty jsou efektivněji přijímány a imobilizovány mikroorganismy, které mají ve srovnání s kořeny větší specifický povrch a jsou strategičtěji rozmístěny v půdě. Mají však krátký životní cyklus v řádu dnů až týdnů a při jejich odumírání či predaci půdní faunou a některými

skupinami bakterií dochází brzy k opětovnému uvolnění živin do rhizosféry (Cheng, 2009; Kuzyakov & Xu, 2013), odkud je mohou přijmout kořeny rostlin či jejich symbionti. Kromě kompetice o živiny s rostlinami ovlivňují mikroorganismy dostupnost živin v rhizosféře také intenzivním rozkladem půdní organické hmoty (Kuzyakov & Razavi, 2019). Exudáty poskytují mikroorganismům dostatek energie pro tvorbu extracelulárních enzymů štěpících komplexní organické látky přítomné v půdě a opadu (Šantrůčková et al., 2018; Šimek, 2019). Určitý podíl enzymů vylučují rostoucí mikroorganismy cíleně, aby zpřístupnily specifické organické látky obsahující biogenní živiny, především N (např. proteázy, peptidázy a chitinázy) a P (fosfatázy). Využívají pak vzniklé nízkomolekulární organické sloučeniny bohaté na potřebné živiny k růstu. S rostoucí biomasou a jejím rychlým obratem roste i množství mikrobiálních produktů a nekromasy, která představuje další dostupný substrát pro přeživší mikroorganismy a může tak dojít k další stimulaci jejich aktivity a rozkladu POH (Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015). Tento jev, kdy vstup lehce dostupného substrátu (nejčastěji kořenových exudátů) aktivuje mikrobiální společenstvo a tím ovlivňuje rychlost rozkladu stávající půdní organické hmoty, se nazývá rhizosférický priming efekt (Canarini et al., 2019; Kuzyakov, 2010). Priming efekt může být buď pozitivní, pokud dojde po vstupu organických látek do půdy k urychlení mineralizace POH, nebo negativní, když se naopak rozklad původní POH zpomalí. K negativnímu priming efektu dochází nejčastěji při vstupu snadno dostupného C do půdy bohaté na minerální živiny, jejichž množství a dostupnost dostatečně pokryje nároky mikroorganismů pro další růst, ale představuje převážně pouze přechodový stav (Blagodatskaya et al., 2007).

2.5.3 Role rhizodepozice při tvorbě stabilní OH a její destabilizaci

Vysokou mikrobiální aktivitu v rhizosféře doprovází rychlý mikrobiální obrat (turnover), při kterém dochází k uvolňování alespoň části jejich buněčného obsahu zpět do půdy. Rostlinné rhizodepozice tak prostřednictvím zvýšeného mikrobiálního obratu a vzniku nekromasy přispívají k tvorbě stabilní MAOM (Cheng, 2009; Jones et al., 2009; Li et al., 2021). Některé nízkomolekulární sloučeniny rhizodepozic mohou MAOM tvořit přímo (Villarino et al., 2021). Další složky rhizodepozic (např. mucigel) společně s kořeny rostlin a mikroorganismy podporují tvorbu půdních agregátů (Baumert et al., 2018; Jones et al., 2009).

Jak již bylo popsáno výše, vstup rhizodepozic do půdy ale také urychluje rozklad organické hmoty prostřednictvím pozitivního priming efektu. Ačkoli se jedná především o rozklad volné fPOM, může dojít i k destabilizaci stávající MAOM (Villarino et al., 2021). Vedle stimulace exoenzymové a mikrobiální aktivity může být MAOM destabilizována i

přímo některými specifickými skupinami látek vylučovaných kořeny, jako jsou organické kyseliny (např. kyselina šťavelová), které narušují vazbu organické hmoty na minerální částice a OH se tak stává přístupnější pro mikroorganismy (Baumert et al., 2018; Jilling et al., 2021). Otázkou tedy je, zda a za jakých podmínek rostlinné rhizodepozice ve výsledku spíše podporují stabilizaci půdní organické hmoty v rhizosféře a kdy naopak převládají ztráty uhlíku z půdy vlivem zvýšené aktivity mikroorganismů a působením některých mikrobiálních či rostlinných metabolitů.

2.5.4 Využití stabilních izotopů C při sledování rhizosférických procesů a tvorby MAOM

Ke sledování osudu organických látek v půdě lze využít stabilních izotopů C, kdy látka nebo směs látek vstupující do půdy musí mít izotopové složení (zastoupení izotopů ^{12}C a ^{13}C) odlišné od stávající POH. Existují dva způsoby „izotopového značení“, a to pulzní a kontinuální. Pokud je značení aplikováno na systém rostlina-půda, pak se při pulzním značení izotopově označí pouze čerstvé asimiláty fixované během „pulzu“ (aplikace CO_2 s vysokým zastoupením ^{13}C v rámci několika minut až hodin). Poté lze sledovat osud těchto látek v systému, včetně jejich exudace a distribuce do různých, převážně labilních frakcí POH (jako je DOM a mikrobiální biomasa či nekromasa) a do CO_2 (Jones et al., 2009; Šantrůček et al., 2018). Takto lze získat informace o tom, jak rostlina v určité růstové fázi distribuuje fotosynteticky fixovaný C v systému, ale nelze je vztáhnout na celé růstové období (Kuzyakov & Domanski, 2000). Během kontinuálního značení jsou rostliny vystaveny „značenému CO_2 “ (obohacenému či ochuzenému o ^{13}C) po delší dobu (v řádu týdnů až měsíců), což umožňuje označení veškeré její biomasy a produktů od vyklíčení po odběr vzorků a sledování osudu rostlinných vstupů C (nejenom exudátů, ale i dalších složek rhizodepozic) do půdy během celého života rostliny (Kuzyakov & Domanski, 2000; Šantrůček et al., 2018). Lze značit také radioaktivním izotopem ^{14}C , což se může jevit výhodné kvůli nižším nákladům, vysoké citlivosti a snadnější přípravě vzorků (Kuzyakov & Domanski, 2000), ovšem vyžaduje práci v k tomu určených prostorách a také specifické nakládání s odpadem.

Analogií kontinuálního značení rostliny pomocí fixace CO_2 s izotopovým složením odlišným od atmosférického CO_2 ($\delta^{13}\text{C} \approx -8,5 \text{ ‰}$) je využití přirozeně odlišného izotopového složení rostlinné biomasy C3 a C4 rostlin dané rozdílnou mírou diskriminace ^{13}C během fotosyntézy (Šantrůček et al., 2018). Biomasa C3 rostlin je z důvodu fixace CO_2 z atmosféry pomocí enzymu ribulóza 1-5 bisfosfát karboxyláza oxygenáza (Rubisco) ochuzenější o izotop ^{13}C ($\delta^{13}\text{C} \approx -27 \text{ ‰}$) na rozdíl od biomasy C4 rostlin ($\delta^{13}\text{C} \approx -13 \text{ ‰}$). U C4 rostlin (např. kukuřice, cukrová třtina) je primární karboxylace v mezofylu listu katalyzována enzymem

fosfoenolpyruvát karboxyláza, který diskriminuje ^{13}C málo a sekundární karboxylace enzymem Rubisco probíhá v buňkách pochev cévních svazků se ztloustlými buněčnými stěnami, ve kterých se CO_2 koncentruje a aktivita Rubisco je tak efektivnější a nedochází k fotorespiraci (Kuzyakov & Domanski, 2000; Šantrůček et al., 2018). Vysazení C_4 rostliny do půdy s organickou hmotou s C_3 historií či obráceně umožňuje, stejně jako metoda umělého kontinuálního značení, kvantifikaci čisté rhizodepozice a její příspěvek k tvorbě a obratu půdní organické hmoty a jejich jednotlivých frakcí (Šantrůček et al., 2018; von Lützow et al., 2007). Lze také kvantifikovat priming efekt, jelikož lze oddělit CO_2 pocházející z mikrobiálně rozkládaných rhizodepozic od rozkládající se původní POH (Kuzyakov & Domanski, 2000; Liu et al., 2020).

2.6 Role žížal v půdě a v přeměnách OH

Žížaly tvoří hlavní biomasu půdní fauny v půdách mírného pásma (Miko, 2019; Šantrůčková et al., 2018). Počet jedinců na m^2 se pohybuje v rozmezí 80-800 jedinců, což může činit 3-300 g/m^2 . Řadíme je mezi půdní makrofaunu, tedy živočichy s šířkou těla přesahující 2 mm. Obývají hlavně luční půdy, půdy lužních lesů a mohou být hojné i v polních půdách. Naopak málo početné jsou v kyselých půdách jehličnatých lesů a rašeliništ'. Žížaly jsou tzv. ekosystémoví inženýři, neboť významným způsobem ovlivňují ekosystémy, ve kterých se vyskytují. Půdní sféra ovlivněná aktivitou žížal se označuje termínem drilosféra, která se fyzikálně a biochemicky odlišuje od okolní půdy a představuje stejně jako rhizosféra hotspot mikrobiální aktivity (Šimek, 2019).

Žížaly využívají jako zdroj potravy mrtvou organickou hmotu, kterou během trávení fragmentují, smíchávají ve svém trávicím traktu s pozřitou minerální složkou půdy, produkty metabolismu a slizem, inokulují ji střevními mikroorganismy a následně vyměšují jako hrudkovitý trus (v anglické literatuře známý jako tzv. casts) (Šantrůčková et al., 2018; Six et al., 2004) v rámci něhož se tvoří stabilní mikroagregáty (Bossuyt et al., 2006; Šimek, 2019). Produkci casts a tvorbou biopórů výrazně zlepšují strukturu půdy. Tím, jak se pohybují půdou a vytváří nové póry, zlepšují provzdušnění půdy a pohyb vody do hlubších vrstev, a zároveň zvyšováním tlaku na okolní půdu a produkcí slizu povrchem těla podporují vznik agregátů (Miko, 2019; Mummey et al., 2006). Mukus (sliz) žížal je složený z proteinů, peptidoglykanů, mastných kyselin a sacharidů a má nízký poměr C/N (okolo 4-5), takže představuje vhodný substrát pro mikroorganismy a stimuluje jejich aktivitu. Rovněž čerstvě defekované

exkrementy se díky dostupnosti dobře rozložitelného materiálu (natrávené rostlinné zbytky, mukus) a inokulaci vyznačují vysokou mikrobiální aktivitou. Mikroorganismy pak svými produkty (polysacharidy a glykoproteiny) a nekromasou přispívají k další tvorbě agregátů v drilosféře a v casts (Guhra et al., 2020). Tato aktivita nicméně po delší době klesá s tím, jak jsou vyčerpány lehce dostupné potravní zdroje a substrát se stává hůře rozložitelný (zbývají v něm především chemicky rekalcitrantní ligninové látky). Nedostupnost substrátu může vést ke sporulaci buněk či jejich odumírání, a tedy tvorbě mikrobiální nekromasy. Tento mikrobiální uhlík je však uzavřen do mikroagregátů, čímž dochází ke stabilizaci této organické hmoty v půdě (Vidal et al., 2019). Stabilita agregátů v žížalích exkrementech je zřejmě vyšší než stabilita agregátů v okolní půdě, což může být dáno vyšším množstvím organického C a pojivových látek spojujících organickou hmotu s minerálními částicemi (Lipiec et al., 2015; Six et al., 2004). V přítomnosti žížal se tedy kombinuje zvýšená mineralizace POH prostřednictvím vyšší mikrobiální aktivity spolu se zvýšenou stabilizací C v půdě v závislosti na délce působení žížal a stáří casts, saturaci půdy C a kvalitě a množství substrátu a druhu žížal (Postma-Blaauw et al., 2006).

Žížaly se dle životních strategií tradičně dělí do tří ekologických skupin na epigeické, endogenické a anektické. Epigeické žížaly (např. *Lumbricus rubellus*) obývají svrchní vrstvy půdy, především opadanku lesních půd, kterou se živí a částečně ji rozkládají. Jejich přímý vliv na půdní strukturu je velmi malý až žádný, nicméně nepřímo mohou půdní prostředí ovlivňovat zvýšeným vyplavováním DOM z natráveného opadu. Anektické žížaly (*Lumbricus terrestris*) vytváří vertikální chodby a konzumují opad z povrchu půdy, který transportují do hlubších půdních vrstev a mohou ho míchat s minerální složkou půdy. Endogeické žížaly (např. *Aporrectodea caliginosa*) jsou geofágní žížaly migrující do hlubších půdních horizontů, kde promíchávají organickou hmotu s minerálními částicemi a jsou považovány za hlavní žížalí přispěvatele k tvorbě agregátů a stabilizaci POH (Hallam & Hodson, 2020; Six et al., 2004).

Obecně se ukazuje, že všechny ekologické skupiny žížal mají pozitivní vliv na kvalitu půdy, růst a stav rostlin. Z dobré struktury půdy, tedy vyššího množství stabilních agregátů, těží i rostliny. Navíc póry vytvořené žížalami nejen přispívají k lepšímu pohybu vody (půdních roztoků) a vzduchu půdou, ale také mohou představovat prostor pro růst kořenů (Šimek, 2019). Zvýšená mikrobiální aktivita v drilosféře vede ke zvýšené mineralizaci rostlinných zbytků a POH, čímž dochází k uvolňování rostlinám dostupných živin, zejména dusíku (Van Groenigen et al., 2014). Dostupný dusík mohou rostliny použít k tvorbě primárních i sekundárních

metabolitů, což může vést mimo jiné i ke zvýšení obranyschopnosti rostlin vůči patogenům. Zároveň mohou žížaly také stimulovat aktivitu rostlinných symbiotických mikroorganismů a svou činností je distribuovat půdě stejně jako natrávenou POH (Scheu, 2003; Van Groenigen et al., 2014). Otázkou tedy je, zda a jak se projeví pozitivní vliv žížal na stav a růst rostlin i v relativně krátkodobém pokusu (a bez čerstvého opadu v půdě) a jaký bude výsledný efekt na množství a stabilizaci POH vzhledem k protikladným procesům (zvýšená mineralizace a destabilizace POH *versus* stabilizace POH), které probíhají v drilosféře i v rhizosféře existující samostatně nebo dohromady.

3 Cíle práce a hypotézy

Hlavním cílem této práce je zjistit, zda a jak žížaly ovlivňují růst rostlin a podmínky v rhizosféře, včetně dostupnosti živin, cyklu uhlíku a jeho stabilizaci v půdě. Abych tyto otázky zodpověděla, sledovala jsem nejen společný, ale i oddělený vliv rostlin a žížal na půdní prostředí. Proto jsem si stanovila následující dílčí cíle: 1) jak rostlinné rhizodepozice ovlivňují dynamiku stávající půdní organické hmoty a jak přispívají k její tvorbě, 2) jak mohou být přeměny, distribuce a stabilizace půdní organické hmoty ovlivněny přítomností žížal a 3) jak se projeví přítomnost žížal na růst rostliny a obsah živin v ní a jaký bude výsledný efekt společného působení rostliny a žížal na přeměny a stabilizaci POH.

Na základě informací z existující literatury jsem stanovila následující hypotézy: 1) v přítomnosti žížal dojde ke stimulaci růstu rostlin, a to především díky zvýšené dostupnosti minerálních forem živin (N a P), 2) rostlinné rhizodepozice stimulují růst mikrobiální biomasy a její aktivitu, a tím i rozklad původní POH, přičemž tento pozitivní priming efekt vzroste v přítomnosti žížal díky nárůstu rostlinné biomasy, a tedy větší produkci rhizodepozic. 3) Přítomnost rostliny, stejně jako aktivita žížal, podpoří stabilizaci C v půdě tvorbou stabilních agregátů, přičemž jejich společná aktivita ve výsledku povede k nejefektivnější stabilizaci POH.

4 Metodika

4.1 Založení pokusu

Pro potřeby pokusu jsem vybrala půdu s nízkým obsahem organické hmoty, abych mohla lépe sledovat vstup rhizodepozic a jejich vliv na půdní procesy. Půda pocházela z kulturního trávníku v areálu Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, z hlubší části organominerálního horizontu (z hloubky asi 15-30 cm), kde půda již nebyla významně ovlivněna kořeny. Tuto půdu jsem mírně vysušila na vzduchu a přesela přes 2mm síto. V této půdě jsem v mini pařeništi předpěstovala ze semen (získaných z jednoho klasu kukuřice) rostlinky kukuřice do výšky asi 15 cm. Zároveň jsem před započítím pokusu dne 27. 4. 2023 odebrala v lese poblíž Plavu u Českých Budějovic několik desítek jedinců žížaly druhu *Aporrectodea caliginosa*, které jsem skladovala ve vlhké půdě v chladu a temnu do založení pokusu.

Samotný pokus jsem prováděla v rhizoboxech o velikosti 15×30×3 cm (š×v×h) (Obr. 3). Dne 9. 5. 2023 jsem 20 rhizoboxů naplnila vždy 1 kg připravené půdy. Rhizoboxy mají ve dně několik otvorů, kterými může vytékat přebytečná zálivková voda. Před naplněním půdou jsem tyto otvory překryla proužkem záclonoviny s otvory o velikosti 1 mm, které minimalizovaly ztráty půdy. Do dvanácti rhizoboxů jsem zasadila po jedné rostlině kukuřice, ostatní zůstaly bez rostlin. Do šesti rhizoboxů s rostlinami a do dalších čtyř rhizoboxů bez rostlin jsem přidala po třech jedincích žížal podobné velikosti, které jsem zvažila, a ke kterým jsem 23. den od založení pokusu přidala další dvě žížaly. V každém rhizoboxu s žížalami bylo tedy celkem 5 zvažovaných jedinců. Celkově bylo tedy založeno 20 rhizoboxů: 6 s rostlinou (R), 6 s rostlinou a žížalami (RZ), 4 s žížalami (Z) a 4 kontrolní bez rostliny i žížal (O) (založení šesti rhizoboxů s rostlinami mi umožňovalo pokračovat v pokusu i pokud by některé rostliny uhynuly nebo se významně odlišovaly biomasou od dalších opakování). Na povrch půdy v každém rhizoboxu jsem položila vatou, která omezovala vysychání půdy a zabraňovala úniku žížal. Rhizoboxy byly umístěny zhruba na týden do skleníku a poté byly přemístěny do venkovních podmínek. Průběžně do nich byla doplňována voda ve stejném množství do každého (odměřováno pomocí kádinky) tak, aby byl celý půdní profil na pohled vlhký a voda začala z boxů dole vykapávat. Po 56 dnech, když byly kukuřice vysoké asi 40 cm, jsem pokus ukončila a připravila rostliny i půdu pro následující analýzy.



Obr. 3: Příklad rhizoboxu s kukuřicemi na konci pokusu, po odstranění krycího plexiskla.

4.2 Zpracování půdy, rostlin a žížal

Z rhizoboxů jsme spolu s kolegou opatrně vyndali kukuřice, z kořenů očistili co nejvíce půdy, kterou jsme vrátili do rhizoboxů, a nůžkami je rozdělili na nadzemní a podzemní část. Půdu jsme umístili na velký tác, ručně zhomogenizovali, vybrali jsme žížaly a jemné kořínky, které jsme společně s oddělenou podzemní biomasou očistili od zbylých půdních částic na jemném sítu pomocí proudu vody.

Nadzemní biomasu jsem rozdělila na živou a mrtvou a stejně jako podzemní biomasu jsem ji usušila při 60 °C po dobu 48 hodin a následně zvažila. Dále jsem biomasu nastříhala nůžkami na zhruba 1cm kousky, reprezentativní vzorek jsem pomlela na kulovém mlýnu (Retch, Německo) a navázila vždy asi 3 mg do cínových kapslí pro následnou analýzu obsahu C, N a izotopového složení C. Vyjmuté žížaly jsem umyla, zvažila, zmrazila při -80 °C, lyofilizovala, pomlela a připravila do cínových kapslí na stejný typ analýz.

Půdu jsem na tácu ručně zhomogenizovala. Asi 50 g čerstvé půdy jsem sušila při 60 °C po dobu 48 hodin. Malou část jsem pomlela na kulovém mlýnu (Retch, Německo) a navázila vždy asi 20 mg do cínových kapslí pro následnou analýzu obsahu C, N a izotopového složení C. Dále jsem tuto usušenou půdu použila pro hustotní frakcionaci. Asi 5 g čerstvé půdy jsem odebrala a zmrazila při -18 °C pro stanovení potenciální aktivity vybraných extracelulárních

enzymů. Dále jsem stanovila podíl suché půdy v 1 g čerstvé půdy. Do hliníkových váženek jsem proto navážila zhruba 5 g čerstvé půdy, vysušila do konstantní hmotnosti při 105 °C a opět zvažila. Z podílu hmotnosti suché a čerstvé půdy jsem vypočítala podíl pevné matrice v gramu původního půdního vzorku neboli „sušinu půdy“. Všechny půdní chemické a biochemické vlastnosti jsem pak vyjadřovala na gram suché půdy s použitím těchto hodnot sušiny. Většinu dalších analýz jsme prováděli z čerstvé půdy buď ihned po odběru, nebo během několika málo následujících dní. Do té doby jsme vzorky uchovávali v plastových sáčcích při 6 °C. Následuje popis dalších analýz.

4.3 Hustotní frakcionace půd – oddělení frakce písku, POM a MAOM

Metodou hustotní frakcionace jsem rozdělila půdní částice ve vzorku na frakce POM, MAOM a písek, které se vedle hustoty liší také charakterem obsažené organické hmoty a stupněm její stabilizace. Do skleněné kádinky jsem navážila vždy 20 g půdního vzorku usušeného při 60 °C a přidala 100 ml SPT o hustotě 1,6 g cm⁻³. Následně jsem vzorky sonikovala v ultrazvukovém homogenizátoru (Sonoplus, Bandelin) při 80 W po dobu 13 min a 27 s (na doporučení Dr. rer. nat. Gerrit Angsta, Ph.D., Biologické centrum AV ČR), aby došlo k rozbití agregátů a uvolnění oPOM. Půdní suspenzi jsem centrifugovala při 3000 g po dobu 30 min a poté jsem veškerou POM (hustota <1,6 g cm⁻³) plovoucí na hladině odsála pomocí vývěvy do Erlenmayerovy baňky. Zbylý kal v centrifugační zkumavce jsem promíchala, opláchla stěny polytungstátem a centrifugaci a odsátí zopakovala. Získanou frakci POM jsem čistila od navázaného SPT promýváním destilovanou vodou přes kovovou fritu s vývěvou, dokud jsem u odebrané profiltrované destilované vody neměřila hodnotu konduktivity nižší než 5 μS (měřeno konduktometrem 107L, GRYF). Poté jsem POM kvantitativně pomocí destilované vody převedla do skleněné kádinky. Z kalu zbylého v centrifugační zkumavce, který představuje frakci půdy těžší než 1,6 g cm⁻³, jsem oddělila písek od jemnější frakce obsahující MAOM přesíváním přes 63 μm síto pomocí destilované vody, dokud na sítu nezbyl pouze písek, který jsem kvantitativně převedla do kádinky. Abych zbavila jemnou frakci s MAOM zbytků SPT, postupovala jsem následovně. Kal jsem centrifugovala v centrifugačních zkumavkách o objemu 750 ml při 3000 g po dobu 30 min, supernatant slíla, usazený kal promíchala a doplnila zkumavky destilovanou vodou. Tento postup jsem opakovala, dokud se konduktivita slévaného supernatantu nedostala pod 50 μS. Získané frakce (POM, MAOM, písek) jsem usušila při 40 °C do konstantní hmotnosti, zvažila a převedla do skleněných 5 ml vialek. Ze získaných hmotností jsem vypočetla podíl jednotlivých frakcí v původních půdních vzorcích.

Poté jsem frakce POM a MAOM namlela na kulovém mlýnu a navázila do cínových kapslí pro následné změření obsahu C a N a izotopového signálu $\delta^{13}\text{C}$.

4.4 Stanovení koncentrace C, N a P a izotopového složení C v pomletých vzorcích půdy, půdních frakcí, rostlinné biomasy a žížal

Analýzy koncentrace C, N a izotopového složení C ($\delta^{13}\text{C}$) provedli kolegové na CHNS elementárním analyzátoru Vario Micro Cube (Elementar, Německo) připojeném k izotopovému poměrovému hmotnostnímu spektrometru IR-MS Delta X Plus (Finnigen, Německo) a poskytli mi výsledky. Ve vzorcích byl stanoven také celkový obsah P po rozkladu kyselinou dusičnou a chloristou kolorimetricky pomocí průtokové vstřikovací analýzy na analyzátoru FIA (FIA Lachat QC8500, Lachat Instruments, USA) dle Kopáčka et al. (2001).

4.5 Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy

4.5.1 Půdní vodní výluh a aktivní pH

Vodný výluh z čerstvé půdy obsahuje rozpuštěné mobilní formy živin i organických látek. Lze ho použít pro charakterizaci aktuální dostupnosti živin pro rostliny a zároveň reprezentuje frakci DOM, do níž vstupují látky z exudace, enzymatického rozkladu komplexní OH a mikrobiální metabolity a zároveň z ní mohou mikroorganismy přijímat jednoduše rozložitelné substráty (Kalbitz et al., 2000). Ve vodném výluhu jsem zjišťovala množství rozpuštěného organického uhlíku (dissolved organic C, DOC), množství celkového rozpuštěného dusíku (dissolved N, DN) a jeho minerálních forem (NO_3^- a NH_4^+), a rozpuštěného reaktivního fosforu (SRP).

Navázila jsem 4 g půdy z každého vzorku do 120ml skleněné NTS láhve a extrahovala 40 ml destilované vody na horizontální třepačce po dobu 1 hodiny. Extrakty jsem následně centrifugovala po dobu 10 min při 3000 g a v supernatantu jsem nejprve stanovila aktivní pH pomocí kalibrovaného pH metru (WTW) se skleněnou elektrodou. Znalost pH půdy jsem také potřebovala pro výpočet půdní respirace. Poté jsem supernatant přefiltrovala přes skleněný filtr (GF/F Whatman, 0,45 μm) a získané filtráty uchovala zmrazené při $-18\text{ }^\circ\text{C}$ ve scintilačních zkumavkách. K analýze množství DOC a DN byl pak použit TOC-L analyzátor vybavený TNM-L jednotkou pro měření celkového dusíku (Shimadzu, Tokyo, Japan). Množství N ve formě nitrátů (NO_3^-), amonného N (NH_4^+), a množství SRP bylo změřeno pomocí průtokové vstřikovací analýzy na analyzátoru FIA (FIA Lachat QC8500, Lachat Instruments, USA).

4.5.2 Analýza stability agregátů

Stabilitu agregátů jsem stanovila metodou mokrého prosévání simulující rozpad agregátů při rychlém zvlhčení dle Nimma a Perkinse (2002) a vyjádřila ji jako index WSA (water-stable aggregates). Index WSA vyjadřuje odolnost agregátů proti rychlému nasycení vodou a jeho vyšší hodnota indikuje vyšší stabilitu agregátů, a tedy lepší strukturu půdy. Postupovala jsem následovně. Ze vzorků usušených při 60 °C jsem do 50ml kádinek navázila 4 g půdy ve dvou opakováních. První z dvojice vzorků jsem ručně prosévala v destilované vodě na sítu s oky o velikosti 0,25 mm po dobu 3 min rychlostí cca 35 zdvihů/min tak, abych síto vždy zvedla nad hladinu vody a opět ho pod ni ponořila. Vodostabilní agregáty, které zbyly na sítu, jsem převedla kvantitativně do hliníkových váženek, vysušila při 105 °C a zvažila (M_{sag}). Druhý z dvojice vzorků jsem na stejném sítu prosévala v roztoku 0,1M hexametfosforečnanu sodného, dokud na sítu nezbyl pouze písek. Hexametfosforečnan sodný působí jako deflokulant, který narušuje chemické vazby mezi jílovými částicemi a většími částicemi půdního matrix a napomáhá tak rozpadu půdních agregátů (Andreola et al., 2004). Na sítu tak po setí v dispergačním činidle zbyly jen jednotlivé půdní částice větší než 250 μ m (písek), které jsem opět převedla kvantitativně do hliníkových váženek, vysušila při 105 °C a zvažila (M_{pis}). Následně jsem stanovila index WSA (water-stable aggregates) jako podíl hmotnosti vodostabilních agregátů (M_{sag}) po odečtení hmotnosti písčítých zrn (M_{pis}) v celkové navážce vzorku (4 g) bez hmotnosti písku (M_{pis}).

4.6 Půdní mikrobiální biomasa a půdní procesy

4.6.1 Množství C, N a P vázané v půdní mikrobiální biomase

Mikrobiální biomasa je citlivý indikátor změn půdních podmínek a její znalost je základem pro studium půdy a v ní probíhajících procesů (Singh & Gupta, 2018). Množství uhlíku, dusíku a fosforu v mikrobiální biomase (MBC, MBN a MBP, respektive) bylo stanoveno fumigačně-extrakční metodou dle Brookes et al. (1982, 1985) a Vance et al. (1987).

Pro stanovení MBC a MBN jsem do 50ml plastových centrifugačních zkumavek navázila dvakrát 5 g čerstvé půdy, v případě MBP pak třikrát 2 g půdy z každého vzorku. Fumigaci jsem provedla následovně. Do exsikátoru s cca 30-50 ml chloroformu stabilizovaného amylenem jsem umístila vždy jeden z dvojice (v případě MBC a MBN) či trojice (pro MBP) navážených půdních vzorků. Uzavřený exsikátor jsem evakuovala 15 minut

pomocí membránové vývěvy a vzorky uvnitř fumigovala po dobu 24 hod parami chloroformu. Následující den jsem exsikátor otevřela, vyčistila, vzorky do něj umístila zpět a provedla střídavě odsátí zbylých par chloroformu pomocí vývěvy (cca 2,5 hod.).

Pro společné stanovení MBC a MBN jsem do centrifugačních zkumavek s fumigovanými i nefumigovanými vzorky přidala 20 ml 0,05M K_2SO_4 a extrahovala 1 hod na třepačce. Po následné 10minutové centrifugaci jsem vzorky a samotný síran draselný pro slepý vzorek přefiltrovala přes skleněný filtrační papír (GF/F Whatman, 0,45 μm) a filtráty uchovala ve scintilačních zkumavkách zmražené až do vlastní analýzy koncentrací organického C a celkového extrahovatelného N. Ta byla provedena pomocí TOC-L analyzátoru s TNM-L jednotkou pro měření celkového dusíku (Shimadzu, Tokyo, Japan). Z rozdílu mezi množstvím organického C ve fumigovaném a nefumigovaném vzorku, korigovaného přepočtovým faktorem pro mikrobiální C ($k_{EC} = 0,38$, Vance et al., 1987) jsem vypočítala obsah uhlíku v mikrobiální biomase MBC. Obdobně rozdíl mezi množstvím rozpuštěného N ve fumigovaném a nefumigovaném vzorku, vydělený korekčním koeficientem pro N v mikrobiální biomase ($k_{EN} = 0,54$, Brookes et al., 1985), odpovídá množství mikrobiálního dusíku MBN.

Pro stanovení MBP (podle Brookes et al., 1982) jsem do centrifugačních zkumavek s fumigovanými i nefumigovanými vzorky přidala 30 ml 0,5M $NaHCO_3$ (pH = 8,5). Do jednoho z dvojice nefumigovaných vzorků jsem dále přidala 0,5 ml roztoku KH_2PO_4 s obsahem P o předem známé koncentraci (odpovídající minimálně 25 $\mu g g^{-1}$ suché půdy), který se přidává jako vnitřní standard pro korekci na sorpci P na půdní částice. Vzorky jsem opět nechala 1 hod třepat na horizontální třepačce a následně jsem je centrifugovala 10 minut. Z každého z centrifugovaných půdních extraktů jsem odebrala pomocí odměrného válce 25 ml do 120ml NTS lahví, okyselila 1,75 ml 4,5M H_2SO_4 po dávkách 0,9 ml a 0,85 ml a nechala stát v chladu do druhého dne. Následně jsem extrakty zfiltrovala přes papírový filtr a získané filtráty uchovala zmražené v scintilačních zkumavkách. Koncentraci P ve vzorcích jsem stanovila spektrofotometricky. Z filtrátů jsem odebrala 2,5 ml do zkumavek o objemu 20 ml, naředila přidáním stejného množství redestilované vody a přidala 0,4 ml reakčního činidla A obsahujícím rozpuštěný vínan antimonylo-draselný a molybdenan amonný a 0,8 ml reakčního činidla B obsahujícího kyselinu askorbovou. Absorbanci vzniklé fosfomolybdenanové modři, která je přímo úměrná obsahu orthofosforečnanů, jsem měřila proti blanku (redestilovaná voda) na spektrofotometru (Genesys 10S, UV-Vis, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) při vlnové délce 886 nm. Zároveň jsem proměřila kalibrační standardy v rozsahu koncentrací

orthofosforečnanů 0–1000 $\mu\text{g P l}^{-1}$ a také vzorky s přidavkem vnitřního standardu přímo do extrakčního činidla. Množství fosforu v měřených vzorcích jsem vypočítala z regresní rovnice popisující kalibrační přímkou. Množství MBP jsem vypočítala jako rozdíl v koncentracích extrahovatelného P před a po fumigaci s provedenou korekcí na sorpci P v půdě a pomocí korekčního koeficientu ($k_{EP} = 0,4$, Brookes et al., 1982).

4.6.2 Stanovení rychlosti respirace půdních organismů a priming efektu

Metabolickou aktivitu půdních mikroorganismů jsem zjišťovala měřením rychlosti respirace půdy, která odpovídá rychlosti mineralizace biologicky dostupné organické hmoty. Respiraci půdy, vyjádřenou jako rychlost produkce CO_2 , jsem stanovovala pomocí plynové chromatografie.

Navážila jsem 20 g půdy do NTS lahví o objemu 120 ml, vzduchotěsně je uzavřela gumovými zátkami a plastovými víčky s otvory. Po 3 dnech inkubace v temnu při 20 °C jsem změřila koncentraci CO_2 akumulovaného v atmosféře nad půdním vzorkem na plynovém chromatografu Agilent 6850 GC systém (detektor TCD, Agilent Technologies, CA, USA). Zároveň jsem změřila koncentraci CO_2 ve slepých vzorcích (láhve NTS bez půdy uzavřené ve stejné době jako ostatní půdní vzorky). Následně jsem vypočítala výslednou rychlost respirace se zohledněním pH půdních vzorků. Množství vyprodukovaného CO_2 jsem korigovala na průměrný obsah CO_2 v blancích, poté vypočítala koncentraci vyprodukovaného CO_2 v plynném objemu vzorku, přičetla množství CO_2 rozpuštěné v půdním roztoku a rychlost respirace vyjádřila na gram suché půdy a den.

Po změření respirace jsem do vakutainerů o objemu 12 ml vypláchnutých N_2 odebrala injekční stříkačkou s jehlou z NTS lahví přesné množství plynu z inkubovaných vzorků dle výpočtu, abych získala vzorky o koncentraci 2300 ppm CO_2 pro následné změření izotopového signálu $\delta^{13}\text{C}$ na IR-MS spektrometru (Thermo Scientific TRACE 1310 GC).

4.6.3 Měření potenciální aktivity hydrolytických a oxidativních extracelulárních enzymů

Potenciální aktivitu hydrolytických enzymů jsem stanovila dle Marx et al. (2005) spektrofotometricky měřením fluorescence, ke které dochází vlivem enzymatického rozkladu přidaného fluorescenčního substrátu, specifického pro daný enzym. Takto jsem změřila aktivitu enzymů rozkládajících půdní organickou hmotu pro zisk uhlíku: β – glukosidáza (BG) a cellobiosidáza (CB), (především) pro zisk dusíku: leucinaminopeptidáza (LAP) a chitináza (NAG), a pro zisk fosforu: fosfatáza (AP). Jako substráty jsem použila fluorescenční deriváty

4-methylumbelliferylu, MUF (pro BG, CB, NAG, AP) a 7-amino-4-methylkumarinu, AMC (pro LAP).

Z rozmražených půdních vzorků jsem vždy navážila 0,5 g, přidala 50 ml destilované vody a sonikovala 4 min. v ultrazvukové lázni, abych narušila půdní částice a uvolnila v nich vázané enzymy. Měření enzymové aktivity jsem provedla na 96 jamkové destičce. Do jamek prvních pěti řad jsem napipetovala vždy 50 μ l roztoku jednotlivých substrátů (MUFG, MUFC, MUFP a AMCL, MUFN), každý substrát do jedné řady. Výslednou koncentraci těchto roztoků pro finální stanovení jsem zvolila na základě předem provedeného testu se třemi koncentracemi substrátů (50/100/300 μ M) a zvolila jsem vždy tu, při které byly aktivity enzymů v daných vzorcích určitého treatmentu nejvyšší. Dále jsem napipetovala 50 μ l vody (jako blank) do další řady jamek a 50 μ l kalibračních roztoků MUF a AMC do posledních dvou řad. Do každé jamky jsem přidala 200 μ l přes síto přecezené půdní suspenze, vždy jeden vzorek do tří po sobě jdoucích sloupců. Fluorescenci jsem měřila na spektrofotometru INFINITE F200 (TECAN, Crailsheim, Germany) při vlnové délce excitace 365 nm a emise 450 nm v čase 0, 30, 90 a 150 minut. Aktivita enzymů, vyjádřená jako množství substrátu rozloženého za jednotku času, přepočtená na gram sušiny, byla vypočtena jako podíl směrnice přímkou nárůstu absorbancí vzorku v čase ku směrnici kalibrační přímkou MUF či AMC.

Pro spektrofotometrické stanovení aktivity lignolytických (oxidativních) enzymů, fenoloxidázy a peroxidázy (PhOx a PerOx) dle Hendel et al. (2005) jsem použila aminokyselinu L-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA). Ta samostatně představuje substrát pro PhOx. Přidáním peroxidu vodíku k L-DOPA se zjišťuje aktivita PhOx i PerOx dohromady, aktivita PerOx se určí odečtením zjištěné aktivity PhOx. Na destičky s hlubokými jamkami jsem pipetovala roztoky ve 4 opakováních pro každý vzorek následovně: 1) 2x200 μ l vzorku + 100 μ l roztoku L-DOPA, 2) 2x200 μ l vzorku + 100 μ l roztoku L-DOPA + 20 μ l 30% roztoku H₂O₂, 3) 2x200 μ l vzorku + 100 μ l acetátového pufru, 4) 2x200 μ l vzorku + 100 μ l acetátového pufru + 20 μ l 30% roztoku H₂O₂. Poslední dvě varianty, 3) a 4), slouží jako blanky bez přidaného substrátu. Jako vzorky jsem použila zbytky homogenátů po změření aktivit hydrolytických enzymů uchovávaných v lednici. Připravené destičky jsem překryla parafilmem, centrifugovala 8 s pro usazení kapek ze stěn a nechala inkubovat 18 hod. při laboratorní teplotě (přibližně 25 °C). Po této době jsem destičky centrifugovala při 2500 ot./min. po dobu 8 min. a následně jsem vždy 250 μ l supernatantu z každého vzorku přepipetovala na mělkou destičku. Poté jsem ihned změřila absorbanci při vlnové délce 450 nm na spektrofotometru INFINITE F200 (TECAN, Crailsheim, Germany). Ze zjištěné

absorbance korigované na průměrnou absorbanci blanků byla spočítána aktivita enzymů korekcí na extinkční koeficient (7,2 ml μmol^{-1} pro podmínky tohoto měření) a vztažena na dobu inkubace a hmotnost sušiny (koncentraci suché půdy na ml homogenátu).

4.7 Výpočty podílu a množství nového C (z kukuřice) ve vybraných frakcích POH

Pro výpočet nového C v POM a MAOM jsem nejprve vypočítala značenou frakci C v jednotlivých vzorcích (f), tedy podíl nového C v celkovém množství C ve vzorku dle rovnice:

$$f = \frac{\delta^{13}\text{C}_{PK} - \delta^{13}\text{C}_P}{\delta^{13}\text{C}_K - \delta^{13}\text{C}_P}$$

kde $\delta^{13}\text{C}_{PK}$ je izotopový signál půdy s kukuřicí (bez žížal/s žížalami), $\delta^{13}\text{C}_P$ je izotopový signál půdy bez kukuřice (tedy izotopový signál původní půdní organické hmoty) (bez žížal/s žížalami) a $\delta^{13}\text{C}_K$ je průměrný izotopový signál nadzemní a podzemní biomasy kukuřice v daném rhizoboxu. Ten zde reprezentuje izotopový signál nově vstupujících organických látek, pocházejících z kořenů kukuřice. Následně jsem spočítala množství nového C v gramu cílového vzorku (POM, MAOM). Poté jsem pomocí známého obsahu POM a MAOM v 1 kg půdy vypočítala celkové množství nového C v celém rhizoboxu. Oba příspěvky jsem pak sečetla a budu je dále prezentovat jako čistou rhizodepozici vyprodukovanou danou rostlinou během celého pokusu.

Podobně jsem postupovala, když jsem chtěla zjistit podíl nového C z rhizodepozice v CO_2 uvolněném z půdy. Izotopový signál CO_2 pocházejícího z plynného objemu inkubovaných vzorků, změřený na IR-MS, jsem pomocí směšovací rovnice korigovala na frakcionaci, ke které dochází při tvorbě HCO_3^- rozpouštěním CO_2 ve vodě, a dále na průměrný izotopový signál pozadí (izotopový signál atmosféry v blancích, $\delta^{13}\text{C} = -8,5 \text{ ‰}$ (Šantrůček et al., 2018)). Takto korigovaný izotopový signál jsem využila při výpočtu podílu nového C z rhizodepozic kukuřice ($\delta^{13}\text{C}_K$) a C z původní půdní organické hmoty ($\delta^{13}\text{C}_P$) ve vydýchaném CO_2 . Poté jsem spočítala priming efekt vyjadřující míru stimulace (procentuální navýšení) rozkladu stávající půdní organické hmoty díky vstupu čerstvého substrátu (rhizodepozic) oproti vzorkům bez rostliny (bez žížal/s žížalami).

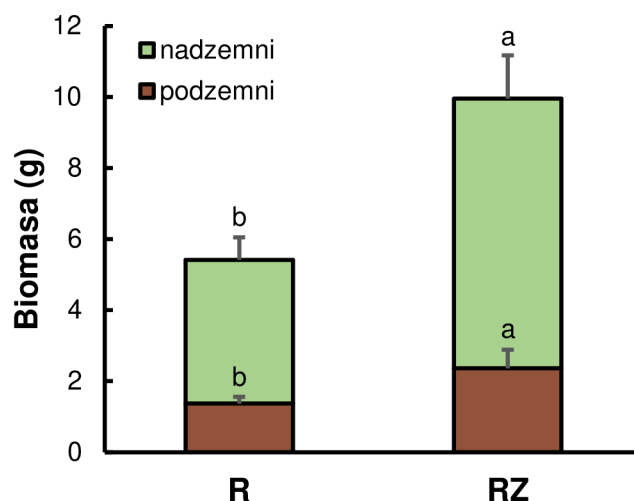
4.8 Statistické zpracování dat

Nejprve jsem ověřila homogenitu variací pomocí Bartlettova testu (před ANOVA testem) a F-testem shody variací (před dvouvýběrovým t-testem). V případě potřeby jsem pro dosažení shody variací provedla logaritmickou transformaci dat. Poté jsem mezi všemi čtyřmi experimentálními variantami hodnotila rozdíly v rostlinných a půdních vlastnostech. Vliv přítomnosti rostliny a žížal (a jejich interakci) na aktivní pH, obsah C, N, P v půdě (včetně vodného výluhu) a mikrobiální biomase, frakcionaci, stabilitu agregátů, respiraci a enzymatickou aktivitu jsem hodnotila pomocí dvoucestné analýzy variance (ANOVA). V případě průkaznosti jsem provedla mnohonásobné porovnání pomocí Tukeyho HSD testu. Poté jsem pouze ve variantách s rostlinou (tedy tam, kde vstupoval rostlinný C) testovala efekt přítomnosti žížal na rostlinnou biomasu a její obsah C, N, P, množství CO₂ uvolněného z původní POH a z nového C, priming efekt a obsah nového C v půdě pomocí dvouvýběrového t-testu.

5 Výsledky

5.1 Rostlinná biomasa

Biomasa rostlin byla pozitivně ovlivněna přítomností žížal (Obr. 4). Kukuřice rostoucí v půdě s žížalami měly ~1,9x větší nadzemní ($t_{10}=5,78$; $P < 0,001$) a ~1,7x větší podzemní biomasu ($t_{10}=3,96$; $P < 0,01$) (Obr. 4). Přítomnost žížal měla vliv také na obsah C, N a P v rostlinné biomase a její živinovou stechiometrii (Tab. 1). Rostlinná biomasa rostoucí v přítomnosti žížal obsahovala více uhlíku (průkazně jen v nadzemní biomase) a dusíku (průkazně jen v podzemní biomase), ale méně fosforu (průkazně opět jen v nadzemní biomase) (Tab. 1). V důsledku toho měly listy i kořeny kukuřic ve variantách s žížalami průkazně vyšší N/P poměr a listy samotné také vyšší C/P poměr oproti kukuřicím v půdě bez žížal (Tab. 1). Poměr C/N v rostlinách se významně nelišil.



Obr. 4: Velikost nadzemní a podzemní biomasy rostlin v gramech ve variantě bez žížal (R) a s žížalami (RZ) (průměr ± SD, n=6). Různá písmena označují signifikantní rozdíly mezi hodnotami.

Tab. 1: Obsah C, N, P a jejich molární poměry (C/N, C/P, N/P) v nadzemní a podzemní biomase rostlin ve variantách bez žížal (R) a s žížalami (RZ) (průměr ± SD, n=6). Tabulka dále obsahuje výsledky dvouvýběrového t-testu hodnotícího vliv žížal (udána je hodnota t testu, průkaznosti P, zkratka ns označuje nesignifikantní výsledek). Různá písmena označují signifikantní rozdíly mezi hodnotami v rámci nadzemní a podzemní biomasy.

	C (mg/g)	N (mg/g)	P (mg/g)	C/N	C/P	N/P
Nadzemní biomasa						
R	408,7±4,0 ^b	6,87±1,2 ^a	2,09±0,2 ^a	71±12 ^a	511±55 ^b	7±1 ^b
RZ	418,3±3,6 ^a	7,96±1,0 ^a	1,70±0,2 ^b	62±7 ^a	643±63 ^a	11±2 ^a
žížala	t ₁₀ =4,01; P <0,01	t ₁₀ =1,55; ns	t ₁₀ =-3,10; P <0,05	t ₁₀ =-1,46; ns	t ₁₀ =3,53; P <0,01	t ₁₀ =3,96; P <0,01
Podzemní biomasa						
R	353,6±38,3 ^a	5,65±0,5 ^b	1,02±0,1 ^a	73±5 ^a	907±154 ^a	12±2 ^b
RZ	376,6±16,1 ^a	6,45±0,5 ^a	0,95±0,1 ^a	68±5 ^a	1034±59 ^a	15±1 ^a
žížala	t ₁₀ =1,24; ns	t ₁₀ =2,71; P <0,05	t ₁₀ =-1,62; ns	t ₁₀ =-1,47; ns	t ₁₀ =1,72; ns	t ₁₀ =3,53; P <0,01

5.2 Půdní parametry

5.2.1 Půdní aktivní pH a obsahy C, N, P v půdě a vodném výluhu

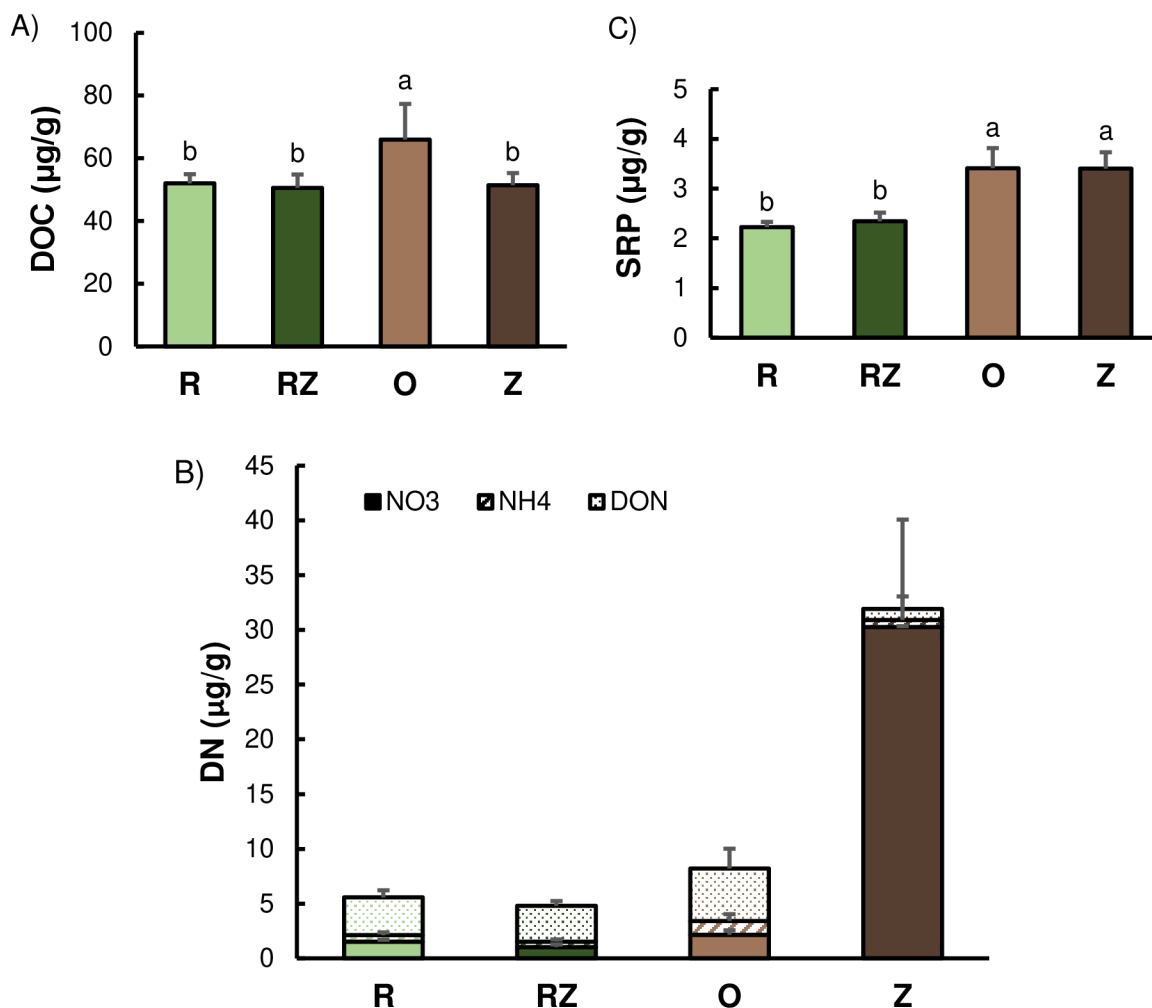
Půdy se žížalami měly nezávisle na přítomnosti rostliny vyšší pH než půdy bez žížal. Nejvyšší pH $7,24 \pm 0,1$ jsem naměřila v půdě s žížalami bez rostlin, nejnižší pH $6,97 \pm 0,1$ v půdě pouze s kukuřicí (Tab. 2). Obsah C v půdě byl naopak ovlivněn přítomností rostlin, které navýšily jeho množství o 3–4 % oproti samotné půdě bez kukuřic (Tab. 2). Obsah půdního N se mezi variantami nelišil, proto měly půdy s rostlinami vyšší poměr C/N.

Samotná půda (kontrola) obsahovala nejvíce DOC ($F_{1,16}=5,65$; $P < 0,05$), ostatní varianty pak obsahovaly asi 1,3x méně DOC a nelišily se od sebe (Obr. 5A). Přítomnost rostliny ($F_{1,16}=165,6$; $P < 0,001$), žížal ($F_{1,16}=30,5$; $P < 0,001$), i jejich vzájemná interakce (rostlina* žížala) ($F_{1,16}=75,4$; $P < 0,001$), měly vliv na množství DN. Půda s kukuřicí obsahovala nejméně DN, přičemž rostliny způsobily především úbytek minerálních forem N, tedy NO_3^- a NH_4^+ v porovnání s půdou bez rostlin ($F_{1,16}=220,9$; $P < 0,001$ a $F_{1,16}=9,38$; $P < 0,01$, respektive) (Obr. 5B). Ve výsledku pak ve frakci DN v půdách s rostlinami dominoval organický rozpuštěný N ($F_{1,16}=5,43$; $P < 0,05$). Nejvíce DN pak obsahovala půda s žížalami bez rostlin (Obr. 5B), téměř 4x více než kontrolní půda a ~6x více než půda s rostlinami a proto měla velmi nízký poměr C/N ve vodním výluhu ($2,02 \pm 0,6$) (Tab. 2). Její DN frakce byla z 95 % tvořena nitrátovým N, 2 % tvořil amoniakální N a zbylé 3 % pak organický N (Obr. 5B). Obsah SRP byl ovlivněn jen přítomností rostlin ($F_{1,16}=82,3$; $P < 0,001$), které jeho obsah v půdě snižovaly oproti půdám bez rostlin (Obr. 5C).

Tab. 2: Půdní pH, obsah půdního C, N a jejich poměr C/N a poměr rozpuštěného C a dusíku (C/N ve vodném výluhu) v půdách jednotlivých variant: s rostlinou bez žížal (R), rostlinou s žížalami (RZ), bez rostlin i žížal jako kontrola (O) a jen s žížalami (Z) (průměr \pm SD, n=6, 6, 4, 4, respektive). Tabulka dále obsahuje výsledky ANOVA hodnotící vliv žížal, rostlin a jejich interakci (udána je hodnota F testu, průkaznosti P, zkratka ns označuje nesignifikantní výsledek). Různá písmena označují signifikantní rozdíly mezi půdními vlastnostmi jednotlivých variant.

	pH (H ₂ O)	C (mg/g)	N (mg/g)	C/N	C/N vodní výluh
R	6,97±0,1 ^b	20,5±0,6 ^a	1,59±0,03 ^a	15±0,2 ^a	11±1,2 ^a
RZ	7,19±0,2 ^a	20,2±0,4 ^a	1,55±0,04 ^a	15±0,3 ^a	12±1,1 ^a
O	7,15±0,1 ^b	19,6±0,8 ^b	1,57±0,03 ^a	15±0,4 ^b	11±3,2 ^a
Z	7,24±0,1 ^a	19,7±0,8 ^b	1,55±0,04 ^a	15±0,5 ^b	2±0,6 ^b

rostlina	$F_{1,16}=3,17$; ns	$F_{1,16}=4,52$; P <0,05	$F_{1,16}=0,23$; ns	$F_{1,16}=5,87$; P <0,05	$F_{1,16}=91,3$; P <0,001
žížala	$F_{1,16}=6,61$; P <0,05	$F_{1,16}=0,30$; ns	$F_{1,16}=2,82$; ns	$F_{1,16}=0,96$; ns	$F_{1,16}=38,0$; P <0,001
rostlina*žížala	$F_{1,16}=0,94$; ns	$F_{1,16}=0,30$; ns	$F_{1,16}=0,12$; ns	$F_{1,16}=0,16$; ns	$F_{1,16}=84,1$; P <0,001



Obr. 5: Množství A) DOC, B) DN (NO₃+NH₄+DON) a C) SRP ve vodném výluhu v jednotlivých variantách: s rostlinou bez žížal (R), rostlinou s žížalami (RZ), bez rostliny i žížal jako kontrola (O) a s žížalami (Z) (průměr ± SD, n=6, 6, 4, 4, respektive). Různá písmena označují signifikantní rozdíly mezi hodnotami.

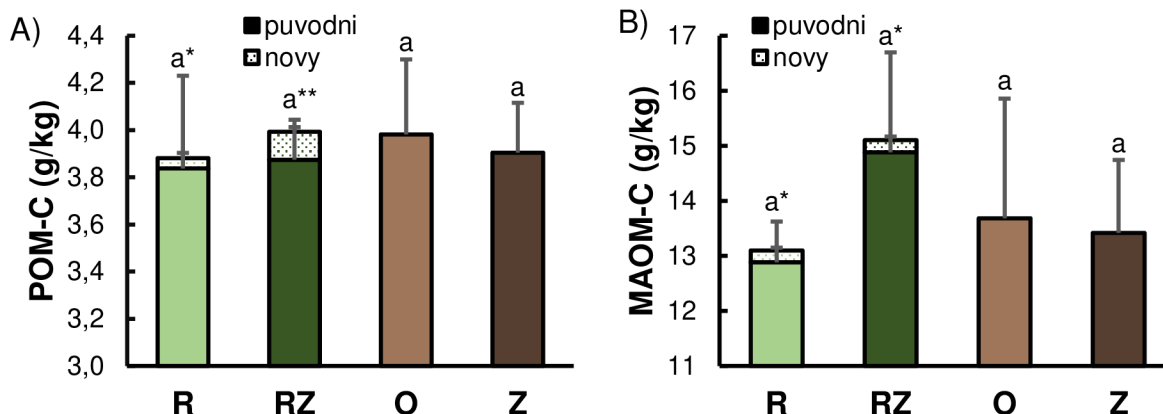
5.2.2 Množství C a C/N poměry v POM, MAOM

Rhizoboxy (1 kg půdy) jednotlivých variant obsahovaly shodně ~10 g POM a dále ~345-370 g MAOM, nejvíce ve variantě s žížalou a rostlinou, avšak tento rozdíl nebyl neprůkazný (Tab. 3). Tyto dvě frakce organické hmoty se lišily koncentrací uhlíku, kdy POM bylo tvořeno

uhlíkem z 38 %, zatímco MAOM pouze ze 4 %. Ve výsledku však POM vázalo asi jen 20 % celkového C v rhizoboxu a MAOM zhruba 65-75 % celkového C v rhizoboxu. Frakce POM a MAOM se dále lišily svými poměry C/N (Tab. 3). Poměr C/N v POM dosahoval v průměru hodnoty 24 a přítomnost rostlin ho průkazně zvyšovala, zatímco C/N poměr MAOM byl nízký, v průměru 13, a mezi variantami se nelišil (Tab. 3).

Tab. 3 Obsah POM a MAOM v gramech a poměr C/N ve frakci POM a ve frakci MAOM v celém rhizoboxu (1 kg půdy) s rostlinou bez žížal (R), rostlinou s žížalami (RZ), kontrolní bez rostliny i žížal (O), s žížalami (Z) (průměr ± SD, n=6, 6, 4, 4, respektive). Tabulka dále obsahuje výsledky ANOVA hodnotící vliv žížal, rostlin a jejich interakci (udána je hodnota F testu, průkaznosti P, zkratka ns označuje nesignifikantní výsledek). Různá písmena označují signifikantní rozdíly mezi hodnotami.

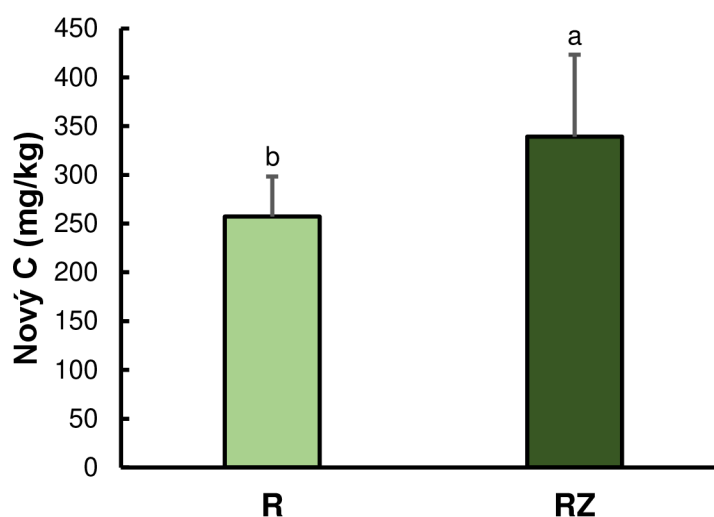
	POM (g/kg)	MAOM (g/kg)	POM C/N	MAOM C/N
R	10,2±1,3 ^a	349,8±12,1 ^a	25±1,4 ^a	13±0,2 ^a
RZ	10,9±1,3 ^a	370,1±25,3 ^a	24±1,0 ^a	13±0,2 ^a
O	10,0±0,7 ^a	348,4±27,1 ^a	24±0,9 ^b	13±0,3 ^a
Z	11,3±1,3 ^a	341,8±25,3 ^a	23±0,6 ^b	13±0,2 ^a
rostlina	F _{1,16} =0,05; ns	F _{1,16} =2,12; ns	F _{1,16} =5,40; P<0,05	F _{1,16} =0,77; ns
žížala	F _{1,16} =2,26; ns	F _{1,16} =0,90; ns	F _{1,16} =3,41; ns	F _{1,16} =0,57; ns
rostlina*žížala	F _{1,16} =0,27; ns	F _{1,16} =1,74; ns	F _{1,16} =0,65; ns	F _{1,16} =0,01; ns



Obr. 6: Obsah uhlíku, včetně příspěvku z rhizodepozice A) v POM a B) v MAOM v rhizoboxu (1 kg půdy) s rostlinou bez žížal (R), rostlinou s žížalami (RZ), kontrolní bez rostliny i žížal

(O), s žížalami (Z) (průměr ± SD, n=6, 5, 4, 4, respektive). Grafy mají rozdílné měřítko na ose y. Signifikantní rozdíly mezi hodnotami obsahu uhlíku v POM jsou označeny písmenem a nového C v POM hvězdičkou.

POM v rhizoboxech celkově obsahovalo zhruba 3900 mg C, k nimž v rostlinných variantách přispíval malým množstvím také nový C z kořenů kukuřice, a to asi 1 % ve variantě bez žížal a 3 % v půdě s žížalami ($t_9=5,18$; $P < 0,001$) (Obr. 6A). MAOM vázalo asi 3,5x více C než POM a rostlinný C tvořil opět zhruba 1,5 % (Obr. 6B). Celkové množství nového C obsaženého v POM+MAOM, reprezentující čistou rhizodepozici C za 56 dní trvání pokusu, dosáhlo 250-350 mg, s mírně vyšším množstvím ve variantě se žížalou ($t_9=1,90$; $P < 0,1$) (Obr. 7). Rostlinný příspěvek tak tvořil necelá 2 % z celkového C v rhizoboxech.

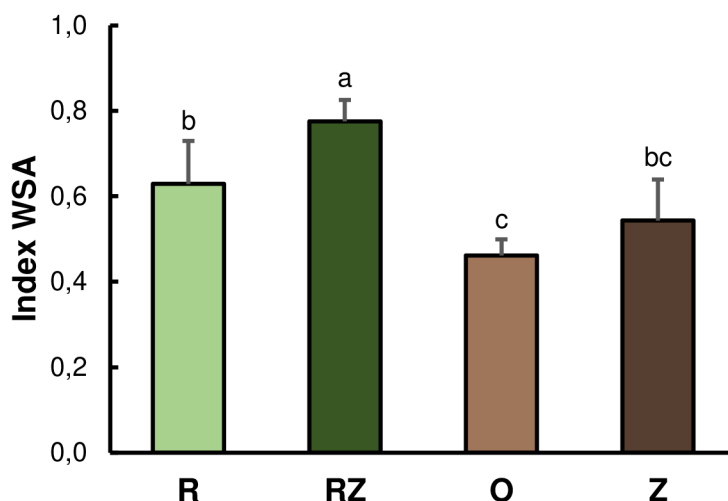


Obr. 7: Množství nového C pocházejícího z kukuřice ve frakcích POM+MAOM v miligramech na celý rhizobox (1 kg půdy) s rostlinou bez žížal (R) a rostlinou s žížalami (RZ) (průměr ± SD, n=6 a 5, respektive). Různá písmena označují signifikantní rozdíly mezi hodnotami ($P < 0,1$).

5.2.3 Stabilita agregátů

Stabilitu agregátů ovlivnila přítomnost rostliny ($F_{1,16}=26,0$; $P < 0,001$) i žížal ($F_{1,16}=9,85$; $P < 0,01$). Nejstabilnější agregáty se vytvořily v půdách s kukuřicí a žížalami RZ, tato varianta měla 1,7x vyšší index WSA než kontrolní půda (Obr. 8). Index WSA pak klesal v pořadí půda

s rostlinou, půda s žížalami a nejnižší (avšak podobný Z) byl v případě kontrolní půdy (Obr. 8).



Obr. 8: Hodnoty indexu WSA indikující stabilitu agregátů v jednotlivých treatmentech s rostlinou bez žížal (R), rostlinou s žížalami (RZ), bez rostliny i žížal jako kontrola (O) a s žížalami (Z) (průměr \pm SD, n=6, 6, 4, 4, respektive). Různá písmena označují signifikantní rozdíly mezi hodnotami.

5.3 Mikrobiální biomasa a aktivita

5.3.1 Mikrobiální biomasa

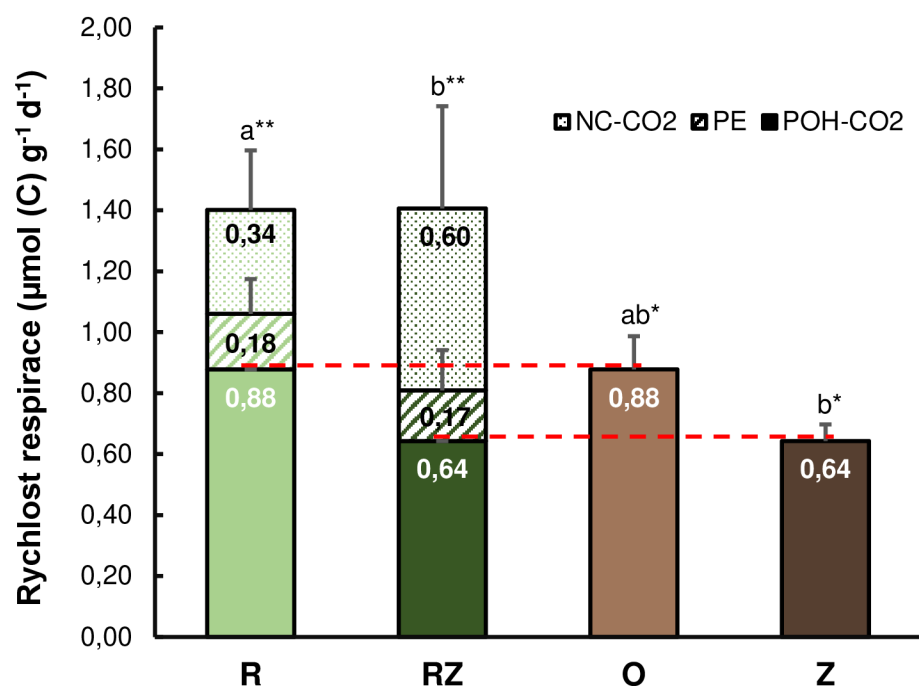
MBC i MBP byly ovlivněny přítomností žížal v půdě, u MBP byla průkazná také interakce mezi rostlinou a žížalami (Tab. 4). Půdy s žížalami měly nižší MBC než půdy bez nich (Tab. 4). Naopak MBP v půdě s rostlinou a žížalami narostl oproti půdám bez žížal 1,6-1,7x. Ačkoli se jednotlivé varianty nelišily v obsahu MBN, mikrobiální C/N poměr byl nejvyšší v kontrolní půdě (Tab. 4). Poměr C/P a N/P mikrobiální biomasy neuvádím, jelikož mnou naměřené hodnoty MBP jsou velmi vysoké relativně k MBC a MBN a neodpovídají koncentracím obvyklým pro mikrobiální biomasu (MBC/MBP \approx 60 (Cleveland & Liptzin, 2007)). Vzhledem k běžným hodnotám absorbance blanku a standardů kalibrační křivky a několikrát kontrolovanému výpočtu předpokládám, že se pravděpodobně jedná o specifikum mnou vybrané minerální a přirozeně fosforem bohaté půdy.

Tab. 4: Obsah C (MBC), N (MBN), P (MBP) a poměr C/N v mikrobiální biomase v půdě z rhizoboxů s rostlinou bez žížal (R), rostlinou s žížalami (RZ), bez rostliny i žížal jako kontrola (O) a s žížalami (Z) (průměr ± SD, n=6, 5, 4, 4, respektive). Tabulka dále obsahuje výsledky ANOVA hodnotící vliv žížal, rostlin a jejich interakci (udána je hodnota F testu, průkaznosti P, zkratka ns označuje nesignifikantní výsledek). Různá písmena označují signifikantní rozdíly mezi hodnotami.

	MBC (µg/g)	MBN (µg/g)	MBP (µg/g)	C/N
R	343,4±40,3 ^a	44,7±3,7 ^a	170,0±73,7 ^b	9±0,7 ^b
RZ	282,5±46,3 ^b	34,6±4,9 ^a	287,0±69,2 ^a	10±0,4 ^{ab}
O	308,6±39,1 ^a	33,6±3,9 ^a	183,9±33,4 ^{ab}	11±0,5 ^a
Z	254,1±14,5 ^b	36,9±6,6 ^a	156,2±13,7 ^b	8±1,3 ^b
rostlina	F _{1,15} =1,76; ns	F _{1,15} =1,89; ns	F _{1,15} =3,18; ns	F _{1,15} =0,89; ns
žížala	F _{1,15} =5,16; P <0,05	F _{1,15} =1,56; ns	F _{1,15} =4,42; P=0,05	F _{1,15} =2,97; ns
rostlina*žížala	F _{1,15} =0,02; ns	F _{1,15} =3,58; ns	F _{1,15} =5,16; P <0,05	F _{1,15} =9,75; P <0,01

5.3.2 Rychlost respirace a priming efekt

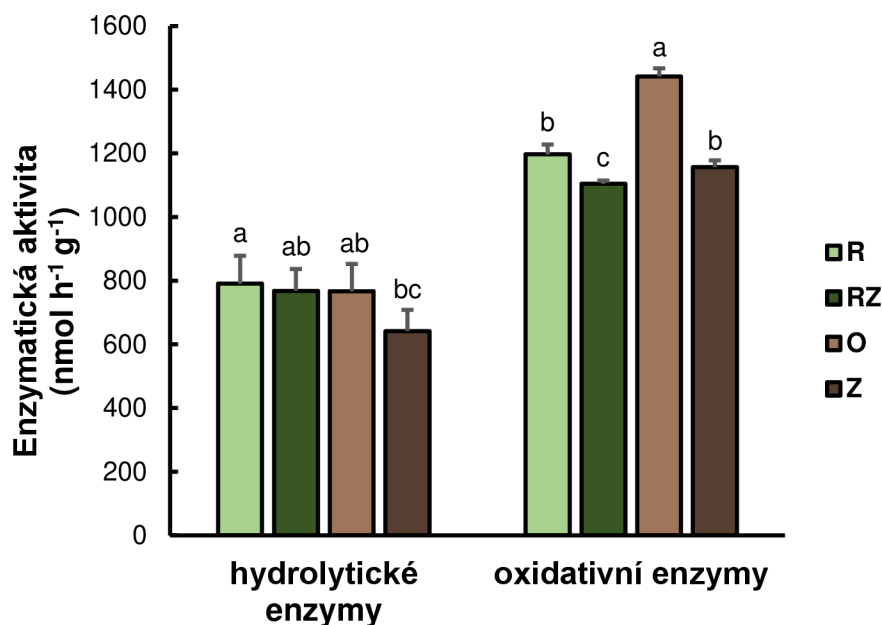
Celková rychlost mikrobiální respirace významně narostla v přítomnosti kukuřice ($F_{1,15}=40,9$; $P <0,001$), a to podobně v přítomnosti i nepřítomnosti žížal (Obr. 9, $R \approx RZ$). Příspěvek nového C z kukuřičných rhizodepozic k celkovému toku CO_2 byl ale vyšší v přítomnosti žížal (42 %) oproti (24 %) ve variantách, kde rostly pouze kukuřice (Obr. 9, horní tečkované části sloupců). Z porovnání toků CO_2 z původní POH mezi variantami s rostlinami a bez nich je zřetelný pozitivní priming efekt (PE), tedy urychlení mineralizace původní POH po vstupu rhizodepozic. Rychlost mineralizace původní POH vzrostla v přítomnosti kukuřice v průměru o 21-26 %, srovnatelně ve variantách s žížalami i bez nich ($t_9=0,43$; ns, Obr. 9, šfárované části sloupců).



Obr. 9: Mikrobiální respirace v $\mu\text{mol (C) g}^{-1} \text{d}^{-1}$ v půdách s rostlinou bez žížal (R), rostlinou s žížalami (RZ), bez rostliny i žížal jako kontrola (O) a s žížalami (Z). U rostlinných variant je odlišena respirace z nového C (z rhizodepozic) (NC-CO₂). Respirace pocházející z původní POH je rozdělena na respiraci odpovídající půdě bez rostlin (bez žížal O/s žížalami Z) a extra respiraci z POH vyvolanou vstupem rhizodepozic, tedy odpovídající pozitivnímu priming efektu (PE) (průměr ± SD, n=6, 5, 4, 4, respektive). Různá písmena označují signifikantní rozdíly mezi hodnotami respirace pocházející z původní POH (POH-CO₂+PE) a hvězdička značí signifikantní rozdíly v celkové rychlosti respirace.

5.3.3 Enzymatická aktivita

Přítomnost rostliny i žížal měla vliv především na aktivitu oxidativních enzymů (Obr. 10). Nejvyšší aktivita oxidativních enzymů byla zjištěna u kontrolní půdy, v půdách s rostlinami ($F_{1,16}=158,2$; $P < 0,001$) a s žížalami ($F_{1,16}=213,1$; $P < 0,001$) klesala a nejnižší byla v půdě s kukuřicí a žížalami (průkazná interakce $F_{1,16}=65,9$; $P < 0,001$). Aktivita hydrolytických enzymů byla jen slabě ovlivněna rostlinou, v její přítomnosti mírně narůstala ($F_{1,16}=3,56$; $P < 0,1$). Nejnižší pak byla v půdě, která obsahovala jen žížaly (Obr. 10).



Obr. 10: Celková potenciální aktivita extracelulárních hydrolytických enzymů a oxidativních enzymů v půdách s rostlinou bez žížal (R), rostlinou s žížalami (RZ), bez rostliny i žížal jako kontrola (O) a s žížalami (Z) (průměr ± SD, n=6, 6, 4, 4, respektive). Různá písmena označují signifikantní rozdíly mezi hodnotami.

6 Diskuse

V mé práci jsem v osmítýdenním pokusu provedeném v rhizoboxech v laboratorních podmínkách sledovala vliv endogeických žížal druhu *Aporrectodea caliginosa* na růst a prvkové složení biomasy rostlin kukuřice *Zea mays*, a dále vliv žížal a kukuřičných rhizodepozic na dostupnost živin (N a P) v půdě a stabilizaci POH.

6.1 Přítomnost žížal měla pozitivní vliv na růst rostlin

Žížaly pozitivně ovlivnily růst rostlin, kdy nadzemní biomasa byla 1,9x vyšší a podzemní 1,7x vyšší oproti biomase kukuřic při absenci žížal (viz Obr. 4), což se shoduje s mojí hypotézou H1. Pozitivní efekt žížal na růst rostlin zaznamenali také autoři dalších studií (Mao et al., 2023; Van Groenigen et al., 2014) u různých půdních typů i ekologických skupin žížal (Mao et al., 2023). Jiné práce ale naznačují, že výsledný efekt může také záviset na druhu rostliny. Metaanalýza Scheu (2003) ukázala neprůkazný až negativní vliv žížal na biomasu luskovin, což bylo dále potvrzeno i experimentem Zheng et al. (2020), kteří pozorovali v přítomnosti

anektického druhu *Metaphire guillelmi* nárůst biomasy pouze u jílku (*Lolium perenne*) a nadzemní biomasy kukuřice (*Zea mays*) a žádný vliv u sledovaných bobovitých rostlin. Růst a velikost nadzemní *versus* podzemní biomasy v přítomnosti žížal se dále může lišit v závislosti na stáří rostliny (Welke & Parkinson, 2003) a půdních podmínkách (Mao et al., 2023).

Žížaly mohou zvyšovat primární produkci různými mechanismy, např. distribucí a stimulací rostlinných symbiontů (Wu et al., 2012), jako jsou například N_2 fixující bakterie (Barois et al., 1987; Šimek et al., 1991), produkcí látek s účinkem podobným rostlinným hormonům (Nardi et al., 1994), biokontrolou rostlinných patogenů, změnou struktury půdy a zvýšenou dostupností živin (Scheu, 2003). Právě lepší živinová výživa, a to zejména dusíkem, je považována za jeden z hlavních mechanismů pozitivního působení žížal na stav a růst rostlin (Van Groenigen et al., 2014). Na to poukazují ve shodě s hypotézou H1 i výsledky mého pokusu, ve kterém biomasa kukuřice obsahovala více dusíku v porovnání s rostlinami v půdě bez žížal (viz Tab. 1). Ovšem zcela opačný výsledek jsem zaznamenala v případě obsahu fosforu, kdy rostlinná biomasa v žížalí variantě byla o P ochuzena, a to hlavně v nadzemní biomase (v průměru o 20 %, viz Tab. 1), oproti variantě bez žížal. To je částečně v rozporu s mojí hypotézou H1 a také s výsledky některých jiných studií poukazujících na zvýšený příjem P rostlinami v přítomnosti žížal (Mao et al., 2023; Ros et al., 2017). K odhalení mechanismů stojících za lepší dusíkovou, ale naopak horší fosforovou výživou rostlin v přítomnosti žížal je třeba dále porovnat vlastnosti půd v kontrolách (O) a ve variantách se samotnými žížalami (Z) a dále i se samotnými rostlinami (R).

6.2 Mechanismus lepší dusíkové výživy rostliny v přítomnosti žížal

Výsledky mého pokusu potvrzují důležitý vliv žížal na recyklaci a dostupnost dusíku. V půdě se samotnými žížalami bez rostlin jsem naměřila až 14x vyšší koncentrace dusičnanového N než v kontrolní půdě (viz Obr. 5B, Z vs O). To spojuje přítomnost žížal se zvýšenou mineralizací organického N a jeho následnou nitrifikací, jako ukázala detailnější studie Parkin & Berry (1994). Ve zmíněné studii čerstvé casts žížal *Octolasion tyrtaeum* a *Aporrectodea tuberculata* obsahovaly zprvu značné množství NH_4^+ , jehož koncentrace začala po dvou týdnech klesat ve prospěch zvyšující se koncentrace NO_3^- (Parkin & Berry, 1994). Jde o to, že v casts je natrávená organická hmota smíchaná s žížalím mukusem, který může mít poměr C/N ~5 (pro endogeickou žížalu (Guhra et al., 2020)) a je dusíkem výrazně bohatší vzhledem

k potřebám půdních mikroorganismů (v mém pokusu byl poměr C/N mikrobiální biomasy ~10). Při jeho rozkladu se tak ve velkém množství může uvolňovat mikroorganismy nespotřebovaný amoniakální N, který je postupně nitrifikován. Navíc žížaly vyměšují N také ve formě močoviny nebo amonné formě (Šimek, 2019). Půdní mikrobiální biomasa, nacházející se v prostředí s vysokou dostupností N v přítomnosti žížal, měla nižší poměr C/N oproti kontrolní půdě (viz Tab. 4, Z vs O), ale byla také celkově menší, tzn., že obsahovala menší množství C, a to zhruba o 18 %. Pokles MBC v půdě s žížalami si vysvětlují tím, že žížaly požíraly půdu – minerální částice spolu s půdní organickou hmotou a na ní žijícími mikroorganismy a při průchodu potravy žížalím střevem došlo ke strávení části mikrobiální biomasy, na což poukazují některé další studie (Devliegher & Verstraete, 1995; McLean et al., 2006). Podobné snížení MBC (o 15 %) pozoroval i Fraser et al. (2003) v opadovém experimentu s *A. caliginosa*. Snižování mikrobiální biomasy je tedy zřejmě spojeno hlavně s aktivitou endogeických druhů žížal prožírajících se půdou, která nabízí obecně méně kvalitní potravu. Naopak druhy žížal živící se rostlinným opadem a na něm narostlými mikroorganismy, který následně transportují do půdy, mohou mít tendenci mikrobiální biomasu zvyšovat (McLean et al., 2006; Wu et al., 2017).

Ke snížení mikrobiální biomasy došlo, i pokud v rhizoboxu s žížalami byla rostlina (RZ), která zásobovala mikroorganismy rhizodepozicemi. I když i zde žížaly urychlovaly recyklaci N, což dokazuje větší a dusíkem bohatší biomasa kukuřice, půdní mikrobiální společenstvo nebylo obohaceno o N tak, jak tomu bylo v půdě se samotnými žížalami (viz Tab. 4). Vysvětlením je velmi nízká koncentrace dusičnanů v půdě varianty RZ (až 30x, viz Obr. 5B, srovnání sloupců Z a RZ), což ukazuje na jejich nízkou aktuální dostupnost v půdě, způsobenou rychlým a efektivním příjmem kořeny, jak ukazují i další práce (Haimi et al., 1992; Mao et al., 2023). Podle Kuzyakov & Xu (2013) sice mikroorganismy dokáží využít N dostupný v půdě rychleji než rostliny, nicméně vzhledem k rychlému obratu jejich biomasy v řádu dní ho brzy uvolní zpět do půdy, kde je znovu přístupný rostlinám, které si o něj s mikroorganismy konkurují (Jilling et al., 2018). Vzhledem k hustému prokořenění rhizoboxů, obohacení rostlinné biomasy o dusík, velmi nízké koncentraci vodou extrahovatelných dusičnanů a poměrně nízké mikrobiální biomase ve variantě RZ lze tvrdit, že kukuřice byly v prostředí se žížalami silnými konkurenty mikroorganismů o dusičnany.

6.3 Mechanismus zhoršené výživy rostlin fosforem v přítomnosti žížal

Samotné žížaly nijak neovlivnily dostupnost fosforu v půdě, jak ukazují srovnatelné koncentrace rozpuštěného reaktivního P v obou půdách bez rostlin, tak i v obou variantách s rostlinami (viz Obr. 5C). Také závěry dalších studií o dostupnosti fosforu v přítomnosti žížal jsou nejednoznačné. Například Ros et al. (2017) ve své studii našli větší množství rozpuštěného anorganického fosforu v casts anektické žížaly *L. terrestris*, zatímco v okolní půdě zůstala jeho koncentrace po dobu experimentu stabilní. Vyšší množství labilních forem P bylo naměřeno i v pórech vzniklých činností anketické žížaly *L. terrestris* (Athmann et al., 2017). I několik dalších studií poukazuje na zvýšené množství dostupného P v casts (Ros et al., 2017; Vos et al., 2014), ale také na rozdíly mezi ekologickými skupinami žížal s vyšším množstvím fosforu v casts epigeických a anektických druhů oproti endogeickým, ke kterým se řadí i mnou použitá *A. caliginosa*. Protože jsem neměřila množství SRP v samotných casts, mohu podle Van Groenigen et al. (2019) jen předpokládat jejich mírné obohacení fosforem, ale v půdě celého systému tento efekt patrný nebyl, podobně jako ukázali Ros et al. (2017).

Ve variantě s žížalami, kde byly rostliny chudší fosforem, jsem ale zároveň našla největší množství P imobilizované v mikrobiální biomase (1,7x vyšší než ve variantě bez žížal, viz Tab. 4, RZ vs R)*. Takto významné obohacení mikrobiální biomasy fosforem, který je obsažen především v membránách, ATP a RNA potřebné pro tvorbu ribozomů (Elser et al., 2000), ukazuje na rychlý růst a vysokou aktivitu mikroorganismů. Dostupný fosfor byl tedy v přítomnosti žížal přijat rychle rostoucím mikrobiálním společenstvem a byl v něm během rychlého obratu recyklován a nebyl rostlině zpřístupňován tak, jako tomu bylo v případě dusíku. Zajímavé by proto bylo zjistit rozdíly ve složení mikrobiálních společenstev (zastoupení r-stratégů a identitu rychle rostoucích druhů), případně také rozdíly v obsahu polyfosfátů v mikrobiální biomase jednotlivých variant.

Dostupnost živin, aktivita enzymů a mikroorganismů a pravděpodobně i složení mikrobiálního společenstva v přítomnosti žížal mohly být ovlivněny také změnami pH, neboť pH v casts se většinou zvyšuje o 0,5 až 2 jednotky oproti okolní půdě (Ros et al., 2017). To je spojeno s aktivitou vápenatých žláz v trávicí soustavě žížal, sloužících pravděpodobně k neutralizaci potravy nebo přítomností alkalických exkrecí žížal v casts (Ros et al., 2017; Van Groenigen et al., 2019). V souladu s těmito zjištěními jsem v mém experimentu pozorovala

*Zde znovu upozorňuji, že naměřené hodnoty MBP v mém pokusu jsou velmi vysoké relativně k MBC a MBN, jak již vysvětluji ve výsledcích. Pokládám však trend vyššího obsahu MPB v rostlinné variantě s žížalami oproti ostatním variantám za platný.

průkazné zvýšení pH půd v žízalích variantách (o 0,1-0,2 jednotky) oproti půdám bez žízal (viz Tab. 2), a to i přesto, že jsem měřila pH ve zhomogenizované půdě z celého rhizoboxu, nikoli jen v casts a že je uváděno, že druh *A. caliginosa* má zřejmě vápenaté žlázy málo vyvinuté (Pearce, 1972).

6.4 Osud rhizodepozic v půdě a jejich vliv na cyklus uhlíku

Rostliny prostřednictvím rhizodepozic vylučovaných z kořenů mírně zvyšovaly půdní mikrobiální biomasu (MBC) (viz Tab. 4) a její aktivitu, což se projevilo zvýšenou respirací oproti kontrolní půdě (viz Obr. 9). Tyto výsledky jsou v souladu s mou hypotézou H2. Rhizodepozice představují vzhledem k jejich složení snadno dostupný zdroj C a energie pro mikroorganismy. Například dle Hütsch et al. (2002) jsou kukuřičné rhizodepozice ze 79 % tvořeny ve vodě rozpustnými exudáty s největším podílem sacharidů, jako je glukóza, fruktóza a sacharóza, které jsou velmi rychle využity mikroorganismy (Yevdokimov et al., 2006).

Na konci pokusu jsem v rhizoboxech našla zhruba 300 mg nového C, reprezentující čistou rhizodepozici na jednu rostlinu kukuřice (viz Obr. 7). Čistá rhizodepozice je však vždy jen podílem celkové, tzv. hrubé rhizodepozice, z níž je po vstupu do půdy zhruba polovina prodýchána (Pausch & Kuzyakov, 2018). Například v experimentu Shepherd & Davies (1993) se ^{14}C značenou *Brassica napus* bylo 35-51 % nového C vydýcháno mikroorganismy a v pokusu Hütsch et al. (2002) bylo během 3denní inkubace prodýcháno 36-66 % značených testovaných složek rhizodepozic (glukóza, kyselina asparagová a citronová) přidaných do půdy. I já jsem došla k podobným výsledkům, když jsem na základě jednorázového měření rychlosti respirace i izotopového složení CO_2 vypočítala příspěvek nového C k respiraci a hrubě pak odhadla množství nového C vyrespirovaného za celou dobu trvání pokusu (56 dní). Můj hrubý odhad byl, že čistá rhizodepozice mohla činit 46-53 % celkového vstupu C hrubou rhizodepozicí, což je v souladu s předchozí literaturou.

Aktivita žízal přitom výrazně ovlivnila množství i osud rhizodepozic v půdě. Množství nového C z rhizodepozic bylo ve výsledku zhruba o 30 % větší v rhizoboxu s žízalami než bez nich (viz Obr. 7) a zároveň zde nový C také více přispíval k celkové respiraci, když tvořil 42 % z celkového množství C vydýchaného mikroorganismy oproti pouze 24 % ve variantě bez žízal (viz Obr. 9, horní tečkované části sloupců RZ vs R). Lze tedy odhadnout, že hrubá rhizodepozice byla až 1,5x vyšší v půdě s žízalami, což odpovídalo i větší rostlinné biomase

v této variantě, a zároveň to ukazuje, že žížaly díky stimulaci růstu rostlin podpořily i produkci rhizodepozic, na což poukazují i jiné studie (Huang et al., 2015). Vyšší podíl C z rhizodepozice v respiraci (uvedený výše) zároveň ukazuje, že rhizosférické společenstvo s žížalami svou aktivitou více záviselo a více využívalo právě tento dostupný C. Mikrobiální společenstvo v této variantě bylo menší, ale dýchalo srovnatelně jako mikrobiální biomasa v čistě rostlinné variantě, a vykazovalo tak vyšší specifickou aktivitu na jednotku MBC. Pokud uvážím i jeho vysoký obsah MBP (viz Tab. 4), opět to poukazuje na rychlý růst a obrat mikrobiální biomasy, využívající ve větší míře snadno dostupné látky vylučované rostlinou. Předpokládám, že toto mikrobiální společenstvo s rychlým obratem mohlo ve variantě s žížalami sloužit jako jejich potrava, což způsobilo pokles MBC o 18 % oproti čistě rostlinné variantě (viz Tab. 4, RZ vs R) podobně, jako jsem již popsala výše pro varianty bez rostlin. Žížaly si pak nepřímo, přes požírané mikroorganismy (Ostle et al., 2007) či přímou konzumací rhizodepozic (Gilbert et al., 2014; Zheng et al., 2018) nebo mikrobiálních metabolitů z nich (Huang et al., 2015) obohacují svou biomasu o rostlinný C. Na konci mého pokusu obsahovala těla žížal od 0,03 do 0,45 % C z rhizodepozic, což svědčí o tom, že žížaly získávají rostlinný C některým z výše uvedených procesů.

Vliv rostlin na cyklus C v půdách, dále také ovlivnění činností žížal, byl dobře patrný především ve frakci POM. Ačkoli všechny varianty obsahovaly podobné množství POM-C, v přítomnosti rostlin ubylo původního POM-C oproti kontrolní půdě o cca 100-150 mg na rhizobox a nový, rostlinný POM-C celkové množství opět navýšil (viz Obr. 6A). Je tedy zřejmé, že vstup rhizodepozic podpořil rozklad původní POM (viz dále diskuse o priming efektu) a zároveň její množství doplnil, přesněji tedy zvýšil rychlost obratu POM. Předpokládám, že nový POM-C mohl vstupovat do půdy i v partikulované formě jako mrtvé kořenové buňky, ale především k němu asi přispěla nová mikrobiální biomasa narostlá na původní POM, kterou metoda hustotní frakcionace nedokáže oddělit. Přitom ve variantě s žížalami přibýlo nového POM-C více než ve variantě bez žížal (120 vs 50 mg kg⁻¹ nového POM-C, viz Obr. 6A, RZ vs R). Předpokládám, že větší podzemní biomasa rostlin, spojená s větší rhizodepozicí a pravděpodobně i s rychlejším obratem kořenové biomasy (Villarino et al., 2021), rychlejším obratem mikrobiálního společenstva a spolu s možnou konzumací jemných kořínků žížalami (Gilbert et al., 2014), by pak mohly vysvětlit větší akumulaci nového POM-C ve variantě s rostlinami obsahující i žížaly.

Naprostá většina uhlíku, 65-75 %, byla v půdách vázána v MAOM. To odpovídá zjištění Begill et al. (2023), že 72 % celkového C v lučních půdách je ve frakci MAOM, tedy že většina OH je transformovaná a takto stabilizovaná. Stejně jako v případě POM jsem v rhizoboxech s rostlinami byla schopná detekovat rostlinný příspěvek k uhlíku v této frakci, který byl však srovnatelný mezi variantou s žížalami a bez žížal (viz Obr. 6B, RZ vs R). V rostlinné variantě bez žížal (R) tento nový MAOM-C z rostliny vyrovnal mírný úbytek původního MAOM-C oproti kontrolní půdě. To je opět v souladu se studiemi, které ukazují, že rhizodepozice jednak způsobují destabilizaci MAOM (Jilling et al., 2021; Li et al., 2021), ale také přispívají k její tvorbě (Sokol, Kuebbing, et al., 2019; Villarino et al., 2021). Malá, pouze <2% výměna MAOM-C za 56 dní pokusu ukazuje na poměrně pomalý obrat uhlíku v této frakci (Jilling et al., 2018), který by v mém případě odpovídal zhruba 10 letům. Přesnější výsledky o obratu C v jednotlivých frakcích POH by vyšly z porovnání jejich množství na začátku (v původní půdě) a na konci pokusu, které jsem ovšem neprováděla. Mohu tak srovnávat pouze s kontrolní půdou na konci pokusu.

Úbytek původního POM-C i MAOM-C v rostlinných variantách oproti kontrolní půdě ukazoval, že vstup čerstvého substrátu z živých kořenů vyvolal pozitivní rhizosférní priming efekt (Kuzyakov, 2010). Z izotopového signálu C v CO₂ uvolněném z půd s rostlinami jsem spočítala, že rozklad původní POH byl asi o 21-26 % vyšší v porovnání s půdami bez rostlin (viz Obr. 9, šrafované části sloupců R a RZ). Takový priming je poměrně nízký v porovnání s pracemi, kde byla exudace napodobována přidávkou čistých chemikálií do půd (Cheng et al., 2014). Odpovídá ale výsledkům některých předchozích prací s rostlinami, kdy například Kaštovská et al. (2022) ve své studii zaznamenali zrychlení mineralizace POH v přítomnosti rostlin rodu *Carex* a *Glyceria* asi o 9-23 %. Pozitivní rhizosférní PE mohl být způsoben zvýšenou mikrobiální aktivitou nebo přímo působením rhizodepozic na destabilizaci POH (Dijkstra et al., 2021). Pozitivní rhizosférní PE sice způsobuje úbytek původní POH, nicméně dle mých odhadů byly tyto ztráty vybalancovány, ba dokonce převýšeny vstupem rhizodepozic, což podporuje mou hypotézu H3. Odhadla jsem, že se za 56 dní vlivem pozitivního rhizosférního PE mohlo prodýchat okolo 115-120 mg původního C na rhizobox s kukuřicí bez žížal podobně jako s žížalami, což bylo 2-3x méně v porovnání s množstvím nového C na konci pokusu (250-350 mg/kg). Rhizodepozice tedy zvyšují obrat POH, ale doplňují zpět zásoby C v půdách. Je zajímavé, že ačkoli byl v rostlinné variantě s žížalami (RZ) vstup rhizodepozic větší než bez žížal, PE byl v obou variantách srovnatelný. To je v rozporu s druhou částí mé hypotézy H2, kdy jsem předpokládala, že se zvýšenou čistou

rhizodepozicí roste i PE (Kaštovská et al., 2022). Nesouhlasí to ani s výsledky některých studií, které poukázaly na to, že i žížaly mohou zvýšit rozklad POH a způsobit tedy pozitivní PE (Bossuyt et al., 2005; Zhang et al., 2013). Mé výsledky proto poukazují na zvýšenou stabilizaci POH v přítomnosti žížal.

6.5 Stabilizace POH v přítomnosti žížal a rostlin

Jak jsem již zmínila, v přítomnosti žížal docházelo ke snížení mikrobiální biomasy, patrně jejím požíráním a trávením společně s půdou. Přitom právě mikroorganismy zprostředkovávají rozklad, přeměny a mineralizaci POH. Toto snížení bylo vždy spojeno i s poklesem aktivity oxidativních enzymů, ve variantě jen s žížalami i s poklesem hydrolytické aktivity (viz Obr. 10) a s poklesem rychlosti mineralizace původní POH (viz Obr. 9). Také respirace z původní POH vyjádřena na jednotku MBC byla vždy nižší oproti variantám bez žížal. V půdách bez rostlin byl tento pokles výrazný, asi o 12 %, což mohlo být známkou nedostatku čerstvého rostlinného substrátu jako zdroje C a energie. Pozorované snížení mikrobiální biomasy a její rozkladné aktivity může souviset s postupnou rostoucí stabilizací stávající POH spojenou s žížalí aktivitou (Vidal et al., 2019). Aktivita žížal vedla ve shodě s mojí hypotézou H3 k tvorbě stabilnějších agregátů ve srovnání s těmi v kontrolní půdě (1,2x vyšší index WSA, viz Obr. 8, Z vs O), což souhlasí s výsledky předchozích studií Hallam & Hodson (2020) pro endo- a epigeickou žížalu (*A. chlorotica* a *L. rubellus*, respektive) či Bossuyt & Hendrix (2004) pro endogeickou žížalu *A. caliginosa*. Příspěvek žížal ke tvorbě agregátů je patrně významnější v minerálních půdách s nižším množstvím organické hmoty (Hallam & Hodson, 2020), což odpovídá charakteru půdy v mém pokusu. Předpokládám, že právě tato postupná stabilizace organické hmoty uzavřením ve stabilních agregátech, tvořících se v žížalích casts, byla hlavní příčinou nižších celkových ztrát C z původní POH v porovnání s půdami bez žížal (viz Obr. 9, sloupce Z a O).

Samotné rostliny přispěly k tvorbě stabilních agregátů dokonce více než činnost žížal v půdách bez čtvrtého rostlinného vstupu. Půda s rostlinami bez žížal (R) měla 1,4x vyšší index WSA než kontrolní půda (viz Obr. 8, R vs O), což je v souladu s mou hypotézou H3. Podobně i Blanchart et al. (2004) ve svém terénním manipulačním experimentu na pastvinách s rostlinou *Digitaria decumbens* zjistili, že přítomnost rostlin ovlivnila stabilitu agregátů větší měrou než přítomnost žížal. Zatímco předchozí studie ukázaly, že kořeny

mohou půdní agregáty destabilizovat, a zároveň mohou přispívat k jejich tvorbě a stabilizaci (Six et al., 2004; Wang et al., 2020), rostliny v mém pokusu měly jednoznačně pozitivní vliv na stabilitu agregátů.

Nicméně, v souladu s mou hypotézou H3, se nejstabilnější agregáty vytvořily v přítomnosti živých kořenů a žížal zároveň (1,7x vyšší WSA než v kontrole, viz Obr. 8, RZ vs O), což si vysvětlují kombinací jejich pozitivního působení na půdní strukturu. Zároveň došlo, k již zmíněnému snížení aktivity oxidativních enzymů (viz Obr. 10), které rozkládají strukturální látky jako je například lignin (Grandy & Neff, 2008; Hendel et al., 2020). Snížení jejich aktivity, které bylo nejpatrnější právě ve variantě RZ, indikuje zvýšenou stabilizaci organické hmoty, pravděpodobně především POM, která je většinou tvořená z málo rozloženého rostlinného materiálu s velkým podílem strukturálních látek. Zároveň možné požívání jemných kořínků žížalami, průchod střevem a uzavření v casts mohlo přispět i ke stabilizaci nového POM-C v agregátech (Vidal et al., 2019), a přispět tak i k jeho zvýšeného množství v půdě RZ oproti R (viz Obr. 6A). Společná aktivita rostlin a žížal tedy vedla k neefektivnějšímu uzavření POM do stabilních agregátů, což vedlo ke snížení dostupnosti kyslíku a omezení přístupu mikroorganismům k ní (Cotrufo & Lavallee, 2022). Zároveň, ačkoli se celkové množství MAOM-C mezi variantami průkazně nelišilo (viz Obr. 6B), byl na konci experimentu v rhizoboxu s rostlinou a žížalami (RZ) patrný trend zvýšeného množství MAOM-C, tvořeného především původní POH (viz Obr. 6B). Do půdy s žížalami vstupovalo více rhizodepozic a relativně více jich bylo prodýcháváno, fungování tohoto systému bylo tedy založeno hlavně na novém C, zatímco původní POH „se šetřila“. Velmi aktivní mikrobiální biomasa, bohatá na fosfor, zároveň mohla tvořit větší množství nekromasy jak z původní POH (výraznější úbytek POM), tak z nového C, která je důležitá pro tvorbu MAOM. Že je MAOM významně obohacena o mikrobiální nekromasu a další mikrobiálně přeměněné produkty (Cotrufo & Lavallee, 2022; Lavallee et al., 2020) je zřejmé i z nízkého poměru C/N v této frakci. Narozdíl od jen částečně rozložené POM s C/N kolem 24 (viz Tab. 3), což je poměr blízký spíše původní rostlinné biomase, postupný rozklad exoenzymy a následná mikrobiální přeměna OH v půdě vedla k postupnému snižování poměru C/N. Poměr C/N v MAOM v mém případě dosahoval 13 (viz Tab. 3) a přiblížil se tak C/N v mikrobiální biomase, dosahující hodnot 8-11. Podobný C/N poměr 13-15 může mít také MAOM v casts žížal, jak zjistil ve svém pokusu se žížalami a kořenovým opadem Vidal et al. (2019). Mírně menší příspěvek nového C k většímu poolu MAOM-C v této variantě naznačuje také pomalejší obrát celkové MAOM. Vše zmíněné poukazuje ve shodě s mou hypotézou H3 na největší stabilitu POH při

společné aktivitě rostlin a žížal, která zřejmě podporuje lepší fyzikální i chemickou stabilizaci C v půdě.

7 Závěr

Hlavním cílem mé práce bylo zjistit, zda a jak endogeické žížaly druhu *Aporrectodea caliginosa* ovlivňují růst a prvkové složení biomasy rostlin kukuřice *Zea mays* a podmínky v rhizosféře, včetně dostupnosti živin, cyklu uhlíku a jeho stabilizaci v půdě. Výsledky osmítýdenního pokusu prováděného v rhizoboxech ukázaly, že žížaly jednoznačně stimulovaly růst rostlin, a to především díky urychlení recyklace dusíku, který rostliny velmi účinně přijímaly z půdy a zabudovaly do své biomasy. Částečně v rozporu s mou hypotézou H1 však byl fakt, že rostlinná biomasa v přítomnosti žížal byla ochuzena o fosfor, a to kvůli jeho zvýšené imobilizaci v půdní mikrobiální biomase. Aktivita mikroorganismů byla jednoznačně stimulována rostlinnými rhizodepozicemi. Ty jednak tvořily 20-40 % uhlíku vydýchaného mikrobiálním společenstvem a také urychlovaly rozklad původní POH asi o 20 % v porovnání s půdami bez rostlin. Ačkoli větší rostlinná biomasa vytvořená v přítomnosti žížal zajišťovala větší vstup rostlinných rhizodepozic do půdy, priming efekt to nezvýšilo a byl tak velmi podobný v obou rostlinných variantách bez ohledu na přítomnosti žížal, což bylo částečně v rozporu s mou hypotézou H2. Půdní aktivita v rhizoboxu s rostlinou i žížalami byla mnohem více závislá na novém uhlíku z rhizodepozic a méně na mineralizaci původní POH. Velmi aktivní mikrobiální biomasa s rychlým růstem a obratem a pravděpodobně významnou tvorbou nekromasy, společně s aktivitou žížal a kořenů rostlin vedla v souladu s hypotézou H3 k tvorbě nejstabilnějších agregátů a podpoře tvorby MAOM jakožto nejstabilnější frakce POH a zároveň k největší redukci oxidázové aktivity v půdě. Lze tedy shrnout, že v přítomnosti rostlin i žížal došlo k nejefektivnější fyzikální i chemické stabilizaci POH.

Seznam literatury

- Andreola, F., Castellini, E., Manfredini, T., & Romagnoli, M. (2004). The role of sodium hexametaphosphate in the dissolution process of kaolinite and kaolin. *Journal of the European Ceramic Society*, 24(7), 2113–2124. [https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(03\)00366-2](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(03)00366-2)
- Angst, G., Mueller, K. E., Nierop, K. G. J., & Simpson, M. J. (2021). Plant- or microbial-derived? A review on the molecular composition of stabilized soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 156(1), 7-31. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108189>
- Athmann, M., Kautz, T., Banfield, C., Bauke, S., Hoang, D. T. T., Lüsebrink, M., Pausch, J., Amelung, W., Kuzyakov, Y., & Köpke, U. (2017). Six months of *L. terrestris* L. activity in root-formed biopores increases nutrient availability, microbial biomass and enzyme activity. *Applied Soil Ecology*, 120, 135–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.08.015>
- Barois, I., Verdier, B., Kaiser, P., Mariotti, A., Rangel, P., & Lavelle, P. (1987). Influence of the tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae) on the fixation and mineralization of nitrogen (pp. 2: 151-158.).
- Baumert, V. L., Vasilyeva, N. A., Vladimirov, A. A., Meier, I. C., Kögel-Knabner, I., & Mueller, C. W. (2018). Root exudates induce soil macroaggregation facilitated by fungi in subsoil. *Frontiers in Environmental Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00140>
- Begill, N., Don, A., & Poepflau, C. (2023). No detectable upper limit of mineral-associated organic carbon in temperate agricultural soils. *Global Change Biology*, 29(16), 4662–4669. <https://doi.org/10.1111/gcb.16804>
- Björklund, P. A., & Mello, F. V. (2012). *Soil organic matter: Ecology, environmental impact and management*. Nova Science Publishers.
- Blagodatskaya, E. V., Blagodatsky, S. A., Anderson, T. H., & Kuzyakov, Y. (2007). Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies. *Applied Soil Ecology*, 37(1–2), 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.05.002>

- Blanchart, E., Albrecht, A., Chevallier, T., & Hartmann, C. (2004). The respective roles of roots and earthworms in restoring physical properties of Vertisol under a *Digitaria decumbens* pasture (Martinique, WI). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *103*(2), 343–355. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.12.012>
- Bossuyt, H., & Hendrix, P. (2004). Rapid incorporation of carbon from fresh residues into newly formed stable microaggregates within earthworm casts. *European Journal of Soil Science*, *55*(2), 393–399. <https://doi.org/10.1111/j.1351-0754.2004.00603.x>
- Bossuyt, H., Six, J., & Hendrix, P. F. (2005). Protection of soil carbon by microaggregates within earthworm casts. *Soil Biology and Biochemistry*, *37*(2), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.035>
- Bossuyt, H., Six, J., & Hendrix, P. F. (2006). Interactive effects of functionally different earthworm species on aggregation and incorporation and decomposition of newly added residue carbon. *Geoderma*, *130*(1–2), 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.01.005>
- Brookes, P. C., Landman, A., Pruden, G., & Jenkinson, D. S. (1985). Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *17*(6), 837–842. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90144-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90144-0)
- Brookes, P. C., Powlson, D. S., & Jenkinson, D. S. (1982). Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *14*(4), 319–329. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90001-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90001-3)
- Camenzind, T., Mason-Jones, K., Mansour, I., Rillig, M. C., & Lehmann, J. (2023). Formation of necromass-derived soil organic carbon determined by microbial death pathways. *Nature Geoscience*, *16*(2), 115–122. <https://doi.org/10.1038/s41561-022-01100-3>
- Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A., & Wanek, W. (2019). Root exudation of primary metabolites: Mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Frontiers in Plant Science*, *10*(2), 115–122. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00157>

- Cheng, W. (2009). Rhizosphere priming effect: Its functional relationships with microbial turnover, evapotranspiration, and C-N budgets. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1795–1801. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.04.018>
- Cheng, W., Parton, W. J., Gonzalez-Meler, M. A., Phillips, R., Asao, S., McNickle, G. G., Brzostek, E., & Jastrow, J. D. (2014). Synthesis and modeling perspectives of rhizosphere priming. *New Phytologist*, 201(1), 31-44. <https://doi.org/10.1111/nph.12440>
- Cleveland, C. C., & Liptzin, D. (2007). C:N:P stoichiometry in soil: Is there a “Redfield ratio” for the microbial biomass? *Biogeochemistry*, 85(3), 235–252. <https://doi.org/10.1007/s10533-007-9132-0>
- Cotrufo, M. F., & Lavelle, J. M. (2022). Soil organic matter formation, persistence, and functioning: A synthesis of current understanding to inform its conservation and regeneration. In *Advances in Agronomy* (Vol. 172, pp. 1–66). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2021.11.002>
- De Gryze, S., Six, J., & Merckx, R. (2006). Quantifying water-stable soil aggregate turnover and its implication for soil organic matter dynamics in a model study. *European Journal of Soil Science*, 57(5), 693–707. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2005.00760.x>
- De Nobili, M., Bravo, C., & Chen, Y. (2020). The spontaneous secondary synthesis of soil organic matter components: A critical examination of the soil continuum model theory. *Applied Soil Ecology*, 154, 1-66. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103655>
- Devliegher, W., & Verstraete, W. (1995). Lumbricus terrestris in a soil core experiment: nutrient-enrichment processes (nep) and gut-associated processes (gap) and their effect on microbial biomass and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(12), 1573-1580. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00090-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00090-2)
- Dijkstra, F. A., Zhu, B., & Cheng, W. (2021). Root effects on soil organic carbon: a double-edged sword. *New Phytologist*, 230(1), 60-65. <https://doi.org/10.1111/nph.17082>
- Elser, J. J., Sterner, R. W., Gorokhova, E., Fagan, W. F., Markow, T. A., Cotner, J. B., Harrison, J. F., Hobbie, S. E., Odell, G. M., & Weider, L. W. (2000). Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecology Letters*, 3(6), 540–550. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2000.00185.x>

- Francesca Cotrufo, M., Lavelle, J. M., Zhang, Y., Hansen, P. M., Paustian, K. H., Schipanski, M., & Wallenstein, M. D. (2021). In-N-Out: A hierarchical framework to understand and predict soil carbon storage and nitrogen recycling. *Global Change Biology*, 27(19), 4465–4468. <https://doi.org/10.1111/gcb.15782>
- Fraser, P. M., Beare, M. H., Butler, R. C., Harrison-Kirk, T., & Piercy, J. E. (2003). Interactions between earthworms (*Aporrectodea caliginosa*), plants and crop residues for restoring properties of a degraded arable soil. *Pedobiologia*, 47(5-6), 870-876. <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00273>
- Frouz, J. (2018). Effects of soil macro- and mesofauna on litter decomposition and soil organic matter stabilization. *Geoderma*, 332, 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.08.039>
- Gilbert, K. J., Fahey, T. J., Maerz, J. C., Sherman, R. E., Bohlen, P., Dombroskie, J. J., Groffman, P. M., & Yavitt, J. B. (2014). Exploring carbon flow through the root channel in a temperate forest soil food web. *Soil Biology and Biochemistry*, 76, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.05.005>
- Grandy, A. S., & Neff, J. C. (2008). Molecular C dynamics downstream: The biochemical decomposition sequence and its impact on soil organic matter structure and function. *Science of the Total Environment*, 404(2–3), 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.11.013>
- Guhra, T., Stolze, K., Schweizer, S., & Totsche, K. U. (2020). Earthworm mucus contributes to the formation of organo-mineral associations in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 145. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107785>
- Gunina, A., & Kuzyakov, Y. (2022). From energy to (soil organic) matter. *Global Change Biology*, 28(7), 2169–2182. <https://doi.org/10.1111/gcb.16071>
- Haimi, J., Huhta, V., & Boucelham, M. (1992). Growth increase of birch seedlings under the influence of earthworms—a laboratory study. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(12), 1525–1528. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90144-M](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90144-M)
- Hallam, J., & Hodson, M. E. (2020). Impact of different earthworm ecotypes on water stable aggregates and soil water holding capacity. *Biology and Fertility of Soils*, 56(5), 607–617. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01432-5>

- Hartmann, A., Rothballer, M., & Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, *312*(1–2), 7–14. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>
- Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D., & Berg, G. (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*, *321*(1-2), 235-257. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9814-y>
- Haynes, R. J., Fraser, P. M., Piercy, J. E., & Tregurtha, R. J. (2003). Casts of *Aporrectodea caliginosa* (Savigny) and *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister) differ in microbial activity, nutrient availability and aggregate stability. *Pedobiologia*, *47*(5-6), 882-887. <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00275>
- Hendel, B., Sinsabaugh, R. L., & Marxsen, J. (2020). Lignin-Degrading Enzymes: Phenoloxidase and Peroxidase. *Methods to Study Litter Decomposition*, *47*(5-6), 425-431. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30515-4_46
- Hendel, B., Sinsabaugh, R., & Marxsen, J. (2005). *Lignin-Degrading Enzymes: Phenoloxidase and Peroxidase* (pp. 273–277). https://doi.org/10.1007/1-4020-3466-0_37
- Huang, J., Zhang, W., Liu, M., Briones, M. J. I., Eisenhauer, N., Shao, Y., Cai, X., Fu, S., & Xia, H. (2015). Different impacts of native and exotic earthworms on rhizodeposit carbon sequestration in a subtropical soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *90*, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.011>
- Hütsch, B. W., Augustin, J., & Merbach, W. (2002). Plant rhizodeposition - An important source for carbon turnover in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *165*(4), 397–407. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200208\)165:4<397::AID-JPLN397>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200208)165:4<397::AID-JPLN397>3.0.CO;2-C)
- Jackson, R. B., Lajtha, K., Crow, S. E., Hugelius, G., Kramer, M. G., Piñeiro, G., & Piñeiro, P. (2017). The Ecology of Soil Carbon: Pools, Vulnerabilities, and Biotic and Abiotic Controls. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *48*(1), 419-445. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-112414-054234>
- Jilling, A., Keiluweit, M., Contosta, A. R., Frey, S., Schimel, J., Schneck, J., Smith, R. G., Tiemann, L., & Grandy, A. S. (2018). Minerals in the rhizosphere: overlooked

- mediators of soil nitrogen availability to plants and microbes. *Biogeochemistry*, *139*(2), 103–122. <https://doi.org/10.1007/s10533-018-0459-5>
- Jilling, A., Keiluweit, M., Gutknecht, J. L. M., & Grandy, A. S. (2021). Priming mechanisms providing plants and microbes access to mineral-associated organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, *158*. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108265>
- Jobbágy, E. G., & Jackson, R. B. (2000). The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecological Applications*, *10*(2), 423–436. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[0423:TVDOSO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[0423:TVDOSO]2.0.CO;2)
- Jones, D. L., Nguyen, C., & Finlay, R. D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil*, *321*(1-2), 5-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>
- Kaiser, K., & Kalbitz, K. (2012). Cycling downwards - dissolved organic matter in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *52*, 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.04.002>
- Kalbitz, K., Solinger, S., Park, J.-H., Michalzik, B., & Matzner, E. (2000). Controls on the Dynamics of Dissolved Organic Matter in Soils: A Review. *Soil Science*, *165*, 277–304. <https://doi.org/10.1097/00010694-200004000-00001>
- Kaštovská, E., Cardenas-Hernandez, J., & Kuzyakov, Y. (2022). Priming effects in the rhizosphere and root detritosphere of two wet-grassland graminoids. *Plant and Soil*, *472*(1–2), 105–126. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05191-6>
- Kellerová, A., Angst, G., & Jílková, V. (2024). Earthworms facilitate stabilization of both more-available maize biomass and more-recalcitrant maize biochar on mineral particles in an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *189*, 109278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2023.109278>
- Kopáček, J., Borovec, J., Hejzlar, J., & Porcal, P. (2001). Spectrophotometric determination of iron, aluminum, and phosphorus in soil and sediment extracts after their nitric and perchloric acid digestion. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *32*(9–10), 1431–1443. <https://doi.org/10.1081/CSS-100104203>
- Kuzyakov, Y. (2010). Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(9), 1363–1371. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.003>

- Kuzyakov, Y., & Blagodatskaya, E. (2015). Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biology and Biochemistry*, 83(1-2), 184-199. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025>
- Kuzyakov, Y., & Domanski, G. (2000). Carbon input by plants into the soil. Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163(4), 421–431. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200008\)163:4<421::AID-JPLN421>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200008)163:4<421::AID-JPLN421>3.0.CO;2-R)
- Kuzyakov, Y., & Razavi, B. S. (2019). Rhizosphere size and shape: Temporal dynamics and spatial stationarity. *Soil Biology and Biochemistry*, 135(1-2), 343-360. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.05.011>
- Kuzyakov, Y., & Xu, X. (2013). Competition between roots and microorganisms for nitrogen: Mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist*, 198(3), 656-669. <https://doi.org/10.1111/nph.12235>
- Lal, R. (2004). Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science*, 304(5677), 1623-1627. <https://doi.org/10.1126/science.1097396>
- Lavallee, J. M., Soong, J. L., & Cotrufo, M. F. (2020). Conceptualizing soil organic matter into particulate and mineral-associated forms to address global change in the 21st century. *Global Change Biology*, 26(1), 261–273. <https://doi.org/10.1111/gcb.14859>
- Lavelle, P., & Spain, A. (2001). *Soil Ecology*. <https://doi.org/10.1007/0-306-48162-6>
- Lehmann, J., & Kleber, M. (2015). The contentious nature of soil organic matter. *Nature*, 528(7580), 60-68. <https://doi.org/10.1038/nature16069>
- Lei, X., Shen, Y., Zhao, J., Huang, J., Wang, H., Yu, Y., & Xiao, C. (2023). Root Exudates Mediate the Processes of Soil Organic Carbon Input and Efflux. *Plants*, 12(3), 60-68. <https://doi.org/10.3390/plants12030630>
- Li, H., Bolscher, T., Winnick, M., Tfaily, M. M., Cardon, Z. G., & Keiluweit, M. (2021). Simple plant and microbial exudates destabilize mineral-Associated organic matter via multiple pathways. *Environmental Science and Technology*, 55(5), 3389–3398. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04592>
- Lipiec, J., Turski, M., Hajnos, M., & Świeboda, R. (2015). Pore structure, stability and water repellency of earthworm casts and natural aggregates in loess soil. *Geoderma*, 243–244, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.12.026>

- Liu, X. J. A., Finley, B. K., Mau, R. L., Schwartz, E., Dijkstra, P., Bowker, M. A., & Hungate, B. A. (2020). The soil priming effect: Consistent across ecosystems, elusive mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107617>
- Mao, N., Shao, M., Wang, X., & Wei, X. (2023). Earthworms regulate plants' effects on soil microbial nutrient limitations: Examinations with contrasting soils and moisture. *Journal of Environmental Management*, 329. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.117061>
- Marx, M. C., Kandeler, E., Wood, M., Wermbter, N., & Jarvis, S. C. (2005). Exploring the enzymatic landscape: Distribution and kinetics of hydrolytic enzymes in soil particle-size fractions. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(1), 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.05.024>
- Mastný, J., Kaštovská, E., Bárta, J., Chroňáková, A., Borovec, J., Šantrůčková, H., Urbanová, Z., Edwards, R. K., & Pícek, T. (2018). Quality of DOC produced during litter decomposition of peatland plant dominants. *Soil Biology and Biochemistry*, 121, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.03.018>
- McLean, M. A., Migge-Kleian, S., & Parkinson, D. (2006). Earthworm invasions of ecosystems devoid of earthworms: Effects on soil microbes. *Biological Invasions*, 8(6), 1257–1273. <https://doi.org/10.1007/s10530-006-9020-x>
- Miko, L. (2019). *Život v půdě: Vol. 240 p.* Lipka- školské zařízení pro environmentální vzdělávání Brno.
- Miltner, A., Bombach, P., Schmidt-Brücken, B., & Kästner, M. (2012). SOM genesis: Microbial biomass as a significant source. *Biogeochemistry*, 111(1–3), 41–55. <https://doi.org/10.1007/s10533-011-9658-z>
- Moni, C., Derrien, D., Hatton, P. J., Zeller, B., & Kleber, M. (2012). Density fractions versus size separates: Does physical fractionation isolate functional soil compartments? *Biogeosciences*, 9(12), 5181–5197. <https://doi.org/10.5194/bg-9-5181-2012>
- Mummey, D. L., Rillig, M. C., & Six, J. (2006). Endogeic earthworms differentially influence bacterial communities associated with different soil aggregate size fractions. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7), 1608–1614. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.11.014>

- Nardi, S., Panuccio, M. R., Abenavoli, M. R., & Muscolo, A. (1994). Auxin-like effect of humic substances extracted from faeces of *Allolobophora caliginosa* and *A. rosea*. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(10), 1341–1346. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90215-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90215-1)
- Ostle, N., Briones, M. J. I., Ineson, P., Cole, L., Staddon, P., & Sleep, D. (2007). Isotopic detection of recent photosynthate carbon flow into grassland rhizosphere fauna. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(3), 768–777. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.09.025>
- Papadopoulos, A. (2011). Soil Aggregates, Structure, and Stability. In J. Gliński, J. Horabik, & J. Lipiec (Eds.), *Encyclopedia of Agrophysics*, 736-740. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3585-1_142
- Parkin, T. B., & Berry, E. C. (1994). Nitrogen transformations associated with earthworm casts. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(9), 1233-1238. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90148-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90148-1)
- Paul, E. A. (2016). The nature and dynamics of soil organic matter: Plant inputs, microbial transformations, and organic matter stabilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 98(9), 109-126. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.04.001>
- Pausch, J., & Kuzyakov, Y. (2018). Carbon input by roots into the soil: Quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale. *Global Change Biology*, 24(1), 1-12. <https://doi.org/10.1111/gcb.13850>
- Pearce, T. G. (1972). The Calcium Relations of Selected Lumbricidae. *The Journal of Animal Ecology*, 41(1), 1-12. <https://doi.org/10.2307/3511>
- Postma-Blaauw, M. B., Bloem, J., Faber, J. H., van Groenigen, J. W., de Goede, R. G. M., & Brussaard, L. (2006). Earthworm species composition affects the soil bacterial community and net nitrogen mineralization. *Pedobiologia*, 50(3), 243–256. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2006.02.001>
- Qualls, R. G. (2000). Comparison of the behavior of soluble organic and inorganic nutrients in forest soils. *Forest Ecology and Management*, 138(1), 29–50. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00410-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00410-2)

- Rasse, D. P., Rumpel, C., & Dignac, M. F. (2005). Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Plant and Soil*, 269(1–2), 341–356. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0907-y>
- Ros, M. B. H., Hiemstra, T., van Groenigen, J. W., Chareesri, A., & Koopmans, G. F. (2017). Exploring the pathways of earthworm-induced phosphorus availability. *Geoderma*, 303, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.05.012>
- Šantrůček, J., Šantrůčková, H., & et al. (2018). *Stabilní izotopy biogenních prvků. Použití v biologii a ekologii: Vol. 175 p.* Academia.
- Šantrůčková, H., Kaštovská, E., Bárta, J., Miko, L., & Tajovský, K. (2018). *Ekologie půdy. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.* <https://books.google.cz/books?id=MzVLuwEACAAJ>.
- Scharlemann, J. P. W., Tanner, E. V. J., Hiederer, R., & Kapos, V. (2014). Global soil carbon: Understanding and managing the largest terrestrial carbon pool. *Carbon Management*, 5(1), 81–91. <https://doi.org/10.4155/cmt.13.77>
- Scheu, S. (2003). Effects of earthworms on plant growth: patterns and perspectives. *Pedobiologia*, 47(5–6), 846–856. <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00270>
- Shepherd, T., & Davies, H. V. (1993). Carbon Loss from the Roots of Forage Rape (*Brassica napus* L.) Seedlings Following Pulse-labelling with $^{14}\text{CO}_2$. *Annals of Botany*, 72(2), 155–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/anbo.1993.1094>
- Šimek, M., Pižl, V., & Chalupský, J. (1991). The effect of some terrestrial oligochaeta on nitrogenase activity in the soil. *Plant and Soil*, 137(1), 161–165. <https://doi.org/10.1007/BF02187449>
- Šimek, M. (2019). *Živá půda.* Academia.
- Singh, J. S., & Gupta, V. K. (2018). Soil microbial biomass: A key soil driver in management of ecosystem functioning. *Science of the Total Environment*, 634, 497–500. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.373>
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., & Denef, K. (2004). A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research*, 79(1), 7–31. <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.03.008>

- Six, J., Elliott, E. T., & Paustian, K. (2000.). Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(14), 2099-2103. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00179-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00179-6)
- Sokol, N. W., Kuebbing, S. E., Karlsen-Ayala, E., & Bradford, M. A. (2019). Evidence for the primacy of living root inputs, not root or shoot litter, in forming soil organic carbon. *The New Phytologist*, 221(1), 233–246. <https://doi.org/10.1111/nph.15361>
- Sokol, N. W., Sanderman, J., & Bradford, M. A. (2019). Pathways of mineral-associated soil organic matter formation: Integrating the role of plant carbon source, chemistry, and point of entry. *Global Change Biology*, 25(1), 12–24. <https://doi.org/10.1111/gcb.14482>
- Stewart, C. E., Paustian, K., Conant, R. T., Plante, A. F., & Six, J. (2007). Soil carbon saturation: Concept, evidence and evaluation. *Biogeochemistry*, 86(1), 19–31. <https://doi.org/10.1007/s10533-007-9140-0>
- Van Groenigen, J. W., Lubbers, I. M., Vos, H. M. J., Brown, G. G., De Deyn, G. B., & Van Groenigen, K. J. (2014). Earthworms increase plant production: a meta-analysis. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep06365>
- Van Groenigen, J. W., Van Groenigen, K. J., Koopmans, G. F., Stokkermans, L., Vos, H. M. J., & Lubbers, I. M. (2019). How fertile are earthworm casts? A meta-analysis. *Geoderma*, 338(14), 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.11.001>
- Vance, E. D., Brggke~, P. C., & Jenkin~on, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(6), 703-707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Vidal, A., Watteau, F., Remusat, L., Mueller, C. W., Nguyen Tu, T. T., Buegger, F., Derenne, S., & Quenea, K. (2019). Earthworm cast formation and development: A shift from plant litter to mineral associated organic matter. *Frontiers in Environmental Science*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00055>
- Villarino, S. H., Pinto, P., Jackson, R. B., & Piñeiro, G. (2021). Plant rhizodeposition: A key factor for soil organic matter formation in stable fractions. *Science Advances*, 7(16), 703-707. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd3176>
- von Lützow, M., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Flessa, H., Guggenberger, G., Matzner, E., & Marschner, B. (2007). SOM fractionation methods: Relevance to functional pools

- and to stabilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(9), 2183–2207.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.03.007>
- Vos, H. M. J., Ros, M. B. H., Koopmans, G. F., & van Groenigen, J. W. (2014). Do earthworms affect phosphorus availability to grass? A pot experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 79, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.08.018>
- Wang, X., Dijkstra, F. A., Yin, L., Sun, D., & Cheng, W. (2020). Rhizosphere priming effects in soil aggregates with different size classes. *Ecosphere*, 11(2).
<https://doi.org/10.1002/ecs2.3027>
- Weil, R., & Brady, N. (2017). *The Nature and Properties of Soils. 15th edition*. Pearson Education.
- Wiesmeier, M., Urbanski, L., Hobbey, E., Lang, B., von Lützow, M., Marin-Spiotta, E., van Wesemael, B., Rabot, E., Ließ, M., Garcia-Franco, N., Wollschläger, U., Vogel, H. J., & Kögel-Knabner, I. (2019). Soil organic carbon storage as a key function of soils - A review of drivers and indicators at various scales. *Geoderma*, 333, 149-162.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.07.026>
- Wu, F., Wan, J. H. C., Wu, S., & Wong, M. (2012). Effects of earthworms and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on availability of nitrogen, phosphorus, and potassium in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175(3), 423–433.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jpln.201100022>
- Wu, J., Li, H., Zhang, W., Li, F., Huang, J., Mo, Q., & Xia, H. (2017). Contrasting impacts of two subtropical earthworm species on leaf litter carbon sequestration into soil aggregates. *Journal of Soils and Sediments*, 17(6), 1672–1681.
<https://doi.org/10.1007/s11368-017-1657-9>
- Yevdokimov, I., Ruser, R., Buegger, F., Marx, M., & Munch, J. C. (2006). Microbial immobilisation of ¹³C rhizodeposits in rhizosphere and root-free soil under continuous ¹³C labelling of oats. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(6), 1202–1211.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.10.004>
- Zhang, W., Hendrix, P. F., Dame, L. E., Burke, R. A., Wu, J., Neher, D. A., Li, J., Shao, Y., & Fu, S. (2013). Earthworms facilitate carbon sequestration through unequal amplification of carbon stabilization compared with mineralization. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3576>

Zheng, Y., Chen, X., Gong, X., Bonkowski, M., Wang, S., Griffiths, B., Hu, F., & Liu, M. (2020). The geophagous earthworm *Metaphire guillelmi* effects on rhizosphere microbial community structure and functioning vary with plant species. *Geoderma*, 379. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114647>

Zheng, Y., Wang, S., Bonkowski, M., Chen, X., Griffiths, B., Hu, F., & Liu, M. (2018). Litter chemistry influences earthworm effects on soil carbon loss and microbial carbon acquisition. *Soil Biology and Biochemistry*, 123, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.05.012>