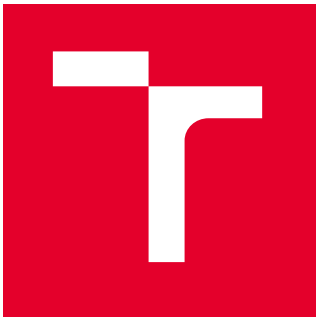
VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2023 Bc. Natálie Štorková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV APLIKACE BIOUHLU NA MIKROBIOLOGICKÉ CHARAKTERISTIKY PŮDY

THE INFLUENCE OF BIOCHAR APPLICATION ON THE MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SOIL

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Bc. Natálie Štorková**
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**
SUPERVISOR

BRNO 2023

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1835/2022	Akademický rok: 2022/23
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Studentka:	**Bc. Natálie Štorková**	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie	
Studijní obor:	bez specializace	
Vedoucí práce:	**Ing. Michal Kalina, Ph.D.**	

Název diplomové práce:

Vliv aplikace biouhlu na mikrobiologické charakteristiky půdy

Zadání diplomové práce:

1) Vypracovat literární rešerši zaměřenou na problematiku studia mikrobiální a enzymatické aktivity půdy a posouzení vlivu aplikace biouhlu na tyto půdní charakteristiky.
2) Na základě literární rešerše zvolit a optimalizovat nastavení jednotlivých laboratorních experimentů umožňující kriticky posoudit vliv aplikace biouhlu na mikrobiální charakteristiky půdy a její enzymatickou aktivitu.
3) Definování vhodného souboru vzorků půd, které byly podrobeny působení biouhlu v delším časovém měřítku (cca 2 roky). Realizace zvolených testů mikrobiální a enzymatické aktivity půd a porovnání získaných výsledků s charakteristikami půd bez přídavku biouhlu.
4) Kritické zhodnocení získaných výsledků a formulace závěrů s ohledem na praktické využití biouhlu jakožto půdního kondicionéru v zemědělství.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Natálie Štorková studentka	Ing. Michal Kalina, Ph.D. vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na posouzení vlivu biouhlu Pflazenkohle aplikovaného do půdy na mikrobiální charakteristiky půdy. Spolu s mikrobiálními vlastnostmi (mikrobiální funkční diverzita, mikrobiální a enzymatická aktivita) bylo v této práci posuzováno také působení biouhlu na fyzikálně-chemické vlastnosti půdy (pH, obsah organické hmoty, obsah organického C a N) a růst rostlin (výška, suchá hmotnost nadzemní a podzemní části). V experimentální části práce byly použity dva typy půd s nízkým obsahem organické hmoty (písčitá aridní půda a arenická černozem) po dvouleté kultivaci s biouhlem v aplikační dávce 0 a 20 $g \cdot kg^{-1}$, jako modelová rostlina byla vybrána kukuřice setá (*Zea mays*). Výsledky pěstebního experimentu ukázaly, že biouhel Pflanzenkohle má potenciál ovlivnit mikrobiální vlastnosti půdy, fyzikálně-chemické vlastnosti půdy a také růst rostlin. Jeho prokazatelné působení na mikrobiální charakteristiky půdy však bylo omezené, zřejmě z důvodu nevhodné aplikační formy biouhlu a nevhodně zvoleného typu použité půdy v rámci pěstebního experimentu. Pro další studium vlivu biouhlu na námi posuzované mikrobiální půdní vlastnosti by bylo vhodné pozměnit nastavení experimentu, aby bylo možné kvantifikovat rozdíly jako statisticky významné.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the effect of Pflazenkohle biochar application into the soil and its corresponding microbial characteristics. Along with microbial characteristics (microbial functional diversity, microbial and enzymatic activity), the effect of biochar on soil physicochemical properties (pH, organic matter content, organic C and N content) and plant growth (height, above and below ground dry weight) was also assessed in this thesis. Two types of soils with low organic matter content (sandy arid soils and arenaceous chernozem) were used for the experiments. These soils were obtained after two years of cultivation with biochar at application doses 0 and 20 $g \cdot kg^{-1}$, maize (Zea mays) was selected as the model plant. The results of the cultivation experiment showed that Pflanzenkohle biochar has the potential to affect soil microbial properties, soil physicochemical properties and also plant growth, but its detectable effects on microbial characteristics of soil were limited. This was probably caused by the inappropriate biochar application form and also by the selection of soil type used for cultivation experiment. To be able to further study the effect of biochar on the soil microbial properties we considered, it would be necessary to modify the setting of cultivation experiments in the way to pronounce the statistically significant differences.

KLÍČOVÁ SLOVA

Biouhel, půda, půdní mikroorganismy, mikrobiální vlastnosti půdy

KEYWORDS:

Biochar, soil, soil microorganisms, soil microbial properties

ŠTORKOVÁ, Natálie. *Vliv aplikace biouhlu na mikrobiologické charakteristiky půdy*. Brno, 2023. Dostupné z: https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148046. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Michal Kalina.

PROHLÁŠENÍ

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

…….

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D. za jeho konzultace, odbornou pomoc a rady, které mi poskytl během psaní diplomové práce. Poděkování patří také Ing. Evě Slaninové, Ph.D. a Ing. Dianě Černayové za cenné rady a pomoc během provádění experimentu. V neposlední řadě velké díky patří mé rodině a přátelům za podporu během celého studia.

OBSAH

1 ÚVOD 7
2 TEORETICKÁ ČÁST 8
2.1 Půda 8
2.1.1 Vznik půdy 8
2.1.2 Degradace půdy 8
2.1.3 Složení půdy 9
2.1.4 Vlastnosti půdy 10
2.1.5 Rhizosféra 10
2.1.6 Půdní organismy 11
2.1.7 Funkce půdy 13
2.2 Půdní mikroorganismy 13
2.2.1 Bakterie 14
2.2.2 Houby 15
2.2.3 Aktinomycety 15
2.3 Mikrobiální indikátory pro sledování kvality půdy 15
2.3.1 Mikrobiální respirace 15
2.3.2 Mikrobiální funkční diverzita 16
2.3.3 Půdní enzymy 16
2.4 Biouhel 18
2.4.1 Vstupní biomasa 18
2.4.2 Termochemické procesy konverze biomasy a výroba biouhlu 19
2.4.3 Elementární složení 21
2.4.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti 21
2.5 Aplikace biouhlu do půdy 22
2.5.1 Vliv na fyzikální a chemické vlastnosti půdy 22
2.5.2 Vliv na půdní biologické vlastnosti 22
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 24
4 CÍL PRÁCE 26
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 27
5.1 Použité chemikálie a materiály 27
5.2 Použité přístroje a pomůcky 27
5.3 Charakteristika použitých půd 28

5.4 Charakteristika použitého biouhlu 28
5.5 Pěstební experimenty 28
5.6 Měření půdních vlastností 29
5.6.1 Termogravimetrická analýza 30
5.6.2 Elementární analýza 30
5.6.3 Měření pH výluhu půdy 30
5.7 Sledování mikrobiální funkční diverzity ve vzorcích půdy 30
5.8 Sledování aktivity fenolytických enzymů 31
5.9 Měření PGPR aktivit 32
5.9.1 Příprava a složení použitých médií 32
5.9.2 Příprava půdních suspenzí a skladování bakteriálních kultur 33
5.9.3 Stanovení produkce indolových sloučenin 34
5.9.4 Stanovení produkce sideroforů 35
5.9.5 Mikrobiální solubilizace fosfátů 35
6 VÝSLEDKY A DISKUZE 36
6.1 Vliv biouhlu na půdní vlastnosti 36
6.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy 36
6.1.2 Biologické vlastnosti půdy 39
6.2 Vliv biouhlu na růst modelové rostliny 44
6.2.1 Aktivita PGPR 44
6.2.2 Růstové charakteristiky rostlin 46
7 ZÁVĚR 49
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 51
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ 62
PŘÍLOHY 63

1 ÚVOD

Půda je nejrozmanitější a nejsložitější systém, který se skládá z milionů hub, miliard bakterií a dalších mikroorganismů. Udržování optimálního stavu půdy je zásadní pro zemědělství. Kvalita půdy je klíčovým faktorem, který odráží produktivitu zemědělských ekosystémů. V současné době jsou však půdní zdroje vážně ohroženy různými antropogenními činnostmi. Mikroorganismy přítomné v půdě hrají důležitou roli v koloběhu živin, stimulují růst rostlin a zvyšují jejich odolnost vůči různým abiotickým (nadbytek či nedostatek chemických a fyzikálních vlivů) a biotickým (vlivem jiných živých organismů) stresům. Intenzivní zemědělské postupy vedou ke zvýšení rostlinné produkce, ale zároveň mají škodlivé účinky na biologické a fyzikální vlastnosti půdy. Vlivem aplikace těchto postupů dochází ke změně rozmanitosti a složení půdních mikrobiomů. Ty nejsou v zemědělských půdách dostatečně stimulovány k činnosti, vzhledem k tomu, že jsou makroživiny často rostlinám poskytovány prostřednictvím chemických hnojiv [1].

Vysoká a stále rostoucí poptávka po udržitelně produkovaných potravinách v současné době vybízí zemědělce a drobné pěstitele k přechodu na udržitelné a ekologické výrobní systémy. Neboť ekologicky šetrné systémy mají potenciál řešit řadu přetrvávajících problémů v zemědělství. Konkrétně se jedná o znečištění způsobené chemickými hnojivy, pesticidy, degradace půdy a ztráta úrodnosti a produktivity půdy. Problémem je také zvýšená salinita půdy, způsobená aplikací hnojiv ve formě solí. Tato hnojiva poskytují živiny rovnou rostlinám a nestimulují tak činnost mikroorganismů, tudíž dochází ke ztrátě biologické aktivity půdy. Jednou ze základních filozofií systémů ekologické produkce je rozvoj kvalitní a produktivní půdy, která poskytuje základní živiny pro růst rostlin, podporuje různorodá aktivní půdní biotická společenstva a vyrovnává celý zemědělský ekosystém. Půdní biologie je přímo spojena s udržitelností zemědělství, protože je hnací silou degradačních procesů, při kterých dochází k rozkladu a přeměně složitých organických molekul a látek na dostupné formy živin pro rostliny. Velká, stabilní a aktivní půdní mikrobiální komunita je základem pro udržení produktivity půdy v zemědělství. K dosažení udržitelného zemědělství pěstitelé přijímají strategie, jako je střídání plodin, aplikace organických látek do půdy, za účelem zlepšení půdní biologie a kvality půdy a zvýšení obsahu půdní organické hmoty [2].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Půda

Jedná se o dynamický, stále se vyvíjející živý systém. Půdu můžeme definovat jako nejsvrchnější část zemské kůry, která vzniká ze zvětralin nebo nezpevněných minerálních a organických sedimentů. Je prostoupena minerálními složkami, odumřelou organickou hmotou, vodou, vzduchem a živými organismy. Tyto složky spolu velmi pomalu a neustále interagují [3, 4].

Půdu považujeme za cenný přírodní zdroj, se kterým je potřeba pečlivě zacházet. Špatné postupy hospodaření mohou vést k degradaci půdy, což může snížit její úrodnost a přímo ovlivnit zemědělství. Jedná se o neobnovitelný zdroj, protože vytvoření 1 cm nové půdy může trvat až stovky let, v závislosti na různých faktorech [5].

2.1.1 Vznik půdy

Půda vzniká působením biologických, klimatických, geologických a topografických vlivů. Půda se tvoří nepřetržitě, ale velmi pomalu, postupným zvětráváním hornin, které může být způsobeno fyzikálními, chemickými nebo biologickými procesy [3]. Vznik půd a jejich vývoj je ovlivněn půdotvornými činiteli. Mezi pět hlavních půdotvorných činitelů patří matečná hornina, živé organismy, klima, topografie a čas. Interakce mezi těmito faktory dávají vzniknout vysoké rozmanitosti půd po celém zemském povrchu [3, 6].

U fyzikálního zvětrávání dochází k rozpadu horniny na menší kousky v důsledku mechanického působení. Děje se tak vlivem teploty, kdy změny teplot vytvářejí tlak v hornině a dochází ke vzniku trhlin [6].

Při chemickém zvětrávání dochází k rozpadu hornin změnou chemického složení, například když minerály v horninách reagují s vodou, vzduchem, nebo s organickými chemikáliemi uvolňovanými vyššími rostlinami a mikroorganismy. Tři hlavní procesy chemického zvětrávání související s vodou jsou hydrolýza, hydratace a rozpouštění [6].

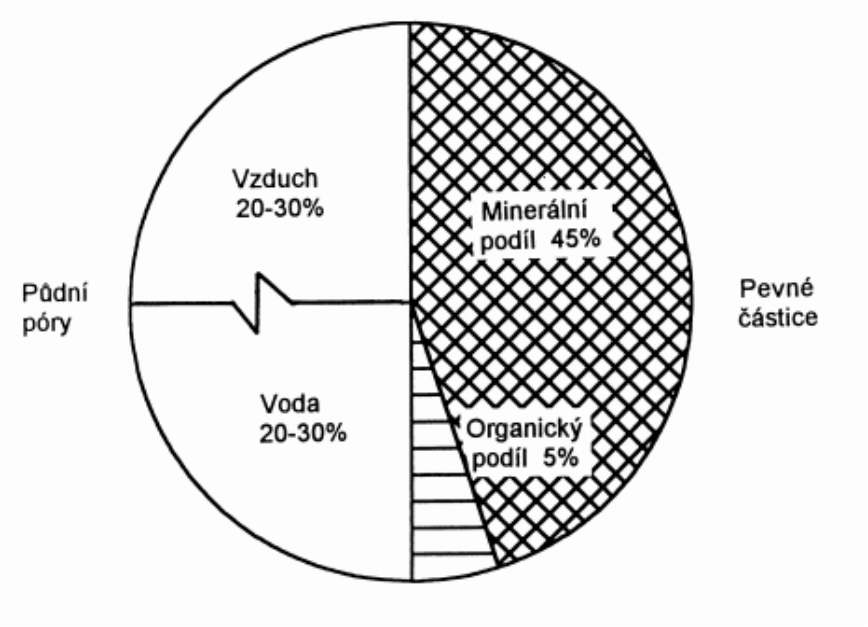
Biologické zvětrávání nastává v přítomnosti živých organismů. Může tak docházet k rozrušování pohybem živočichů v matrici. Dalším případem může být také zvětrávání v důsledku zapouštění kořenů do puklin [6].

2.1.2 Degradace půdy

Degradací se rozumí proces, při kterém dochází ke ztrátě nebo snížení úrodnosti, využitelnosti půdy a snižují se také její ekologické funkce. Nejvýznamnějšími příčinami degradace půdy jsou změna klimatu, využívání půdy a urbanizace. Existují čtyři hlavní typy degradace půdy: vodní eroze, větrná eroze, chemická degradace (acidifikace, kontaminace, zasolování, dehumifikace) a fyzikální eroze (zhutnění, urbanizace, zamokření). Eroze půdy je způsobena aktivitou vody a větru a v důsledku představuje odpoutání a pohyb půdních částic z jednoho místa na druhé. Tento proces může být přirozený, nebo urychlený lidskou činností [7].

2.1.3 Složení půdy

Půda se skládá ze čtyř hlavních složek, uspořádaných v půdním horizontu. Hlavními složkami je voda, vzduch a anorganický a organický podíl (grafické znázornění – Obrázek 1). Složení a podíl těchto složek výrazně ovlivňuje jak fyzikální vlastnosti půd (např. textura, struktura, pórovitost, objemová hmotnost a kompaktnost), tak i chemické vlastnosti (pH, iontově výměnná kapacita, schopnost zadržovat vodu atd.). Z celkového objemu půdy přibližně polovinu zabírá pevná část (anorganický a organický podíl) a druhou polovinu zaujímají póry, které jsou vyplněny vzduchem a vodou. Ačkoliv půdní organická hmota (SOM) tvoří jen relativně malou část půdy, hraje klíčovou roli v mnoha půdních procesech [8].



Obrázek 1: Průměrné zastoupení jednotlivých složek minerální hlinité půdy ve stavu příznivém pro růst rostlin [9].

Půdní organická hmota

Půdní organická hmota (SOM) je část půdy, která se skládá z rostlinných nebo živočišných tkání v různých fázích rozkladu. Většina zemědělských půd má obsah organické hmoty v rozmezí 3–6 %. Organická hmota je velmi důležitou částí půdy a přispívá různými způsoby k její produktivitě. SOM se skládá z různých složek, které lze seskupit do tří hlavních typů [10]:

- rostlinné zbytky a živá mikrobiální biomasa,
- aktivní půdní organická hmota (označovaná jako detritus),
- stabilní půdní organická hmota (označovaná jako humus).

Živá mikrobiální biomasa zahrnuje mikroorganismy zodpovědné za rozklad jak rostlinných zbytků, tak i aktivní organické hmoty. Humus, jakožto stabilní podíl půdní organické hmoty (z rozložených rostlinných a živočišných tkání) je konečným produktem rozkladu. První dva typy organické hmoty přispívají k úrodnosti půdy, protože rozkladem těchto frakcí dochází k uvolňování živin (dusík, fosfor, draslík atd.). Dále organická hmota zlepšuje strukturu půdy a zvyšuje retenční schopnosti půdy [10].

2.1.4 Vlastnosti půdy

Rozmanitost (diverzita) půd, podobně jako diverzita rostlin a živočichů, představuje přírodní bohatství daného území. Vlastnosti půdy jsou určeny složením půdy, v závislosti na různém množství biotických a abiotických složek. Ideální fyzikální a chemické vlastnosti půdy vedou k ideálním biologickým vlastnostem, a tedy i vysoké kvalitě a produktivitě půdy [11].

Fyzikální vlastnosti jako je textura, struktura, objemová hmotnost, pórovitost a stabilita agregátů korelují s hydrologickými procesy (eroze, provzdušňování, kapacita zadržování vody a další). Dále fyzikální vlastnosti zahrnují také barvu a teplotu půdy. Všechny tyto vlastnosti určují vhodnost půdy pro různá využití a mohou být také použity pro definování a klasifikaci půdních typů a horizontů [11, 12]. Jedna z nejdůležitějších půdních charakteristik je struktura půdy, která zahrnuje uspořádání primárních půdních částic (písek, bahno a jíl), a mění se v důsledku působení různých faktorů (zhutňování, vysychání atd.). Podobně jako textura (zrnitost), podmiňuje struktura i další fyzikální vlastnosti jako je pórovitost, objemová hmotnost, infiltrace a retence vody. Protože obsah dostupné vody je faktor určující mikrobiální aktivitu v půdě, jsou fyzikální vlastnosti půdy úzce spjaty také s biologickými vlastnostmi [12].

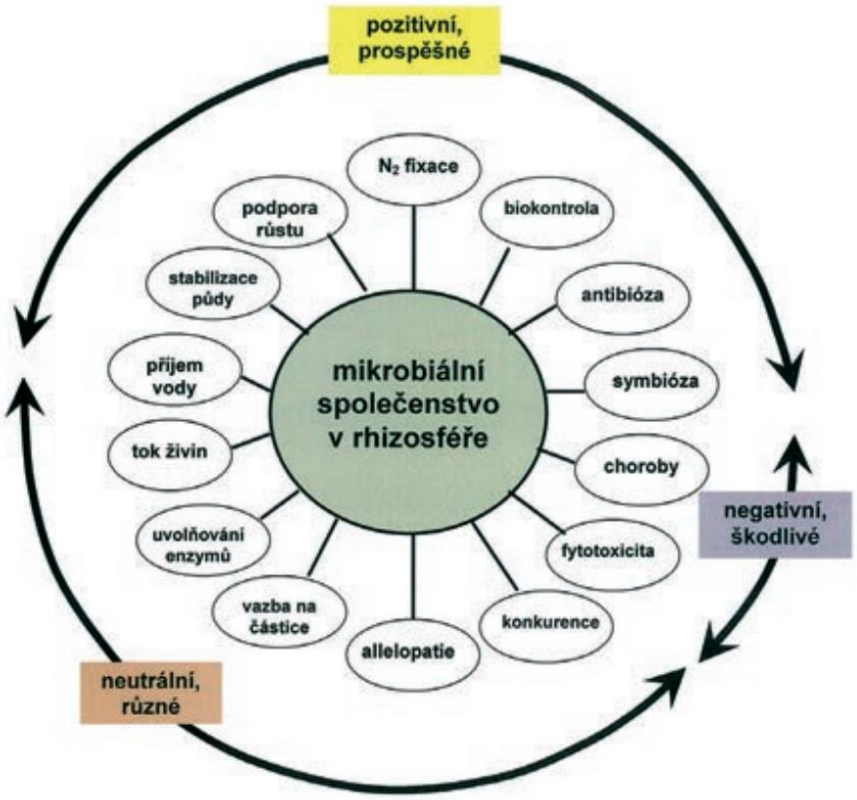
Mezi chemické vlastnosti půdy řadíme pH půdy, kapacitu výměny kationtů, elementární složení, minerální složení, složení půdní organické hmoty, salinitu a elektrickou vodivost. Tyto vlastnosti korelují se schopností poskytovat rostlinám živiny a zadržovat chemické prvky nebo sloučeniny škodlivé pro životní prostředí a růst rostlin. Klíčovým ukazatelem je zde pH půdy, protože ovlivňuje růst rostlin, rozpustnost a dostupnost prvků a složení mikrobiálních společenstev. Jak příliš kyselé, tak i příliš zásadité půdy jsou nepříznivé pro většinu mikroorganismů a také rostlin [13, 14].

Biologické vlastnosti zahrnují charakteristiky společenstev půdních organismů a biologických procesů (např. aktivita půdních enzymů, složení půdního mikrobiomu nebo půdní respirace). Biologické indikátory jsou citlivější než fyzikální a chemické atributy, tudíž pomocí nich můžeme včas reagovat na změny způsobené například špatným hospodařením [14].

2.1.5 Rhizosféra

Jako rhizosféra se obecně označuje část půdy, nacházející se v bezprostřední blízkosti kořenů rostlin. Od okolní půdy se liší zvýšenou mikrobiální aktivitou a zvýšenou koncentrací kořenových exsudátů. Kořenové exsudáty jsou látky vylučované rostlinami a zahrnují například enzymy, vodu, aminokyseliny, nukleotidy, vitamíny, organické kyseliny, sacharidy, fenolické sloučeniny a proteiny. Složení a množství exsudátů se liší v závislosti na mnoha faktorech: druh rostliny, vývojové stádium rostliny, stresové faktory a podmínky prostředí (vlhkost, teplota, pH a textura půdy). Kromě své úlohy ve výživě rostlin mohou kořenové exsudáty ovlivňovat životně důležité procesy v půdě, jako je přeměna organické hmoty, koloběh živin a vývoj stabilní půdní struktury [15, 16]

Biochemické reakce vyvolané mikroorganismy na rozhraní půda–kořen (tj. rhizosféra) hrají důležitou roli v rozkladu organické hmoty a biologické dostupnosti živin pro rostliny [15, 16]. Rhizosférické mikroorganismy tedy úzce souvisí s rostlinami a jejich vývojem. Přehled vzájemného působení mikroorganismů a rostlin je uveden na Obrázku 2.



Obrázek 2: Vzájemné působení rostlin a mikroorganismů v rhizosféře [17].

2.1.6 Půdní organismy

Půda obsahuje obrovské množství rozmanitých živých organismů, které ovlivňují různé ekosystémové procesy. Půdní organismy (edafon) jsou tedy velmi důležitou složkou půdního prostředí a hrají zásadní roli při vývoji a tvorbě půdy. Mezi hlavní funkce, které organismy zajišťují patří [17]:

- rozklad a koloběh organické hmoty,
- regulace dostupnosti a příjmu živin,
- detoxikace půdy,
- udržování struktury půdy a regulace hydrologických procesů,
- výměna plynů a ukládání uhlíku,
- kontrola růstu rostlin,
- kontrola škůdců a chorob.

Edafon tvoří přibližně 10 % půdní organické hmoty, zbylých 90 % sestává z mrtvé organické hmoty a kořenů rostlin [18, 19]. Mezi půdní edafon řadíme například bakterie, houby, žížaly, mravence, členovce, prvoky, hlístice atd. Díky obrovské biologické rozmanitosti je půda považována za největší genový rezervoár na Zemi. Půda bez živých organismů není půdou, ale pouhým substrátem, který by nebyl schopen zajistit prostředí pro vývoj rostlin. Zastoupení jednotlivých skupin půdního edafonu je proměnlivé v závislosti na půdních vlastnostech (Tabulka 1) [20, 21].

Tabulka 1: Orientační hodnoty biomasy půdních organismů v zemědělských půdách [18].

Skupina organismů	Biomasa v $kg \cdot ha^{-1}$
Bakterie a aktinomycety (aktinobakterie)	2 000–10 000
Houby	1 000–10 000
Mikrofauna a mezofauna	300–4 000
Žížaly	300–2 000
Makrofauna a megafauna	100–1 000

Rozdělení půdních organismů

Běžně se edafon dělí na fytoedafon (mikroflóra) a zooedafon (půdní fauna). Mikroflóra představuje asi tři čtvrtiny celkové suché hmotnosti edafonu a půdní fauna tedy pouhou jednu čtvrtinu. Dále lze půdní organismy klasifikovat do skupin na základě různých kritérií [19, 22]:

Trofické vztahy:

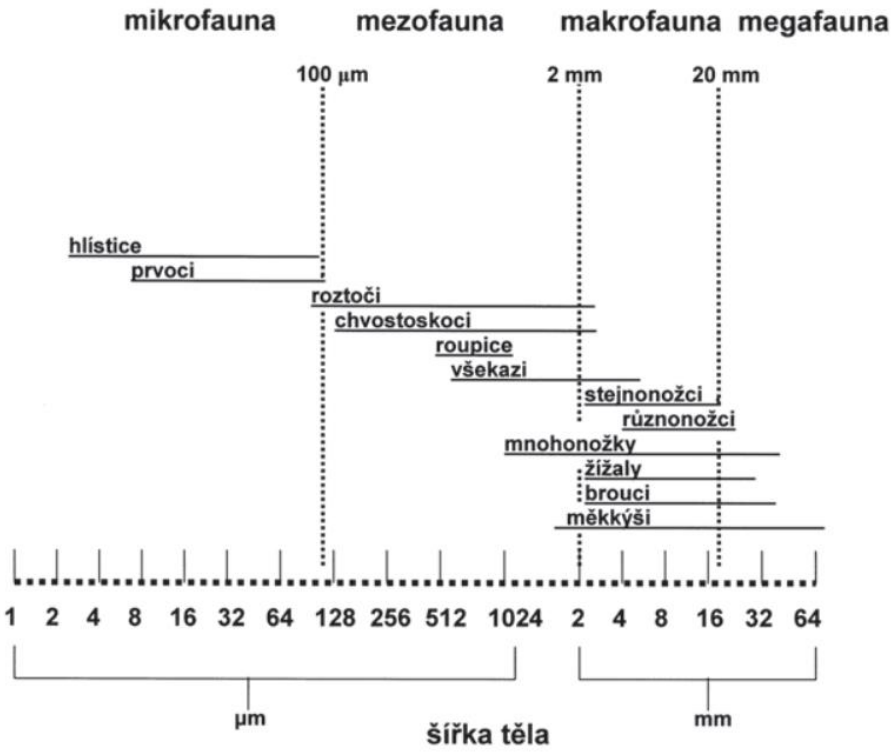
- Autotrofové: organismy schopné přeměny anorganického uhlíku na organický,
- Saprotrofové: organismy živící se odumřelou organickou hmotou,
- Fytofágové: organismy konzumující rostlinnou biomasu,
- Zoofágové: organismy konzumující jiné živočichy.

Velikost (viz. Obrázek 3):

- Mikroedafon (mikroflóra a mikrofauna),
- Mezoedafon (mezofauna),
- Makroedafon (makrofauna a megafauna).

Preferovaná půdní vrstva a životní cyklus:

- Euedafon: organismy stále žijící v půdě, fauna spodních vrstev půdy,
- Hemiedafon: organismy vyskytující se občas v půdě, fauna svrchní vrstvy půdy,
- Protoedafon: organismy žijící v půdě jen určitá vývojová stádia,
- Pseudoedafon: organismy vyskytující se občas v půdě – úkryt, zisk potravy,
- Tychoedafon: organismy vyskytující se v půdě náhodně,
- Epigeon: organismy žijící na půdním povrchu.



Obrázek 3: Rozdělení půdních živočichů podle velikosti (šířky těla) [17].

2.1.7 Funkce půdy

Půda je spojením mezi vzduchem, vodou, horninami a organismy a plní mnoho důležitých funkcí. Mezi nejvýznamnější funkce patří zejména [23, 24]:

- produkce biomasy,
- skladování, filtrování a přeměna živin, látek a vody,
- prostředí pro půdní organismy,
- zdroj surovin,
- zásobárna uhlíku,
- prostředí pro člověka a lidské činnosti.

2.2 Půdní mikroorganismy

Půdní ekosystém skrývá nesčetné množství mikroorganismů. Většina z nich je přítomna v ornici, konktrétně v okolí kořenů rostlin (rhizosféra), kde probíhají nejdůležitější biochemické reakce. Podle hmotnosti a počtu druhů jsou mikroorganismy hlavní složkou edafonu (zaujímají přibližně 75-80 hm.% edafonu). Ačkoliv v porovnání s celkovou hmotností půdy, tvoří jen pouhou tisícinu suché hmotnosti, mají zde nezastupitelnou roli [17]. Účastní se rozkladu organické hmoty, ovlivňují procesy zvětrávání hornin, zadržují v půdě živiny a hrají důležitou roli v koloběhu živin. Dále ovlivňují také fyzikální vlastnosti půdy, například produkcí extracelulárních polysacharidů. Tyto materiály fungují jako pojiva, která stabilizují půdní agregáty, a tím ovlivňují kapacitu zadržování vody, rychlost infiltrace a náchylnost ke zhutnění půdy [25].

Mezi půdní mikroorganismy řadíme bakterie, aktinomycety, houby, řasy, prvoky a viry. V jednom gramu úrodné půdy mohou být až stovky milionů mikroorganismů, z nichž

nejpočetnějšími skupinami jsou bakterie, následované houbami a aktinomycety [26]. Přítomnost mikroorganismů a tím i kvalitu půdy ovlivňuje mnoho parametrů, mezi které řadíme například obsah živin v půdě, teplotu, vlhkost a pH půdy, aktivitu kořenů a půdní strukturu a texturu.

2.2.1 Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné organismy, jedna z nejjednodušších a nejmenších forem života. Půdní bakterie jsou buď autotrofní (získávají energii z oxidace minerálních částí půdy) nebo častěji heterotrofní – získávají energii a uhlík přímo z organické hmoty. Mnoho bakterií je také schopno produkovat spory, jenž slouží k dlouhodobému přežití v nepříznivých podmínkách. Díky své činnosti (rozklad organické hmoty, fixace dusíku atd.), schopnosti přizpůsobovat se prostředí a rychlému dělení jsou bakterie schopny rychle reagovat na změny v půdě [27].

PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

Rhizobakterie podporující růst rostlin (PGPR) jsou skupina bakterií, schopná aktivně kolonizovat kořenový systém rostlin a zlepšit jejich růst, což v důsledku pozitivně ovlivňuje výnos prostřednictvím různých přímých i nepřímých mechanismů. PGPR představují asi 2–5 % ze všech rhizosférických bakterií. Dříve bylo označení PGPR používáno zejména pro fluorescentní pseudomonády, které se podílejí na biologické kontrole patogenů a podporují růst rostlin. Dnes se ale termín PGPR používá k označení všech bakterií, žijících v rhizosféře, které zlepšují růst rostlin prostřednictvím jednoho nebo více mechanismů. Široká škála volně žijících i asociativních a symbiotických druhů rhizobakterií byla hlášena jako PGPR, nejvýznamnějšími rody jsou *Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Pseudomonas* a *Rhizobium* [28].

Podle jejich vztahu k rostlinám lze PGPR rozdělit do dvou skupin: symbiotické bakterie a volně žijící rhizobakterie. Další možností dělení je podle jejich výskytu: extracelulární rhizobakterie podporující růst rostlin (ePGPR) a intracelulární rhizobakterie podporující růst rostlin (iPGPR). iPGPR (tj. symbiotické bakterie) žijí uvnitř rostlinných buněk, kde produkují metabolity a jsou lokalizovány převážně uvnitř specializovaných modulárních struktur kořenových buněk. Zatímco ePGPR (volně žijící rhizobakterie) žijí mimo rostlinné buňky (v prostorech mezi buňkami), ale přesto ovlivňují růst a vývoj rostlin [28, 29].

Na základě zmíněných vlastností mají PGPR potenciál přispět k rozvoji udržitelných zemědělských systémů. Obecně platí, že fungují třemi způsoby: syntéza konkrétní sloučeniny pro rostliny, usnadnění vstřebávání některých živin z půdy, zmírnění nebo prevence onemocnění rostlin. Tyto děje nejsou zcela pochopeny, ale předpokládá se, že podpora růstu je spojena s těmito mechanismy [29]:

- schopnost produkovat životně důležitý enzym, 1-aminocyklopropan-1-karboxylát (ACC) deaminázu ke snížení hladiny ethylenu v kořenech vyvíjejících se rostlin, čímž se zlepšuje růst kořenů,
- schopnost produkovat hormony jako je auxin (tj. kyselina indoloctová – IAA), kyselina abscisová (ABA), kyselina giberolová (GA) a cytokininy,
- fixace dusíku,
- produkce sideroforů, β-1,3-glukanázy, chitináz, antibiotik, fluorescenčního pigmentu a kyanidu, jako antagonismus proti fytopatogenním bakteriím,

- solubilizace a mineralizace živin (zejména fosfátů),
- zvýšená odolnost vůči suchu, salinitě, zamokření a oxidačnímu stresu,
- výroba vitamínů skupiny B rozpustných ve vodě (niacin, kyselina pantothenová, thiamin, riboflavin a biotin).

Způsob, jakým mohou různé PGPR působit na okolí je ovlivněn podle typu hostitelské rostliny (genotyp), vývojového stádia rostlin, obranných mechanismů rostlin a také dalšími členy mikrobiální komunity. Oproti tomu mezi abiotické faktory, které mají vliv na působení PGPR patří složení půdy, hospodaření s půdou a klimatické podmínky [28].

2.2.2 Houby

Hojné zastoupení mezi mikroorganismy mají také houby, které se řadí stejně jako většina bakterií mezi heterotrofní organismy. Nejběžnější skupinou hub jsou plísně, schopné růstu ve všech prostředích (preferují však mírně kyselé prostředí). Houby jsou velmi všestranné ve své schopnosti rozkladu organických zbytků. Rozkládají například celulózu, škrob nebo lignin a jsou obvykle účinnější v porovnání s bakteriemi (do svých těl transformují až 50 % rozložených látek, kdežto bakterie jen cca 20 %). Na rozdíl od bakterií se ale houby nemohou účastnit některých procesů, jako je fixace dusíku nebo oxidace kovů [27].

2.2.3 Aktinomycety

Aktinomycety jsou skupinou bakterií, která svou morfologií připomínají plísně (houby). Řadíme je opět mezi heterotrofní organismy, schopné rozkládat i složitější organické látky jako je například lignin nebo chitin. Nejlépe se aktinomycety vyvíjejí ve vlhké a provzdušněné půdě, jsou ale citlivé na kyselé půdní prostředí. Některé aktinomycety jsou schopny produkovat geosmin (organická sloučenina zemité vůně a chuti) a také antibiotika (například streptomycin), které slouží k potlačení konkurenčních mikroorganismů [27].

2.3 Mikrobiální indikátory pro sledování kvality půdy

Mikroorganismy mají schopnost rychle reagovat na změny prostředí a jeví se tedy jako velmi vhodné a citlivé indikátory včasného varování nebo prediktivní nástroje pro monitorování stavu půdy. Mikrobiální indikátory zdraví půdy zahrnují rozmanitý soubor mikrobiálních měření díky multifunkčním vlastnostem mikrobiálních společenstev v ekosystému.

2.3.1 Mikrobiální respirace

Půdní respirace, což je biologická oxidace organické hmoty na CO_2 aerobními organismy, zaujímá klíčové postavení v koloběhu C a vrací fotosynteticky fixovaný uhlík do atmosféry. Vzhledem k tomu, že půdní respirace pozitivně koreluje s obsahem organické hmoty v půdě, mikrobiální biomasou a mikrobiální aktivitou, využíváme tuto techniku ke kvantifikaci metabolické aktivity půdních mikroorganismů [25].

Měření půdní respirace je jednou z nejstarších, ale stále nejčastěji používaných technik pro kvantifikaci mikrobiálních aktivit v půdě. Stanovení produkce CO_2 z půdních vzorků lze v laboratoři provést jednoduchými a levnými technikami, založenými na alkalických lapačích CO_2 a následné titraci. Další možností stanovení produkce CO_2 je použití sofistikovanějších automatizovaných přístrojů založených na plynové chromatografii nebo infračervené spektroskopii [25].

Nicméně respirace je silně ovlivněna teplotou, vlhkostí a strukturou půdy, kdy předúprava a standardizace půdy před měřením respirace je nezbytná k minimalizaci vlivu těchto proměnných. Z tohoto důvodu se měření respirace provádí převážně v laboratořích a jen velmi málo v terénu [25].

2.3.2 Mikrobiální funkční diverzita

Informace o struktuře a diverzitě společenstva jsou důležité pro pochopení vztahu mezi enviromentálními faktory a funkcemi ekosystému. Měření mikrobiální diverzity je proto doporučeno při monitorování kvality půdy a představuje měření na úrovni komunity [25].

Jednou z možností měření mikrobiální diverzity je fyziologické profilování na úrovni společenství (CLPP). Jedná se o rychlou a relativně levnou techniku, která spojuje mikrobiální funkční rozmanitost v prostoru a čase se změnami prostředí. Kupříkladu destičky Biolog EcoPlates^{TM} byly vyvinuty za účelem analýzy funkční rozmanitosti bakteriálních komunit pomocí měření jejich schopnosti oxidovat uhlíkové substráty [30].

2.3.3 Půdní enzymy

Dostupnost živin a tím i zdraví půdy je ovlivněno přítomností půdních enzymů (složení a množství). Půdní enzymy jsou proteiny, které katalyzují nespočet reakcí v půdách, hrají klíčovou roli v procesech rozkladu organické hmoty a slouží jako bioindikátory biochemické a mikrobiální aktivity [31]. Příklady půdních enzymů a jejich funkce v půdě jsou uvedeny v Tabulce 2.

V závislosti na jejich výskytu mohou být enzymy extracelulární nebo intracelulární. Další možnost klasifikace enzymů v biologických systémech je založena na typu probíhající reakce, a je klasifikována následovně: (1) oxidoreduktázy: oxidace – redukce, (2) transferázy: přenos funkčních skupin, (3) hydrolázy: hydrolýza, (4) lyázy: eliminační reakce, tvorba dvojné vazby nebo adice dvojné vazby, (5) izomerázy: přeskupení uvnitř molekul, (6) ligázy: tvorba vazeb za současného štěpení ATP. Mezi nejčastěji studované půdní enzymy řadíme oxidoreduktázy (zejména dehydrogenázy, katalázy a peroxidázy) a hydrolázy (fosfatáza, ureáza a proteináza). Hlavním zdrojem půdních enzymů jsou mikroorganismy, živočichové a rostliny [32].

Tabulka 2: Významné enzymy v zemědělství a jejich funkce v půdě [33, 34].

Enzym	Funkce v půdě
fenoloxidáza	humifikace organické hmoty
nitrogenáza	fixace vzdušného kyslíku
dehydrogenáza	oxidace organické hmoty
fosfodiesteráza	zpřístupnění fosforu rostlinám
ureáza	zpřístupnění dusíku
amidáza	mineralizace dusíku
peroxidáza	detoxikační funkce
fosfatáza	zpřístupnění fosforu

Jelikož mají enzymy potenciál rychle reagovat na změny životního prostředí, je stanovení enzymové aktivity velmi často využívanou metodou pro charakterizaci biologických vlastností půdy, především její kvality. Měření enzymové aktivity půdy je založeno na detekci degradace substrátů a tvorbě produktů, kde se využívá řady metod, v závislosti na způsobu detekce (spektrofotometrie, fluorescence), reakčních substrátech a podmínkách (teplota, reakční doba, pufry). Enzymový test může být přímý, kdy je substrát přidán do půdy a vytvořený produkt je kvantifikován, nebo nepřímý, kdy je enzym extrahován z půdy a testován až po oddělení. Extrahování půdních enzymů je nevýhodou nepřímé metody, protože některé půdní enzymy jsou vázány na půdní složku, a nejsou tedy extrahovány úplně [31].

Aktivita enzymů je ovlivňována mnoha faktory, mezi které řadíme mikrobiální rozmanitost a biomasu, hydrotermální podmínky, pH, strukturní složení půdy, množství živin, úroveň znečištění a také způsob hospodaření (hnojení, obměna plodin). Nicméně každý enzym má optimální hodnotu pH, při změně pH nad nebo pod hodnotu optima dochází ke snížení enzymové aktivity. Co se týče vlivu teploty, ve většině případů dochází zvyšováním teploty ke zvýšení aktivity enzymů. Enzymy jsou však proteinové molekuly, u kterých vyšší teplota (>50 °C) způsobuje denaturaci, a dochází tak k porušení proteinové struktury enzymu [35].

Dehydrogenázy

Dehydrogenázy se řadí mezi hlavní enzymy oxidoreduktáz, které oxidují organické sloučeniny v půdě přenosem elektronů mezi substráty a akceptory. Tyto enzymy slouží jako ukazatelé mikrobiálního metabolismu a jako indikátory biologické aktivity půd. Jedná se o hlavní skupinu enzymů, jež jsou přítomny uvnitř buněk a nehromadí se mimo buňku [36]. Nejběžnějším laboratorním postupem používaným pro stanovení dehydrogenáz je metoda vyvinutá *Casida a kol.* (1964), která využívá jako substrát trifenyltetrazolium chlorid, jehož redukcí vzniká trifenylformazan, který lze snadno kolorimetricky kvantifikovat [37].

Fosfatázy

Fosfor se nachází v půdě většinou v organické formě, fosfatázy katalyzují hydrolýzu organického fosforu pro zisk anorganické formy, jenž je pro rostliny dostupnější. Fosfatázy hrají tedy důležitou roli v cyklu P a souvisí také se stresem P a růstem rostlin, díky čemuž jsou dobrým ukazatelem úrodnosti půdy. V půdách s nedostatkem fosforu se zvyšuje sekrece kyselé fosfatázy z kořenů rostlin, aby se zvýšila dostupnost fosfátů pro rostliny [36]. Aktivita fosfatáz může být stanovena spektrofotometricky analýzou produkce p-nitrofenolu z p-nitrofenylfosfátu (katalyzovaného fosfatázou) [38].

Ureáza

Jedná se o extracelulární enzym, který katalyzuje hydrolýzu močoviny na NH_3 a CO_2. Ureáza představuje až 63 % celkové enzymové aktivity v půdě a často se využívá jako bioindikátor, kvůli své vysoké citlivosti na změny vyvolané vnějším prostředím [36]. Její aktivita může být stanovena pomocí spektrofotometrického stanovení amoniaku [39].

Fenoloxidázy

Půdní fenoloxidázy jsou enzymy vylučované převážně mikroorganismy, které katalyzují oxidaci aromatických sloučenin (např. lignin), do lépe dostupných substrátů. Tyto enzymy se také podílejí na procesech biodegradace a detoxikace některých aromatických kontaminantů.

Vzhledem k tomu, že jsou fenoloxidázy velmi citlivé na mnoho znečišťujících látek, mohou být použity jako bioindikátory kvality a znečištění půdy. K měření aktivit fenoloxidáz v různých prostředích se nejčastěji používá metoda L-3,4-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA) [40].

2.4 Biouhel

Biouhel může být definován jako zuhelnatěná organická hmota, produkovaná nejčastěji za účelem aplikace do půdy (sekvestrace uhlíku, zlepšení půdních vlastností) [41]. Jedná se o porézní uhlíkatý materiál s vysokým stupněm aromatizace a vysokou odolností proti rozkladu. Biouhel vzniká tepelným rozkladem biomasy za omezeného přístupu kyslíku a pro jeho přípravu lze použít širokou škálu vstupních surovin (zvířecí hnůj, dřevní štěpka, zbytky plodin) [42, 43].

2.4.1 Vstupní biomasa

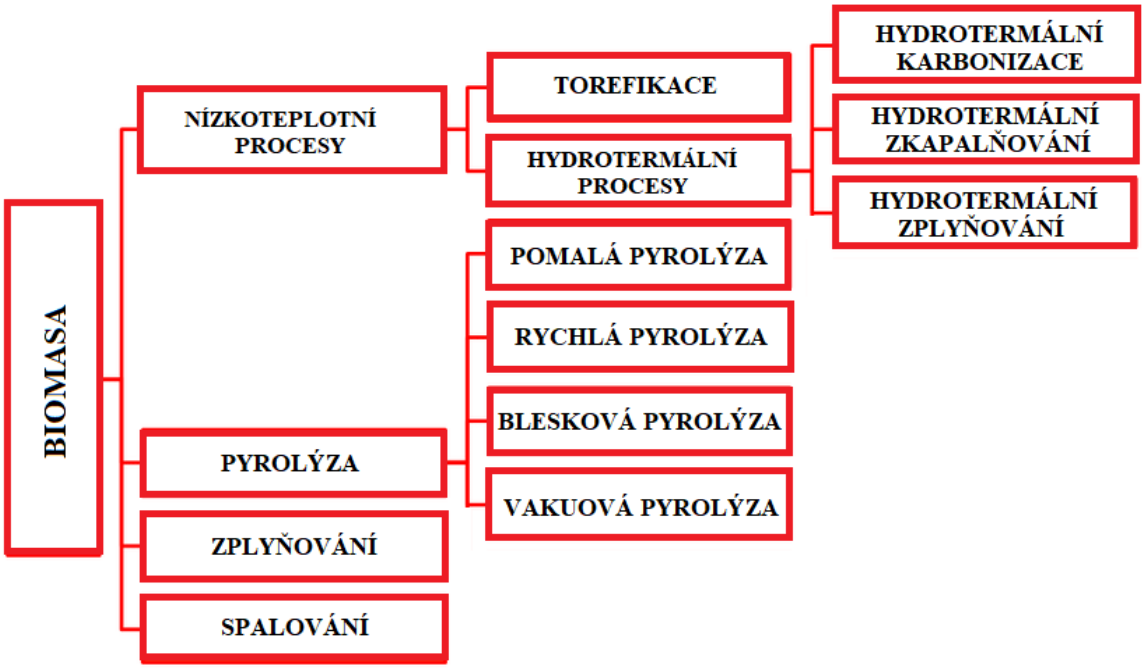
Biomasa se skládá převážně z pěti primárních složek: celulóza, hemicelulóza, lignin, menší množství organických těkavých látek a anorganické minerály [44]. Tyto složky mohou být však přítomny v různých poměrech v návaznosti na typu biomasy a také v závislosti na klimatických podmínkách růstu biomasy. Velká rozmanitost potenciálních surovin umožňuje produkovat biouhly s žádanými vlastnostmi s ohledem na jejich aplikaci [45]. Je prokázáno, že různé vstupní suroviny mohou významně ovlivnit vlastnosti biouhlu (výtěžek, obsah popela, obsah prvků, funkční skupiny, aromaticita, pórovitost, specifický povrch atd.) [46]. Materiály vhodné pro výrobu biouhlu mohou být například zbytky plodin po sklizni, skořápky ořechů, ovocné pecky, bagasa (odpadní materiál z výroby cukrové třtiny), dále potravinářské a lesní odpady nebo různé druhy hnoje. Vstupní biomasa však nesmí obsahovat vyšší množství toxinů, zejména těžké kovy (Cd, Pb, As atd.), které se mohou nacházet v kalech z čistíren odpadních vod nebo v průmyslových odpadech [47]. Při výběru biomasy je důležitá také její vlhkost, kdy biomasa s vysokým obsahem vlhkosti vyžaduje vysoké teploty a energie k její přeměně, což je finančně nákladné [42].

Celulóza, hemicelulóza a lignin mají charakteristické chování při jejich tepelném rozkladu, v závislosti na rychlosti ohřevu. Hemicelulóza se rozkládá nejdříve (220–315 °C), následuje celulóza, jejíž rozklad začíná přibližně při 315 °C. Rozklad ligninu je specifický, začíná už při 160 °C, ale probíhá až do 900 °C (kvůli velkému počtu funkčních skupin s odlišnou tepelnou stabilitou) [45]. Vyšší podíl ligninu v biomase (dřevní štěpka) vede k vyššímu výtěžku biouhlu, zatímco nižší stabilita celulózy a hemicelulózy významně přispívá k výtěžku kondenzovatelných plynů [48]. Je nutno podotknout, že zvířecí hnůj neobsahuje žádné významné množství těchto složek, tudíž biouhel vyrobený z této biomasy musí být posouzen v rámci jiných kritérií [49].

Anorganický obsah biomasy zahrnuje elementární živiny jako je dusík (ve formě dusitanů), fosfor (ve formě fosforečnanů) a draslík, v menší míře také síru, křemík a kovy alkalických zemin. Pokud je vstupním materiálem například hnůj, získáme biouhel s vyšším obsahem živin pro rostliny (vyšší obsah popela) a nižším obsahem uhlíku, naopak je tomu například u dřevní biomasy [45, 48].

2.4.2 Termochemické procesy konverze biomasy a výroba biouhlu

Biouhel se vyrábí termochemickou přeměnou biomasy na pevné (biouhel), kapalné (bioolej) a plynné (syngas) produkty. Výrobní techniky využívané pro zisk biouhlu zahrnují pyrolýzu (pomalá, rychlá, blesková), zplyňování a nízkoteplotní termochemické přeměny (hydrotermální karbonizace a torefikace) [42]. Přehled technik pro přeměnu biomasy znázorněn na Obrázku 4.



Obrázek 4: Technologie termochemické konverze biomasy-upraveno [50].

Zplyňování

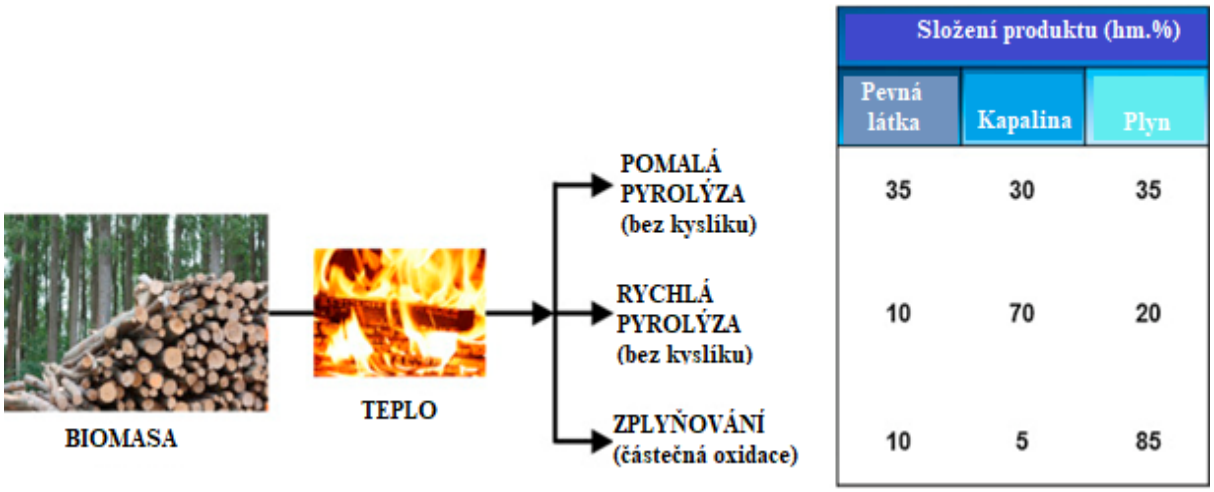
Zplyňování je proces rozkladu biomasy na plynné produkty (syngas), probíhající při teplotách nad 800 °C za přítomnosti činidel (kyslík, vzduch, pára). Celý tento proces zahrnuje několik kroků: sušení, pyrolýza, oxidace/spalování a nakonec zplyňování. Hlavním produktem je syngas, skládající se hlavně z oxidu uhličitého, oxidu uhelnatého, vodíku, methanu a dusíku. Vedlejšími produkty zplyňování jsou kapalné (dehet a olej) a pevné (uhel a popel) látky. Vzhledem k tomu, že zplyňování je zaměřeno na výrobu především plynných produktů, výtěžek biouhlu se pohybuje pouze okolo 5–10 hm.% [51, 52].

Pyrolýza

Jak již bylo uvedeno, nejvhodnější metodou přípravy biouhlu je pyrolýza. Jedná se o termochemický proces, při kterém je vstupní biomasa přeměněna na kapalný, plynný a pevný produkt. Dochází k zahřívání organických materiálů (biomasa) na teploty vyšší než 400 °C v nepřítomnosti kyslíku [53]. Atmosféra bez kyslíku umožňuje zahřát biomasu na teplotu, která je nad mezí termické stability, což vede k tvorbě stabilních produktů a tuhého zbytku. Vytvořením prostředí bez kyslíku je také zajištěno, že při ohřevu biomasy nedojde ke spalování. Pyrolýza se v podstatě skládá ze dvou fází, označovaných jako primární a sekundární fáze. Při primární pyrolýze se biomasa rozštěpí a devolatilizuje na hlavní složky působením tepla. V této fázi se také formují různé karboxylové, karbonylové a hydroxylové skupiny. Proces

devolatilizace zahrnuje hydrataci, dekarboxylaci a hydrogenaci biomasy. Po dokončení primární pyrolýzy začíná sekundární pyrolýza, ve které dochází ke krakování sloučenin s vysokou molekulovou hmotností, jež přeměňují biomasu na pevný produkt (biouhel) nebo plynný produkt (syngas) (CH_4, CO, CO_2 atd.). Některé těkavé biomolekuly znovu kondenzují a vzniká kapalných produkt (bioolej). Výsledné vlastnosti biouhlu (fyzikální, chemické a mechanické vlastnosti) jsou potom funkcí několika parametrů, jako jsou reakční podmínky (reakční teplota, reakční doba, rychlost ohřevu), okolní prostředí (typ nosného plynu, průtok nosného plynu), biomasa (typ biomasy, obsah vlhkosti, velikost částic) a další faktory (katalyzátor, typ reaktoru) [54].

V závislosti na provozních parametrech lze pyrolýzu rozdělit na pomalou, rychlou a bleskovou. Pomalá pyrolýza je konvenčním typem pyrolýzy, vyznačuje se pomalou rychlostí ohřevu (0,1–1 °C za sekundu) a dlouhou dobou zdržení (5–30 minut). Probíhá při teplotách v rozmezí 400–500 °C. Díky těmto podmínkám získáme vyšší výtěžek biouhlu (až 35 hm.%). Při rychlé pyrolýze se biomasa zahřívá na teplotu 850–1250 °C s rychlostí ohřevu 10–200 °C za sekundu po velmi krátkou dobu (1–10 sekund). Dochází ke vzniku obvykle 60–75 % kapalného produktu (bio-olej), 15-25 % pevného produktu (biouhel) a 10–20 % plynných produktů. Tento typ pyrolýzy je využíván za účelem produkce bio-oleje (hmotnostní složení produktů pyrolýzy v závislosti na typu pyrolýzy je znázorněno na Obrázku 5). Bleskovou pyrolýzu lze považovat za modifikovanou formu rychlé pyrolýzy, kdy teploty potřebné pro degradaci složek biomasy dosahují rychlosti zahřívání řádově 1000 °C za sekundu. Teplota pyrolýzy se pohybuje okolo 900–1200 °C a doba zdržení je pouhých 0,1–1 sekund. Tyto podmínky vedou tedy k vysokému výtěžku kapaliny (výtěžnost pevného produktu klesá). Blesková pyrolýza se potýká však s několika problémy, například snížení stability a kvality bio-oleje v důsledku přítomnosti částeček popela a uhlí. Uhlí přítomné v bio-oleji může potom katalyzovat polymeraci v kapalném produktu, čímž dochází ke zvýšení jeho viskozity [54].



Obrázek 5: Srovnání složení produktů pyrolýzy a zplyňování – upraveno [52].

Torefikace

Torefikaci (nízkoteplotní termochemickou přeměnu) lze také označit jako mírnou pyrolýzu. Je to proces, při kterém dochází k odstranění vlhkosti, oxidu uhličitého a kyslíku z biomasy. Přeměna probíhá v inertní atmosféře (bez přístupu kyslíku) při teplotě 200–300 °C, kdy dochází

k depolymerizaci dlouhých polysacharidových řetězců. Torefikace se často využívá jako předúprava ke zlepšení termochemických vlastností biomasy používané pro další zpracování (spalování, zplyňování atd.) [52, 55].

Hydrotermální procesy

Existuje spousta vstupních surovin, které mají vysoký obsah vlhkosti a musí být před samostatným procesem pyrolýzy sušeny, což je nákladově nevýhodné. Hydrotermální karbonizace se tedy jeví jako slibná technika přeměny biomasy bez nutnosti sušení [56]. Jedná se o nízkoteplotní termochemický proces probíhající při teplotách 180–250 °C, kde je produktem hydrouhel (uhel vzniklý mokrou cestou). Stejně jako v případě pyrolýzy, vstupní biomasa, reakční teplota a reakční doba hrají důležitou roli při definování vlastností hydrouhlu [57]. Hydrouhel, bohatý na uhlík, může být použit jako: palivo, vstupní surovina pro zkapalňování, adsorbent nebo půdní přísada pro obohacení půdy živinami [58].

Hydrotermální procesy zahrnují mimo hydrotermální karbonizaci také hydrotermální zkapalňování a zplyňování. Zkapalňování probíhá při teplotě 250–400 °C za vzniku bio-oleje a produktem zplyňování jsou syntetické plyny (CO, CO_2, H_2 a CH_4) vznikající při teplotě nad 400 °C [51].

2.4.3 Elementární složení

Jelikož se biouhly vyrábějí z biomasy, očekává se, že budou mít vysoký obsah uhlíku a budou obsahovat řadu rostlinných makroživin (N, P, K, S, Ca a Mg) a mikroživin (Mn, Zn, Cu, Fe, B, Mo, Cl, Si). Jak již bylo uvedeno, složení biouhlu závisí na povaze vstupních surovin a provozních podmínkách pyrolýzy, a tedy je obtížné jej jednoznačně definovat [59]. V porovnání se vstupní biomasou lze obecně říct, že ve většině případů obsah uhlíku v biouhlu se zvýšil, kdežto například u kyslíku a vodíku došlo k poklesu koncentrace těchto prvků (ve srovnání se vstupní biomasou). U dusíku lze pozorovat mírný nárůst koncentrace, taktéž v porovnání s původní biomasou [49]. Dle provedených průzkumů, v biohlu se obsah uhlíku pohybuje mezi 17–90 hm.%, dále dusík se zde vyskytuje v rozmezí 0,18–5,6 hm.% a například draslík je v biouhlu zastoupen z 0,1–5,8 hm.% [59]. Obsah vodíku se pohybuje mezi 1–5 hm.% a kyslík v rozmezí 0,01–39,2 % [60, 61].

2.4.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Vlastnosti biouhlu jsou výsledkem použitých vstupních surovin a také podmínek přípravy, kdy největší vliv má teplota. Fyzikálně-chemické vlastnosti (CEC, specifický povrch, hodnota pH, pórovitost atd.) nelze tedy jednoznačně definovat. Provedené studie však ukazují trendy, díky nimž je možné konstatovat, že CEC (kationtová výměnná kapacita), obsah těkavých látek a počet kyselých funkčních skupin klesají s rostoucí teplotou pyrolýzy. Naopak hodnota pH, specifický povrch pórovitost a obsah uhlíku se s rostoucí teplotou zvyšují. Ztráta funkčních skupin a zvýšení pórovitosti jsou velmi důležitými vlastnostmi biouhlu, protože ztráta funkčních skupin má vliv například na zvyšování hodnoty pH a také na hydrofobnost biouhlu. Pórovitost zase ovlivňuje vlastnosti jako jsou hustota, CEC, mechanická stabilita a schopnost zadržovat vodu. Co se týče vstupních surovin, důležitými parametry, jež ovlivňují výsledné vlastnosti jsou vlhkost biomasy a obsah ligninu a celulózy ve vstupní biomase [49, 62]. Klíčové vlastnosti a jejich význam jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 3).

Tabulka 3: Souhrn vlastností biouhlu a jejich význam [49, 63].

Fyzikálně-chemické vlastnosti	Význam
Specifický povrch	Specifický povrch indikuje větší adsorpční kapacitu a schopnost biouhlu zadržovat vodu.
Pórovitost	Pórovitost spolu se specifickým povrchem ovlivňují interakci biouhlu s okolním prostředím a použití biouhlu jako sorbentu.
Objem pórů a distribuce velikosti pórů	Objem pórů a distribuce velikosti pórů významně ovlivňují hydrofobní charakter a schopnost zadržovat vodu.
Hustota	Nízká hustota a vysoká pórovitost znamenají nízkou hmotnost na jednotku objemu. Sypká hustota je důležitá pro přepravu a manipulaci.
Hodnota pH	Indikátor zásaditosti (nebo kyselosti biouhlu. Vlastnost důležitá pro aplikaci do půdy.
Obsah těkavých látek	Obsah těkavých látek odráží labilní frakci biouhlu.
Obsah a složení popela	Obsah určitý anorganických prvků (Ca a K) v biouhlu je důležitý pro využití v zemědělství (zvyšování kvality půdy).
Kationtová výměnná kapacita	Ukazatel vlivu biouhlu na úrodnost půdy.
Hydrofobnost a schopnost zadržovat vodu	Indikátor schopnosti zadržovat vodu a snižovat vodní stres rostlin.
Povrchové funkční skupiny	Typ a množství funkčních skupin ovlivňuje zásaditost biouhlu, schopnost neutralizovat kyseliny v půdě.
Stabilita	Indikace vzpurnosti biouhlu při určité aplikaci (sekvestrace uhlíku) za různých podmínek, v časovém měřítku.

2.5 Aplikace biouhlu do půdy

Nejčastěji nachází biouhel využití v agronomických aplikacích, kde slouží jako půdní kondicionér a zlepšuje fyzikálně-chemické vlastnosti půdy a její úrodnost.

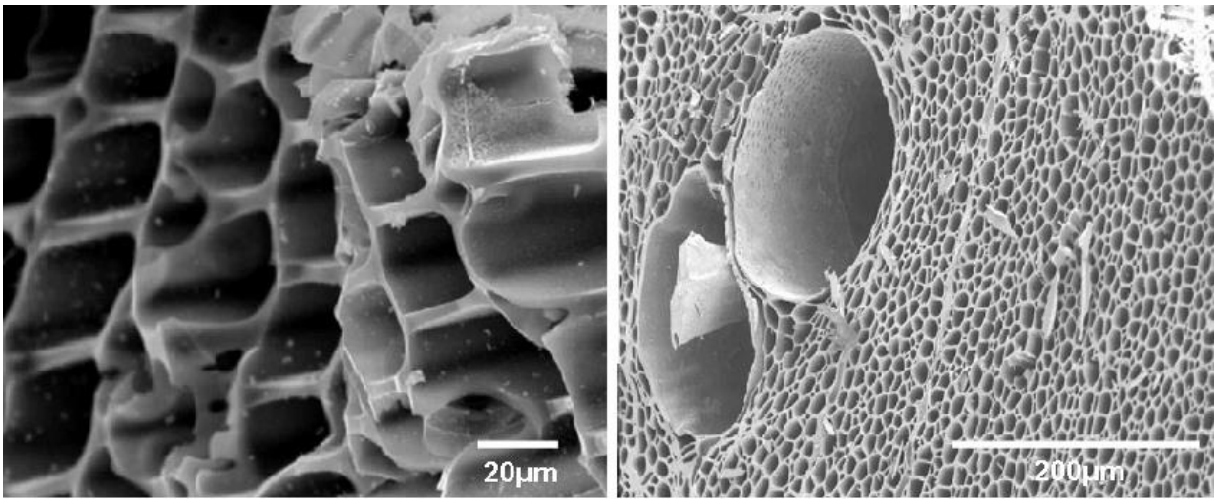
2.5.1 Vliv na fyzikální a chemické vlastnosti půdy

Obecně platí, že po aplikaci biouhlu do půdy dochází ke zlepšení fyzikálních a chemických vlastností půdy (pH, živiny, kapacita výměny kationtů atd). Některé provedené studie uvádějí, že biouhel v půdě zvyšuje pórovitost půdy, snižuje její objemovou hmotnost a zlepšuje agregaci a zadržování vody. V několika případech bylo také prokázáno zlepšení vodní retence půd po aplikaci biouhlu, a to díky jeho vysoké porozitě. Dále biouhel snižuje kyselost půd (díky jeho alkalické povaze), má pozitivní vliv na kapacitu výměny kationtů (CEC) a elektrickou vodivost půdy [43]. Aplikace biouhlu do půdy může v neposlední řadě výrazně zvýšit dostupnost hlavních kationtů (K, Mg, Ca, Mn, Zn, Cu), které jsou nezbytné pro růst rostlin. Je však nutné podotknout, že nadměrné množství biouhlu přidaného do půdy může mít i nepříznivé účinky na fyzikální a chemické vlastnosti a tím může být negativně ovlivněn růst rostlin [64].

2.5.2 Vliv na půdní biologické vlastnosti

Účinky biouhlu na fyzikálně-chemické vlastnosti půdy přímo nebo nepřímo ovlivňují půdní mikrobiální aktivitu. Vysoce aromatická uhlovodíková struktura a povrchové vlastnosti biouhlu se stávají stanovištěm pro půdní mikroorganismy (řasy, bakterie, houby) a poskytují živiny pro mikrobiální růst.

Většina provedených studií prokázala, že přídavek biouhlu mění diverzitu půdních mikroorganismů. Na jedné straně je toto zjištění přičítáno skutečnosti, že povrch biouhlu obsahuje částečně rozpustné zdroje uhlíku a dusíku, které přispívají k mikrobiální aktivitě. Na druhé straně mají póry biouhlu značnou variabilitu. Struktura pórů a velký specifický povrch mohou ukládat vodu a živiny a stát se tak mikroprostředím, kde mohou mikroorganismy žít (Obrázek 6). Přidání biouhlu tak ovlivňuje změny biomu a cirkulaci půdní organické hmoty [64].



Obrázek 6: Porézní struktura biouhlu – vhodné prostředí pro mikrobiální kolonizaci [65].

Co se týče půdních enzymů, jejich aktivita byla po přidání biouhlu do půdy v mnoha případech zvýšena. Úloha biouhlu související s aktivitou půdních enzymů je složitá, protože biouhel může přímo i nepřímo měnit kinetiku půdních enzymů modifikací fyzikálně-chemických vlastností (obzvláště porozita a hodnota pH). Mezi faktory, jež aktivitu půdních enzymů ovlivňují řadíme typ biouhlu (vstupní suroviny, teplota pyrolýzy), typ půdy a skupiny enzymů, které jsou v půdě přítomny [66].

Závěrem lze říct, že porézní struktura biouhlu poskytuje prostředí půdním mikroorganismům, zlepšuje biologickou aktivitu a diverzitu půdy a podporuje tvorbu půdních agregátů. Zvýšení bakteriální aktivity, zejména bakterií fixujících dusík, je prospěšné také pro chemickou aktivitu půdy. Tak jako u fyzikálních a chemických vlastností půdy, i zde platí, že ne vždy přidání biouhlu podpoří zvýšení půdní mikrobiální biomasy a celkově zlepší biologické vlastnosti půdy [64].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Vzhledem ke stále rostoucí populaci a rychlému vyčerpávání organické hmoty a živin z půdy je udržení zemědělské produktivity celosvětovou výzvou. Je třeba najít vhodné, a především udržitelné postupy, jak zlepšit úrodnost, produktivitu a biochemickou kvalitu půdy. V tomto ohledu se stále častěji setkáváme s využitím biouhlu jako půdního kondicionéru. Jak již bylo zmíněno v předešlých kapitolách, biouhel přidaný do půdy zlepšuje fyzikální, chemické a biologické vlastnosti půdy a tím zvyšuje její úrodnost a produktivitu. Zejména v delším časovém horizontu zvyšuje biouhel agregaci půdy, zadržování vody, pH a mikrobiální aktivitu, čímž zlepšuje celkovou kvalitu půdy a potenciálně pomáhá snižovat potřebu chemických hnojiv.

Během posledních 15–20 let bylo provedeno nespočet studií zaměřujících se právě na aplikaci biouhlu do půdy. Rozmanitost experimentů a lokalit popsaných v publikované literatuře však ztěžuje shrnutí účinků na půdní biomasu a vyvození jednoznačných závěrů. V mnoha případech jsou výsledky experimentů protichůdné a zaměřují se pouze na jeden faktor více faktorového systému. Již vícekrát v této práci bylo zmíněno, že rozsah účinků biouhlu se liší v závislosti na vlastnostech půdy, podmínkách prostředí, typu biouhlu, aplikační dávce biouhlu a mnoha dalších biotických a abiotických faktorech. Tento fakt je tedy potřeba vzít v úvahu při hodnocení vlivu biouhlu na půdní charakteristiky a celkovou kvalitu půdy.

Doposud mnoho studií prokázalo, že biouhel aplikovaný do půdy působí příznivě na růst a produktivitu rostlin. *Uzoma a kol.* [67] zkoumali vliv přídavku biouhlu na produktivitu kukuřice seté (*Zea mays*) v písčité půdě. K experimentu použili biouhel vyrobený z kravského hnoje v aplikačních dávkách 0, 10, 15 a 20 $t \cdot ha^{-1}$. Během kultivace zaznamenávali výšku rostlin a počet listů v různých stádiích růstu (6, 15, 24, 38, 48, 55 a 85 dní po vyklíčení). Po ukončení a vyhodnocení experimentu došli k závěrům, že aplikace biouhlu do půdy zlepšila fyzikálně-chemické vlastnosti půdy (hydraulická vodivost, pH, celkový C, celkový N) a také zvýšila růst a výnos rostlin (ve srovnání s kontrolou: 0 $t \cdot ha^{-1}$). Významné pozitivní účinky biohlu na celkovou výšku rostlin a počet listů byly pozorovány v různých stádiích růstu, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo s přídavkem biouhlu v aplikační dávce 15 $t \cdot ha^{-1}$. Posouzením vlivu biouhlu na půdní vlastnosti a růst rostlin kukuřice seté se zabývali také *Tanure a kol.* [68] a *Syuhada a kol.* [69], v obou případech došlo po aplikaci biouhlu (v různých aplikačních dávkách) v kombinaci s anorganickým hnojivem NPK ke zlepšení úrodnosti půdy a podpoření růstu rostlin.

V systému půda – rostlina jsou posuzovány především mikrobiologické vlastnosti rhizosféry. Studiem působení biouhlu na půdní mikroflóru se při polních pokusech zabývali *Halmi a kol.* [70], kteří biouhel aplikovali do půdy v dávce 20 $t \cdot ha^{-1}$. Posuzovanými parametry tohoto experimentu byly fyzikálně-chemické vlastnosti půdy (pH, CEC, organický C), mikrobiální biomasa (C, N) a aktivita sedmi enzymů (celuláza, endoglukanáza, β-glukosidáza, xylanáza, invertáza, fenoloxidáza a peroxidáza). Výsledky studie ukázaly, že biouhel aplikovaný do půdy měl pozitivní účinky na fyzikálně-chemické vlastnosti půdy (zvýšení obsahu organického C, pH, CEC) a podpořil její mikrobiální hojnost. Co se týče aktivity enzymů, ve srovnání s kontrolní půdou byly v půdách ošetřených biouhlem pozorovány významné změny aktivity (zvýšení aktivity) u β-glukosidázy, xylanázy a invertázy. Aktivita celulázy, endoglukanázy

a lignolytických enzymů (fenoloxidáza a peroxidáza) nebyla po přídavku biouhlu nijak významně ovlivněna. Aktivitu půdních enzymů v půdách s přídavkem biouhlu sledovali také *Jabborova a kol*. [71], kteří k tomu použili biouhel, pocházející z dřevní biomasy, ve čtyřech aplikačních dávkách (0 hm.%, 1 hm.%, 2 hm.% a 3 hm.%). Experiment byl prováděn v laboratorních podmínkách v květináčích po dobu 35 dní. Po ošetření půdy biouhlem (2 hm.%) se významně zvýšila aktivita fosfatázy oproti kontrole (0 hm.%). Dále byla u aplikačních dávek 2 a 3 hm.% zvýšená aktivita hydrolázy a také aktivita fenoloxidázy (až o téměř 50 %). Vliv biouhlu na změnu biologických vlastností a stav živin v půdě posuzovali také *Karimi a kol.* [72], kteří použili biouhel vyrobený z kukuřičných zbytků při různých teplotách (200, 350 a 500 °C), jenž byl aplikován do půdy v množství 1 hm.% a 2 hm.%. Výsledky ukázaly, že nejvhodnější variantou za podmínek tohoto experimentu se zdá být biouhel vyrobený při 200 °C, protože došlo k nejvýraznějšímu zvýšení CEC půdy, organického C, dostupnosti mikronutrientů, mikrobiální biomasy a aktivity katalázy a dehydrogenázy.

V současné době je také značná pozornost věnována kombinaci biouhlu s rhizobakteriemi podporujícími růst rostlin. Souběžná aplikace PGPR a biouhlu nabízí udržitelnou, nákladově efektivní a ekologickou techniku pro zvýšení produktivity plodin a zlepšení kvality půdy. Dokonce i za normálních podmínek může tato kombinace působit synergicky na zlepšení půdních vlastností, a snížit tak potřebu chemických hnojiv [73, 74, 75]. Například *Ullah a kol.* [76] provedli studii za účelem posouzení integrovaného účinku biouhlu a PGPR na růst a fyziologii kukuřice při různých deficitních zavlažováních. Výsledky ukázaly, že jak růst, tak fyziologie rostlin kukuřice byly silně ovlivněny závlahovými podmínkami. Bylo zjištěno, že přidání biouhlu a PGPR společně mělo ve srovnání s jejich samotnou aplikací synergický vliv nejen na růst a fyziologii kukuřice (hodnocena byla výška rostlin, plocha listů, počet listů, čerstvá a suchá hmotnost výhonků a kořenů), ale také na zlepšení chemických vlastností půdy (obsah organické hmoty, dostupnost živin NPK). K podobným závěrům dospěli také *Ahmad a kol*. [77], kteří hodnotili vliv biouhlu v kombinaci s PGPR na růst kukuřice seté a biologické vlastnosti alkalické půdy. Tato studie potvrdila, že integrované použití biouhlu spolu s PGPR zvýšilo obsah půdní organické hmoty a pozitivně ovlivnilo růst rostlin (výška rostlin, výnos a kvalita plodin). Zatímco *Wang a kol.* [78] se zaměřili na vliv biouhlu aplikovaného s PGPR na složení půdních mikrobiálních společenstev. Jejich studie ukázala, že biouhel v kombinaci s PGPR významně zvyšuje diverzitu mikrobiální komunity a také aktivitu půdních enzymů. U řady provedených experimentů byl potvrzen pozitivní vliv biouhlu a PGPR při aplikaci do půdy, k prozkoumání potenciálu kombinované aplikace PGPR a biouhlu pro udržitelné zlepšení kvality půdy a zemědělské produktivity je však zapotřebí dalších studií.

4 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je posoudit, zda má biouhel přidávaný do půdy vliv na vybrané mikrobiologické charakteristiky půdy, a tím i na její vitalitu a úrodnost. Je potřeba v první řadě na základě literární rešerše zvolit a také optimalizovat techniky potřebné pro posouzení vlivu aplikace biouhlu na již zmiňované mikrobiologické půdní charakteristiky. Dále je nutné definovat vhodný soubor vzorků (biouhel, půda), jež byly vystaveny působení biouhlu a hlavní částí práce je samotná realizace zvolených testů mikrobiální a enzymatické aktivity, zpracování výsledků, kritické hodnocení naměřených a zpracovaných dat a také formulace závěrů s ohledem na základní fyzikálně-chemické charakteristiky modelové půdy a její úrodnost během realizovaného pěstebního experimentu.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie a materiály

- 3,4-dihydroxy-L-fenylalanin (L-DOPA) (Sigma-Aldrich, CAS: 59-92-7),
- 3-indoloctová kyselina (Sigma-Aldrich, CAS: 87-51-4),
- Agar Powder (Himedia, CAS: 9002-18-0),
- Bromthymolová modř (Sigma-Aldrich, CAS: 76-59-5),
- Cetrimoniumbromid (Sigma-Aldrich, CAS: 57-09-0),
- Dihydrát chloridu vápenatého (Penta, CAS: 10035-04-8),
- Dihydrát molybdenanu sodného (Sigma-Aldrich, CAS: 10102-40-6),
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, CAS: 7778-77-0),
- Fosforečnan vápenatý (Sigma-Aldrich, CAS: 7758-87-4),
- Glukóza (Lach-Ner, CAS: 50-99-7),
- Glycerol (Penta, CAS: 56-81-5),
- Heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner, CAS: 10034-99-8),
- Hexahydrát chloridu hořečnatého (Panta, CAS: 7791-18-6),
- Hexahydrát chloridu železitého (Sigma-Aldrich, CAS: 10025-77-1),
- Hydrogenfosforečnan didraselný (Lach-Ner, CAS: 7758-11-4),
- Hydrogenfosforečnan disodný (Sigma-Aldrich, CAS: 7558-79-4),
- Hydroxid draselný (Penta, CAS: 1310-58-3),
- Hydroxid sodný (Penta, CAS: 1310-73-2),
- Chlorid draselný (Lach-Ner, CAS: 7447-40-7),
- Chlorid sodný (Lach-Ner, CAS: 7647-14-5),
- Chrome azurol S (Sigma-Aldrich, CAS: 1667-99-8),
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, CAS: 7647-01-0),
- Kyselina octová (Lach-Ner, CAS: 64-19-7),
- Kyselina sírová (Lach-Ner, CAS: 7664-93-9),
- L-tryptofan (Sigma-Aldrich, CAS: 73-22-3),
- Peptone (Himedia, CAS: 91079-40-2),
- Peroxid vodíku (Penta, CAS: 7722-84-1),
- Piperazin bezvodý (Sigma-Aldrich, CAS: 110-85-0),
- Sacharóza (Penta, CAS: 57-50-1),
- Síran amonný (Sigma-Aldrich, CAS: 7783-20-2),
- Yeast extrack powder (Himedia, CAS: 8013-01-2).

Všechny použité chemikálie v této práci byly čistoty p.a. a větší.

5.2 Použité přístroje a pomůcky

- Váhy, d=0,01 g, (MERCI, s.r.o.),
- Váhy, d=0,0001 g, (Pioneer),
- Thermo – Hydro metr (VERK, Digitální teploměr HTC–2),
- pH metr (METTER TOLEDO, S47 SevenMulti),
- Kultivační box (Probox BASIC 80, 80×80×160 cm),
- Manuální spínací hodiny (Elektrobock ZS10)
- Osvitové lampy (Viparspectra V900 Reflector, Viparspectra V300 Reflector),
- Květináče (Toku květináč 1500 ml, zakoupeno: Speciální zahradnictví–Radek Tichý),

- ELISA Synergy HTX multimode reader (Bio Tek),
- Magnetická míchačka (Kartell, TKO),
- Centrifuga (Boeco),
- Centrifuga (Hettich),
- Laminární box Aura mini (BioAir instrument),
- Vortex (Benchmark),
- Temperovaná třepačka Heidolph (Labicom),
- Temperovaný biologický inkubátor (Binder),
- Spektrometr UV-VIS (Unicam),
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky.

5.3 Charakteristika použitých půd

Pro tento experiment byly použity dva druhy půd, které mají v porovnání s půdami v České republice nižší obsah organické hmoty (pod 2,5 hm.%). Jedná se o běžné půdní typy vyskytující se na území České republiky. Prvním typem je písčitá aridní půda (regozem), odebraná v lokalitě Hodonín-Pánov (48.878150°N, 17.132275°E). Druhá půda je arenická černozem z oblasti Žabčice u Brna (49.006433°N, 16.591367°E). Vzorky těchto půd byly odebrány 28. 5. 2020, ze svrchní vrstvy půdy a posloužily jako zdrojové matrice pro realizaci dlouhodobých kultivačních experimentů (viz. kapitola 5.5).

5.4 Charakteristika použitého biouhlu

Na základě předchozích kultivačních experimentů v rámci pracoviště byl pro posouzení dlouhodobého působení biouhlu na fyzikálně-chemické a mikrobiologické charakteristiky půdy vybrán biouhel Pflanzenkohle (Sonnenerde GmbH). Jedná se o vzorek biouhlu s evropským certifikátem EBC (European Biochar Certificate) pro využití v zemědělství. Použitý biouhel byl vyroben z obilných slupek, slunečnicových slupek a ovocných kalů, kdy pyrolýza probíhala 20 minut při teplotě max. 650 °C.

Do půdy byl biouhel aplikován uvnitř semipermeabilních pytlíčků z polypropylenové tkaniny (propustné pro vodu a látky rozpuštěné ve vodě) v dávce 20 g biouhlu na 1 kg půdy.

5.5 Pěstební experimenty

První cyklus kultivace rostlin proběhl již v rámci bakalářské práce [79], kdy bylo do všech květináčů naváženo 1000 g půdy, přidáno doporučené množství perlitu (250 ml) a také biouhel v aplikační dávce 20 g (kontrolní půdy byly bez biouhlu). Na základě literární rešerše tato dávka (20 $g \cdot kg^{-1}$) představuje konvenční dávku biouhlu využívanou pro aplikaci v zemědělství. Jako modelová rostlina byla na základě literární rešerše zvolena kukuřice setá (*Zea mays*). Kultivace probíhala v pěstebním boxu s osvitovými lampami. Lampy byly vybaveny automatickým spínačem a každý den se zapnuly v 6:15 a vypnuly v 18:30 (tyto hodnoty představují průměrnou dobu východu a západu slunce v České republice). Zavlažování probíhalo třikrát týdně odstátou kohoutkovou vodou. Při tomto nastavení probíhala řízená kultivace po dobu vegetačního cyklu růstu rostlin (cca 3 měsíce). Bližší detaily nastavení experimentu je možné nalézt v rámci předchozí bakalářské práce [79]. Následně byl v rámci pracoviště tento proces opakován na stejných vzorcích půd v opakovaných kultivačních cyklech kukuřice seté po celkovou dobu experimentu v délce 2 roky.

Pro účely posouzení vlivu biouhlu na vybrané mikrobiální charakteristiky půd v rámci této diplomové práce byly využity vzorky půd získané po dlouhodobém pěstebním experimentu (popsaném výše). Na těchto vzorcích půd byly realizovány krátkodobé kultivace (po dobu 24 dní), aby bylo možné získat půdu z okolí jednotlivých rostlin.

K zahájení experimentu bylo nutné nejdříve vyloupat z klasu kukuřice seté jednotlivá semínka (Obrázek 7 – vlevo), zabalit je do papírového ubrousku a vložit do kádinky s vodou, aby došlo k jejich naklíčení. Jak je vidět na Obrázku 7 – vpravo, po pěti dnech byla jednotlivá semínka kukuřice seté vyklíčena a mohla být zasazena do připravených květináčů. Po zasazení naklíčených rostlin byly květináče přesunuty do pěstebního boxu, kultivace probíhala stejným způsobem popsaným výše (osvit, závlaha, kontrola teploty a vlhkosti) po dobu 24 dní. Měření výšky rostlin proběhlo pouze třikrát (10., 15. a 24. den od začátku kultivace). Následně byly rostliny vyjmuty z půdy, přebytečná půda byla odstraněna a pro další analýzy byla odebrána pouze půda, která ulpěla na kořenech.

Obrázek 7: Vlevo – vyloupaná semínka kukuřice, vpravo – naklíčená semínka kukuřice (po 5 dnech).

Pro vyhodnocení vlivu biouhlu na růst rostlin byly jednotlivé rostliny vyjmuté z půdy sušeny na vzduchu až do konstantní hmotnosti (po dobu dvou týdnů). Rostliny byly poté separovány na nadzemní a podzemní část, kdy z nadzemní části byly odseparovány ještě klasy. Jednotlivé části byly zváženy na analytických vahách. Vážila se vždy podzemní část (kořen), nadzemní část i s klasem a poté samostatně pouze klas.

5.6 Měření půdních vlastností

Pro posouzení vlivu biouhlu na fyzikálně-chemické půdní charakteristiky byla využita termogravimetrická analýza, elementární analýza a měření pH výluhu ze vzorků půd. Stanovení vlastností jednotlivých půd proběhlo po odběru půdy (před aplikací biouhlu) a poté po dvouleté kultivaci (s biouhlem). Tato měření proběhla v rámci souběžného experimentu v rámci pracoviště a pro účely této diplomové práce slouží jako doplňkové parametry, se kterými jsou získané mikrobiální charakteristiky porovnávány. Před samotnou charakterizací byly vzorky půd nejprve předsušeny při 50 °C (v sušárně) po dobu 2 dnů.

5.6.1 Termogravimetrická analýza

Obsah vlhkosti, organické hmoty a popela (anorganické hmoty) ve vzorcích půdy a v biouhlu byl stanoven pomocí termogravimetrické analýzy (TGA) na termogravimetrickém analyzátoru Q5000. Do platinové misky bylo naváženo přibližně 5 mg vzorku půdy. Během analýzy byla kontinuálně měřena zbytková hmotnost při zahřívání s rychlostí zahřívání 10 °C/min z laboratorní teploty na teplotu 800 °C ve vzdušné atmosféře. Obsah vlhkosti půdy byl stanoven jako rozdíl hmotností při 105 °C, rozdíl hmotností v rozmezí 105 °C a 800 °C odpovídá obsahu organické hmoty a zbytková hmotnost při 800 °C byla přiřazena obsahu popela.

5.6.2 Elementární analýza

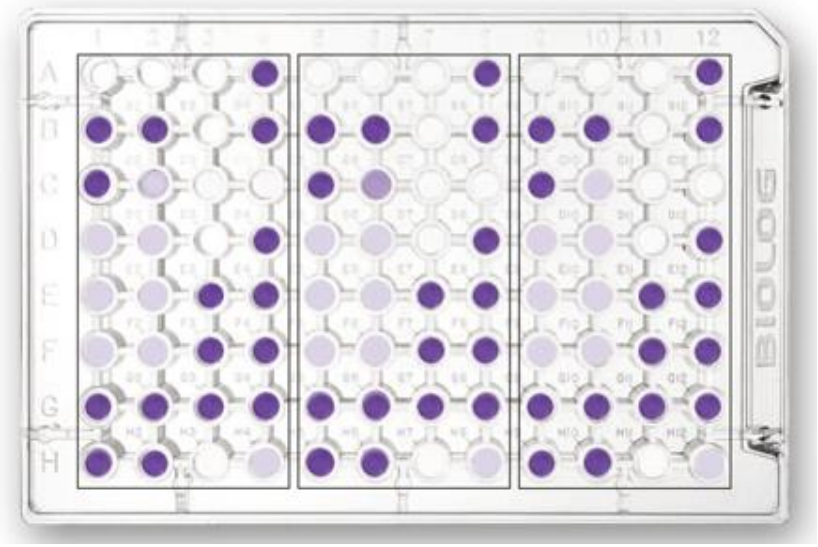
Relativní obsah organických prvků ve vzorcích půdy a v biouhlu byl charakterizován pomocí analyzátoru EA 3000. Pro účely analýzy bylo naváženo 0,5–1 mg vzorku do kapsle a zabaleno. Analýza byla provedena spalováním připravených kapslí se vzorky při 980 °C v analyzátoru s použitím kyslíku jako spalovacího plynu a helia jako nosného plynu. Kalibrace stanovení relativních obsahů uhlíku (C), vodíku (H), dusíku (N) byla provedena pomocí sulfanilamidu jako standartního vzorku.

5.6.3 Měření pH výluhu půdy

Pro účely měření pH půdy byl 1 g půdy dispergován v 10 ml demineralizované vody. Po hodině dispergace na třepačce se změřilo pH přímo v půdní suspenzi.

5.7 Sledování mikrobiální funkční diverzity ve vzorcích půdy

Pro posouzení vlivu biouhlu na mikrobiální charakteristiky půdy byla nejprve využita metoda stanovení funkční diverzity pomocí mikrotitračních destiček Biolog EcoPlates™ (Obrázek 8). Každá mikrotitrační destička obsahuje 96 jamek (31 uhlíkových zdrojů v triplikátech a 3 kontrolní jamky). Uhlíkové substráty sestávají z uhlovodíků (n = 10), karboxylových kyselin (n = 9), aminů a amidů (n = 2), aminokyselin (n = 6) a polymerů (n = 4). Rozložení uhlíkových substrátů na destičce je uvedeno v příloze (Tabulka 8). Jednotlivé jamky obsahují redoxní barvivo (tetrazoliová fialová), jež slouží jako indikátor utilizace uhlíkových zdrojů mikroorganismy.



Obrázek 8: Mikrotitrační destička Biolog EcoPlates™ [80].

Pro charakterizaci každého vzorku půdy byl 1 g půdy převeden do Erlenmeyerovy baňky obsahující 9 ml sterilního 0,85% fyziologického roztoku (NaCl). Vzorky byly vloženy na 30 minut na třepačku (150 rpm, laboratorní teplota), poté byla půdní suspenze zředěna 100krát 0,85% roztokem chloridu sodného. Nakonec byl každý vzorek (120 µl) napipetován na destičku Biolog Ecoplates (do jamek A1, A5 a A9 byla napipetována destilovaná voda – kontrolní jamky). Mikrotitrační destička byla poté inkubována ve tmě při laboratorní teplotě a průběžně (dvakrát denně, po dobu 4 dní) se měřila optická hustota jednotlivých jamek při vlnové délce 590 nm na přístroji ELISA. První spektrofotometrické měření proběhlo ihned po naplnění destičky vzorky.

Celková míra využití substrátu mikroorganismy byla zjištěna vypočítáním průměrného vývoje barvy jamky (AWCD) podle Rovnice 1.

$$AWCD = \sum \frac{(c_i - R)}{31} \quad (1)$$

V Rovnici 1 je c_i optická hustota v každé jamce obsahující uhlíkový zdroj a R je optická hustota kontrolní jamky.

Mikrobiální funkční rozmanitost byla hodnocena pomocí indexu bohatosti (počet jamek s OD>0,15) a Shannonova indexu diverzity H' (Rovnice 2).

$$H' = -\sum p_i \cdot ln\, p_i \quad (2)$$

Pro p_i (z Rovnice 2) platí:

$$p_i = \frac{OD_i}{\sum OD_i} \quad (3)$$

5.8 Sledování aktivity fenolytických enzymů

Testy aktivity půdních oxidáz jsou založeny na oxidaci substrátu za vzniku spektrofotometricky kvantifikovatelných produktů. V našem případě byla aktivita fenoloxidáz měřena za použití L-3,4-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA) jako substrátu. Za přítomnosti peroxidu vodíku lze stanovit stejným způsobem aktivitu peroxidáz (aktivita peroxidáz se určí odečtením aktivity fenoloxidáz).

Suspenze půdy pro fenoloxidázový a peroxidázový test byla připravena přidáním 1 g půdy do 50 ml připraveného acetátového pufru (50 mM, pH = 5) a zhomogenizována ve vortexu. Dále byly do 5 ml zkumavek napipetovány 2 ml připravené půdní suspenze a 2 ml L-DOPA (5 mM) ve čtyřech opakováních pro stanovení fenoloxidáz, a navíc 0,2 ml 0,3% peroxidu vodíku pro stanovení aktivity peroxidáz. Jako blank byla použita směs půdní suspenze a acetátového pufru (2 opakování), kdy v případě peroxidáz bylo přidáno opět 0,2 ml peroxidu vodíku. Všechny vzorky byly promíchány pomocí vortexu a vloženy do stojánku, kde byly inkubovány 60 minut při laboratorní teplotě. Po hodině byly vzorky odstředěny v centrifuze (1 min, 3000 g) a z odebraného supernatantu byla změřena absorbance při vlnové délce 460 nm. Aktivita enzymů byla vypočtena dle následujících rovnic (Rovnice 4 a Rovnice 5) [81]:

a) Aktivita fenoloxidáz:

$$A\ (PheOx) = Abs_{460} \cdot k^{-1} \cdot T^{-1} \cdot OMC^{-1}\ [\mu mol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}] \quad (4)$$

Abs_{460} rozdíl absorbance vzorku a absorbance kontroly při 460 nm

k molární absorpční koeficient, který je 1,66 pro L-DOPA (v podmínkách tohoto měření)

T inkubační doba, h

OMC koncentrace organické hmoty, g organické hmoty na ml homogenátu

b) Aktivita peroxidáz

$$A\ (PerOx) = [Abs_{460} \cdot k^{-1} \cdot T^{-1} \cdot OMC^{-1}] - A(PheOx)\ [\mu mol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}] \quad (5)$$

Abs_{460} rozdíl absorbance vzorku a absorbance kontroly při 460 nm

k molární absorpční koeficient, který je 1,66 pro L-DOPA (v podmínkách tohoto měření)

T inkubační doba, h

OMC koncentrace organické hmoty, g organické hmoty na ml homogenátu

5.9 Měření PGPR aktivit

Volně žijící půdní bakterie prospěšné pro růst rostlin, označované jako rhizobakterie podporující růst rostlin (PGPR), jsou schopny podporovat růst rostlin kolonizací kořene rostlin. Pomocí tří testů zjistíme, zda biouhel přidaný do půdy má schopnost ovlivnit aktivitu těchto rhizobakterií.

5.9.1 Příprava a složení použitých médií

V této části je uvedena příprava a složení použitých médií a roztoků. Pro experimenty byla použita destilovaná voda.

Roztok Chrom azurolu S (CAS):

1. Příprava CAS **roztoku 1**: bylo smícháno 13,5 ml $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ a 41 µl HCl a doplněno destilovanou vodou na objem 50 ml.
2. Příprava CAS **roztoku 2**: bylo smícháno 121 mg CAS s vodou a doplněno vodou na výsledný objem 100 ml.
3. Příprava CAS **roztoku 3**: bylo smícháno 364,45 mg CTAB (Cetrimoniumbromid) s vodou a doplněno na objem 100 ml.
4. Příprava CAS **roztoku 4**: k 4,307 g bezvodého piperazinu v kádince byla pomalu přidávána HCl až do pH 5,6.
5. Do 50 ml destilované vody bylo přidáno (v tomto pořadí): 1,5 ml **roztoku 1**, 7,5 ml **roztoku 2,** 6 ml **roztoku 3** a 6,25 ml **roztoku 4** a doplněno vodou na výsledný objem 100 ml. Roztok CAS byl připraven těsně před použitím.

Kapalné King B médium:

- 15 g glycerol,
- 20 g pepton,
- 1,15 g K_2HPO_4,
- 1,50 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
- doplnit vodou na 1 litr a médium vysterilovat

Polotuhé LGI-P médium:

- 100 g sacharóza,
- 0,2 g K_2HPO_4,
- 0,6 g KH_2PO_4,
- 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
- 0,01 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$,
- 0,02 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,
- 0,002 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$,
- 5 ml bromthymolová modř,
- kyselina octová (úprava pH na 5,5),
- 1,8 g agarový prášek,
- doplnit vodou na 1 litr a médium vysterilovat.

Pevné CAS médium:

- 3 g glycerol,
- 4 g pepton,
- 0,25 g K_2HPO_4,
- 0,3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
- NaOH (úprava pH na 6,8),
- 15 g agarového prášku,
- doplnit vodou na 900 ml a médium vysterilovat.

Po vysterilování bylo do vychladlého média (50 °C) opatrně přidáno 100 ml připraveného roztoku CAS a posléze bylo médium smícháno.

Pevné NBRIP médium:

- 10 g glukózy,
- 5 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$,
- 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
- 0,2 g KCl,
- 0,1 g $(NH_4)_2SO_4$,
- 15 g agarového prášku,
- doplnit vodou na 1 litr a médium vysterilovat.

Salkowského činidlo:

V digestoři bylo k 2,4 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ pomalu přidáno 84,2 ml H_2SO_4 a doplněno vodou na objem 200 ml.

5.9.2 Příprava půdních suspenzí a skladování bakteriálních kultur

Do Erlenmeyerovy baňky (100 ml) bylo naváženo vždy 10 g půdy a přidáno 90 ml 0,85% fyziologického roztoku (NaCl). Takto připravená suspenze se nechala inkubovat 16 hodin na třepačce (170 ot./min.) při teplotě 4 °C.

Po inkubaci se z počáteční půdní suspenze (10^0) připravila sériová ředění (10^{-1}–10^{-3}) v duplikátech. Ředění byla připravena následovně:

- dvě zkumavky 10^{-1}: 1 ml suspenze (10^0) + 9 ml fyziologického roztoku,
- dvě zkumavky 10^{-2}: 1 ml suspenze (10^{-1}) + 9 ml fyziologického roztoku,
- dvě zkumavky 10^{-3}: 1 ml suspenze (10^{-2}) + 9 ml fyziologického roztoku.

Připravené počáteční suspenze a jejich ředění byly naočkovány do sterilního polotuhého LGI-P média. Pomocí automatické pipety bylo v duplikátech do polotuhého média napipetováno 100 µl počátečních suspenzí a jejich ředění. Zkumavky byly uzavřeny a inkubovány 5 dní v termostatu při 30 °C.

Část bakteriálních kultur jednotlivých ředění, které byly kultivovány na polotuhém LGI-P médiu byly ve sterilním laminárním boxu napipetovány ke sterilnímu glycerolu (1 : 1) v kryogenních zkumavkách. Zkumavky byly uzavřeny a pomocí vortexu byl jejich obsah promíchán. Následně byly zkumavky naskládány do krabičky a přeneseny do mrazáku (−80 °C), kde byly skladovány.

5.9.3 Stanovení produkce indolových sloučenin

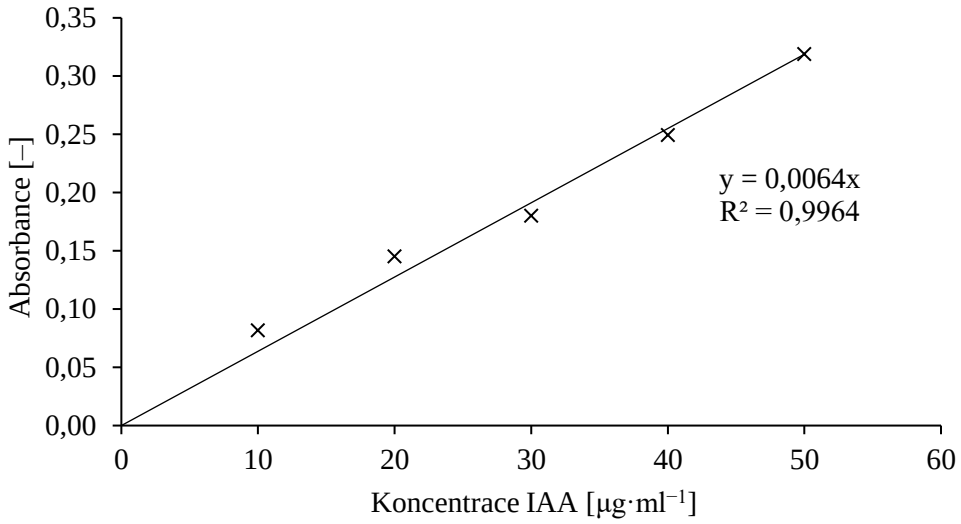
Tento test, založený na metodě Glickmann a Dessaux [82], se používá ke stanovení celkového množství indolových sloučenin produkovaných bakteriálním kmenem.

Kolorimetrický test

Do zkumavek obsahujících 3 ml sterilního King B média bylo napipetováno 750 µl 10 mM sterilního tryptofanu a následně bylo do média naočkováno 500 µl bakteriální kultury (z kryo zkumavek). Kultivace probíhala 48 až 72 hodin v temperované třepačce při 28 °C a 160 rpm. Z každé zkumavky bylo odebráno 1,5 ml bakteriální kultury do mikrocentrifugačních zkumavek, centrifugace probíhala 10 minut při 5400 × g za laboratorní teploty. Po odstředění bylo 500 µl supernatantu odebráno do nových mikrocentrifugačních zkumavek a přidáno 500 µl Salkowského činidla. Zkumavky byly inkubovány ve tmě po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Vzniklá růžová nebo načervenalá barva indukuje produkci indolových sloučenin.

Spektrofotometrický test

Standartní roztok IAA byl připraven rozpuštěním 2,5 mg IAA v 1 ml ethanolu. Kalibrační křivka byla sestrojena ředěním připraveného standardu IAA (od 0 do 60 $\mu g \cdot ml^{-1}$) (Obrázek 9). Na mikrotitrační destičku bylo napipetováno 100 µl každého bakteriálního vzorku v triplikátech a také 100 µl koncentrační řady roztoků IAA. Vzorky byly proměřeny na přístroji Elisa reader při 550 nm.



Obrázek 9: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci IAA.

5.9.4 Stanovení produkce sideroforů

K identifikaci izolátů schopných produkovat siderofory, utilizací chrom azurolu S (CAS), se využívá metody podle Schwyn a Neilands [83].

Do zkumavek obsahujících 3 ml sterilního King B média bylo naočkováno 500 µl bakteriálních kultur. Kultivace probíhala 72 hodin v temperované třepačce při 28 °C a 160 rpm. Po kultivaci byla pomocí očkovací kličky každá bakteriální kultura naočkována na misky obsahující pětinásobně zředěné tuhé King B médium s CAS (označované jako CAS médium, viz. podkapitola 5.9.1). Na jednu misku byly naočkovány dva vzorky v duplikátech. Takto naočkovaná média byla inkubována 72 hodin v termostatu při teplotě 30 °C. Vznik žluté, oranžové nebo fialové halozóny indikuje produkci sideroforů.

5.9.5 Mikrobiální solubilizace fosfátů

K posouzení izolátů schopných solubilizovat fosfát z nerozpustného zdroje se využívá metody podle Sylvester-Brandley a kol. [84].

Pro tento test bylo nutné do zkumavek obsahujících 3 ml sterilního King B média naočkovat 500 µl bakteriálních kultur, takto připravené vzorky byly inkubovány v temperované třepačce (28 °C a 160 rpm) po dobu 72 hodin. Poté byl každý vzorek v duplikátech naočkován pomocí očkovací kličky na připravené tuhé médium NBRIP (viz. podkapitola 5.9.1) a inkubován po dobu 4 dnů při 30 °C. Vznik bezbarvé halozóny svědčí o schopnosti rhizobakterií solubilizovat fosforečnan vápenatý.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této části diplomové práce bylo posoudit, zda má použitý biouhel přidaný do půdy vliv na mikrobiologické charakteristiky půdy. Pro tyto účely posloužily vzorky půd získané z dlouhodobých experimentů, které byly na FCH VUT realizovány v rámci probíhajícího výzkumu využití biouhlu jakožto potenciálního půdního kondicionéru. Nastavení pěstebních experimentů a charakteristika půd a biouhlu využitých v rámci tohoto experimentu jsou blíže popsány v kapitole 5.3–5.5.

Je známo, že mikrobiální vlastnosti půdy úzce souvisí s fyzikálně-chemickými vlastnostmi půdy, kvalitou půdy a také růstem rostlin. Abychom mohli poskytnout komplexnější pohled na působení biouhlu jakožto půdního kondicionéru a byli schopni posoudit jeho vliv na mikrobiální procesy v půdě, zaměřili jsme se v této práci také na vybrané půdní fyzikálně-chemické vlastnosti a růstové charakteristiky kukuřice seté. Účinky aplikace biouhlu do půdy jsou tedy diskutovány ze dvou pohledů. Jednak se zabýváme posouzením vlivu biouhlu na vybrané fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti půd (kapitola 6.1) a dále je rozebrán vliv biouhlu na růstové charakteristiky rostlin kukuřice seté spojené s aktivitou PGPR (kapitola 6.2).

6.1 Vliv biouhlu na půdní vlastnosti

Potenciál biouhlu zlepšit fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti půdy byl prokázán již v mnoha provedených studiích [85, 86, 87]. Bylo zjištěno, že jakožto půdní kondicionér může biouhel zvýšit obsah organických prvků (C, N) v půdě [88], zvýšit pH půdy [86] nebo stimulovat aktivitu půdních mikroorganismů [89, 90]. Jelikož biologické vlastnosti půdy jsou úzce spojeny s fyzikálně-chemickými vlastnostmi půdy, budou v této části diskutovány společně.

Pro posouzení vlivu biouhlu na fyzikálně-chemické vlastnosti byly stanoveny základní informace o celkových změnách v obsahu organické hmoty pomocí termogravimetrické analýzy a elementární analýza vzorků půd nám poskytla informace o zastoupení organických prvků v půdě (C, N). Dalším posuzovaným parametrem bylo také pH půdy, jež je spjato s ovlivněním dostupnosti živin a s biologickými vlastnostmi půdy (mikrobiální aktivita).

Z hlediska působení biouhlu na mikrobiální vlastnosti půdy bylo posuzováno vícero parametrů, konkrétně aktivita půdních enzymů (fenoloxidáza, peroxidáza), mikrobiální metabolická aktivita a mikrobiální funkční rozmanitost. Jak již bylo zmíněno v teoretické části (viz. podkapitola 2.3), mikroorganismy mají schopnost rychle reagovat na změny prostředí, jsou tedy vhodnými a citlivými indikátory při základním screeningu změn stavu půdy právě v důsledku přídavku biouhlu.

6.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy

Změny fyzikálně-chemických vlastností půd (vlhkost, relativní obsah organických prvků, obsah organické hmoty a popela) po přidání biouhlu do půd jsou zobrazeny v Tabulce 4 a Tabulce 5. Posuzovaným parametrem bylo také pH výluhu půd, jež je graficky znázorněno na Obrázku 10. Zkratky P, resp. Č zde označují vzorky původních půd (písčitá půda a černozem) jejichž vlastnosti byly stanoveny ihned po samotném odebrání půd. Označení P0 (Č0) a P20 (Č20) jsou vzorky půd bez biouhlu a s přídavkem 20 $g \cdot kg^{-1}$ biouhlu, analyzované po dvouletém pěstebním experimentu.

Tabulka 4: Charakteristika biouhlu a vzorků půd stanovená pomocí termogravimetrické analýzy.

	vlhkost [%]	Obsah organické hmoty [hm.%]	Obsah popela [hm.%]
biouhel	4,52	73,53	21,95
P	0,25	1,68	98,07
P0	0,49	1,70	97,81
P20	0,77	3,23	95,99
Č	1,01	2,46	96,53
Č0	0,68	2,40	96,92
Č20	0,69	2,82	96,69

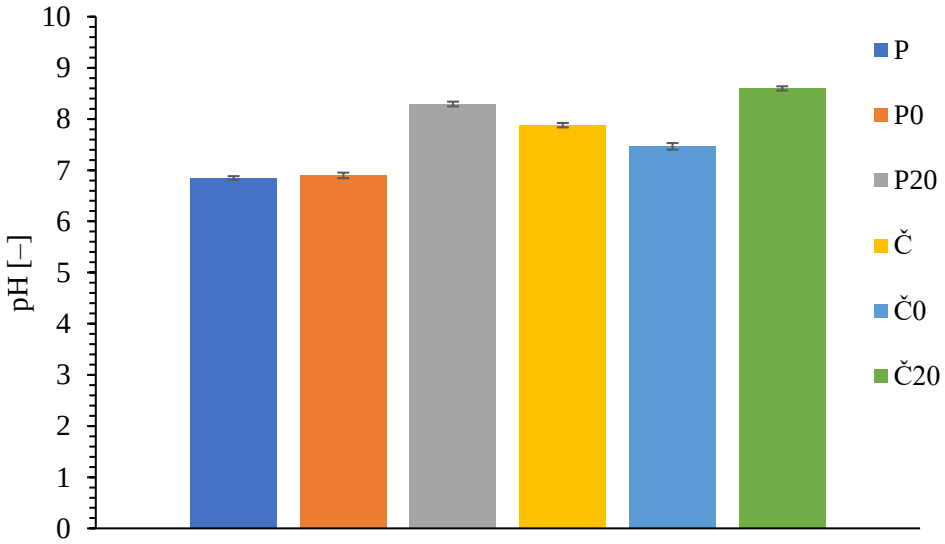
Jak již bylo zmíněno, k charakterizaci vlhkosti, obsahu organické hmoty a obsahu popela byla využita termogravimetrická analýza. Z výsledků uvedených v Tabulce 4 můžeme vidět, že z původních půd měla černozem vyšší obsah organických látek a vyšší vlhkost, ve srovnání s písčitou půdou, která je, co se týče obsahu organické hmoty, velmi chudá. Předpokladem tohoto experimentu tedy bylo, že postupně dojde ke zvýšení obsahu organické hmoty vlivem přídavku biouhlu (obzvláště u písčité půdy) z důvodu vyluhování (organických) látek z biouhlu do půdy. Z výsledků analýzy je zřejmé, že tento předpoklad byl potvrzen a přídavek biouhlu skutečně vedl ke zvýšení obsahu organické hmoty v písčité půdě i v černozemi. Více se biouhel projevil v případě písčité půdy, kdy se obsah organické hmoty zvýšil z 1,68 hm.% na 3,23 hm.%. Tento výsledek koreluje s literaturou [91], kde bylo pozorováno zvýšení obsahu organické hmoty zejména u méně úrodných půd (měly na počátku nižší obsah organické hmoty). U půd bez biouhlu po dvouleté kultivaci (P0, Č0) nedošlo k výraznější změně v obsahu organické hmoty, byl pozorován pouze mírný pokles v důsledku postupného vyčerpávání organické hmoty půdy v rámci realizovaného pěstebního experimentu, kdy na použitých půdách byla kultivovaná po dobu experimentu kukuřice setá v opakovaných vegetačních cyklech.

Tabulka 5: Charakteristika vzorků půd stanovená pomocí elementární analýzy.

	C [hm.%]	H [hm.%]	N [hm.%]
biouhel	65,223	3,712	2,925
P	1,088	0,206	0,193
P0	0,658	0,225	0,126
P20	1,286	0,205	0,172
Č	0,644	0,264	0,127
Č0	0,457	0,286	0,089
Č20	1,215	0,445	0,133

Využitím metody elementární analýzy byl u jednotlivých vzorků půd stanoven také obsah základních organických prvků (C, H, N) (Tabulka 5). Z naměřených dat je zřejmé, že z celkového obsahu organické hmoty v půdách představuje organický uhlík cca 19–65 % (dle vzorku). Po dvouleté kultivaci došlo u půd bez biouhlu (P0, Č0) k poklesu obsahu organického C a N (ve srovnání s původními půdami – P, Č), což lze opět vysvětlit postupným vyčerpáváním těchto živin v důsledku opakovaného pěstování kukuřice. V případě půd s biouhlem (P20, Č20) není ve většině případů až tak výrazný rozdíl oproti původním půdám (P, Č), jako tomu bylo u celkového obsahu organické hmoty (stanovení pomocí TGA). Pouze v případě černozemě lze pozorovat výraznější změnu v obsahu organického C, kdy přídavek biouhlu s vysokým obsahem uhlíku (65,223 hm.%) zvýšil obsah organického C z 0,644 hm.% na 1,215 hm.%. U písčité půdy došlo sice také k nárůstu organického uhlíku, rozdíly však nebyly tak významné. Ve většině studií zabývajících se aplikací biouhlu do půdy bylo také potvrzeno zvýšení obsahu organické uhlíku, což svědčí o tom, že biouhel může zvýšit akumulaci a sekvestraci uhlíku v půdě [92].

V případě organického dusíku (představujícího spolu s P, K základní složky výživy rostlin) došlo u písčité půdy po kultivaci (bez biouhlu i s biouhlem) k poklesu obsahu N, výraznější úbytek byl však dle očekávání pozorován v půdách bez biouhlu. V případě černozemě s přídavkem biouhlu (Č20) naopak vidíme mírný nárůst organického N, což ale může souviset s heterogenitou analyzované půdy, nebo také může spadat do rozsahu nejistoty stanovení dané metody.



Obrázek 10: Naměřené hodnoty pH výluhu vzorků půdy.

Také půdní reakce neboli pH půdy je jedním z klíčových faktorů, jenž ovlivňují dostupnost živin pro rostliny, hojnost půdních mikroorganismů a v konečném důsledku také růst a produktivitu rostlin. Na základě pH lze půdy klasifikovat v rozmezí kyselé (>6,5) až alkalické (<7,5). V důsledku přítomnosti iontů vápníku, hořčíku, draslíku a sodíku ve formě rozpustných oxidů a uhličitanů v biouhlu může aplikací biouhlu do půdy dojít ke zvýšení pH půdy [93].

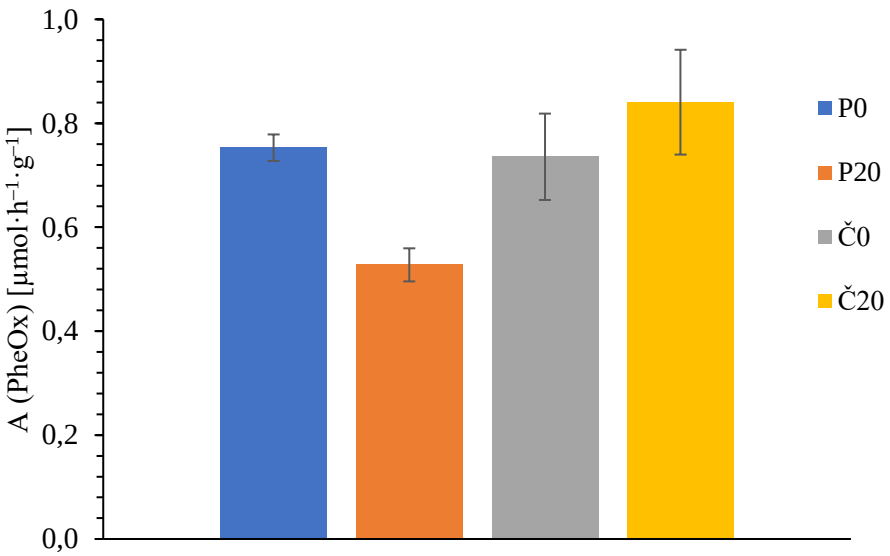
Na Obrázku 10 jsou graficky znázorněny naměřené hodnoty pH výluhu půdních vzorků. Vidíme, že pH původní černozemě (Č) bylo 7,9, jedná se tedy o půdu alkalickou, v případě písčité půdy (P) byla půdní reakce stanovena na 6,8 (neutrální půda). Po dlouhodobé kultivaci došlo u černozemě bez biouhlu (Č0) k mírnému poklesu pH, u písčité půdy po kultivaci bez biouhlu (P0) bylo pH srovnatelné s pH původní půdy.

Biouhel Pflanzenkohle použitý v tomto experimentu byl alkalické povahy (pH = 10,33), předpokládá se tedy zvýšení pH půdy po jeho aplikaci, způsobené vyluhováním anorganických alkalických solí přítomných v biouhlu ve formě popela, které se postupně rozpouštějí a zvyšují pH půdy. Jak můžeme vidět na obrázku výše, po dvouleté kultivaci v půdách s přídavkem biouhlu (P20, Č20) skutečně došlo v obou případech ke zvýšení hodnot pH půd (ve srovnání s původními půdami). Přídavek biouhlu se více projevil v písčité půdě, kde pH bylo zvýšeno z původních 6,8 na 8,3. V případě černozemě bylo pH půdy zvýšeno téměř o jednotku, a to na hodnotu 8,6 z původní hodnoty.

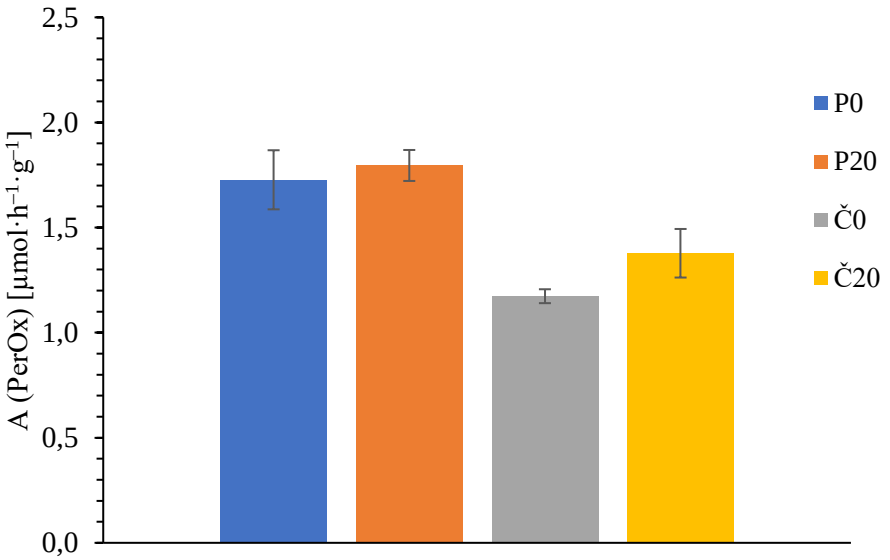
Námi získané výsledky jsou v souladu s výsledky publikovanými v literatuře, v nichž bylo prokázáno zvýšení pH půdy po aplikaci biouhlu do půdy [94]. Ve většině případů se však jednalo o aplikaci biouhlu do kyselé půdy, kdy zvýšení pH v těchto půdách je více žádoucí kvůli zvýšení dostupnosti živin pro rostlin. O účincích biouhlu v alkalických půdách jsou k dispozici pouze omezené informace, v některých studiích byl však prokázán pokles pH alkalické půdy po aplikaci biouhlu [95]. Jak již bylo zmíněno, v našem případě došlo aplikací biouhlu do půdy ke zvýšení pH, je tedy otázkou, zda zvýšením pH již alkalické půdy (v případě černozemě) nedošlo spíše ke snížení rozpustnosti živin a jejich využitelnosti rostlinami.

6.1.2 Biologické vlastnosti půdy

Tato podkapitola pojednává o působení biouhlu na biologické vlastnosti půdy. Hodnocenými paramenty jsou zde enzymová aktivita vybraných půdních enzymů (fenoloxidáza a peroxidáza) a také průměrný vývoj barvy jamky (AWCD), který indikuje mikrobiální metabolickou aktivitu půdy. Ze získaných dat lze usoudit, že přídavek biouhlu se v půdách po dvouleté kultivaci více projevil v případě černozemě, kdy v půdách s biouhlem došlo ke zvýšení aktivity fenoloxidázy i peroxidázy a byla také významně zvýšena hodnota AWCD. Jednotlivé výsledky testů jsou graficky znázorněny a rozebrány na následujících obrázcích (Obrázek 11–Obrázek 16) a odstavcích. Před samotnou interpretací výsledků je však ještě nutné podotknout, že biologické (mikrobiální) vlastnosti půdy (hlavně aktivita půdních mikroorganismů) jsou silně závislé na pH půdy. Obecně se udává, že většina půdních mikroorganismů preferuje neutrální pH půdy (rozsah 6–7 jednotek pH stupnice). Jelikož přídavek biouhlu způsobil v obou případech půd zvýšení pH půdy (Kapitola 6.1.1) na hodnoty 8,3 v případě písčité půdy, resp. 8,6 u černozemě, mohlo dojít k nepříznivému ovlivnění mikrobiálního společenství, a tedy k potlačení aktivity půdních mikroorganismů. Dalším faktorem, jež měl pravděpodobně vliv na dosažené výsledky byla aplikační forma biouhlu. Při námi prováděném pěstebním experimentu byl biouhel do půdy přidán uvnitř semipermeabilních pytlíčků (Kapitola 5.4), nedošlo tedy k přímému kontaktu biouhlu s půdou v okolí kořenů, jenž byla analyzována.



Obrázek 11: Průměrné hodnoty aktivity fenoloxidázy ve vzorcích půd.



Obrázek 12: Průměrné hodnoty aktivity peroxidázy ve vzorcích půd.

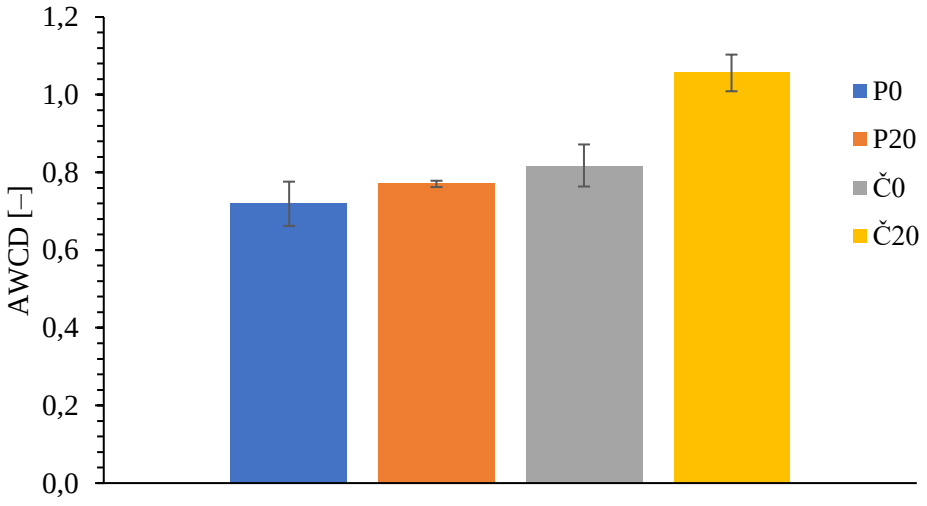
Na Obrázku 11 jsou graficky znázorněny vypočtené hodnoty aktivit fenoloxidázy v písčité půdě a černozemi bez přídavku biouhlu (P0, Č0) a s přídavkem 20 g biouhlu (P20, Č20). Hodnota aktivity fenoloxidázy v písčité půdě a černozemi bez biouhlu byla srovnatelná ($0{,}75 \pm 0{,}03$ µmol·h^{-1}·g^{-1} pro písčitou půdu, resp. $0{,}74 \pm 0{,}08$ µmol·h^{-1}·g^{-1} pro černozem). V písčité půdě však přídavek biouhlu způsobil pokles aktivity fenoloxidázy, naopak v případě černozemě došlo ke zvýšení aktivity tohoto enzymu.

Grafické znázornění aktivity peroxidázy ve vzorcích půd je zobrazeno na Obrázku 12. Vidíme, že v půdách bez biouhlu (P0, Č0) byla naměřena vyšší enzymová aktivita v případě písčité půdy – $1{,}73 \pm 0{,}14$ µmol·h^{-1}·g^{-1}. Po přídavku biouhlu došlo u obou půd ke zvýšení aktivity peroxidázy, výraznější nárůst lze ale pozorovat pouze v případě černozemě

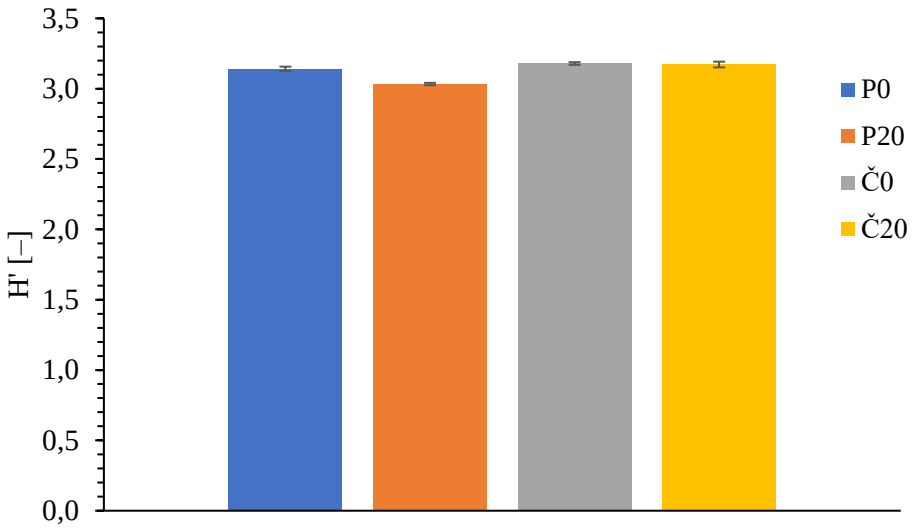
(Č0: 1,17 ± 0,03 μmol·h^{-1}·g^{-1} a Č20: 1,72 ± 0,14). U písčité půdy biouhel zvýšil aktivitu peroxidázy jen nepatrně.

Z dostupné literatury víme, že aktivita oxidačních enzymů je závislá na mnoha faktorech, mezi které řadíme pH půdy, hydrotermální podmínky, strukturní složení půdy, množství živin atd.). Aplikací biouhlu do půdy jsou výše zmíněné faktory ovlivňující aktivitu enzymů pozměněny, a tak by mělo dojít také ke změně samotné aktivity enzymů (může dojít jak ke zvýšení, tak i ke snížení) [71, 96]. V některých studiích [70, 97] nebyl pozorován žádný významný rozdíl mezi aktivitami těchto enzymů v půdách bez biouhlu a s biouhlem. Nevýznamné změny aktivity fenoloxidázy a peroxidázy by mohly ukazovat na vysoce stabilní organický (aromatický) skelet biouhlu, který jen velmi pomalu podléhá mikrobiální degradaci v půdě. Na základě námi získaných dat lze říct, že vliv biouhlu na aktivitu fenoloxidáz a peroxidáz byl závislý na typu půdy (hlavně pH půdy, obsahu organické hmoty, textuře a kompaktnosti půdy). V případě černozemě došlo v půdách s biouhlem ke zvýšení aktivity obou tříd enzymů. U písčité půdy (která měla nižší obsah organické hmoty, měla hrubší částicovou strukturu a byla i méně kompaktní) přídavek biouhlu naopak vedl k poklesu aktivity fenoloxidázy a aktivita peroxidázy nebyla významně pozměněna.

Technika Biolog EcoPlates, známá také jako fyziologické profilování na úrovni společenství (CLPP), se využívá za účelem získání metabolických otisků prstů (fingerprint) mikrobiálních společenstev, svědčících o mikrobiální metabolické aktivitě [98]. V rámci této práce je technika Biolog použita k rozpoznání rozdílů v metabolické aktivitě a mikrobiální funkční rozmanitosti v půdách bez přídavku a s přídavkem biouhlu. Vzhledem k tomu, že po 72 hodinách od začátku inkubace došlo k ustálení hodnot AWCD, jsou na následujících obrázcích graficky prezentovány výsledky získané v tomto čase (72. hodina). Označení P0 (Č0) opět znamená přídavek 0 g biouhlu (půdy bez biouhlu) a označení P20 (Č20) značí přídavek 20 g biouhlu.



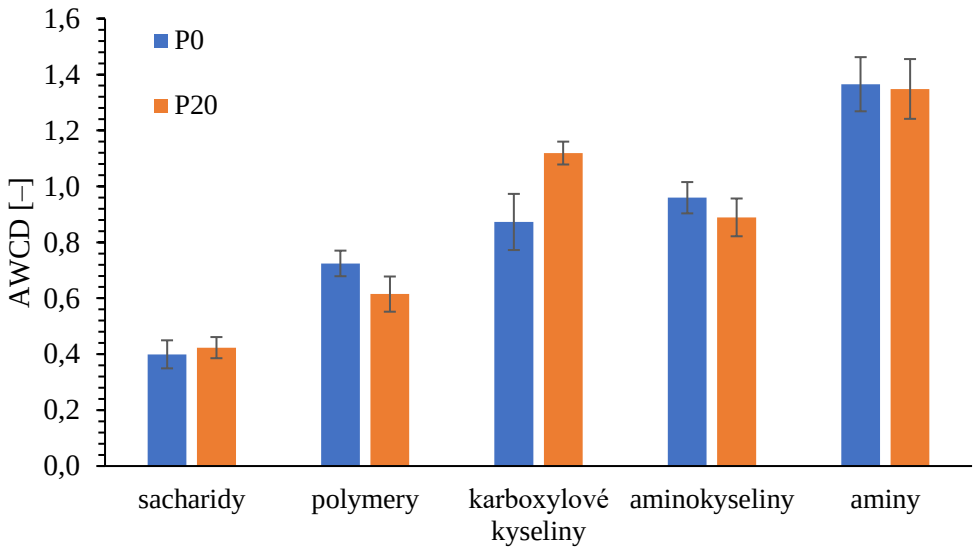
Obrázek 13: Celková míra utilizace uhlíkových substrátů ve vzorcích půd, vyjádřená jako AWCD.



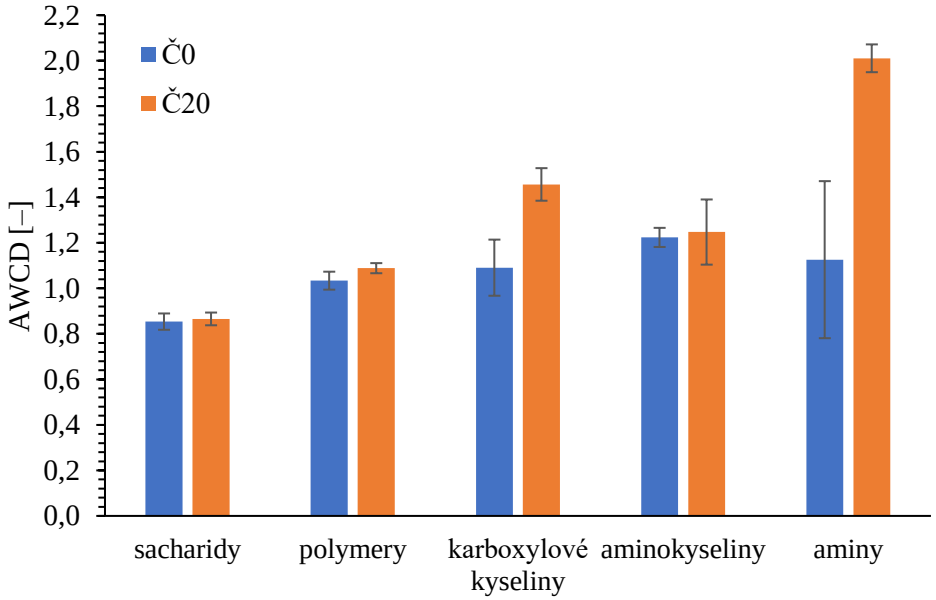
Obrázek 14: Shannonův index rozmanitosti v jednotlivých vzorcích půd.

Na Obrázku 13 jsou graficky znázorněny vypočtené hodnoty AWCD jednotlivých půdních vzorků. Hodnota AWCD představuje schopnost půdních mikroorganismů využívat různé zdroje uhlíku. Podle hodnot AWCD může být odhadnuta mikrobiální metabolická aktivita v půdě, kdy vyšší hodnota AWCD odráží vyšší metabolickou aktivitu. Pro správné pochopení interpretace dosažených výsledků je nutné zdůraznit, že tato metoda slouží pouze k porovnání změn mikrobiální metabolické aktivity v rámci jedné půdy, tedy porovnání v půdě s biouhlem a bez biouhlu. Ze získaných hodnot AWCD lze tedy říct, že přídavek biouhlu jak u písčité půdy, tak i u černozemě zvýšil celkovou míru utilizace uhlíkových substrátů, a tedy zvýšil mikrobiální metabolickou aktivitu v dané půdě. To patrně souvisí s rozdílným obsahem organické hmoty (kapitola 6.1.1) v půdách bez biouhlu a s biouhlem (obsah organické hmoty v obou půdách s biouhlem byl znatelně vyšší než v kontrolních půdách). Tento výsledek byl v souladu s některými publikovanými studiemi, kdy přídavek biouhlu do půdy způsobil zvýšení mikrobiální aktivity půdy [99, 100]. K dispozici jsou však také publikace, ve kterých přídavek biouhlu naopak snížil AWCD (nejspíše z důvodu nedostatku substrátu), a tedy snížil mikrobiální metabolickou aktivitu půd [101]. To opět nasvědčuje tomu, že kvůli velké variabilitě podmínek experimentů (použitých biouhlů a půd) nelze vyvodit obecné výsledky působení biouhlu na mikrobiální aktivitu.

Grafické znázornění mikrobiální funkční rozmanitosti vzorků pud, pomocí Shannonova indexu, je zobrazeno na Obrázku 14. Shannonův index H' (Rovnice 2) je jedním z nejčastěji používaných měřítek mikrobiální rozmanitosti. Je založen na rozmanitosti využití substrátu celé mikrobiální komunity každého vzorku. Vyšší hodnoty H' naznačují, že celá mikrobiální komunita je schopna metabolizovat vyšší počet rozdílných substrátů přítomných na destičkách Biolog během uvažované inkubační doby [102]. Ze získaných hodnot H' jde vidět, že v písčité půdě ani v černozemi nedochází po aplikaci biouhlu do půdy ke statisticky významné změně ve funkční mikrobiální rozmanitosti. Tento výsledek je v souladu s dostupnými publikacemi, kdy sice došlo po aplikaci biouhlu ke zvýšení mikrobiální aktivity, ale funkční rozmanitost půdních mikroorganismů nebyla nijak významně ovlivněna [99].



Obrázek 15: Míra utilizace uhlíkových substrátů v 72. hodině – písčitá půda.



Obrázek 16: Míra utilizace uhlíkových substrátů v 72. hodině – černozem.

Grafické znázornění míry utilizace uhlíkových zdrojů rozdělených do šesti skupin substrátů pro písčitou půdu je zobrazeno na Obrázku 15. Přídavek biouhlu v této půdě zvýšil využití pouze jedné kategorie substrátů (karboxylové kyseliny). U polymerů a aminokyselin došlo k mírnému snížení využití těchto substrátů mikroorganismy a v případě sacharidů a aminů biouhel aplikovaný do půdy neměl téměř žádný vliv na utilizaci uhlíkových zdrojů mikroorganismy. Co se týče černozemě (Obrázek 16), přídavek biouhlu způsobil zvýšení využití všech šesti skupin substrátů. U sacharidů, polymerů a aminokyselin šlo jen o nepatrné zvýšení, ale v případě karboxylových kyselin a aminů bylo zvýšení utilizace výrazné. Biouhel by tedy mohl zlepšit růst mikroorganismů, kterým se daří (vyšší hodnoty AWCD) na těchto substrátech.

6.2 Vliv biouhlu na růst modelové rostliny

V této části jsme se zaměřili na zhodnocení vlivu biouhlu Pflazenkohle na růst modelových rostlin. V krátkodobém pěstebním experimentu (24 dní) popsaném v experimentální části (kapitola 5.5) bylo zkoumáno působení biouhlu Pflanzenkohle v aplikační dávce 20 $g \cdot kg^{-1}$ na růst modelové rostliny *Zea mays*. Po ukončení pěstebního experimentu byly také provedeny testy pro zjištění vlivu biouhlu na aktivity PGPR, jež úzce souvisí právě s růstem rostlin.

6.2.1 Aktivita PGPR

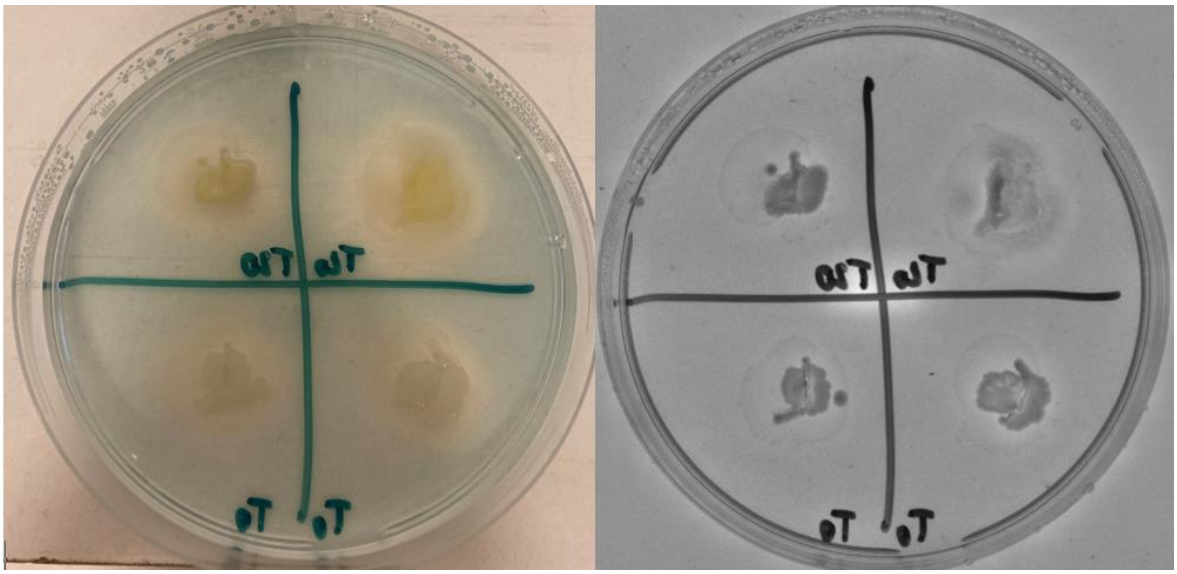
Na základě různých mechanismů, popsaných v teoretické části práce (kapitola 2.2.1), rhizosférické bakterie podporují růst rostlin. K posouzení vlivu biouhlu na aktivitu PGPR byly vybrány následující vlastnosti rhizosférických bakterií: schopnost solubilizace fosfátů, schopnost produkce indolových sloučenin a schopnost produkce sideroforů. Předpokladem bylo zvýšení aktivity PGPR v důsledku přídavku biouhlu, a tedy podpora růstu rostlin. U většiny posuzovaných vlastností však nebyl prokázán viditelný rozdíl aktivit rhizobakterií mezi vzorky půd s biouhlem a bez biouhlu, je to pravděpodobně z důvodu již zmiňované aplikační formy biouhlu uvnitř semipermeabilních pytlíčků, které nebyly v přímém kontaktu s kořeny rostlin. Vhodnější variantou by bylo spíše smísení biouhlu s půdou, kdy by se dalo očekávat výraznějších rozdílů v aktivitách těchto rhizobakterií právě v půdách s biouhlem a bez něj.

Tabulka 6: Hodnoty koncentrace indolových sloučenin ve vzorcích půd.

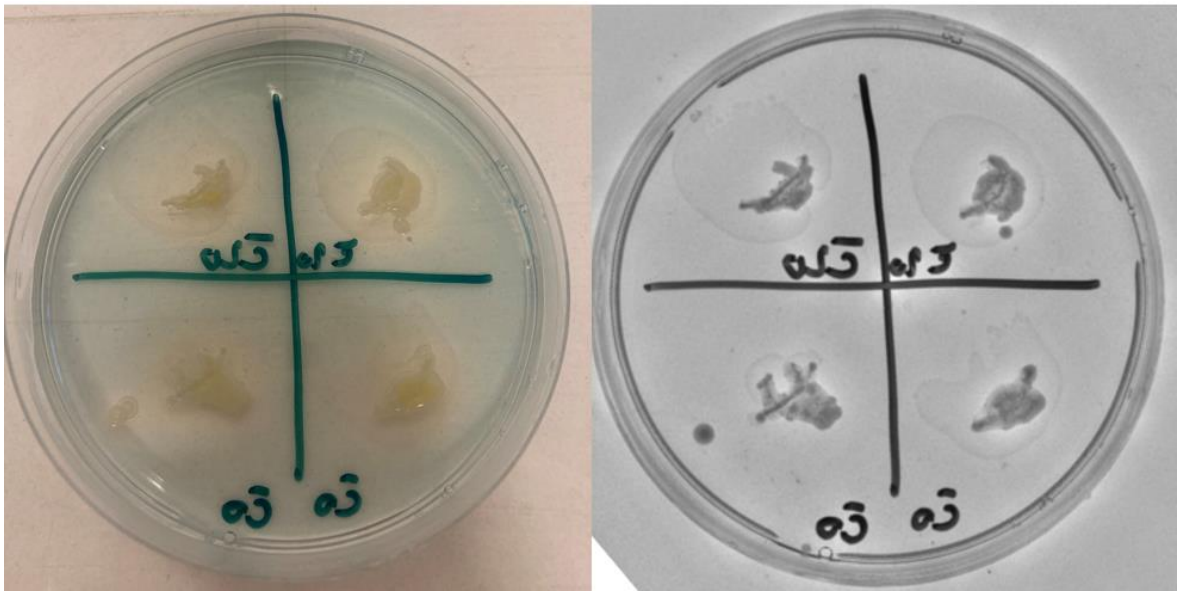
	P0	**P20**	**Č0**	**Č20**
c [µg/ml]	18,46 ± 0,18	17,94 ± 0,23	19,82 ± 0,23	22,16 ± 2,70

Rhizosférické bakterie jsou schopny produkovat auxin (kyselinu 3-indoloctovou [IAA]), rostlinný hormon, který má široký vliv na růst a vývoj rostlin. Z Tabulky 6 je patrné, že k produkci indolových sloučenin dochází v obou typech půd, a to jak s přídavkem 20 g biouhlu Pflanzenkohle, tak i bez biouhlu. U písčité půdy přídavek biouhlu nezpůsobil žádné výrazné změny koncentrace indolových sloučenin. V případě černozemě lze však v půdě s přídavkem biouhlu pozorovat mírný nárůst produkce indolových sloučenin rhizosférickými bakteriemi.

Při ukončení pěstebního experimentu a oddělování rostlin kukuřice seté z jednotlivých použitých půd byl pozorován v případě rostlin pěstovaných v černozemi viditelný rozdíl mezi kořeny rostlin v půdě s biouhlem a bez biouhlu. Bylo pozorováno, že v půdách s biouhlem byla zkrácena délka kořenů a kořenový systém byl objemnější (více postranních neboli sekundárních kořenů). Tento výsledek částečně koreluje s publikovanou literaturou, kdy aplikací biouhlu do půdy dochází ke zvýšenému růstu postranních kořenů, zároveň ale nedochází k tak významnému zkrácení délky kořene [103]. V publikované studii bylo také prokázáno, že vyšší hladiny IAA (nejaktivnější a nejznámější indolová sloučenina produkovaná bakteriemi) zkracují délku primárního kořene a stimulují tvorbu postranních kořenů, čímž rostliny získávají lepší přístup k půdním živinám [104]. Pozorovaný rozdíl ve struktuře kořenů kukuřice seté by tedy mohl být spojen se zvýšenou produkcí indolových sloučenin v černozemi (s přídavkem biouhlu).

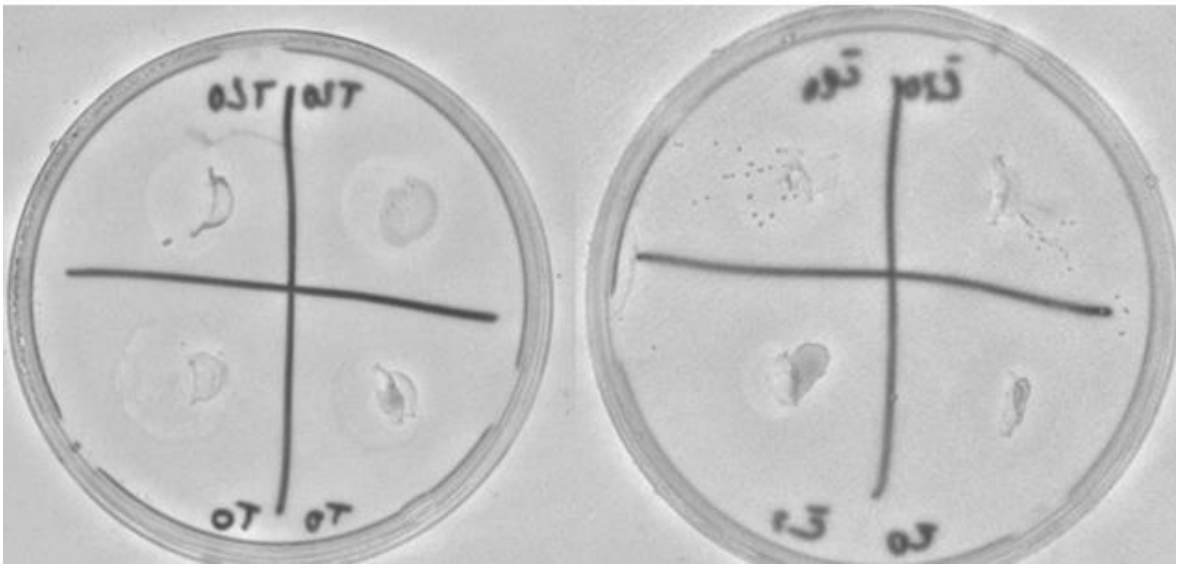


Obrázek 17: CAS médium s bakteriálními izoláty písčité půdy, vykazujícími produkci sideroforů. Obrázek vlevo je totožný s obrázkem vpravo, je focen pouze v jiném režimu.



Obrázek 18: CAS médium s bakteriálními izoláty černozemě, vykazujícími produkci sideroforů. Obrázek vlevo je totožný s obrázkem vpravo, je focen pouze v jiném režimu.

Produkce sideroforů úzce souvisí se schopností bakteriálních izolátů absorbovat železo. Na Obrázku 17 a Obrázku 18 jsou zobrazeny CAS média po provedení testu na přítomnost sideroforů v písčité půdě a černozemi bez biouhlu – P0, Č0 (v obrázku dole) a s biouhlem – P20, Č20 (v obrázku nahoře). Z dosažených výsledků jde vidět, že přítomnost sideroforů byla prokázána u všech bakteriálních izolátů půd. V případě vzorků půd černozemě (Č0, Č20) je aktivita rhizobakterií schopných produkovat siderofory vyšší, protože vytvořené halozóny v okolí naočkovaných bakteriálních vzorků jsou větší.



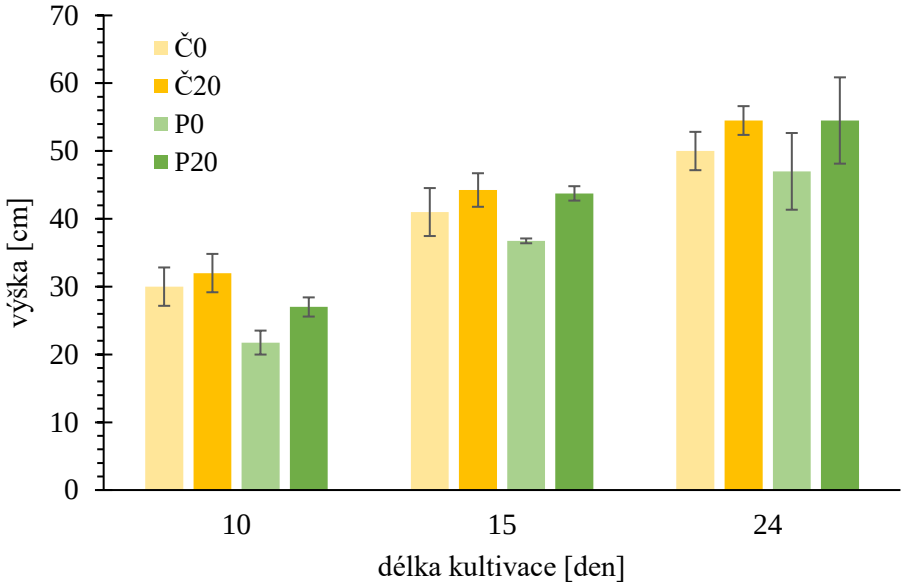
Obrázek 19: NBRIP médium s bakteriálními izoláty schopnými solubilizovat fosfáty. Vlevo – písčitá půda, vpravo – černozem).

Fosfor je základním biogenním prvkem nezbytným pro všechny metabolické procesy růstu a vývoje rostlin. V půdě se však fosfor vyskytuje převážně ve formách ($Ca_3(PO_4)_2$) pro rostliny nedostupných. Důležitou roli v cyklu P hrají mikroorganismy, které se podílejí na rozpouštění (solubilizaci) anorganických sloučenin fosforu a na rozkladu (mineralizaci) organických sloučenin. Schopnost rhizosférických bakterií solubilizovat fosfáty byla potvrzena opět u všech vzorků půd (dole – půda bez biouhlu, nahoře – půda s biouhlem). Na Obrázku 19 – vlevo jsou zobrazeny bakteriální izoláty z písčité půdy, u nichž je viditelná vyšší aktivita rhizobakterií, schopných rozpouštět fosfáty (ve srovnání s aktivitou rhizobakterií z černozemě – vpravo).

6.2.2 Růstové charakteristiky rostlin

Působení biouhlu na růst kukuřice seté bylo rozsáhle zkoumáno vzhledem k velkému významu kukuřice jako potravinářské plodiny. V našem pěstebním experimentu je kvantitativní charakterizace při krátkodobé kultivaci kukuřice založena na měření růstových parametrů modelových rostlin. Na základě literatury byly pro tuto práci posuzovanými růstovými parametry výška rostlin a suchá hmotnost nadzemních a podzemních částí rostlin [105, 106].

Z dosažených výsledků je vidět, že v písčité půdě i černozemi s biouhlem (označení P20, Č20) došlo ke zvýšení výšky rostlin a také zvýšení suché hmotnosti nadzemní části a suché hmotnosti klasů rostlin. Růstové charakteristiky rostlin jsou blíže rozebrány u následujících obrázků (Obrázek 20, Obrázek 21) a Tabulky 7. Získané výsledky jsou v souladu s většinou již provedených experimentů, kdy byl potvrzen pozitivní vliv biouhlu, kdy byly po jeho aplikaci skutečně vylepšeny některé půdní vlastnosti, a tím zvýšen růst a výnos rostlin kukuřice [107, 108]. Existují však také studie, ve kterých přídavek biouhlu působil neutrálně nebo dokonce až negativně na růst rostlin kukuřice [109, 110]. Je tedy potřeba znovu zdůraznit, že výsledné účinky biouhlu ať už na chemické a biologické vlastnosti půdy, nebo na růst a produktivitu rostlin jsou podmíněny typem a aplikační dávkou biouhlu, typem půdy a také délkou experimentů.



Obrázek 20: Grafická závislost výšky rostlin v čase – černozem a písčitá půda.

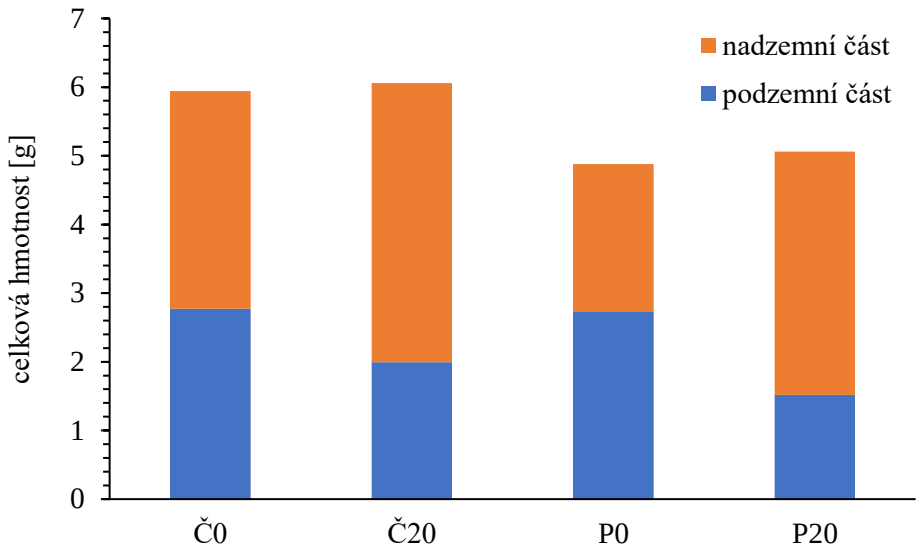
Grafické znázornění růstu rostlin (výška rostlin) kukuřice seté v čase v písčité půdě a černozemi bez přídavku biouhlu (P0, Č0) a s přídavkem 20 g biouhlu Pflazenkohle (P20, Č20) je zobrazeno na Obrázku 20. Vidíme, že v den ukončení kultivace rostliny v kontaktu s biouhlem v obou půdách svou výškou předčily rostliny v půdách bez biouhlu. Tento trend lze pozorovat i v celém průběhu krátkodobého kultivačního experimentu, kdy při všech měřeních rostliny v černozemi i písčité půdě s přídavkem 20 $g \cdot kg^{-1}$ biouhlu dosahovaly vyššího vzrůstu než rostliny v kontrolních půdách. Zvýšený růst rostlin v půdách s biouhlem by mohl být spojen přímo s vyluhováním potřebných živin z biouhlu (například fosfor) nebo zvýšením obsahu uhlíku, jenž je zdrojem energie pro půdní mikroorganismy. Podobných výsledků dosáhli například také *Uzoma a kol*, kteří sledovali vliv biouhlu na růstové charakteristiky kukuřice v písčité půdě [67].

Tabulka 7: Průměrné suché hmotnosti jednotlivých částí rostlin.

vzorek	**$m_{podzemní\ část}$ [g]**	**$m_{nadzemní\ část}$ [g]**	**m_{klas} [g]**
Č0	2,77 ± 1,24	3,17 ± 1,64	0,13 ± 0,01
Č20	1,99 ± 0,03	4,06 ± 0,27	0,31 ± 0,03
P0	2,73 ± 1,08	2,15 ± 1,04	0,10 ± 0,02
P20	1,52 ± 0,47	3,54 ± 0,61	0,22 ± 0,15

Po ukončení pěstebního experimentu byly také porovnány suché hmotnosti jednotlivých částí rostlin. Jak je ukázáno v Tabulce 7, v případě černozemě i písčité půdy dosahovaly nadzemní části rostlin a také klasy výrazně vyšších hmotností v kontaktu s biouhlem (Č20, P20). Klasy u rostlin v obou půdách s biouhlem měly dokonce více jak dvojnásobnou hmotnost (ve srovnání s půdami bez biouhlu). Naopak tomu bylo v případě hmotnosti kořenů (podzemní část), kdy vyšších hmotností dosahovaly rostliny v půdách bez biouhlu. Nižší hmotnost kořenového systému v půdách s biouhlem by mohla být spojena s vyšším obsahem živin v těchto půdách

(v případě černozemě také s vyšší koncentrací indolových sloučenin), tudíž dochází k růstu postranních kořenů a primární kořeny nemusí být tak dlouhé, aby získaly potřebné živiny. V publikované literatuře [67, 107, 108] dochází obvykle v důsledku přídavku biouhlu ke zvýšení suché hmotnosti jak nadzemní, tak i podzemní části rostlin. Námi získané výsledky korelují s těmito výsledky pouze částečně (kvůli snížení suché hmotnosti kořenů).



Obrázek 21: Celková suchá hmotnost rostlin ve všech zkoumaných půdách.

Obrázek 21 znázorňuje celkovou suchou hmotnost rostlin v jednotlivých půdách. Při srovnání rostlin v písčité půdě a černozemi (s biouhlem i bez něj) vidíme, že vyšších celkových hmotností dosahují rostliny pěstované v černozemi. Přídavek biouhlu nijak významně neovlivnil celkovou suchou hmotnost rostlin, je to z důvodu snížení hmotnosti podzemní části, které ve výsledku prakticky kompenzovalo nárůst hmotnosti nadzemní části rostliny (diskutováno výše).

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo posoudit, zda biouhel přidaný do půdy ovlivňuje mikrobiální vlastnosti půdy (mikrobiální a enzymatická aktivita, funkční mikrobiální diverzita), a tím i její vitalitu a úrodnost. Aby bylo možné působení biouhlu posoudit komplexně, byly mikrobiální vlastnosti půdy propojené také s fyzikálně-chemickými vlastnostmi půdy a růstem rostlin.

Pro kultivaci rostlin a následné mikrobiální a fyzikálně-chemické analýzy byly použity dvě půdy – písčitá aridní regozem a arenická černozem (s přídavkem 0 a 20 $g \cdot kg^{-1}$ biouhlu Pflanzenkohle), získané po dlouhodobém pěstebním experimentu (2 roky), který probíhal na FCH VUT v rámci dlouhodobého výzkumu využití biouhlu jakožto potenciálního půdního kondicionéru. V obou případech se jednalo o méně úrodné půdy s neutrálním až alkalických pH a nízkým obsahem organické hmoty (obzvláště u půdy písčité).

K vyhodnocení změn fyzikálně-chemických vlastností půdy v důsledku aplikace biouhlu bylo využito termogravimetrické analýzy (obsah vlhkosti, obsah organické hmoty a obsah popela), elementární analýzy (obsah organického C, N a H) a měření pH výluhu půd. Biouhel Pflanzenkohle, jenž je určen pro využití v zemědělství měl vysoký obsah organické hmoty a byl alkalické povahy, předpokladem bylo tedy zvýšení obsahu humusu a zvýšení pH v důsledku jeho aplikace do půdy. Lze říct, že tento předpoklad byl skutečně potvrzen a po dvouleté kultivaci biouhel přidaný do půdy ve formě semipermeabilních pytlíčků skutečně zvýšil obsah organické hmoty (o 1,55 hm.% u písčité půdy, resp. o 0,36 hm.% u černozemě), obsah organického C (o 0,192 hm.%, resp. o 0,571 hm.%) a také pH obou půd (o 1,5, resp. 0,7). Zvýšený obsah organické hmoty a organického C je v těchto půdách (s nízkým obsahem organické hmoty) žádoucí, protože dodání organické hmoty do půdy má předpoklad pozitivně podpořit mikrobiální vlastnosti půdy (mikrobiální aktivita) a také růst rostlin. Naopak zvýšení pH v těchto půdách (neutrální až alkalické půdy) mohlo vést nejen ke snížení rozpustnosti živin a snížení jejich dostupnosti pro rostliny, ale také ke snížení aktivity mikroorganismů.

Co se týče změny biologických (mikrobiálních) vlastností studovaných půd, byl proveden pouze základní screening, kdy posuzovanými parametry byla aktivita půdních enzymů (fenoloxidáza, peroxidáza) a mikrobiální metabolická aktivita (indikovaná AWCD). Přídavek biouhlu se projevil spíše v případě černozemě, kdy zvýšil jak aktivitu posuzovaných půdních enzymů (fenoloxidáza, peroxidáza), tak viditelným způsobem zvýšil také utilizaci uhlíkových substrátů (AWCD) a v konečném důsledku zvýšil metabolickou aktivitu půdy (v porovnání s půdou bez biouhlu). Ačkoliv u písčité půdy došlo také ke zvýšení obsahu organické hmoty po přídavku biouhlu (předpoklad pro zvýšení metabolické aktivity), byly pozorovány pouze nepatrné změny AWCD, a tedy metabolická aktivita v této půdě nebyla nijak významně ovlivněna. Funkční mikrobiální rozmanitost (posuzovaná pomocí Shannonova indexu) nebyla přídavkem biouhlu změněna ani v jedné půdě. Předpokládáme, že pokud by byl biouhel rovnoměrně smísen s půdou (ne ve formě semipermeabilních pytlíčků) a byl by tedy v kontaktu jak s kořeny rostlin, tak s mikroorganismy v rhizosféře, byl by vliv biouhlu zřetelnější. Rovněž také pH biouhlu hraje v případě biologických vlastností velkou roli, pokud by se do půdy aplikoval spíše neutrální biouhel, pH by nebylo zvýšeno, což by znamenalo příznivější prostředí pro mikroorganismy.

Měřením aktivit PGPR se v této práci potvrdila přítomnost rhizobakterií schopných solubilizovat fosfáty, produkovat indolové sloučeniny a siderofory, a to jak v půdách s přídavkem biouhlu, tak bez něj. Opět pouze v případě černozemě byla prokázána vyšší aktivita rhizobakterií v půdě s biouhlem (produkce indolových sloučenin, produkce sideroforů), jež by měla v konečném důsledku pozitivně ovlivnit růst kukuřice seté (podpora růstu kořenů, lepší dostupnost živin). V případě růstových charakteristik kukuřice seté se přídavek biouhlu v obou půdách skutečně projevil vyšší suchou hmotností nadzemních částí a také rostliny v půdách s biouhlem dosahovaly také vyššího vzrůstu. Zlepšení růstových charakteristik rostlin kukuřice seté může být spojeno jak s fyzikálně-chemickými (zvýšení obsahu organické hmoty a organického uhlíku), tak i biologickými změnami v důsledku aplikace biouhlu (zvýšená mikrobiální aktivita). Opět jako v případě biologických vlastností půdy, i pro růst rostlin by bylo vhodnější do půdy aplikovat spíše neutrální nebo mírně kyselý biouhel, aby pH půdy po aplikaci biouhlu dosahovalo neutrálních hodnot (nebo využitý biouhel aplikovat do kyselejších půd), a byla tak zvýšena mikrobiální aktivita a také dostupnost živin pro rostliny. Stejně tak rovnoměrným smísením s půdou by kořeny kukuřice seté a také rhizobakterie interagovaly více s biouhlem a pravděpodobně by se jeho přídavek projevil ve větší míře.

Pokud vezmeme v potaz všechny získané výsledky, můžeme konstatovat, že biouhel v aplikační dávce 20 $g \cdot kg^{-1}$ má potenciál zvýšit svou aplikací mikrobiální aktivitu a zlepšit tak úrodnost půdy, jeho účinky jsou však v případě aplikace do námi zvolených půd omezené. K dosažení lepších výsledků by bylo potřeba pozměnit nastavení pěstebních experimentů, respektive jak již bylo zmíněno, biouhel smíchat přímo s půdou v dané aplikační dávce. Pokud bychom chtěli zlepšit mikrobiální vlastnosti námi vybraných půd, byla by patrně vhodnější aplikace neutrálního nebo lehce kyselého biouhlu. V případě, že bychom chtěli do půdy aplikovat právě námi zvolený alkalický biouhel Pflazenkohle bylo by pro experiment vhodnější zvolit jiné půdy (lehce kyselé půdy). Námi provedený pěstební experiment tedy sloužil spíše k optimalizaci metod, jimiž lze posoudit vliv přídavku biouhlu na fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti půdy a také jako odrazový můstek pro další experimenty zabývající se aplikací biouhlu do půdy a komplexním posouzením jeho vlivu na fyzikálně-chemické, růstové a mikrobiální charakteristiky půdy.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] DUBEY, Anamika, Muneer MALLA, Farhat KHAN et al. Soil microbiome: a key player for conservation of soil health under changing climate. *Biodiversity and Conservation* [online]. 2019, **28**(8-9), 2405-2429 [cit. 2022-11-18]. ISSN 0960-3115.

[2] NAIR, Ajay a Mathieu NGOUAJIO. Soil microbial biomass, functional microbial diversity, and nematode community structure as affected by cover crops and compost in an organic vegetable production system. *Applied Soil Ecology* [online]. 2012, **58**, 45-55 [cit. 2022-11-17]. ISSN 09291393.

[3] BIČÍK, Ivan a Jiří CIBULKA. *Půda v České republice*. Editor Ivo HAUPTMAN, editor Zdeněk KUKAL, editor Karel POŠMOURNÝ. Praha: Pro Ministerstvo životního prostředí a Ministerstvo zemědělství vydal Consult, 2009. ISBN 80-903482-4-6.

[4] SPOSITO, Garrison. Soil. In: *Encyclopedia Britannica* [online]. [cit. 2022-11-18]. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/soil

[5] BAXTER, Nathalie a John WILLIAMSON. *Know your soils: Introduction to soil*. Department of Natural Resources and Environment, 2001. ISBN 9780731145560.

[6] ABDULKADIR, Mohamed. Chapter One-Introduction to Soil. In: *Fundamental Of Soil Science*. 1st edition. s. 1-27.

[7] DRAGOVIć, Nada a Tijana VULEVIć. Soil Degradation Processes, Causes, and Assessment Approaches. *Life on Land* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, s. 1-12 [cit. 2022-11-18]. Encyclopedia of the UN Sustainable Development Goals. ISBN 978-3-319-71065-5.

[8] MCCAULEY, Ann, Clain JONES a Jeff JACOBSEN. Basic soil properties. In: *Soil and Water management module*. s. 1-12.

[9] ŠIMEK, Miloslav. *Základy nauky o půdě*. Vyd. 1. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2003. ISBN 80-7040-629-1.

[10] KUMAR, Rajat, Gadandeep KAUR a Deepika GULATI. Effect of soil organic matter on physical properties of soil. *Just Agriculture* [online]. **2020**(1), 25-30 [cit. 2022-11-26].

[11] Soil properties. In: *Soil Health Nexus* [online]. [cit. 2022-11-18]. Dostupné z: https://soilhealthnexus.org/resources/soil-properties/

[12] USHARANI, , ROOPASHREE a DHANANJAY. Role of soil physical, chemical and biological properties for soil health improvement and sustainable agriculture. *Journal of*

Pharmacognosy and Phytochemistry [online]. 2019, 1256-1267 [cit. 2022-11-18]. ISSN 2278-4136.

[13] CARDOSO, Elke, Rafael VASCONCELLOS, Daniel BINI et al. Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health?. *Scientia Agricola* [online]. 2013, **70**(4), 274-289 [cit. 2022-11-18]. ISSN 0103-9016.

[14] ŠIMEK, Miloslav. *Základy nauky o půdě*. 2., upr a rozš. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, 2005. ISBN 80-7040-747-6.

[15] KOO, B-.J., D.C. ADRIANO, N.S. BOLAN a C.D. BARTON. ROOT EXUDATES AND MICROORGANISMS. In: *Encyclopedia of Soils in the Environment* [online]. Elsevier, 2005, s. 421-428 [cit. 2023-02-20]. ISBN 9780123485304.

[16] ANTOSZEWSKI, Marcel, Agnieszka MIEREK-ADAMSKA a Grażyna DąBROWSKA. The Importance of Microorganisms for Sustainable Agriculture—A Review. *Metabolites* [online]. 2022, **12**(11) [cit. 2023-02-20]. ISSN 2218-1989.

[17] ŠIMEK, Miroslav, Dana ELHOTTOVÁ a Václav PIŽL. *Živá půda: Rozmanitost života a zdraví ekosystémů*. 2015. ISBN 978-80-200-2567-8.

[18] ŠARAPATKA, Bořivoj. *Půda - přehlížené bohatství: publikace pro střední školy i další zájemce o danou problematiku*. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci ve spolupráci s Českou pedologickou společností, z.s. a Radou vědeckých společností ČR, z.s., 2021. ISBN 978-80-244-6022-2.

[19] *Mikroorganismy jako indikátory stavu půdního prostředí: Půdní edafon – živá část půdy* [online]. In: . Mendelova univerzita Brno. Brno [cit. 2023-02-08]. Dostupné z: https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=3407&typ=html

[20] FORTUNA, A. The Soil Biota. In: *Nature Education* [online]. Washington State University [cit. 2023-02-08].

[21] USMAN, Suleiman, Yakubu MUHAMMAD a Alhaji CHIROMAN. Roles of soil biota and biodiversity in soil environment – A concise communication. *EURASIAN JOURNAL OF SOIL SCIENCE (EJSS)* [online]. 2016, **5**(4), 255-265 [cit. 2023-02-08]. ISSN 2147-4249.

[22] SCHLAGHAMERSKÝ, Jiří. *Úvod do půdní biologie*. Brno, 2013. Skriptum. Masarykova univerzita, přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie.

[23] BALLABIO, Cristiano a Frank VERHEIJEN. *Soil threats in Europe* [online]. In: . [cit. 2022-11-18]. ISBN 978-92-79-54019-6. Dostupné z: doi:10.2788/488054

[24] SOIL AND THE ENVIRONMENT. In: *Soil Science Society of America* [online]. [cit. 2022-11-18]. Dostupné z: https://www.soils4teachers.org/soil-and-environment/

[25] NIELSEN, M.N. a A. WINDING. *Microorganisms as Indicators of Soil Health*. Denmark: National Environmental Research Institute, 2002. ISBN 87-7772-658-8.

[26] JOHNS, Christopher. *Living Soils: The Role of Microorganisms in Soil Health* [online]. In: . Future DIrections International [cit. 2023-02-14].

[27] *Soil ~ a Living Organism* [online]. In: . [cit. 2023-02-14]. Dostupné z: https://agriprofocus.com/upload/04_Chapter_2_Soil_a_living_organism1452583877.pdf

[28] PRASAD, Mahendra, R. SRINIVASAN, Manoj CHAUDHARY, Mukesh CHOUDHARY a Lokesh JAT. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture. In: *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture* [online]. Elsevier, 2019, s. 129-157 [cit. 2023-02-01]. ISBN 9780128158791.

[29] HAYAT, Rifat, Safdar ALI, Ummay AMARA, Rabia KHALID a Iftikhar AHMED. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* [online]. 2010, **60**(4), 579-598 [cit. 2023-02-03]. ISSN 1590-4261.

[30] SOFO, Adriano a Patrizia RICCIUTI. A Standardized Method for Estimating the Functional Diversity of Soil Bacterial Community by Biolog® EcoPlatesTM Assay—The Case Study of a Sustainable Olive Orchard. *Applied Sciences* [online]. 2019, **9**(19) [cit. 2023-02-14]. ISSN 2076-3417.

[31] Soil Enzymes. In: LAL, Rattan. *Encyclopedia of Soil Science, Third Edition* [online]. CRC Press, 2017, s. 2100-2107 [cit. 2023-02-11]. ISBN 9781315161860.

[32] LADD, J. N. Soil Enzymes. In: VAUGHAN, D. a R. E. MALCOLM, ed., D. VAUGHAN, R. MALCOLM. *Soil Organic Matter and Biological Activity* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1985, s. 175-221 [cit. 2023-02-11]. ISBN 978-94-010-8757-5.

[33] ALKORTA, Itziar, Ana AIZPURUA, Patrick RIGA, Isabel ALBIZU, Ibone AMÉZAGA a Carlos GARBISU. Soil Enzyme Activities as Biological Indicators of Soil Health. *Reviews on Environmental Health* [online]. 2003, **18**(1) [cit. 2023-02-11]. ISSN 2191-0308.

[34] GUNJAL, A.B., M.S. WAGHMODE, N.N. PATIL a N.N. NAWANI. Significance of soil enzymes in agriculture. In: *Smart Bioremediation Technologies* [online]. Elsevier, 2019, s. 159-168 [cit. 2023-02-11]. ISBN 9780128183076.

[35] KARACA, Ayten, Sema CETIN, Oguz TURGAY a Ridvan KIZILKAYA. Soil Enzymes as Indication of Soil Quality. In: SHUKLA, Girish a Ajit VARMA, ed., Girish SHUKLA,

Ajit VARMA. *Soil Enzymology* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, s. 119-148 [cit. 2023-02-12]. Soil Biology. ISBN 978-3-642-14224-6.

[36] BUEIS, Teresa, María TURRIÓN, Felipe BRAVO, Valentín PANDO a Adele MUSCOLO. Factors determining enzyme activities in soils under Pinus halepensis and Pinus sylvestris plantations in Spain: a basis for establishing sustainable forest management strategies. *Annals of Forest Science* [online]. 2018, **75**(1) [cit. 2023-02-12]. ISSN 1286-4560.

[37] WOLINSKA, Agnieszka a Zofia STEPNIEWSK. Dehydrogenase Activity in the Soil Environment. In: CANUTO, Rosa Angela, ed., Rosa CANUTO. *Dehydrogenases* [online]. InTech, 2012 [cit. 2023-02-12]. ISBN 978-953-307-019-3.

[38] XIE, Chunsheng, Jie TANG, Jie ZHAO, Donglei WU a Xinhua XU. Comparison of phosphorus fractions and alkaline phosphatase activity in sludge, soils, and sediments. *Journal of Soils and Sediments* [online]. 2011, **11**(8), 1432-1439 [cit. 2023-02-12]. ISSN 1439-0108.

[39] AN, Youn-Joo a Minjin KIM. Effect of antimony on the microbial growth and the activities of soil enzymes. *Chemosphere* [online]. 2009, **74**(5), 654-659 [cit. 2023-02-12]. ISSN 00456535.

[40] FLOCH, Carine, Enrique ALARCON-GUTIÉRREZ a Stéven CRIQUET. ABTS assay of phenol oxidase activity in soil. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2007, **71**(3), 319-324 [cit. 2023-02-12]. ISSN 01677012.

[41] VERHEIJEN, F, S JEFFERY, A BASTOS, M VAN DER VELDE a I DIAFAS. *Biochar Application to Soils: A Critical Scientific Review of Effects on Soil Properties, Processes and Functions* [online]. [cit. 2022-11-18]. ISSN 1018-5593.

[42] AMALINA, Farah, Abdul SYUKOR ABD RAZAK, Santhana KRISHNAN, Haspina SULAIMAN, A.W. ZULARISAM a Mohd NASRULLAH. Advanced techniques in the production of biochar from lignocellulosic biomass and environmental applications. *Cleaner Materials* [online]. 2022, **6** [cit. 2022-11-18]. ISSN 27723976.

[43] HUI, Dafeng. Effects of Biochar Application on Soil Properties, Plant Biomass Production, and Soil Greenhouse Gas Emissions: A Mini-Review. *Agricultural Sciences* [online]. 2021, **12**(03), 213-236 [cit. 2022-11-18]. ISSN 2156-8553.

[44] WILLIAMS, C., Rachel EMERSON a Jaya TUMULURU. Biomass Compositional Analysis for Conversion to Renewable Fuels and Chemicals. In: TUMULURU, Jaya Shankar, ed., Jaya TUMULURU. *Biomass Volume Estimation and Valorization for Energy* [online]. InTech, 2017 [cit. 2022-11-20]. ISBN 978-953-51-2937-0.

[45] LEHMANN, Johannes a Stephen JOSEPH. *Biochar for Enviromental Management*. Second Edition. 2015. ISBN 978-0-415-70415-1.

[46] JI, Mengyuan, Xiaoxia WANG, Muhammad USMAN et al. Effects of different feedstocks-based biochar on soil remediation: A review. *Environmental Pollution* [online]. 2022, **294** [cit. 2022-11-21]. ISSN 02697491.

[47] Biochar Feedstocks. In: *International Biochar Initiative* [online]. 2018 [cit. 2022-11-22]. Dostupné z: https://biochar-international.org/biochar-feedstocks/

[48] IPPOLITO, James, Liqiang CUI, Claudia KAMMANN et al. Feedstock choice, pyrolysis temperature and type influence biochar characteristics: a comprehensive meta-data analysis review. *Biochar* [online]. 2020, **2**(4), 421-438 [cit. 2022-11-22]. ISSN 2524-7972.

[49] WEBER, Kathrin a Peter QUICKER. Properties of biochar. *Fuel* [online]. 2018, **217**, 240-261 [cit. 2022-11-22]. ISSN 00162361.

[50] DEY, Deborita a Prithusayak MONDAL. *A Comprehensive Review on Biochar -The Black Carbon: Production Technologies, Physico-chemical Properties and Utilization for Sustainable Environment* [online]. [cit. 2023-02-19]. ISSN 2278-6783.

[51] YAASHIKAA, P.R., P. KUMAR, Sunita VARJANI a A. SARAVANAN. A critical review on the biochar production techniques, characterization, stability and applications for circular bioeconomy. *Biotechnology Reports* [online]. 2020, **28** [cit. 2022-11-19]. ISSN 2215017X.

[52] CHA, Jin, Sung PARK, Sang-Chul JUNG, Changkook RYU, Jong-Ki JEON, Min-Chul SHIN a Young-Kwon PARK. Production and utilization of biochar: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 2016, **40**, 1-15 [cit. 2022-11-19]. ISSN 1226086X.

[53] LAIRD, David, Robert BROWN, James AMONETTE a Johannes LEHMANN. Review of the pyrolysis platform for coproducing bio-oil and biochar. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* [online]. 2009, **3**(5), 547-562 [cit. 2022-11-19]. ISSN 1932104X.

[54] TRIPATHI, Manoj, J.N. SAHU a P. GANESAN. Effect of process parameters on production of biochar from biomass waste through pyrolysis: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2016, **55**, 467-481 [cit. 2022-11-18]. ISSN 13640321.

[55] JIANG, Hewei, Yangtian YE, Ping LU, Mingxing ZHAO, Guiling XU, Dandan CHEN a Tao SONG. Effects of torrefaction conditions on the hygroscopicity of biochars. *Journal of the Energy Institute* [online]. 2021, **96**, 260-268 [cit. 2022-11-20]. ISSN 17439671.

[56] DAFUL, Asfaw a Meegalla R CHANDRARATNE. Biochar Production From Biomass Waste-Derived Material. In: *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials* [online]. Elsevier, 2020, s. 370-378 [cit. 2022-11-19]. ISBN 9780128131961.

[57] NASROLLAHZADEH, Mahmoud, Zahra NEZAFAT a Nasrin SHAFIEI. Lignin chemistry and valorization. In: *Biopolymer-Based Metal Nanoparticle Chemistry for Sustainable Applications* [online]. Elsevier, 2021, s. 145-183 [cit. 2022-11-20]. ISBN 9780128221082.

[58] KUMAR, Sunil a Snehalata ANKARAM. Waste-to-Energy Model/Tool Presentation. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* [online]. Elsevier, 2019, s. 239-258 [cit. 2022-11-20]. ISBN 9780444640833.

[59] LEHMANN, Johannes a Stephen JOSEPH. *Biochar for environmental management: science and technology* [online]. Sterling, VA: Earthscan, 2009 [cit. 2020-04-02]. ISBN 18-440-7658-X.

[60] JOSEPH, S, P TAYLOR, F REZENDE, K DRAPER a A COWIE. The Properties of Fresh and Aged Biochar. In: *Biochar for Sustainable Soils* [online]. [cit. 2022-11-23]. Dostupné z: https://biochar.international/guides/properties-fresh-aged-biochar/

[61] JATAV, Hanuman, Vishnu RAJPUT, Tatiana MINKINA et al. Sustainable Approach and Safe Use of Biochar and Its Possible Consequences. *Sustainability* [online]. 2021, **13**(18) [cit. 2022-11-25]. ISSN 2071-1050.

[62] DAI, Zhongmin, Xinquan XIONG, Hang ZHU, Haojie XU, Peng LENG, Jihui LI, C. TANG a Jianming XU. Association of biochar properties with changes in soil bacterial, fungal and fauna communities and nutrient cycling processes. *Biochar* [online]. 2021, **3**(3), 239-254 [cit. 2023-02-19]. ISSN 2524-7972.

[63] XIE, Yanqi, Liang WANG, Hailong LI et al. A critical review on production, modification and utilization of biochar. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* [online]. 2022, **161** [cit. 2023-02-15]. ISSN 01652370.

[64] ZHANG, Yafu, Jinman WANG a Yu FENG. The effects of biochar addition on soil physicochemical properties: A review. *CATENA* [online]. 2021, **202** [cit. 2022-11-26]. ISSN 03418162.

[65] THIES, Janice a Matthias RILLIG. Characteristics of biochar: Biological properties. *Biochar for Enviromental Management*. 2009, 85–105.

[66] PALANSOORIYA, Kumuduni, James WONG, Yohey HASHIMOTO et al. Response of microbial communities to biochar-amended soils: a critical review. *Biochar* [online]. 2019, **1**(1), 3-22 [cit. 2023-02-22]. ISSN 2524-7972.

[67] UZOMA, K., M. INOUE, H. ANDRY, H. FUJIMAKI, A. ZAHOOR a E. NISHIHARA. Effect of cow manure biochar on maize productivity under sandy soil condition. *Soil Use and Management* [online]. 2011, **27**(2), 205-212 [cit. 2023-04-03]. ISSN 02660032.

[68] TANURE, Maria, Liovando DA COSTA, Hugo HUIZ, Raphael FERNANDES, Paulo CECON, José PEREIRA JUNIOR a José DA LUZ. Soil water retention, physiological characteristics, and growth of maize plants in response to biochar application to soil. *Soil and Tillage Research* [online]. 2019, **192**, 164-173 [cit. 2023-04-03]. ISSN 01671987.

[69] SYUHADA, A.B., J. SHAMSHUDDIN, C.I. FAUZIAH, A.B. ROSENANI, A. ARIFIN a Francis ZVOMUYA. Biochar as soil amendment: Impact on chemical properties and corn nutrient uptake in a Podzol. *Canadian Journal of Soil Science* [online]. 2016, **96**(4), 400-412 [cit. 2020-03-29]. ISSN 0008-4271.

[70] HALMI, Muhammad a Khanom SIMARANI. Effect of two contrasting biochars on soil microbiota in the humid tropics of Peninsular Malaysia. *Geoderma* [online]. 2021, **395** [cit. 2023-04-04]. ISSN 00167061.

[71] JABBOROVA, Dilfuza, Hua MA, Sonoko BELLINGRATH-KIMURA a Stephan WIRTH. Impacts of biochar on basil (Ocimum basilicum) growth, root morphological traits, plant biochemical and physiological properties and soil enzymatic activities. *Scientia Horticulturae* [online]. 2021, **290** [cit. 2023-04-04]. ISSN 03044238.

[72] KARIMI, Akbar, Abdolamir MOEZZI, Mostafa CHOROM a Naeimeh ENAYATIZAMIR. Application of Biochar Changed the Status of Nutrients and Biological Activity in a Calcareous Soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* [online]. 2020, **20**(2), 450-459 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0718-9508.

[73] KARI, András, Zsuzsanna NAGYMÁTÉ, Csaba ROMSICS et al. Evaluating the combined effect of biochar and PGPR inoculants on the bacterial community in acidic sandy soil. *Applied Soil Ecology* [online]. 2021, **160** [cit. 2023-04-04]. ISSN 09291393.

[74] MALIK, Laraib, Muhammad SANAULLAH, Faisal MAHMOOD, Sabir HUSSAIN, Muhammad SIDDIQUE, Faiza ANWAR a Tanvir SHAHZAD. Unlocking the potential of co-applied biochar and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture under stress conditions. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* [online]. 2022, **9**(1) [cit. 2023-04-04]. ISSN 2196-5641.

[75] FOSTER, Erika, Peter BAAS, Matthew WALLENSTEIN a M. COTRUFO. Precision biochar and inoculum applications shift bacterial community structure and increase specific nutrient availability and maize yield. *Applied Soil Ecology* [online]. 2020, **151** [cit. 2023-04-04]. ISSN 09291393.

[76] ULLAH, Naseer, Allah DITTA, Azeem KHALID et al. Integrated Effect of Algal Biochar and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Physiology and Growth of Maize Under Deficit Irrigations. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* [online]. 2020, **20**(2), 346-356 [cit. 2023-04-25]. ISSN 0718-9508.

[77] AHMAD, Maqshoof, Xiukang WANG, Thomas HILGER et al. Evaluating Biochar-Microbe Synergies for Improved Growth, Yield of Maize, and Post-Harvest Soil

Characteristics in a Semi-Arid Climate. *Agronomy* [online]. 2020, **10**(7) [cit. 2023-04-25]. ISSN 2073-4395.

[78] WANG, Yuan, Wenqing LI, Binghai DU a Hanhao LI. Effect of biochar applied with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on soil microbial community composition and nitrogen utilization in tomato. *Pedosphere* [online]. 2021, **31**(6), 872-881 [cit. 2023-04-25]. ISSN 10020160.

[79] ŠTORKOVÁ, Natálie. *Optimalizace metod pro posouzení vlivu biouhlu na růst modelových rostlin* [online]. Brno, 2021 [cit. 2023-03-23]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/130297. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Michal Kalina.

[80] Microbial Community Analysis with EcoPlates. In: *Biolog* [online]. 2022 [cit. 2023-03-07].

[81] HENDEL, Björn, Robert SINSABAUGH a Jürgen MARXSEN. Lignin-Degrading Enzymes: Phenoloxidase and Peroxidase. In: BÄRLOCHER, Felix, Mark O. GESSNER a Manuel A.S. GRAçA, ed., Felix BÄRLOCHER, Mark GESSNER, Manuel GRAçA. *Methods to Study Litter Decomposition* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, s. 425-431 [cit. 2023-03-07]. ISBN 978-3-030-30514-7.

[82] GLICKMANN, E a Y DESSAUX. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1995, **61**(2), 793-796 [cit. 2023-04-26]. ISSN 0099-2240.

[83] SCHWYN, Bernhard a J.B. NEILANDS. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* [online]. 1987, **160**(1), 47-56 [cit. 2023-04-26]. ISSN 00032697.

[84] SYLVESTER-BRADLEY, R., N. ASAKAWA, S. TORRACA, F.M.M. MAGALHãES, L.A. OLIVEIRA a R.M. PEREIRA. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica* [online]. 1982, **12**(1), 15-22 [cit. 2023-04-26]. ISSN 0044-5967.

[85] JEFFERY, S., F.G.A. VERHEIJEN, M. VAN DER VELDE a A.C. BASTOS. A quantitative review of the effects of biochar application to soils on crop productivity using meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment* [online]. 2011, **144**(1), 175-187 [cit. 2023-04-19]. ISSN 01678809.

[86] OGUNTUNDE, Philip, Matthias FOSU, Ayodele AJAYI a Nick VAN DE GIESEN. Effects of charcoal production on maize yield, chemical properties and texture of soil.

Biology and Fertility of Soils [online]. 2004, **39**(4), 295-299 [cit. 2023-04-19]. ISSN 0178-2762.

[87] AMELOOT, Nele, Stefaan DE NEVE, Kanagaratnam JEGAJEEVAGAN et al. Short-term CO2 and N2O emissions and microbial properties of biochar amended sandy loam soils. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2013, **57**, 401-410 [cit. 2023-04-19]. ISSN 00380717.

[88] ZHENG, Yu, Xiaori HAN, Yuying LI, Jinfeng YANG, Na LI a Ning AN. Effects of Biochar and Straw Application on the Physicochemical and Biological Properties of Paddy Soils in Northeast China. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1) [cit. 2023-04-19]. ISSN 2045-2322.

[89] ZHU, Li-xia, Qian XIAO, Hong-yan CHENG, Bing-jie SHI, Yu-fang SHEN a Shi-qing LI. Seasonal dynamics of soil microbial activity after biochar addition in a dryland maize field in North-Western China. *Ecological Engineering* [online]. 2017, **104**, 141-149 [cit. 2023-04-19]. ISSN 09258574.

[90] PAZ-FERREIRO, J., G. GASCÓ, B. GUTIÉRREZ a A. MÉNDEZ. Soil biochemical activities and the geometric mean of enzyme activities after application of sewage sludge and sewage sludge biochar to soil. *Biology and Fertility of Soils* [online]. 2012, **48**(5), 511-517 [cit. 2023-04-19]. ISSN 0178-2762.

[91] CEN, Rui, Weiying FENG, Fang YANG, Wenyong WU, Haiqing LIAO a Zhongyi QU. Effect mechanism of biochar application on soil structure and organic matter in semi-arid areas. *Journal of Environmental Management* [online]. 2021, **286** [cit. 2023-04-25]. ISSN 03014797.

[92] TRUPIANO, Dalila, Claudia COCOZZA, Silvia BARONTI et al. The Effects of Biochar and Its Combination with Compost on Lettuce (Lactuca sativa L.) Growth, Soil Properties, and Soil Microbial Activity and Abundance. *International Journal of Agronomy* [online]. 2017, **2017**, 1-12 [cit. 2023-04-19]. ISSN 1687-8159.

[93] SUN, Zenghui, Ya HU, Lei SHI, Gang LI, Zhe PANG, Siqi LIU, Yamiao CHEN a Baobao JIA. Effects of biochar on soil chemical properties: A global meta-analysis of agricultural soil. *Plant, Soil and Environment* [online]. 2022, **68**(6), 272-289 [cit. 2023-04-19]. ISSN 12141178.

[94] YUAN, Jin-Hua, Ren-Kou XU, Ning WANG a Jiu-Yu LI. Amendment of Acid Soils with Crop Residues and Biochars. *Pedosphere* [online]. 2011, **21**(3), 302-308 [cit. 2023-04-24]. ISSN 10020160.

[95] ABRISHAMKESH, S., M. GORJI, H. ASADI, G.H. BAGHERI-MARANDI a A.A. POURBABAEE. Effects of rice husk biochar application on the properties of alkaline

soil and lentil growth. *Plant, Soil and Environment* [online]. 2015, **61**(11), 475-482 [cit. 2023-04-24]. ISSN 12141178.

[96] WU, Qifeng, Ruiyuan LIAN, Meixia BAI et al. Biochar co-application mitigated the stimulation of organic amendments on soil respiration by decreasing microbial activities in an infertile soil. *Biology and Fertility of Soils* [online]. 2021, **57**(6), 793-807 [cit. 2023-04-26]. ISSN 0178-2762.

[97] HALMI, M. a K. SIMARANI. Responses of Soil Microbial Population and Lignocellulolytic Enzyme Activities to Palm Kernel Shell Biochar Amendment. *Eurasian Soil Science* [online]. 2021, **54**(12), 1903-1911 [cit. 2023-04-26]. ISSN 1064-2293.

[98] BARAZA RUIZ, Elena, Josefina BOTA SALORT, Antonia ROMERO MUNAR a Balbina NOGALES FERNÁNDEZ. Application of the Biolog ™ ECO-plate technique for the study of the physiological profile of microbial communities in agricultural land. *Ecosistemas* [online]. 2019, **28**(3), 46-53 [cit. 2023-04-26]. ISSN 16972473.

[99] XU, W., G. WANG, F. DENG, X. ZOU, H. RUAN, H. CHEN a Matt AITKENHEAD. Responses of soil microbial biomass, diversity and metabolic activity to biochar applications in managed poplar plantations on reclaimed coastal saline soil. *Soil Use and Management* [online]. 2018, **34**(4), 597-605 [cit. 2023-04-25]. ISSN 02660032.

[100] LIAO, Na, Qi LI, Wen ZHANG, Guangwei ZHOU, Lijuan MA, Wei MIN, Jun YE a Zhenan HOU. Effects of biochar on soil microbial community composition and activity in drip-irrigated desert soil. *European Journal of Soil Biology* [online]. 2016, **72**, 27-34 [cit. 2023-04-25]. ISSN 11645563.

[101] ZHU, Li-xia, Qian XIAO, Yu-fang SHEN a Shi-qing LI. Microbial functional diversity responses to 2 years since biochar application in silt-loam soils on the Loess Plateau. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2017, **144**, 578-584 [cit. 2023-04-25]. ISSN 01476513.

[102] PRESTON-MAFHAM, Juliet, Lynne BODDY a Peter RANDERSON. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles â□□ a critique. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2002, **42**(1), 1-14 [cit. 2023-04-25]. ISSN 01686496.

[103] ABIVEN, Samuel, Andreas HUND, Vegard MARTINSEN a Gerard CORNELISSEN. Biochar amendment increases maize root surface areas and branching: a shovelomics study in Zambia. *Plant and Soil* [online]. 2015, **395**(1-2), 45-55 [cit. 2023-04-25]. ISSN 0032-079X.

[104] VEJAN, Pravin, Rosazlin ABDULLAH, Tumirah KHADIRAN, Salmah ISMAIL a Amru NASRULHAQ BOYCE. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in

Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules* [online]. 2016, **21**(5) [cit. 2023-04-17]. ISSN 1420-3049.

[105] FÜZY, Anna, Ramóna KOVÁCS, Imre CSERESNYÉS, István PARÁDI, Tibor SZILI-KOVÁCS, Bettina KELEMEN, Kálmán RAJKAI a Tünde TAKÁCS. Selection of plant physiological parameters to detect stress effects in pot experiments using principal component analysis. *Acta Physiologiae Plantarum* [online]. 2019, **41**(5) [cit. 2023-04-09]. ISSN 0137-5881.

[106] BRUKHIN, V. a N. MOROZOVA. Plant Growth and Development - Basic Knowledge and Current Views. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena* [online]. 2011, **6**(2), 1-53 [cit. 2023-04-09]. ISSN 0973-5348.

[107] BUTNAN, Somchai, Jonathan DEENIK, Banyong TOOMSAN, Michael ANTAL a Patma VITYAKON. Biochar characteristics and application rates affecting corn growth and properties of soils contrasting in texture and mineralogy. *Geoderma* [online]. 2015, **237-238**, 105-116 [cit. 2023-04-19]. ISSN 00167061.

[108] NAEEM, Muhammad, Muhammad KHALID, Zahoor AHMAD a Muhammad NAVEED. Low Pyrolysis Temperature Biochar Improves Growth and Nutrient Availability of Maize on Typic Calciargid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* [online]. 2015, **47**(1), 41-51 [cit. 2023-04-19]. ISSN 0010-3624.

[109] DEENIK, Jonathan, Tai MCCLELLAN, Goro UEHARA, Michael ANTAL a Sonia CAMPBELL. Charcoal Volatile Matter Content Influences Plant Growth and Soil Nitrogen Transformations. *Soil Science Society of America Journal* [online]. 2010, **74**(4), 1259-1270 [cit. 2023-04-19]. ISSN 03615995.

[110] JONES, D.L., J. ROUSK, G. EDWARDS-JONES, T.H. DELUCA a D.V. MURPHY. Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three year field trial. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2012, **45**, 113-124 [cit. 2023-04-19]. ISSN 00380717.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ABA	kyselina abscisová
Abs	absorbance
ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylát
AWCD	průměrný vývoj barvy jamky
CEC	kationtová výměnná kapacita
CLPP	fyziologické profilování na úrovni společenství
CTAB	cetrimoniumbromid
Č	vzorek černozemě po odběru
Č0	vzorek černozemě po kultivaci bez biouhlu
Č20	vzorek černozemě po kultivaci s biouhlem
EA	elementární analýza
EBC	evropský certifikát pro biouhel využitelný v zemědělství
GA	kyselina giberolová
H'	Shannonův index diverzity
Hm.%	hmotnostní procenta
IAA	indoloctová kyselina
k	molární absorpční koeficient
L-DOPA	3,4-dyhydroxy-L-fenylalanin
NPK	anorganické hnojivo (dusík, fosfor, draslík)
OD	optická hustota
P	vzorek písčité půdy po odběru
P0	vzorek písčité půdy po kultivaci bez biouhlu
P20	vzorek písčité půdy po kultivaci s biouhlem
PGPR	rhizobakterie podporující růst rostlin
pH	potenciál vodíku
SOM	půdní organická hmota
T	inkubační doba
TGA	termogravimetrická analýza

PŘÍLOHY

Tabulka 8: Rozložení substrátů na mikrotitrační destičce Biolog EcoPlates™.

	1	2	3	4
A	Voda	β-methyl-D-glukosid	γ-lakton galaktonová kyselina	L-arginin
B	Metylester kyseliny pyrohroznové	D-xylóza	D-galakturonová kyselina	L-asparagin
C	Tween 40	i-erythritol	2-hydroxybenzoová kyselina	L-fenylalanin
D	Tween 80	D-mannitol	4-hydroxybenzoová kyselina	L-serin
E	α-cyklodextrin	N-acetyl-D-glukosamin	γ-aminobutanová kyselina	L-threonin
F	Glykogen	D-glukosaminová kyselina	Itakónová kyselina	Glycyl-L-glutamová kyselina
G	D-celobióza	Glukóza-1-fosfát	A-ketobutanová kyselina	Fenylethylamin
H	α-D-laktóza	D,L-α-glycerolfosfát	D-jablečná kyselina	putrescin