

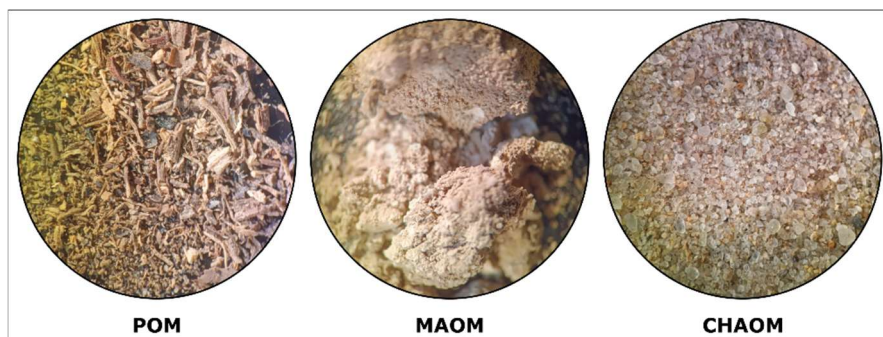
2025

Ústav výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA



**Fyzikální frakcionace půdní organické hmoty dle velikosti a hustoty
půdních částic a význam pro vyhodnocení stability uhlíku v půdě**



Viktor Nagy, Daniel Růžička, Sneha Patra, Vendula Koublová, Karel Klem

Ústav výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i., Bělidla 986/4a, 603 00 Brno

Dedikace:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu NAZV č. QK23020080 “Systém dlouhodobého ukládání uhlíku a snižování emisí oxidu dusného a metanu v zemědělství, vyhodnocení jejich efektivity a certifikace přínosů”.

Oponenti:**Mgr. Stanislav Malý, Ph.D.**

Oddělení mikrobiologie a biochemie

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Hroznová 63/2, Pisárky, 603 00 Brno

prof. Ing. Jiří Balík, CSc., dr. h. c.

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Česká zemědělská univerzita v Praze

Kamýcká 129

165 00 Praha – Suchbátka

Metodika byla certifikována Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ), pod osvědčením: 025418/2026

ISBN: 978-80-87902-46-2

Abstrakt

Metodika se zaměřuje na fyzikální frakcionaci půdního organického uhlíku (SOC) podle velikosti a hustoty částic, což je klíčové pro přesné stanovení stabilní složky uhlíku v zemědělské půdě a odhad jeho doby setrvání. Stabilita uložení uhlíku je z hlediska mitigace klimatické změny významnější než samotné množství. Protokol kombinuje separaci podle hustoty s následnou frakcionací podle velikosti částic, čímž umožňuje rozdělení SOC na dvě funkčně odlišné frakce: labilní částicový organický uhlík (POC) a stabilní minerálně asociovaný organický uhlík (MAOC). Separace probíhá pomocí polywolframanu sodného (SPT) při hustotě $1,86 \text{ g ml}^{-1}$ a síta s velikostí ok $50 \text{ }\mu\text{m}$. V oddělených frakcích se stanovuje obsah uhlíku a dusíku, což poskytuje ukazatele kvality ukládaného uhlíku. Metodika byla optimalizována pro české podmínky, aby byla časově i materiálově efektivní, a zahrnuje praktická řešení běžných problémů. Testování na vzorcích z víceletého polního experimentu ukázalo, že zvýšení stabilní frakce MAOC je dosažitelné zejména kombinací bezorebné technologie, pěstování druhově bohatých mezplodin, aplikace kompostu či kompostovaného biouhlu a hnojení dusíkem. Samostatné faktory mají nízký efekt. Výsledky potvrzují, že běžně používaný parametr Cox není vhodným indikátorem stability uhlíku, zatímco POxC (manganistanem draselným oxidovatelný uhlík) vykazuje vyšší predikční spolehlivost v odhadu MAOC. Metodika přináší nástroj pro přesnější hodnocení dlouhodobého ukládání uhlíku, což je zásadní pro certifikaci uhlíkového zemědělství, tvorbu politik a praktické rozhodování zemědělců. Frakcionace umožňuje snížit nejistotu v systémech MRV, zlepšit auditovatelnost uhlíkových kreditů a podpořit efektivní hospodaření s půdou.

Klíčová slova:

Půdní organický uhlík; frakcionační metoda; částicová organická hmota; organická hmota asociovaná s minerály; uhlíkové zemědělství

Abstract

The methodology focuses on the physical fractionation of soil organic carbon (SOC) according to particle size and density, which is key to accurately determining the stable carbon component in agricultural soil and estimating its retention time. From the perspective of climate change mitigation, the stability of carbon storage is more important than the quantity itself. The protocol combines separation by density with subsequent fractionation by particle size, allowing SOC to be divided into two functionally distinct fractions: labile particulate organic carbon (POC) and stable mineral-associated organic carbon (MAOC). Separation is performed using sodium polywolframate (SPT) at a density of 1.86 g ml^{-1} and a sieve with a mesh size of $50 \text{ }\mu\text{m}$. The carbon and nitrogen content is determined in the separated fractions, which provides indicators of the quality of the stored carbon. The methodology has been optimized for Czech conditions to be time and material efficient and includes practical solutions to common problems. Testing on samples from a multi-year field experiment showed that an increase in the stable MAOC fraction is achievable mainly through a combination of no-till technology, cultivation of species-rich cover crops, application of compost or composted biochar, and nitrogen fertilization. Individual factors have a low effect. The results confirm that the commonly used Cox parameter is not a suitable indicator of carbon stability, while POxC (potassium permanganate-oxidizable carbon) shows higher predictive reliability. The methodology provides a tool for more accurate assessment of long-term carbon storage, which is essential for carbon farming certification, policy making, and practical decision-making by farmers. Fractionation reduces uncertainty in MRV systems, improves the auditability of carbon credits, and promotes effective land management.

Keywords:

Soil organic carbon; fractionation method; particulate organic matter; mineral-associated organic matter; carbon farming

Obsah

Abstrakt	3
Klíčová slova:	3
Abstract	4
Keywords:	4
1 Cíle metodiky	7
2 Vlastní popis metodiky	7
2.1 Literární přehled	7
2.1.1 Půdní organická hmota a její složky	7
2.1.2 Význam stability uložení uhlíku pro uhlíkové zemědělství	8
2.1.3 Rozdělení zásobníků půdního organického uhlíku z pohledu délky uložení	9
2.2 Popis metodiky frakcionace půdního organického uhlíku dle velikosti a hustoty částic	15
2.2.1 Charakteristika dílčích frakcí	15
2.2.2 Materiál a vybavení	16
2.3 Popis vakuového odsávacího systému	17
2.4 Seznam zkratk	19
2.5 Časová náročnost protokolu	20
2.6 Popis postupu frakcionace	20
2.6.1 Příprava půdního vzorku	20
2.6.2 Separace POMu	23
2.6.3 Promývání POMu	24
2.6.4 Separace CHAOMu a MAOMu	24
2.6.5 Promývání CHAOMu	25
2.6.6 Promývání MAOMu	25
2.7 Optimalizace metodických kroků	27
2.7.1 Rozrušení půdních agregátů	27
2.7.2 Separace podle velikosti částic	29
2.7.3 Stanovení obsahu celkového uhlíku a dusíku v jednotlivých frakcích	29
2.7.4 Recyklace separačního roztoku SPT	29
2.7.5 Výsledky a limitace metody	31
2.7.6 Opakovatelnost postupu	38
2.7.7 Časté problémy	39
2.8 Vliv pěstitelské technologie na zvyšování obsahu stabilní frakce MAOC	40
2.8.1 Materiál a metody	40
2.8.2 Výsledky a diskuse	43
2.8.3 Závěr	50

3	Shrnutí dosažených výsledků a přínosy pro praxi	51
4	Srovnání novosti postupů.....	52
5	Popis uplatnění metodiky.....	53
6	Ekonomické aspekty uplatnění metodiky	55
7	Seznam použité související literatury.....	57
8	Seznam publikací které předcházely metodice.....	62

1 Cíle metodiky

- Vyvinout standardizovaný postup fyzikální frakcionace půdního organického uhlíku (SOC) podle velikosti a hustoty částic, který umožní přesné oddělení funkčních frakcí SOC dle jejich stability.
- Zajistit spolehlivé stanovení stabilní složky uhlíku v půdě (MAOC) pro odhad jeho dlouhodobé perzistence, což je zásadní pro hodnocení mitigace klimatické změny.
- Minimalizovat metodické zkreslení a zvýšit reprodukovatelnost výsledků kombinací separace podle hustoty a velikosti částic.
- Zvýšit dostupnost a použitelnost technik frakcionace SOC pro odbornou praxi v České republice, včetně optimalizace nákladů a času.
- Podpořit efektivní hospodaření s půdou a monitorování záchytu uhlíku prostřednictvím přesnějších analytických nástrojů pro certifikaci uhlíkového zemědělství.

2 Vlastní popis metodiky

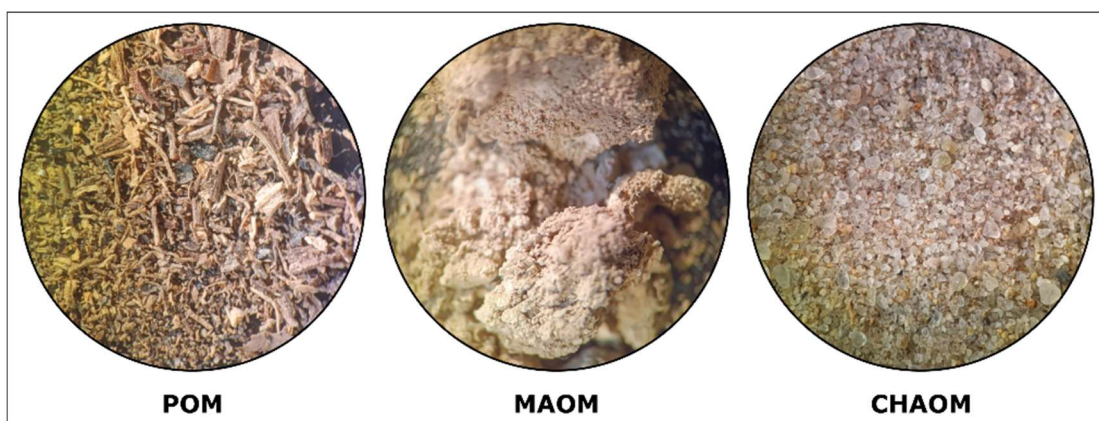
2.1 Literární přehled

2.1.1 Půdní organická hmota a její složky

Půdní organická hmota (soil organic matter, SOM) představuje kontinuum organického materiálu v různých fázích transformace a rozkladu (Lehmann and Kleber, 2015). Koncepce fyzikálních frakcí SOM zjednodušuje komplexní povahu SOM na jednotlivé funkční frakce, mezi které patří organická hmota asociovaná s minerály (mineral-associated organic matter, MAOM), částicová organická hmota tvořená fragmenty rostlin, živočichů a mikroorganismů (particulate organic matter, POM), organická hmota asociovaná s hrubými těžkými částicemi - pískem (coarse heavy associated organic matter, CHAOM) a rozpuštěná organická hmota (dissolved organic matter, DOM). Půdní organický uhlík (SOC) obsažený v jednotlivých frakcích je definován jako: organický uhlík asociovaný s jemnou minerální frakcí (mineral-associated organic carbon, MAOC), tedy asociovaný s jílem a prachem/hlinitými částicemi, částicový organický uhlík (particulate organic carbon, POC), organický uhlík asociovaný s hrubými těžkými částicemi (coarse heavy associated organic carbon, CHAOC) a rozpuštěný organický uhlík (dissolved organic carbon, DOC) (Lavallee et al., 2020). Podíly SOC alokované v jeho jednotlivých fyzikálních frakcích jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka 1 Podíl jednotlivých frakcí na SOC v orné půdě.

Frakce	Podíl ze SOC	Zdroj
MAOC	~65 %	(Georgiou et al., 2022)
POC (+ CHAOC)	~35 %	(Georgiou et al., 2022)
DOC	0,05–0,4 %	(von Lützow et al., 2007)



Obrázek 1 Mikrofotografie tří půdních frakcí po frakcionaci, zachycené světelným mikroskopem při 70násobném zvětšení, ilustrující jejich rozdílnou morfologii a strukturu.

MAOC je integrován v jednoduchých organických molekulách, mikroskopických fragmentech materiálu převážně rostlinného původu nebo organického materiálu který prošel mikrobiální transformací (Angst et al., 2024). Klíčovým rozdílem mezi MAOC a POC je schopnost MAOC vázat se na jemné minerální povrchy, což poskytuje fyzikální i chemickou ochranu před mikrobiálně řízenou mineralizací (Lehmann and Kleber, 2015). Tato fyzikálně-chemická stabilizace organického uhlíku (MAOC) vede k podstatně delší době setrvání v půdě — od několika desetiletí až po staletí — ve srovnání s POC, jehož běžná doba setrvání v zemědělské půdě se obvykle pohybuje v jednotkách let u volného POC až po několik desetiletí v případě uzavření v půdních makroagregátech (Kleber et al., 2015).

Tyto funkčně odlišné frakce SOC – MAOC a POC – se od sebe liší velikostí a hustotou částic jichž jsou součástí, především v důsledku vazby MAOC na jemné minerální částice. Frakcionace MAOM a POM tak může být provedena separací jemných minerálních částic z půdní matrice (Leuthold et al., 2024). Vzhledem k rostoucímu zájmu o sekvestraci uhlíku v zemědělských půdách je zapotřebí vyvinout metodiku pro frakcionaci SOM optimalizovanou pro české prostředí, která umožní přesné stanovení stabilní složky půdního organického uhlíku – MAOC.

2.1.2 Význam stability uložení uhlíku pro uhlíkové zemědělství

Spravedlivé a objektivní zavedení systému obchodování s uhlíkovými kredity v zemědělství s reálnými přínosy pro zmírňování klimatické změny do značné míry závisí na odpovědi na otázku, na jak dlouho dokážeme uhlík uložit v půdě. Hlavním důvodem je to, že je relativně snadné zvýšit množství nestabilního organického uhlíku v půdě, který v ní zůstává pouze v řádu měsíců až jednotek let, a tento uhlík může být v důsledku nevhodných rozhodnutí v hospodaření rozložen během jednotek let. Zaměření se na uhlík uložený tímto způsobem by vyvolalo více kontroverzí než skutečné zmírnění

dopadů a přínosy zavedení systému, který by se opíral o takový relativně nestabilní uhlík, by pravděpodobně nepřevážily nad náklady.

2.1.3 Rozdělení zásobníků půdního organického uhlíku z pohledu délky uložení

Na základě doby setrvání organického uhlíku v půdě dostupná literatura podporuje mechanistickou klasifikaci půdního uhlíku do čtyř hlavních skupin: a) labilní formy půdního organického uhlíku (SOC) s dobou setrvání v rozmezí od dnů do let, b) formy SOC se střednědobou délkou setrvání v rozmezí od let do desetiletí, c) organický uhlík poutaný na půdní minerální složku - prach a jíl (MAOC) s dobou setrvání v rozmezí desítek až stovek let, d) vysoce stabilní uhlík s dobou setrvání delší než 1000 let (Basile-Doelsch et al., 2020; Lavallee et al., 2020; Schmidt et al., 2021; Stoner et al., 2023).

2.1.3.1 Labilní formy uhlíku v půdě tvořené rozpustným organickým uhlíkem (DOC) a volným fragmentovaným (pevným částicovým) uhlíkem (POC) tvořeným odumřelými zbytky rostlin a mikroorganismů

Labilní formy zahrnují snadno dostupné substráty s minimální fyzickou nebo chemickou ochranou. Jedná se především o rozpustné sloučeniny, jako jsou kořenové exsudáty a rozpuštěný organický uhlík (DOC), stejně jako nechráněný částicový organický uhlík představovaný fragmenty zbytků rostlin či jiných organismů (POC), které jsou snadno zpracovatelné mikroorganismy a jsou proto silně ovlivňovány tzv. „primingem“ rhizosféry, který stimuluje jejich odbourávání v kombinaci s vhodnými podmínkami prostředí. Labilní formy uhlíku v půdě představují chemicky velmi rozmanitou skupinu, která zahrnuje jak nízkomolekulární labilní sloučeniny, jako jsou cukry, organické kyseliny, aminokyseliny a jiné rozpustné metabolity pocházející z kořenů/rhizosféry nebo z rané fáze rozkladu zbytků rostlin a půdních mikroorganismů, tak i nechráněné rostlinné fragmenty (tzv. volný POC) v převážné míře tvořené celulózou a ligninem, které ještě nebyly uzavřeny v agregátech nebo poutány na minerální frakce půdy (Basile-Doelsch et al., 2020; Stoner et al., 2023). DOC však není jednotně labilní, protože se vyměňuje s minerálními povrchy a pouze jeho část je snadno biologicky dostupná (Poeplau et al., 2018). To poukazuje na ústřední roli při tvorbě stabilního zásobníku uhlíku v půdě prostřednictvím asociace s minerály v půdě – MAOC, za předpokladu, že labilní vstupy podporují účinný růst mikroorganismů, maximalizují produkci snadno sorbovatelné odumřelé mikrobiální biomasy (nekromasy) a extracelulárních produktů (Cotrufo et al., 2013; Sokol et al., 2019; Zhang et al., 2021). Zároveň však labilní uhlík v půdě může vyvolat pozitivní priming nativního SOC (Schmidt et al., 2011) a vást i k vyčerpávání stabilní frakce MAOC (Li et al., 2021) prostřednictvím spřažených biologických a fyzikálně-chemických cest. Vzhledem k tomu, že zásoba labilního organického uhlíku v půdě vykazuje obvykle obrat v řádu několika dnů až několika let, je jeho přímá role v obchodování s uhlíkovými kredity

výrazně omezená. Na druhou stranu je tato složka zjevně klíčovým vstupem při formování zásobníku MAOC a je zásadní pro pochopení procesů, kterými se uhlík přeměňuje na MAOC nebo naopak přispívá k vyčerpání MAOC zásobníku, které je klíčové pro modelování procesů při monitorování nebo vykazování v rámci systémů obchodování s uhlíkovými kredity.

2.1.3.2 Fragmentovaný částicový uhlík (POC) stabilizovaný uzavřením v půdních agregátech

Druhá skupina organického uhlíku v půdě, s dobou setrvání v rozmezí od několika let do několika desetiletí, může být pro obchodování s uhlíkovými kredity významnější, i když ani zde nelze při běžných zemědělských postupech na orné půdě uvažovat o době setrvání delší než několik let. Tato skupina se skládá z lehkého POC, pocházejícího hlavně z rostlinných zbytků, který je chráněn před rozkladem půdními organismy prostřednictvím uzavření ve stabilních půdních agregátech (Lavallee et al., 2020; von Lützow et al., 2007). Rozsah doby setrvání tohoto uhlíku je široký, protože perzistence POC je velmi závislá na kontextu, přičemž hlavními vlivy jsou kvalita zbytků, klima, narušení/zpracování půdy a textura/mineralogie půdy (Basile-Doelsch et al., 2020; Lavallee et al., 2020; Luo et al., 2020). Zpracování půdy a přejezdy těžké mechanizace, které rozrušují agregáty přispívají významně ke zkrácení doby setrvání tohoto SOC zásobníku, zatímco snížené narušení a silná agregace podporují tvorbu uzavřeného POM a delší perzistenci (Lavallee et al., 2020; Poeplau et al., 2018; von Lützow et al., 2007). Teplé a vlhké počasí urychluje rozklad POC, včetně odolných frakcí s vyšším obsahem ligninu. Kromě toho střídající se cykly vlhka a sucha, nebo mrazu a tání zvyšují obrat agregátů, čímž vystavují POC rozkladu (Basile-Doelsch et al., 2020). Z dlouhodobého hlediska však klima hraje v rozkladu POC menší roli než způsob hospodaření a vstupy rostlinných zbytků do půdy (Luo et al., 2020). Doba setrvání POC se také prodlužuje díky odolným chemickým sloučeninám v rostlinných zbytcích, které snižují rychlost depolymerizace přítomných polymerních látek na malé sorbovatelné molekuly, jako je lignin, lignin-sacharidové komplexy, kutin, suberin nebo krystalická celulóza zabudovaná do lignocelulózové matrice (Basile-Doelsch et al., 2020; Schmidt et al., 2011). Nedávné studie však ukázaly, že vysoký obsah ligninu má nižší stabilizační účinek na SOC kvůli neefektivnímu mikrobiálnímu zpracování (a tím i menšímu poutání ve formě MAOC), což má za následek spíše neutrální vliv ligninu na délku uložení uhlíku v půdě (Stewart et al., 2007).

2.1.3.3 Organický uhlík stabilizovaný poutáním na minerální frakci půdy (jíl a prach)

Třetí skupinou, která z hlediska obchodování s uhlíkovými kredity představuje klíčovou frakci SOC kvůli své době setrvání v řádu desítek až stovek let, je MAOC. MAOC však nelze považovat za nedotknutelný nebo zcela trvalý. Obecně se jedná o nejtrvalejší zásobu SOC, ale ta zůstává dynamická,

a může být mobilizována a rozložena, pokud podmínky napomáhají desorpci, rozpuštění sorbujičích minerálů nebo intenzivní biologické poptávce na rozklad organické hmoty. Trvalost vyplývá hlavně ze silných organo-minerálních interakcí, zejména prostřednictvím výměny ligandů ve vnitřní sféře jílových minerálů za oxidy/hydroxidy Fe/Al nebo kationtového můstku k fylosilikátovým jílům (zejména tam, kde je hojný Ca^{2+}), vodíkových vazeb/hydrofobních interakcí a příležitostně společné precipitace se sekundárními fázemi Fe/Al, jejichž účinnost závisí na typu minerálu, pH/iontové síle, hydroklimatu a saturaci sorpčního místa (Basile-Doelsch et al., 2020; Jilling et al., 2018; Lavallee et al., 2020). Tyto vazby jsou v různé míře reverzibilní a mohou být narušeny chemicky kompetitivními ligandy, změnami pH/iontů, redukčním rozpouštěním nebo biologicky exsudátem řízeným primingem či upregulací enzymů, což činí MAOC náchylným k uvolnění za nepříznivých podmínek (Basile-Doelsch et al., 2020; Bramble et al., 2024; Li et al., 2021). MAOC obsahuje molekuly rostlinného i mikrobiálního původu. Terénní a laboratorní studie ukazují, že se jedná spíše o komplexní směs než o jediný typ molekuly. Značné množství lipidů rostlinného původu spolu s fenolickými sloučeninami v jílových minerálech naznačuje, že sloučeniny rostlinného původu podstatně přispívají k tvorbě MAOC (Angst et al., 2017). Komplexní přehled literatury a experimentální data naznačují, že rhizodepozice má nejvyšší účinnost tvorby MAOC (46 %) ve srovnání s kořeny (9 %) nebo vstupy nadzemní biomasy (7 %) (Villarino et al., 2021). Důkazy z adsorpčních experimentů a analýz reziduí ukazují, že sloučeniny bohaté na dusík, jako jsou aminokyseliny, aminocukry a materiály bohaté na amidy (bílkoviny), jsou přítomny ve frakci MAOC ve významných množstvích (Aufdenkampe et al., 2001; Jilling et al., 2018; Whalen et al., 2022). Transformaci sloučenin bohatých na dusík v rostlinném odpadu mikroorganismy před spojením s jílovými minerály a prachem podporuje také zvýšení $\delta^{15}\text{N}$ a $\delta^{13}\text{C}$ v důsledku preferenčního zabudování lehčích izotopů během metabolismu (Connin et al., 2001; Kramer et al., 2003).

Jia et al. (2025) uvedli důkazy pomocí značení izotopem ^{13}C , že mikrobiální zbytky bohaté na dusík se preferenčně vážou na minerály již pokryté organickými látkami, spíše než přímo na neobsazené minerální místa, což vede k vyššímu nasycení MAOC v souladu s vícevrstvou akumulací. Několik studií založených na předběžném kondicionování nebo sekvenčních adsorpčních experimentech s jílovými minerály poskytuje nepřímou podporu pro vícevrstvý model tvorby MAOC (Gao et al., 2018). Qafoku et al. (2024) uvádějí, že adsorbované lipidy nebo aminokyseliny tvoří počáteční povrchovou vrstvu, která podporuje následnou adsorpci sacharidů a ligninu prostřednictvím organické vícevrstvé struktury. Adsorpce lipidů a aminokyselin vyvolává odpuzování ferrihydritových částic, čímž se zvětšuje reaktivní plocha a podporuje se absorpce sacharidů/ligninu. Je proto zřejmé, že k tvorbě MAOC v půdě přispívá celá řada organických sloučenin, především rostlinného původu, ale do značné míry transformovaných nebo transportovaných (v případě půdních hub) půdními mikroorganismy, a že vzhledem k afinitě půdních minerálů reprezentovaných oxidy/hydroxidy Fe/Al (Souza et al., 2017) a

dalších vazebných mechanismů dochází k vrstvení různých skupin látek, především sloučenin bohatých na N (aminokyseliny, aminocukry, amidové sloučeniny), lipidů, fenolických sloučenin a sacharidů. Úlohu mikroorganismů při tvorbě MAOC podporuje také výrazně větší délka hyf hub v půdě, odhadovaná na 15 000násobek délky jemných kořenů, což naznačuje, že houby mohou navázat větší kontakt s minerály v půdě než kořeny rostlin (See et al., 2022).

Uzavřené mikroagregáty jsou potvrzenými místy rychlého vzniku MAOC, přičemž nejjasnější signály vzniku mikroagregátů s poutaným MAOC jsou patrné u bezorebných technologií a ponechání zbytků rostlin, které zvyšují množství organického uhlíku v mikroagregátech (Ren et al., 2024), a u organických hnojiv, které zvyšují reaktivní Fe/Al a mikrobiálně odvozený MAOC (Xiao et al., 2016). Izotopové sledování ukázalo, že rostlinné vstupy rychle tvoří MAOC v agregátech, přičemž MAOC se v průběhu času zvyšuje zejména v uzavřených mikroagregátech (Fulton-Smith and Cotrufo, 2019). Ačkoli Meyer et al., (2024) zjistili, že mikroagregáty zvyšují dobu zadržování uhlíku na 62 let v mikroagregátech uzavřených ve větších agregátech, a na 105 let ve volných mikroagregátech ve srovnání s volnou půdou (58 let), z distribuce izotopů uhlíku v mikroagregátech je zřejmé, že mikroagregáty procházejí opakovanými cykly narušení a opětovného formování v půdě, spíše než že by zůstávaly stabilními, neměnnými strukturami po dlouhou dobu. Dlouhodobé experimenty s konzervačním (bezorebným) obděláváním půdy ukazují, že uzavření mikroagregátů v makroagregátech (okluze) představovalo 90–97% nárůstu SOC, což naznačuje, že okluze je dominantní zásobník pro akumulaci uhlíku, ačkoli většina této akumulace byla ve formě POC, protože MAOC přispěl pouze 25–29% k celkovému nárůstu SOC (Ren et al., 2024). Z hlediska stability MAOC se význam okluze mikroagregátů v makroagregátech jeví jako méně důležitá a nejasná, přičemž mikroagregáty samy o sobě pravděpodobně hrají klíčovou roli ve stabilizaci MAOC. Mikroagregáty se tvoří z koloidní fáze minerální frakce půdy, která vytváří asociace s organickými sloučeninami v půdě. Pyrolýzní ionizační hmotnostní spektrometrie odhalila, že volné koloidy byly relativně bohaté na méně rozložené organické sloučeniny rostlinného původu, jako jsou lipidy, suberin a volné mastné kyseliny, zatímco okluzní koloidy tvořící mikroagregáty obecně obsahovaly více rozložených a mikrobiálních organických sloučenin, jako jsou sacharidy a amidy (Tang et al., 2022). Tyto výsledky také podporují vícevrstvou formaci MAOC, při které se mikrobiální produkty a nekromasa hromadí na minerálních površích později a hrají důležitou roli při tvorbě mikroagregátů, kde zůstávají uzavřeny a chráněny před rozkladem (Fulton-Smith and Cotrufo, 2019; Tang et al., 2022). Tvorba MAOC zahrnující organické sloučeniny mikrobiálního původu a utváření struktury mikroagregátů jsou proto s největší pravděpodobností vzájemně propojené procesy, které vzhledem k omezené přítomnosti větších pórů v mikroagregátech vedou k zásadní stabilizaci MAOC v půdě (Tang et al., 2022).

Současná úroveň mineralogické saturace orné půdy je kolem 31 %, zatímco v přírodních ekosystémech, jako jsou lesy nebo pastviny, je průměrná hodnota kolem 46 % (Georgiou et al., 2022). To naznačuje, že degradované nebo intenzivně obhospodařované pozemky mají větší potenciál ke zvýšení úrovně saturace uhlíkem. Potenciál pro ukládání uhlíku ve formě MAOC závisí do značné míry na kvalitě jílovitých minerálů. Zatímco vysoce aktivní minerály, jako je illit, smektit, vermikulit a chlorit (např. montmorillonit), mohou mít maximální hodnotu ukládání kolem 86 g C kg⁻¹, nízkoaktivní minerály, jako je kaolinit a gibbsit, mají maximální hodnotu ukládání pouze 48 g C kg⁻¹ (Georgiou et al., 2022). Ještě důležitější pro úložný potenciál MAOC je celkový obsah jílu a prachu v půdě. V případě chudé písčité půdy s obsahem jílu a prachu pouze 25 % (a v případě vysoce aktivních minerálů, jako je montmorillonit) je potenciál ukládání uhlíku v MAOC 21,5 g C kg⁻¹, a pro stejný typ minerálů s obsahem jílu a prachu 75 % (např. hlinitá půda) je to 64,5 g C kg⁻¹. Při objemové hmotnosti 1300 kg m⁻³ mohou tyto půdy uložit přibližně 83,9, respektive 251,6 t C ha⁻¹ v půdním profilu 0–30 cm. Při současné úrovni nasycení orné půdy (31 %) je potenciál pro další ukládání uhlíku v MAOC až 57,9–173,6 t C ha⁻¹. Tyto údaje ukazují, že nasycení MAOC není klíčovým limitujícím faktorem pro dlouhodobé ukládání uhlíku v orné půdě, alespoň v příštích desetiletích, i když se očekává, že vyšší úrovně nasycení povedou k poklesu ročního přírůstku MAOC (Georgiou et al., 2022). Ačkoli je obtížné určit roční přírůstek MAOC na základě existujících studií, na základě provedené metaanalýzy lze odvodit přibližnou hodnotu 1,4 % při použití technologie bezorebného obdělávání půdy a při integraci dalších opatření, jako je pěstování meziplodin nebo víceletých plodin s chovem hospodářských zvířat, to může být přibližně 5 % nebo více (Prairie et al., 2023). Pro výše uvedené modelové případy s 25 % a 75 % jílu a prachu představují tyto hodnoty maximální roční potenciál pro ukládání do MAOC, který se pohybuje od 1,3 do 3,8 t C ha⁻¹ rok⁻¹. Ačkoli studie nespécifikuje délku trvání experimentů, z nichž je meta-analýza odvozena, podobné údaje o maximálním ukládání uhlíku v MAOC jsou také uváděny pro kombinaci bezorebné technologie a ponechání zbytků (Adil et al., 2022). Naopak účinek technologie bez orby ale bez ponechání zbytků rostlin je mnohonásobně nižší, což naznačuje synergické účinky integrace více postupů hospodaření, jejichž individuální účinky na tvorbu MAOC jsou spíše nižší (Adil et al., 2022).

2.1.3.4 Pyrolyticky stabilizovaný uhlík

Pyrolyticky stabilizovaný uhlík – známý také jako stabilní polycyklický aromatický uhlík – se dostává do půdy buď přirozeně během lesních požárů, nebo prostřednictvím aplikace biouhlu, který je uměle vyráběn pyrolýzou a aplikován do půdy. Studie poskytují kvantitativní nebo modelové odhady perzistence pyrolyticky stabilizovaného uhlíku v několika stoletích až po více než 1000 let, což potvrzuje potenciál biouhlu pro dlouhodobou sekvestraci uhlíku v půdě (Howell et al., 2022; Vorrath et al., 2025). Stabilita pyrolyticky stabilizovaného uhlíku je ovlivněna typem suroviny, teplotou pyrolýzy a strukturou půdy, či jinými půdními vlastnostmi (Adhikari et al., 2024; Fang et al., 2014; Singh et al., 2012). Vysoké

teploty pyrolýzy produkují biouhel s vyšším obsahem stabilního uhlíku, nižším obsahem labilních sloučenin jako jsou sacharidy a delší rezidenční dobou, zatímco biouhel z nízkoteplotní nebo rychlé pyrolýzy obsahuje nepřeměněné celulóznové/hemicelulóznové frakce, které se rychle mineralizují (Verheijen et al., 2014). Dlouhodobé inkubace ukazují, že biouhel vyrobený při teplotě 400 °C se mineralizuje rychleji než biouhel vyrobený při teplotě 550 °C, přičemž průměrná rezidenční doba se odhaduje na 90 až 1600 let v závislosti na surovinách a teplotách (Singh et al., 2015, 2012). Biouhel získaný z hnoje a některé nízkoteplotně pyrolyzované zbytky zemědělských plodin se mineralizují rychleji než dřevěný biouhel (Singh et al., 2015). Vlivy druhu stromů v kombinaci s pyrolyzní teplotou vedly v jednom experimentu k průměrné rezidenční době v rozmezí 4 až 450 let, což souviselo s rozdíly v obsahu reaktivního uhlíku rozpustného ve vodě mezi druhy (Singh a Cowie, 2010). Jemnější částice a fragmentace biouhlu rovněž zvyšují povrchovou plochu a přístupnost biouhlu pro mikroorganismy, což urychluje uvolňování CO₂ (Lutfalla et al., 2017). Vyšší poměry O/C nebo H/C a vyšší koncentrace ve vodě rozpustné organické hmoty korelují s vyšší krátkodobou mineralizací a vyšší teplotní citlivostí (Singh et al., 2012; Singh a Cowie, 2010). Abiotické stárnutí rovněž zvyšuje uvolňování rozpuštěné organické hmoty a mění funkčnost povrchu, čímž zvyšuje mobilitu a potenciální reaktivitu biouhlu (Ameloot et al., 2013). Lutfalla et al. (2017) identifikovali jako hlavní příčinu ztráty pyrogenního uhlíku mikrobiální degradaci. Abiotické faktory, jako je fotooxidace a eroze, měly na ztráty pyrogenního uhlíku menší vliv. Vzhledem k převládajícímu biologickému rozkladu pyrogenního uhlíku v půdě je zřejmý významný vliv teploty a vlhkosti. Teplejší půdy zvyšují naměřenou mineralizaci biouhlu, zatímco odhady rezidenční doby se v teplejších půdách odpovídajícím způsobem zkracují (Wang et al., 2022). Mikroorganismy rychle spotřebovávají labilní frakce biouhlu, přičemž podíl labilní složky se významně liší v závislosti na typu a teplotě pyrolýzy. Metaanalýza odhaduje průměrnou dobu setrvání labilního zásobníku uhlíku v biouhlu na přibližně 108 dní a recalcitrantního (stabilního) zásobníku na 556 let, přičemž labilní zásobník představuje jen asi 3 % a recalcitrantní zásobník 97 % hmotnosti v souhrnných souborech dat z experimentů s biouhlem (Wang et al., 2016). Ačkoli uváděné hodnoty mikrobiálního rozkladu biouhlu vedoucího k uvolňování CO₂ se většinou vztahují k labilní uhlíkové složce, která obecně představuje pouze malou část hmotnosti biouhlu a jejíž rozklad vykazuje značnou časovou dynamiku v závislosti na podmínkách prostředí a přístupnosti pro mikroorganismy (velikost částic biouhlu), je z hlediska plateb za uhlíkové kredity důležité správně vyhodnotit rozdíly ve výrobě biouhlu z hlediska teploty pyrolýzy a suroviny, které se následně odrážejí v podílu labilního uhlíkového zásobníku a rychlosti jeho degradace mikroorganismy, což ovlivní průměrnou délku uložení uhlíku a tím i výsledný mitigační účinek aplikace biouhlu.

2.2 Popis metodiky frakcionace půdního organického uhlíku dle velikosti a hustoty částic

2.2.1 Charakteristika dílčích frakcí

Představená metoda fyzikální frakcionace vychází z robustních vědeckých poznatků a byla optimalizována tak, aby byla úspornější na materiál i potřebný čas ve srovnání s tradičními vícestupňovými metodami frakcionace podle hustoty a velikosti částic. Metodický koncept vychází z původního protokolu fyzikální frakcionace vyvinutého profesorkou Francescou Cotrufo z Colorado University (Lavallee et al., 2020; Leuthold et al., 2024) a z jeho následné úpravy pro lesní půdy realizované profesorkou Johannou Pausch z Bayreuth University (Klink et al., 2022). Obě pracoviště jsme osobně navštívili, získali jsme detailní praktické know-how k provádění metodiky a obdrželi jsme laboratorní protokoly z obou pracovišť, které sloužily jako východisko pro úpravy a optimalizaci zde prezentovaného postupu.

Nejprve se oddělí POM na základě nižší hustoty ($< 1,86 \text{ g/ml}$) a větší velikosti částic ($> 50 \text{ }\mu\text{m}$) s využitím sedimentace v roztoku polywolframnanu sodného (sodium polytungstate, SPT) a nylonové tkaniny s definovanou velikostí ok. Zbýlý sediment, který je tvořen materiálem s vyšší hustotou ($> 1,86 \text{ g/mL}$), je dále frakcionován vodním proséváním na jemnozrnnou minerální frakci MAOM ($< 50 \text{ }\mu\text{m}$) a hrubozrnnou frakci CHAOM ($> 50 \text{ }\mu\text{m}$). Všechny frakce je pak zapotřebí zbavit zbytkového SPT pomocí opakovaného promývání, aby bylo možné přesně kvantifikovat hmotnostní podíl frakcí MAOM, POM a CHAOM a množství organického uhlíku v těchto frakcích. Protože CHAOM a POM vykazují funkční i chemickou podobnost, může být obsah organického uhlíku ve frakci CHAOM (CHAOC) zahrnut do POC pro snazší a jasnější interpretaci výsledků (Lavallee et al., 2020).

Během dvou let bylo frakcionováno přibližně 300 půdních vzorků pocházejících ze dvou lokalit v blízkosti obce Banín, reprezentujících rozdílné půdní typy – Rendzic Leptosol (49.67349402374678, 16.45900838058931) a Gleyic Cambisol (49.664285318049956, 16.472683623250106) – klasifikované podle systému FAO World Reference Base for Soil Resources (WRB, 2015). Na vzorcích z těchto dvou lokalit byl proveden vývoj a optimalizace metodiky.

Následně byla metodika ověřena na dalších 36 vzorcích zemědělských půd (společně se dvěma experimentálními lokalitami 44 vzorků) a doplněný soubor půd tak reprezentoval celkem 7 půdních typů a rozdílné zrnitostní složení v rozpětí obsahu jílovitých částic $\sim 10\text{--}29\%$. Za klíčové z pohledu vyhodnocení spolehlivosti (hmotnostního výtěžku a výtěžku uhlíku) a opakovatelnosti lze považovat vedle půdního typu obsah jílovité frakce a celkový obsah půdního organického uhlíku (SOC). Výsledky tohoto testu jsou uvedeny v sekci 2.7.5 Výsledky a limitace metody.

2.2.2 Materiál a vybavení

- Vzorek půdy
- Roztok polywolframanu sodného (SPT) o hustotě 1,86 g/ml (TC-Tungsten Compounds GmbH)
- Deionizovaná voda (dH₂O)
- Kohoutková voda

- 50ml centrifugační zkumavky - *Pro účely vážení výtěžků zvažte prázdnou zkumavku bez víčka a hmotnost napište na zkumavku.*
- Nylonová tkanina s velikostí ok 50 μm (Screen servis spol. s r.o.)
- Analytické nerezové síto s velikostí ok 50 μm
- Nerezová mísa s průměrem větším než nerezové síto
- Skleněné lahve odolné k podtlaku o objemu 250 a 500 ml
- Skleněná nálevka
- Stříčka
- Skleněné kuličky o průměru 4 mm
- Laboratorní rukavice
- Filtrační nálevka se závitem (Thermo Fisher Scientific)
- Hladký filtrační papír s plošnou hmotností 80 g m⁻² (Papírna Perštejn spol s.r.o.)
- Filtr ze skleněných mikrovláken s velikostí pórů 2,7 μm (Whatman GF/D) a 0,7 μm (Whatman GF/F)

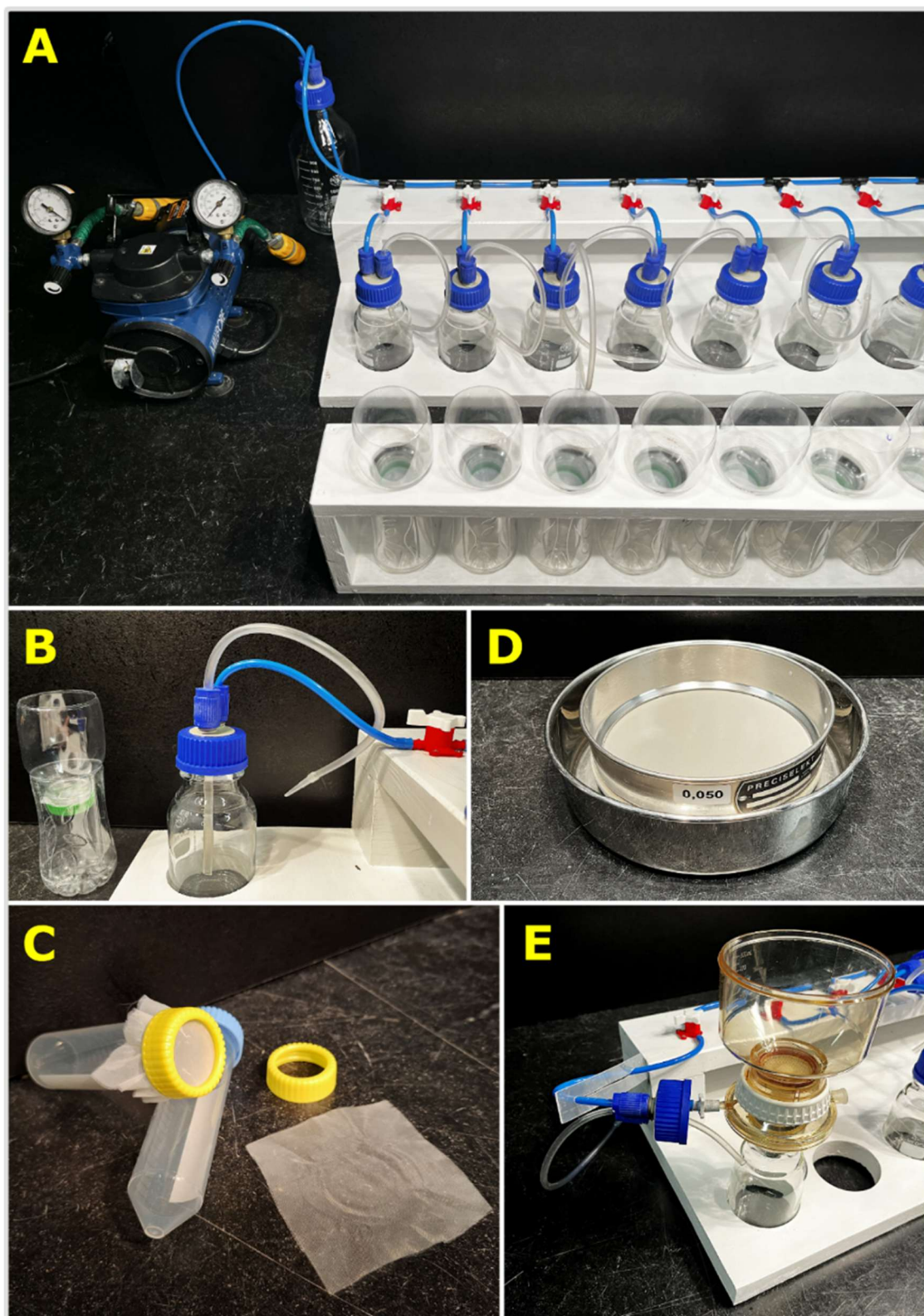
- Váha (přesnost na jednotky mg)
- Lyofilizátor
- Centrifuga s rotorem pro 50ml zkumavky, požadovaná relativní centrifugační síla 2683 x g nebo silnější.
- Laboratorní kompresor
- Vortex
- Konduktometr
- Vakuový odsávací systém (popsaný níže)

2.3 Popis vakuového odsávacího systému

Vakuový systém se skládá z kompresoru, pojistné nádoby, stojanu s ovládacími ventily a stojanu pro filtrační nálevky. Kompresor ze systému odvádí vzduch a vytváří tak podtlak. Silnostěnná modrá hadice vede z kompresoru do pojistné nádoby, která zabraňuje vniknutí nasávané kapaliny do kompresoru v případě přeplnění některé ze sběrných nádob. Z pojistné nádoby je vedená hadice po zadní straně stojanu k paralelně zapojeným přetlakovým ventilům. Odtud vedou hadičky do 250ml sběrných nádob, ze kterých vystupují silikonové manipulační hadice zakončené pipetovací špičkou se seříznutým hrotem, umožňujícím nasávání částic o velikosti do 2 mm (obr. 2A).

Filtrační nálevka je zhotovena z PET láhve se širokým hrdlem. Víčko je provrtáno tak, aby po jeho odšroubování mohla být vložena nylonová tkanina s velikostí ok 50 μm . Po dotažení víčka se tkanina napne a funguje jako filtr (obr. 2B). Promývání frakce POM probíhá v 50ml centrifugační zkumavce s obdobně upraveným víčkem jako u filtrační nálevky. Extrahovaný POM se přenesse do zkumavky, uzavře se nylonovou tkaninou a napne dotažením provrtaného víčka. Přes tuto tkaninu se doplňuje destilovaná voda stříčkou a následně se odsává pomocí vakuového odsávacího systému (obr. 2C).

Frakce MAOM se od CHAOM odděluje na nerezovém sítu s velikostí otvorů 50 μm , které je uloženo v nerezové nádobě o větším průměru než síto (obr. 2D). Pod uzávěrem jedné ze skleněných lahví je instalován konektor pro připojení vakuové filtrační aparatury. Ta se používá k filtraci použitého SPT po osazení filtrem ze skleněných vláken určeným pro velkoobjemové filtrace (obr. 4E). Pro předfiltraci se používá filtrační papír a následná filtrace se provádí na filtrech ze skleněných mikrovláken s velikostí pórů 2,7 μm (Whatman GF/D) a 0,7 μm (Whatman GF/F) viz. sekce 2.7.6 Recyklace separačního roztoku SPT.



Obrázek 2 Vakuový filtrační systém a sestava pro frakcionaci půdy. Kompletní vakuový filtrační systém propojující vývěvu se sběrnými lahvemi na kapaliny (A). Jednotka pro frakcionaci půdy tvořená skleněnou lahví (vpravo) pro sběr kapalin pomocí vývěvy a ručně zhotoveným filtračním modulem (vlevo) s 50 μm nylonovou tkaninou pro separaci POM a SPT (B). Zkumavka o objemu 50 ml s 50 μm sítkem pro promývání frakce POM (C). Nerezové síto s velikostí pórů 50 μm s větší sběrnou mísou pro oddělení frakcí MAOM a CHAOM (D). Filtrační systém pro SPT s membránou ze skelných vláken o velikosti póru 0,7 μm umožňující čištění a následné opětovné použití SPT (E).

2.4 Seznam zkratek

CHAOM – Coarse Heavy Associated Organic Matter, organická hmota asociovaná s hrubými těžkými částicemi (převážně písek), která při centrifugaci v SPT sedimentuje a zároveň je větší než 50 μm

CHAOC – Coarse Heavy Associated Organic carbon, organický uhlík asociovaný s hrubými těžkými částicemi (převážně písek). Organický uhlík obsažený ve frakci CHAOM.

DOM – Dissolved Organic Matter, rozpuštěná organická hmota. Velmi jemná organická hmota, která nesedimentuje při centrifugaci a projde 50 μm filtrem.

DOC – Dissolved Organic Carbon, rozpuštěný organický uhlík. Organický uhlík obsažený ve frakci DOM.

MAOM – Mineral-Associated Organic Matter, organická hmota asociovaná s minerály. Velmi jemná organická hmota nebo částice organického materiálu asociované s povrchy jílových a prachových půdních částic.

MAOC – Mineral-Associated Organic Carbon, organický uhlík asociovaný s minerály. Organický uhlík obsažený ve frakci MAOM.

POM – Particulate Organic Matter, částicová organická hmota. Frakce půdní organické hmoty s hustotou nižší než 1,86 g/cm a zároveň větší než 50 μm , tvořený převážně fragmentovaným rostlinným materiálem.

POC – Particulate Organic Carbon, částicový organický uhlík. Organický uhlík obsažený ve frakci POM.

SOM – Soil Organic Matter, půdní organická hmota. Organická frakce půdy tvořená všemi frakcemi organické hmoty souhrnně. Stanovuje se ve vzorku půdy bez předchozí frakcionace.

SOC – Soil Organic Carbon, půdní organický uhlík. Organický uhlík obsažený v SOM.

SPT – polywolframan sodný, chemický vzorec $\text{Na}_6[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}]$.

TGA-MS – Thermogravimetric Analysis coupled with Mass Spectrometry, termogravimetrická analýza spojená s hmotnostní spektrometrií. Analýza stanovuje ztrátu hmotnosti v čase v závislosti na nárůstu teploty. Hmotnostní spektrometrie zároveň identifikuje a kvantifikuje iontový proud molekul uvolněných při termogravimetrické analýze.

2.5 Časová náročnost protokolu

Celý postup frakcionace půdy, včetně přípravy vzorku a následného stanovení výtěžku, vyžaduje přibližně 8 hodin práce s přímým zapojením (hands-on time) a celkem 150 hodin nepřímého času (hands-off time). Samotná frakcionace vyžaduje přibližně 5 hodin aktivní práce a 3 hodiny nepřímého času. Tyto časové úseky se částečně překrývají, takže při níže popsaném postupu dokáže jeden člověk zpracovat přibližně šest vzorků během standardního osmihodinového pracovního dne.

V případě zpracování většího počtu vzorků čas investovaný do přípravy půdních vzorků a stanovení výtěžku stoupá nelineárně, a to v závislosti na dostupné kapacitě hluboko-mrazicího boxu a lyofilizátoru.

2.6 Popis postupu frakcionace

2.6.1 Příprava půdního vzorku

- 1) Usušte půdu v horkovzdušné sušárně při 40 °C po dobu 48 hodin co nejdříve po odběru vzorků.
- 2) Rozdrťte a prosejte vysušenou půdu přes síto s oky o velikosti 2 mm.

Před rozdrčením odstraňte z půdy kameny, protože jejich rozdrčení by vedlo k umělému navýšení podílu frakce písku a jemné rozdrčení by částečně vedlo k umělému navýšení jemné minerální frakce (jíl a prach).

Rozdrčenou půdu lze skladovat v uzavřených nádobách při stálé teplotě, v suchu a temnu. Mějte na paměti, že dlouhodobé skladování v nevhodných podmínkách může ovlivnit vlastnosti půdy.

- 3) Navážte 5,5 g rozdrčené a prosáté vysušené půdy do 50ml centrifugační zkumavky.

Protokol vyžaduje alespoň 5 g vzorku po lyofilizaci. Navýšení počáteční navážky o 10 % zohledňuje předpokládanou ztrátu vlhkosti během lyofilizace.

- 4) Postříkejte povrch půdy malým množstvím deionizované vody (dH₂O) a ponechejte vzorek zmrznout při -80 °C.

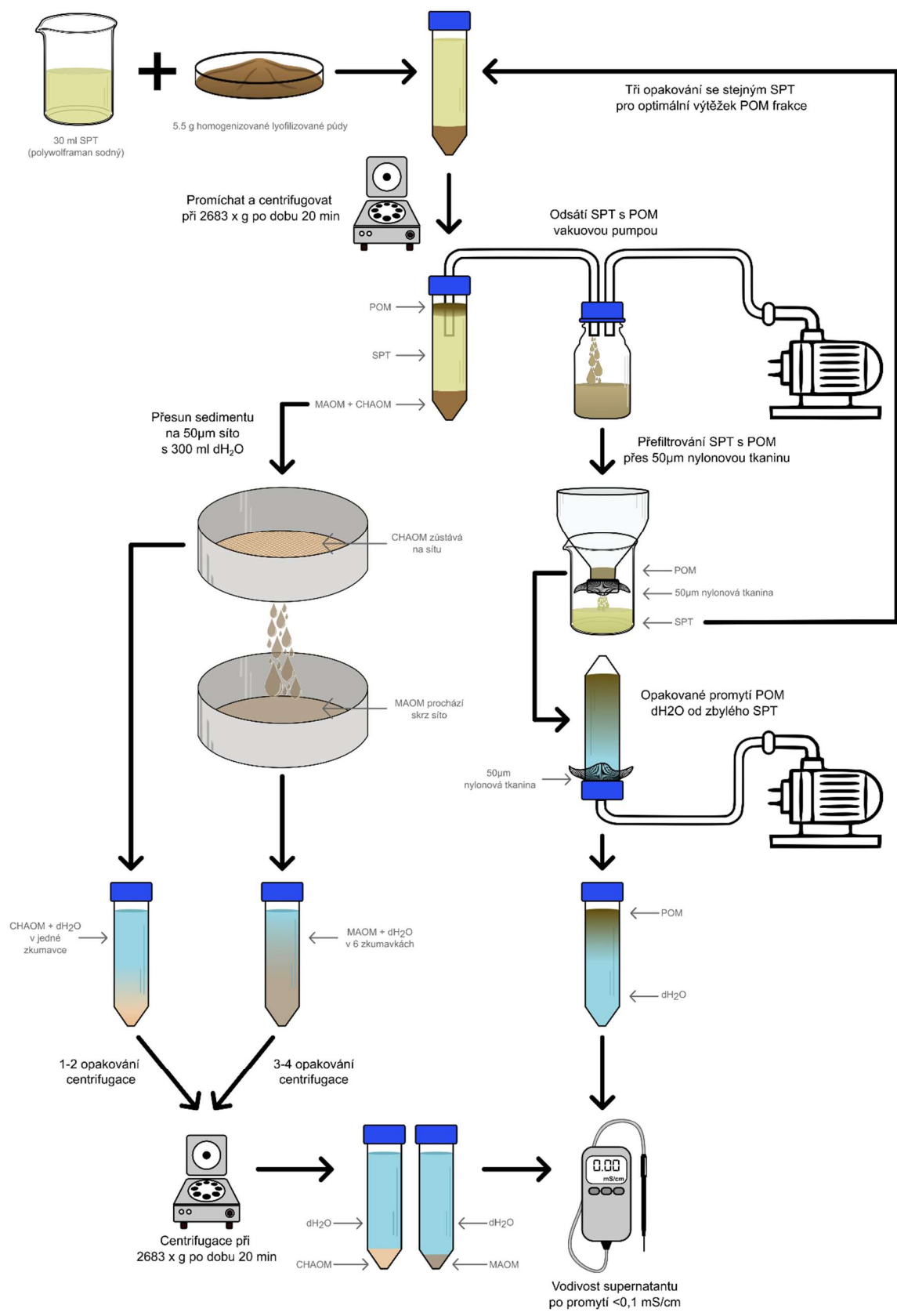
Vrstva ledu na povrchu půdy zabraňuje vylétávání částic prachu a jílu ze zkumavek při budování podtlaku v komoře lyofilizátoru.

- 5) Sundejte víčko z centrifugační zkumavky a lyofilizujte vzorek po dobu 48 hodin, aby se vzorek dokonale vysušil.

Plastové zkumavky mohou při sušení v sušící skříni ztrácet hmotnost i při nízkých teplotách. Použití lyofilizátoru zlepšuje přesnost analýzy.

Po skončení lyofilizace vpouštějte vzduch do lyofilizátoru pomalu, aby nedošlo k vylétávání jemných částic půdy ze zkumavek.

- 6) Zvažte centrifugační zkumavku se vzorkem půdy po lyofilizaci a od této hmotnosti odečtěte hmotnost prázdné centrifugační zkumavky. Tak získáte hmotnost suché půdy před frakcionací.



Obrázek 3 Schematický diagram protokolu frakcionace organického uhlíku v půdě

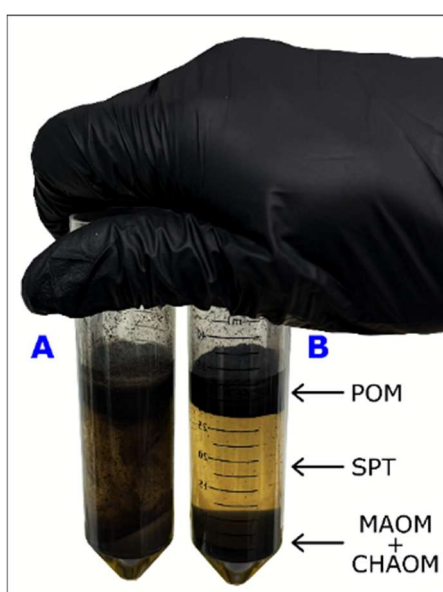
2.6.2 Separace POMu

- 1) Napipetujte 30 ml SPT do centrifugační zkumavky s lyofilizovaným vzorkem půdy.
- 2) Uzavřete zkumavku a důkladně ji protřepejte.

Půdu je nutné s roztokem SPT důkladně promísit. Půdy s vysokým obsahem jílu mohou vytvářet shluky na dně zkumavky. Pro lepší promíchání můžete do zkumavky přidat 10 skleněných kuliček o průměru 4 mm a vzorek promíchat na vortexu. Skleněné kuličky později snadno odstraníte při oddělování frakcí MAOM a CHAOM.

- 3) Centrifugujte při 2683 RCF po dobu 20 minut.

Rychlost a dobu centrifugace upravte podle parametrů své centrifugy. Vyšší RCF může vést k tvorbě těžko rozbitelných shluků jílovitých částic, což ztěžuje následné resuspendování vzorku v kapalině.



Obrázek 4 Půdní frakce v SPT; půda promíchaná s SPT před centrifugací (A); po centrifugaci plave POM na hladině SPT, sediment na dně obsahuje MAOM a CHAOM (B).

- 4) Odsajte supernatant obsahující plovoucí organické částice (POM) pomocí vakuového odsávacího systému.
- 5) Nalijte roztok SPT s frakcí POM do filtrační nálevky s nylonovou tkaninou s velikostí ok 50 μm .
- 6) SPT, které proteklo skrz filtr do spodní nádoby nalijte zpět do zkumavky s původním vzorkem.
- 7) Opakujte kroky 2 až 5 alespoň třikrát, dokud na povrchu roztoku SPT neplavou žádné hrubé organické částice. Po posledním opakování roztok SPT vlijte do odpadní lahve.

Roztok SPT lze po důkladné filtraci znovu použít viz sekce 2.7.6 Recyklace separačního roztoku SPT.

2.6.3 Promývání POMu

- 1) Propláchněte vakuový odsávací systém a sběrnou lahev dH₂O a veškerou vodu z proplachu nalijte do nálevky s nylonovou tkaninou se zbytkem POMu. Poté pomocí stříčky s dH₂O kvantitativně spláchněte všechny POM z nálevky do centrifugační zkumavky a doplňte dH₂O.
- 2) Překryjte vršek zkumavky nylonovou tkaninou s 50µm oky a zavřete víčkem s vyvrtaným otvorem tak, drželo tkaninu na místě.
- 3) Otočte centrifugační zkumavku dnem vzhůru a pomocí vakuového odsávacího systému vysajte dH₂O přes nylonovou tkaninu. POM zůstane uvnitř zkumavky.
- 4) Změřte vodivost odsáté vody. Pokud vodivost přesahuje hodnotu 0,1 mS cm⁻¹, doplňte zkumavku znovu dH₂O.
- 5) Opakujte kroky 3 a 4, dokud naměřená vodivost neklesne pod hodnotu 0,1 mS cm⁻¹.
- 6) Poté spláchněte POM zachycený na nylonové tkanině zpět do zkumavky, uzavřete neprovrtaným víčkem a zamrazte při -80 °C. Lyofilizujte po dobu minimálně 48 hodin.

Dobu lyofilizace přizpůsobte množství vody před zmrazením.

- 7) Po lyofilizaci zvažte centrifugační zkumavku bez víčka a odečtěte hmotnost prázdné zkumavky. Tak získáte hmotnost frakce POM.

2.6.4 Separace CHAOMu a MAOMu

Sediment zbylý po odsátí SPT a POMu obsahuje frakce CHAOM a MAOM se zbytkem SPT.

- 1) Vložte nerezové síto s oky o velikosti 50 µm do větší sběrné misky.

Navlhčení síta dH₂O před separací pomůže udržet na sítu tenkou vrstvu vody, která usnadňuje separaci.

- 2) Resuspendujte sediment ve zkumavce s dH₂O a nalijte ho na síto.
- 3) Pomocí stříčky vypláchněte zkumavku dH₂O, aby se veškerý zbylý sediment dostal na síto.
- 4) Kontinuálně přidávejte dH₂O a oplachujte MAOM přes síto. Pokud jsou na sítu hrudky, jemně je rozdrťte prstem v rukavici. Opláchněte částice zachycené na rukavici.

Celkový objem frakce MAOM by neměl překročit 300 ml, jinak bude v následujících krocích nutné použít další centrifugační zkumavky. Pamatujte na to, že kvantitativní přenos MAOMu ze sběrné misky bude vyžadovat další dH₂O, která se také počítá do tohoto limitu.

Při rozbíjení hrudek na sítu netlačte příliš silně a nepoužívejte nástroje, aby nedošlo k poškození síta.

- 5) Kružte sítem dokola, aby se částice MAOMu oddělily od CHAOMu. Pokračujte, dokud voda protékající sítem nebude čistá.

Oplach může trvat přibližně 5–10 minut.

- 6) Opláchněte zbylý MAOM z okrajů síta malým množstvím dH₂O ze stříčky.

Obrázek 5 Ve vzorcích s vyšším obsahem jílu se po centrifugaci mohou tvořit hrudky, které je potřeba mechanicky rozrušit



2.6.5 Promývání CHAOMu

- 1) Vyndejte síto z misky a odložte misku s frakcí MAOMu stranou. Pod slabým proudem vody z vodovodu spláchněte CHAOM na kraj síta.
- 2) S pomocí nálevky přeneste CHAOM do centrifugační zkumavky za použití maximálně 50 ml dH₂O.
- 3) Centrifugujte při 2683 RCF po dobu 20 minut.
- 4) Odsajte supernatant pomocí vakuového odsávacího systému a změřte jeho vodivost. Pokud vodivost přesahuje 0,1 mS cm⁻¹, doplňte znovu zkumavku dH₂O.
- 5) Opakujte kroky 9 a 10, dokud vodivost neklesne pod 0,1 mS cm⁻¹. Poté zkumavku nedoplňujte další vodou, zmrazte vzorek a lyofilizujte po dobu 48 hodin nebo dokud CHAOM zcela nevyschne.
- 6) Zvažte zkumavku s lyofilizovaným CHAOMem bez víčka a odečtěte hmotnost prázdné zkumavky. Tak získáte hmotnost frakce CHAOM.

2.6.6 Promývání MAOMu

Hnědá suspenze v nerezové misce obsahuje MAOM a zbytek SPT. Objem suspenze v tomto okamžiku by neměl překročit 200 ml.

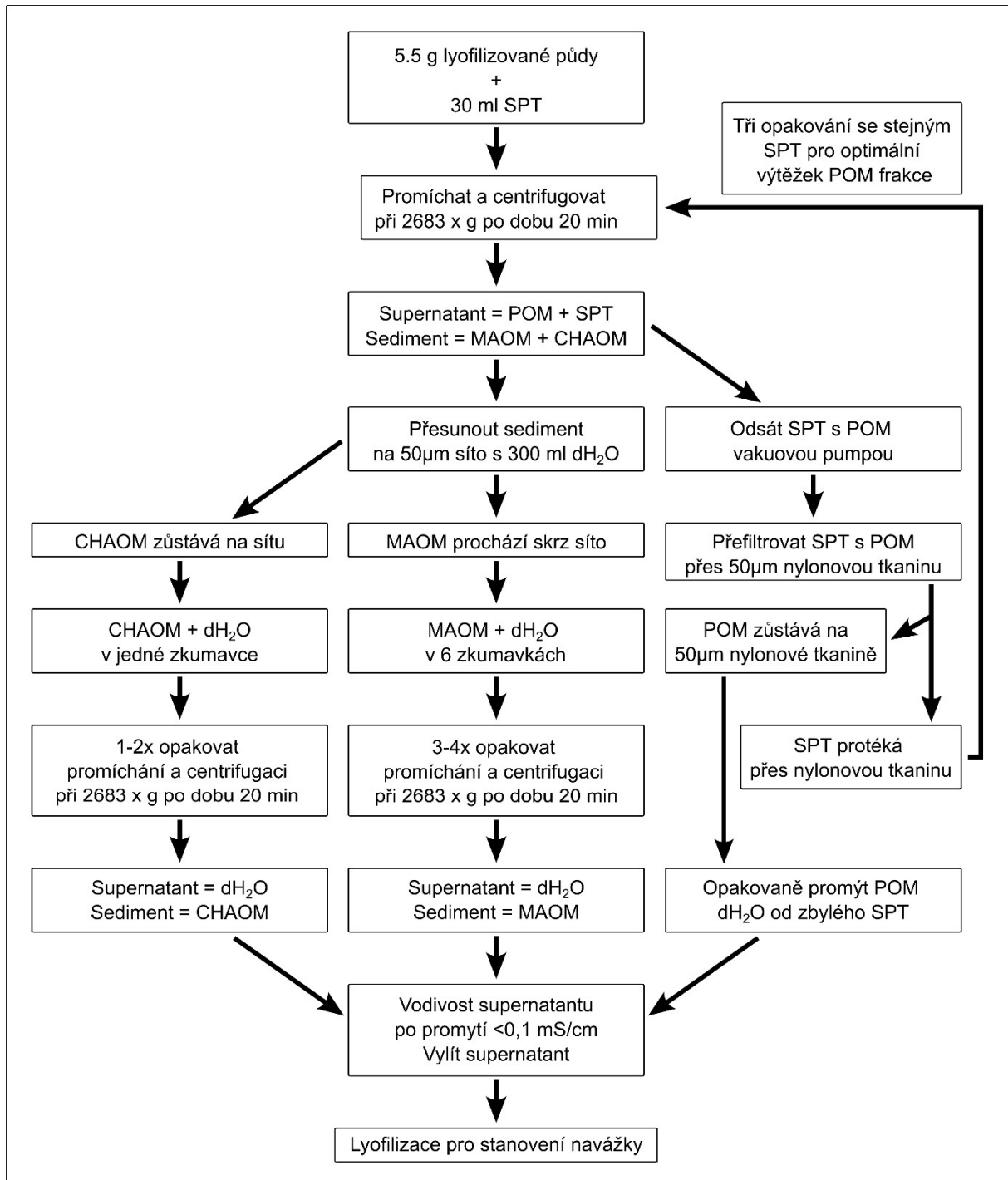
- 1) Kvantitativně přelijte suspenzi z nerezové misky do kádinky. Pomocí stříčky s dH₂O spláchněte všechny zbytky z nerezové misky.
- 2) Rovnoměrně rozdělte suspenzi do šesti centrifugačních zkumavek a v případě potřeby doplňte dH₂O do objemu 50 ml.
- 3) Centrifugujte při 2683 RCF po dobu 20 minut.
- 4) Odsajte supernatant pomocí vakuového odsávacího systému a změřte jeho vodivost. Pokud vodivost přesahuje 0,1 mS cm⁻¹, pokračujte v promývání.
- 5) Resuspendujte sediment v každé zkumavce v malém objemu dH₂O. V případě potřeby slučte vzorky do menšího počtu zkumavek.

V případě našich vzorků se osvědčilo postupné slučování ze šesti zkumavek do tří a následně do dvou. Příliš rychlé slučování může snížit účinnost odstraňování SPT kvůli nízkému celkovému objemu použité dH₂O. Může pak být zapotřebí vyšší počet oplachových cyklů.

- 6) Doplňte centrifugační zkumavky dH₂O do objemu 50 ml.

Před centrifugací je zapotřebí důkladně resuspendovat všechny MAOM.

- 7) Opakujte kroky 3 až 6, dokud vodivost neklesne pod $0,1 \text{ mS cm}^{-1}$. Poté zkumavky nedoplňujte další vodou, zmrazte vzorek a lyofilizujte po dobu 48 hodin nebo dokud MAOM zcela nevyschne.
- 8) Zvažte zkumavku s lyofilizovaným MAOMem bez víčka a odečtěte hmotnost prázdné zkumavky. Tak získáte hmotnost frakce MAOM.



Obrázek 6 Schéma shrnující protokol frakcionace organické hmoty v půdě

2.7 Optimalizace metodických kroků

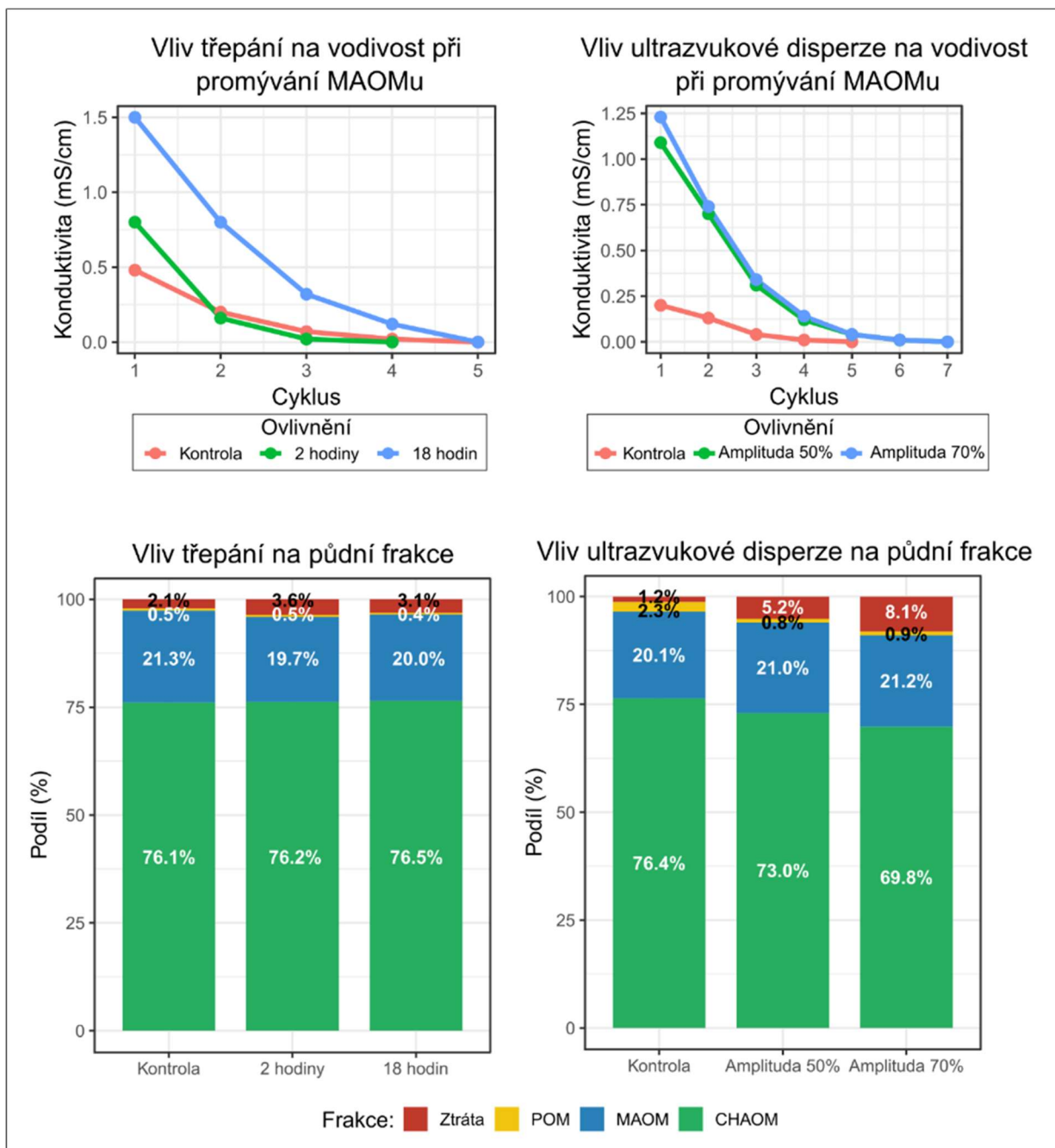
2.7.1 Rozrušení půdních agregátů

2.7.1.1 Sonikace (*desintegrace ultrazvukem*)

V této části bylo testováno, jak sonikace rozemleté půdy v SPT ovlivňuje relativní poměry jednotlivých frakcí. Při celkovém příkonu energie 440 J ml^{-1} (Amelung and Zech, 1999), s amplitudou 50 % (mírná sonikace) po dobu 36 min 45 s a s amplitudou 70 % (intenzivní sonikace) aplikovanou po dobu 19 min 26 s byl pozorován negativní vliv na distribuci frakcí. Ve všech případech došlo ke snížení podílů frakcí CHAOM a POM (obr. 7). Získané výsledky naznačují, že vlivem sonikace (byť s malou intenzitou) dochází k rozpadu částic CHAOM a POM, které tak z menší části přecházejí do MAOMu a vedou tak k ovlivnění výsledků.

2.7.1.2 Třepání

Další testovanou metodou narušení půdních agregátů bylo třepání vzorků před frakcionací. Vzorky umístěné na třepačce po dobu 2 hodin a 18 hodin vykazovaly stejné rozložení frakcí jako neovlivněné vzorky (obr. 7). Z těchto důvodů jsme tyto časově náročné postupy z protokolu vyloučili. Pokud je půda řádně vysušena a jemně rozemleta, není další homogenizace nutná.



Obrázek 7 Vliv dvou nejčastěji využívaných metod narušení půdních agregátů na vodivost supernatantu během promývání MAOMu a na distribuci půdních frakcí.

2.7.2 Separace podle velikosti částic

Separace podle velikosti částic byla provedena pomocí sít z nerezové oceli nebo nylonových tkanin s přesně definovanou velikostí otvorů 50 μm . Testovali jsme také nitrocelulóзовé membrány s velikostí pórů 50 μm . Ty se však rychle ucpávaly a materiál menší než nominální velikost pórů se hromadil na povrchu membrány. Prosévání na sítích a filtrace přes nylonovou tkaninu zabere několik minut a nevyžaduje žádné další přístroje, zatímco membránová filtrace může trvat řádově hodiny, a to i při využití vakua. Proto nedoporučujeme používat membrány pro separaci podle velikosti. Nerezová síta a opakovaně používaná nylonová tkanina je vhodné příležitostně kontrolovat pod stereomikroskopem, jestli nedošlo k jejich poškození.

2.7.3 Stanovení obsahu celkového uhlíku a dusíku v jednotlivých frakcích

Doporučenou metodou pro stanovení obsahu uhlíku (a společně i dusíku) je Dumasova spalovací metoda s chromatografickou separací vzniklých plynů na koloně (prvkový analyzátor). Při spalování se používá teplota 900-1200 $^{\circ}\text{C}$ v proudu kyslíku (O_2). Vzniká oxid uhličitý (CO_2) a oxidy dusíku (NO_x), které se dále redukují na N_2 . Kvantitativní detekce vzniklých plynů probíhá většinou pomocí teplotně vodivostního detektoru (TCD). V rámci této metodiky byl použit prvkový analyzátor Vario PYROcube (Elementar Analysensysteme, Německo) spojený s izotopovým hmotnostním spektrometrem ISOPRIME100 (Isoprime, Velká Británie). V případě půd s vyšším obsahem karbonátů (CaCO_3 nebo MgCO_3) je nutné tento uhlík odstranit okyselením HCl ve frakcích MAOM a zejména CHAOM aby nedocházelo ke zkreslení obsahu organického uhlíku v půdě.

2.7.4 Recyklace separačního roztoku SPT

Separanční roztok SPT kontaminovaný organickou hmotou se shromažďuje do k tomu určené zásobní nádoby. Tento roztok obsahuje rozpuštěnou organickou hmotu (DOM) a jemnou frakci POM, která není zachycena při půdní frakcionaci v rozsahu velikosti částic 0–50 μm . Zásobní nádoba se ponechá několik dní v klidu, aby došlo k částečné gravitační separaci. Z praktických zkušeností se na hladině vytváří vrstva bohatá na organickou hmotu, která má nižší hustotu než SPT, zatímco na dně vzniká sediment tvořený převážně jílovitou frakcí a těžší organickou hmotou (např. jemně rozemletý biouhel) nebo sraženinami SPT vzniklými interakcí s Ca^{2+} .

Horní, obvykle černě zbarvená a neprůhledná vrstva se odsaje a dále se centrifuguje do doby, než dojde k oddělení SPT od organické hmoty. Organická fáze z hladiny je znovu odsáta a je určena k chemické likvidaci. Tato frakce se nedoporučuje filtrovat z důvodu rychlého zanášení filtrů. SPT nacházející se pod touto vrstvou je následně připraven k filtraci a přelévá se do druhé zásobní nádoby. Sediment ze dna první nádoby je opět určen k chemické likvidaci.

Předfiltrace největších částic probíhá ve filtračním systému (obr. 2E), do kterého se instalují kruhové výstřižky z hladkého filtračního papíru s plošnou hmotností 80 g m^{-2} . Do filtrační aparatury se aplikuje maximálně 100 ml SPT ze druhé zásobní nádoby. Při zpomalení nebo zastavení filtrace se filtr vymění. Předfiltrováný roztok se shromažďuje ve třetí zásobní nádobě. V této fázi má SPT stále hnědé zbarvení a je mírně zakalený.

Následně se do filtračního systému instaluje filtr ze skleněných mikrovláken s velikostí pórů $2,7 \text{ }\mu\text{m}$ (Whatman GF/D) a roztok se přefiltruje. Přefiltrované SPT se shromažďuje ve čtvrté zásobní nádobě a následně se filtruje přes filtr ze skleněných mikrovláken s velikostí pórů $0,7 \text{ }\mu\text{m}$ (Whatman GF/F). Po této filtraci lze SPT pocházející z frakcionace orných půd považovat za vyčištěné. Doporučuje se zkontrolovat výsledek recyklace SPT stanovením obsahu C a N ve vyčištěném SPT, a to zejména pokud dochází ke změně půdního typu, u půd s rozdílným zrnitostním složením, nebo tam, kde se dá očekávat vyšší podíl rozpustného organického uhlíku (DOC) v půdě (zejména lesní a travní ekosystémy na kyselých půdách). Nicméně z našeho průzkumu vyplývá, že pro rozpětí orných půd, na kterých probíhalo testování, je tento postup čištění dostatečný. Po vyčištění je nutné zkontrolovat hustotu SPT. Pokud je nižší než $1,85 \text{ g ml}^{-1}$, přebytečná voda se odstraní odpařením v sušárně. SPT dodané výrobcem (SPT-OL – extrémně vysoká čistota – TC-Tungsten Compounds, Německo) obsahuje 0 % N a 0,042 % C, nefiltrované použité SPT obsahuje v průměru 0 % N a 0,055 % C a přefiltrované SPT obsahuje 0 % N a 0,044 % C. Pro vzorky určené k analýzám stabilních izotopů C a N nebo pro molekulárně-biologické analýzy se doporučuje používat výhradně od dodavatele vyčištěné SPT. Pro rutinní stanovení obsahu celkového uhlíku a dusíku v jednotlivých frakcích je možné používat filtrované SPT (po předchozí frakcionaci orných půd), neboť obsah DOC (navýšení obsahu C) v takto upraveném roztoku je zanedbatelný.

V případě půd s vysokým obsahem DOC lze vyzkoušet postup publikovaný (Six et al., 1999). Tento postup spočívá v pomalém průtoku SPT přes sloupec aktivního uhlí a iontoměniče. Obdobný způsob recyklace používají u lesních půd na University of Colorado (rozdíl je ve větším sloupci aktivního uhlí, rozděleného do několika trubic, rychlejším průtoku a opakováním průtoku přes aktivní uhlí), nicméně pracovníci této laboratoře upozorňují že při vysokém obsahu DOC v půdě nemusí být ani tento optimalizovaný postup efektivní, a je tak nutné kontrolovat obsah C a N u každé filtrované šarže a často je nutno některé šarže úplně vyřadit. Ostatně to potvrzují výsledky právě zmiňované publikace (Six et al., 1999), kde se z celkového počtu 15 vzorků ve třech případech nepodařilo dosáhnout žádného snížení kontaminace SPT. Ve čtvrtém případě došlo dokonce k 2,35násobnému nárůstu obsahu uhlíku. Tyto významné rozdíly mezi vzorky poukazují na riziko, že v případě vysokého obsahu DOC v lesních půdách a u travních porostů na kyselých půdách nemusí být recyklace úspěšná ani při použití složitějšího systému s aktivním uhlím a iontoměniči. Tato publikace uvádí dále, že kontaminace komerčně

dodaného SPT uhlíkem činila 0.122% C. To je pravděpodobně chyba v desetinném místě, protože takových hodnot kontaminace nedosahují ani vzorky SPT prošlé frakcionací, a to jak v jejich případě, tak ani u našich vzorků. Pokud tedy vezmeme, že počáteční znečištění bylo 0.0122% C (ne 0.122% jak uvádí), po jeho použití při půdní frakcionaci pak v rámci této studie stouplо toto znečištění v průměru na 0.035% C, a po přečištění opět kleslo na hodnotu 0.014% C. Z toho vyplývá, že účinnost čištění je ~92% a navýšení kontaminace SPT oproti komerčně dodávanému SPT je o ~15%. U námi vyvinutého postupu (spolehlivě použitelného pouze u orných půd s nutností kontroly obsahu C po filtraci) dosahujeme v průměru účinnosti čištění ~85% a navýšení kontaminace o ~5%. Přestože je tedy účinnost našeho postupu filtrace mírně nižší než při použití aktivního uhlí a iontoměnič, výsledné navýšení kontaminace je u našeho postupu dokonce 3x nižší než v uvedené studii, což je ovšem otestováno pouze pro orné půdy, a lze předpokládat, že u lesních půd a lučních porostů bude kontaminace narůstat. U takových půd pak nemusí být uvedený postup recyklace dostačující a SPT nemůže být opakovaně použito, nebo musí být zvolen postup s čištěním přes aktivní uhlí a iontoměnič, který ovšem také nemusí zajistit dostatečné vyčištění.

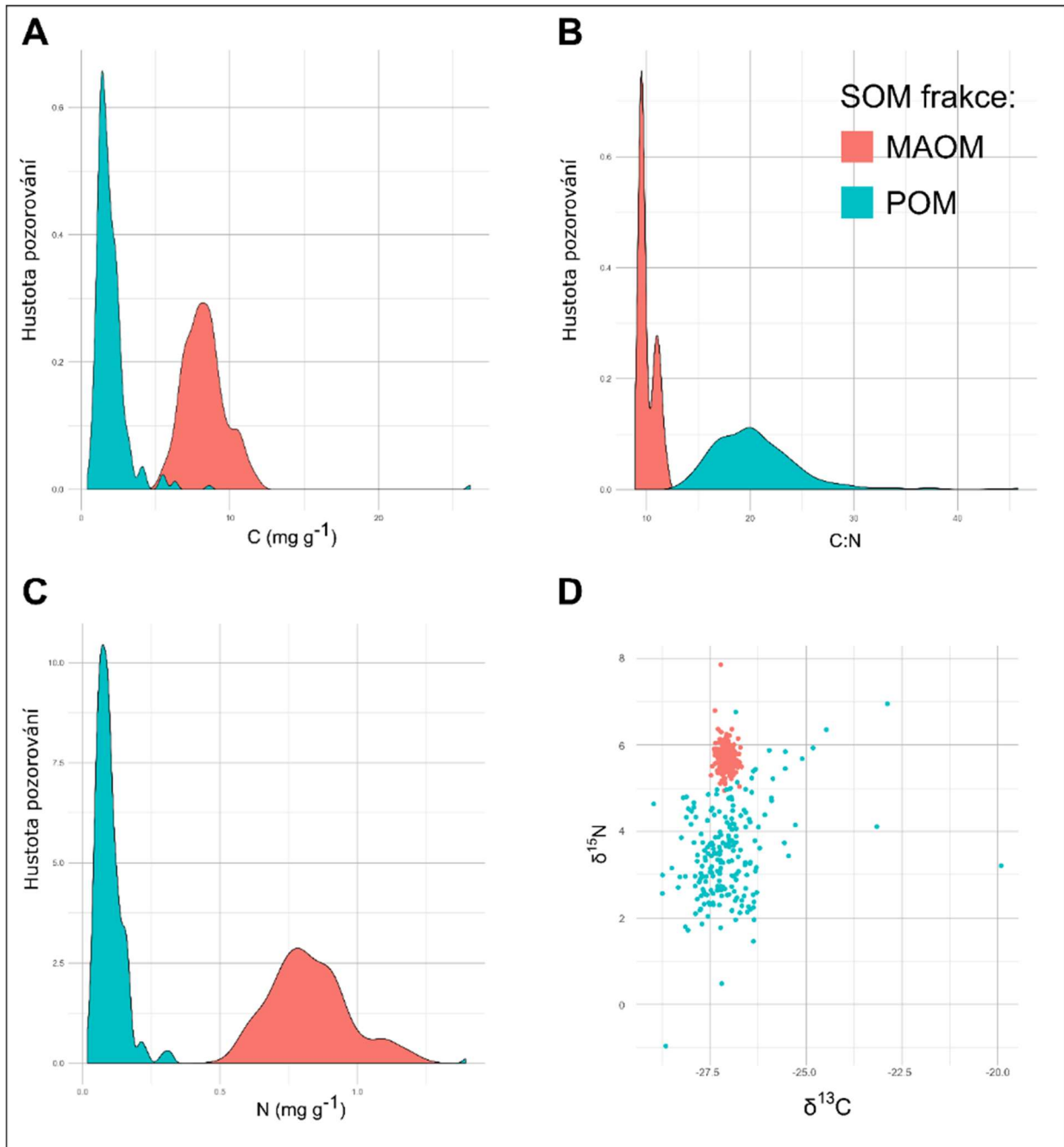
Naopak pozorovaná změna zabarvení roztoku po filtraci je v souladu s našimi výsledky, kdy se barva SPT mění z neonově žluté na žlutohnědou. Sraženiny SPT vznikající v důsledku interakce s Ca^{2+} jsou zachyceny na filtrech, zatímco rezidua ostatních kationtů spolu s rozpuštěným organickým uhlíkem (DOC) zůstávají v přefiltrovaném roztoku.

Závěrem lze konstatovat, že navržený postup recyklace je u orných půd dostatečně spolehlivý, s podmínkou, že bude vždy kontrolována kontaminace SPT C a N u každé šarže, minimálně však při změně půd, přičemž není vyloučeno, že některé šarže budou muset být vyloučeny. U námi používaného souboru půd, kde hlavní složku znečištění tvoří velmi jemný POC, ovšem tento případ nenastal. V případě lesních půd a půd z lučních ekosystémů, především na kyselých půdách, lze očekávat, že námi navržený postup nebude dostatečný a bude nutné použít filtraci přes aktivní uhlí a iontoměnič, přičemž dle zkušeností z Univerzity of Colorado lze doporučit opakované promývání roztoku, protože efektivita jímání DOC u tohoto systému není dostatečná.

2.7.5 Výsledky a limitace metody

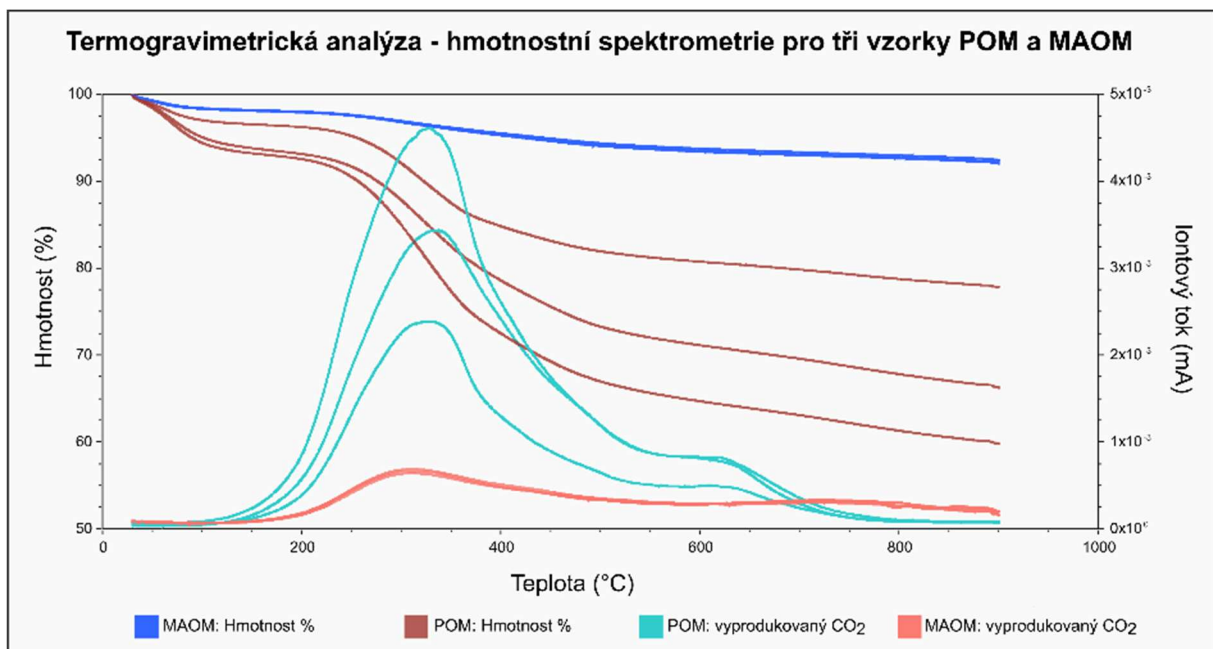
Efektivní rozdělení frakcí SOM – MAOM a POM (včetně CHAOM) za využití této metody je demonstrováno pomocí vynesení rozdílného obsahu C a N, jejich poměru (C:N) a odlišných vzorců stabilního izotopového složení uhlíku a dusíku do 4 grafů (obr. 8). Histogramy POM a MAOM ukazují, že většina organického uhlíku a dusíku je uložena ve frakci MAOM, což je pro ornou půdu typické (Georgiou et al., 2022). V případě N je histogram jeho obsahu pro MAOM posunut více než histogram obsahu C, a dochází tak ke zřetelnějšímu oddělení histogramu hodnot mezi POM a MAOM. Dále u POM

pozorujeme vyšší hodnoty poměru C:N a vyšší variabilitu poměru C:N. Dále je zřetelné oddělení POM a MAOM z pohledu izotopové diskriminace stabilních těžkých izotopů uhlíku a dusíku $\delta^{15}\text{N}$ a $\delta^{13}\text{C}$. To je zvláště zřejmé u diskriminace izotopu dusíku $\delta^{15}\text{N}$. To odpovídá předchozím zjištěním studií využívajících víceúrovňovou frakcionaci podle velikosti a hustoty půdních částic zaměřených na chování frakcí SOM v orné půdě (Leuthold et al., 2024; Poeplau et al., 2018; Witzgall et al., 2021).



Obrázek 8 POM a MAOM jako chemicky odlišné frakce SOM. První tři grafy ukazují obsah organického uhlíku (A) a dusíku (C) v oddělených frakcích a jejich poměry C:N (B). Poslední graf (D) je bodový diagram znázorňující izotopové složení těžkých stabilních izotopů uhlíku a dusíku v MAOM a POM.

Termogravimetrická analýza spojená s hmotnostní spektrometrií (TGA–MS) zdůrazňuje odlišné tepelné a chemické vlastnosti mezi frakcemi SOM (obr. 9). Frakce POM vykazovala úbytek hmotnosti přibližně 20–40 % (hnědá čára), zatímco MAOM ztratila přibližně jen 8 % (modrá čára) své hmotnosti v rozmezí teplot 25–900 °C, a to především v důsledku dehydratace, desorpce, dekarboxylace a rozkladu (Wayne a White, 2019). Odpovídající signály MS (POM = světle modrá a MAOM = růžová čára) potvrdily, že většinu tohoto úbytku hmotnosti tvořil uvolněný CO₂. Specifické emise mezi 200 a 430 °C jsou typicky spojovány s SOC (Pallasser et al., 2013). Zřetelné rozdíly v uvolňování CO₂ a v průběhu tepelné degradace mezi POM a MAOM potvrzují, že tyto frakce mají odlišné strukturní, fyzikální i chemické vlastnosti. TGA–MS tak poskytuje spolehlivý nástroj k rozlišení jejich stability a k přesnějšímu odhadu podílu stabilnějšího organického uhlíku v zemědělských půdách. Tyto informace jsou klíčové pro interpretaci procesů, které řídí ukládání uhlíku v půdě a reakci půdního prostředí na různé formy hospodaření.



Obrázek 9 Odlišné profily termogravimetrické analýzy (TGA) a hmotnostní spektrometrie (MS) frakcí POM a MAOM.

Popisovaná metodika byla vyvinuta a optimalizována pro orné půdy, které se podle zrnitostního složení řadí mezi písčitohlinité půdy, nicméně je dostatečně flexibilní, aby byla po drobných úpravách použitelná i pro jiné půdní druhy, což bylo v dalších krocích testováno na souboru dalších 36 vzorků půd s rozdílným zrnitostním složením a reprezentujících 7 půdních typů. Při práci s půdou s odlišnými mineralogickými vlastnostmi či půdou z jiných ekosystémů může dojít ke změnám výtěžku jednotlivých frakcí a tím i uhlíku v nich obsaženého, což může ovlivnit výsledky. V těchto případech je vhodné sledovat, ve kterých krocích může docházet ke ztrátám, a podle potřeby protokol cíleně upravit.

Konkrétní technické potíže, jejich příčiny a doporučená opatření jsou uvedeny v kapitole „2.7.6 Časté problémy“.

Vliv zrnitostního složení půd a celkového obsahu organického uhlíku v půdě - (SOC) na hmotnostní výtěžek metodiky a výtěžek uhlíku byly sledovány na souboru 36 vzorků půd s rozsahem obsahu jílovitých částic ~10-29% a rozsahem obsahu SOC ~0.9-3.2%.

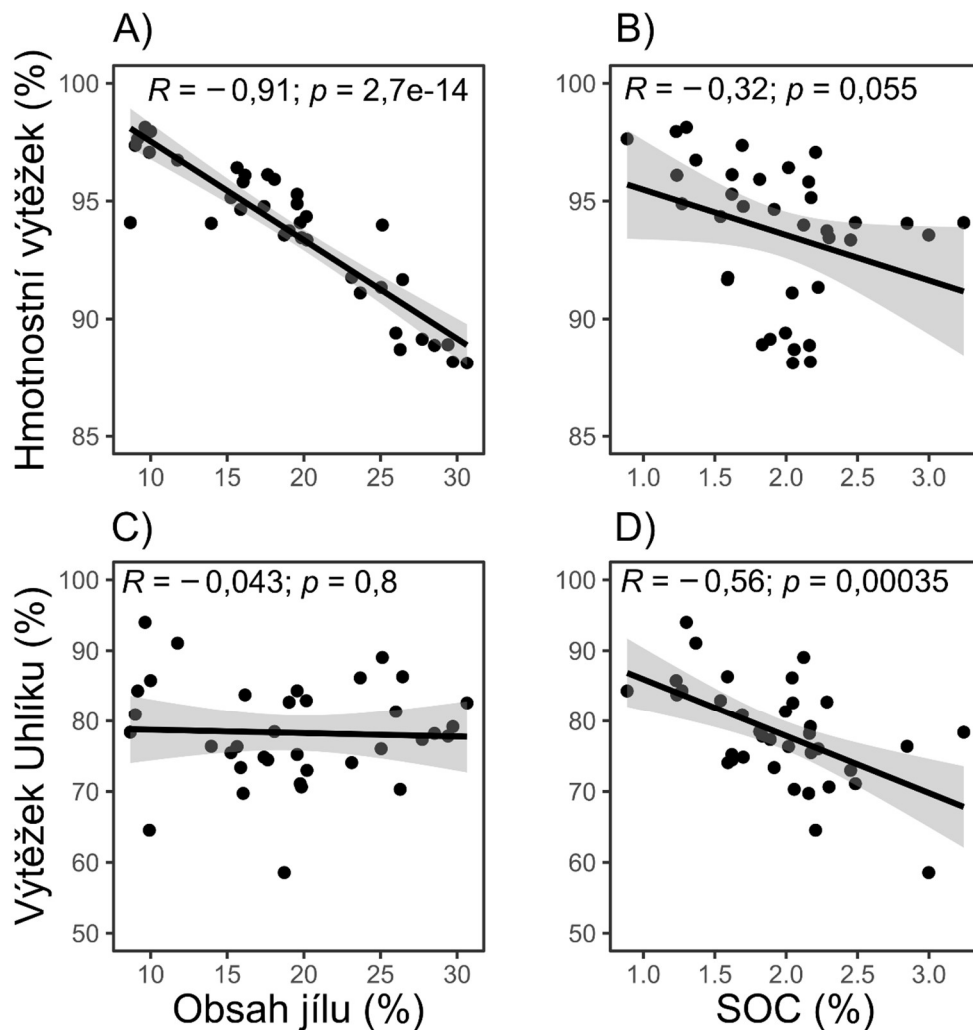
Závislosti znázorněné na obr. 10 byly hodnoceny pomocí jednoduché lineární regrese a Pearsonova korelačního koeficientu ($n = 36$). Výsledky poukazují na průkaznou negativní lineární závislost mezi obsahem jílu v půdním vzorku a hmotnostním výtěžkem frakcionace (panel A). S rostoucím obsahem jílové frakce je pozorován systematický pokles hmotnostního výtěžku, přičemž u půd s vyšším obsahem jílu se hodnoty výtěžku pohybují přibližně okolo 90 %, zatímco u vzorků s nízkým obsahem jílu se pohybují až okolo 97 %. Tento vztah naznačuje, že vlastnosti půdy spojené s vyšším zastoupením jemných částic mohou být spojeny se zvýšenými ztrátami materiálu během separačního postupu, pravděpodobně v důsledku vyplavování jemných minerálních částic v průběhu frakcionace.

V literatuře se hmotnostní výtěžek ani výtěžek uhlíku obvykle neuvádí, a z dostupných informací se ale pohybuje v rozpětí od 85% do více jak 95% pro hmotnostní výtěžek a nižší hodnoty jsou pak dosahovány pro výtěžek uhlíku (od 80% do 90%)(Leuthold et al., 2024; Poeplau et al., 2025). To koresponduje s našimi výsledky pro hmotnostní výtěžek, nicméně pro výtěžek uhlíku naše výsledky prokazují větší variabilitu, ačkoliv průměr se pohybuje okolo 80%. V případě hmotnostního výtěžku je zřejmé, že dochází ke ztrátám jílovitých částic a tím i k částečnému podhodnocování MAOC v půdách s vyšším obsahem jílovitých částic.

V panelu B je patrný slabší, statisticky hraniční negativní vztah mezi hmotnostním výtěžkem a SOC, který se vyznačuje výrazně vyšším rozptylem hodnot. Tento výsledek naznačuje, že vliv tohoto parametru na hmotnostní výtěžek frakcionace je ve srovnání s obsahem jílu méně výrazný a může být překryt variabilitou ostatních vlastností půdy nebo průběhem samotného separačního postupu.

Naproti tomu nebyla lineární regrese mezi obsahem jílu a výtěžkem uhlíku statisticky neprůkazná (panel C) a vliv obsahu jílovitých částic na samotný výtěžek uhlíku lze považovat za zanedbatelný. To naznačuje, že obsah jílové frakce nevysvětluje variabilitu výtěžku uhlíkové frakce a že tento parametr je pravděpodobně ovlivněn jinými faktory, případně jejich kombinací. Je naopak zřejmé, že ztráty uhlíku spíše souvisí s nárůstem obsahu SOC a tyto ztráty jsou dány zejména ztrátami POC, případně DOC (i když tento efekt by měl být u orné půdy malý). V panelu D byla zjištěna středně silná negativní lineární závislost mezi SOC a výtěžkem uhlíku. S rostoucím obsahem organické hmoty dochází k systematicky nižším hodnotám celkového výtěžku uhlíku. Tento vztah naznačuje, že u organicky bohatších půd mohou být ztráty uhlíku během frakcionace vyšší, přičemž se pravděpodobně uplatňuje

jak přechod části rozpustné organické hmoty do roztoku polywolframátu sodného (SPT), tak především ztráta jemné frakce částic organické hmoty typu POM o velikosti přibližně 0–50 μm . Přestože jsou ztráty rozpustné organické hmoty do SPT obvykle považovány za malé, výsledky lineární regrese naznačují, že v případě půd s vyšším obsahem organické hmoty mohou tyto ztráty spolu se ztrátami jemné POM frakce představovat systematickou složku nejistoty hmotnostní bilance separačního postupu.



Obrázek 10. Vztahy mezi vybranými půdními charakteristikami a výtěžností separačního postupu hodnocené pomocí jednoduché lineární regrese ($n = 36$). Panel A znázorňuje vztah mezi obsahem jílu (%) a hmotnostním výtěžkem frakcionace (%). Panel B zobrazuje vztah mezi obsahem půdního organického uhlíku (SOC, %) a hmotnostním výtěžkem frakcionace (%). Panel C znázorňuje vztah mezi obsahem jílu (%) a výtěžkem uhlíku (%). Panel D zobrazuje vztah mezi obsahem půdního organického uhlíku (SOC, %) a výtěžkem uhlíku (%). Plná čára představuje odhad lineárního regresního modelu, šedé pásmo odpovídá 95% intervalu spolehlivosti. V jednotlivých panelech jsou uvedeny hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu (R) a příslušné hladiny statistické významnosti (p).

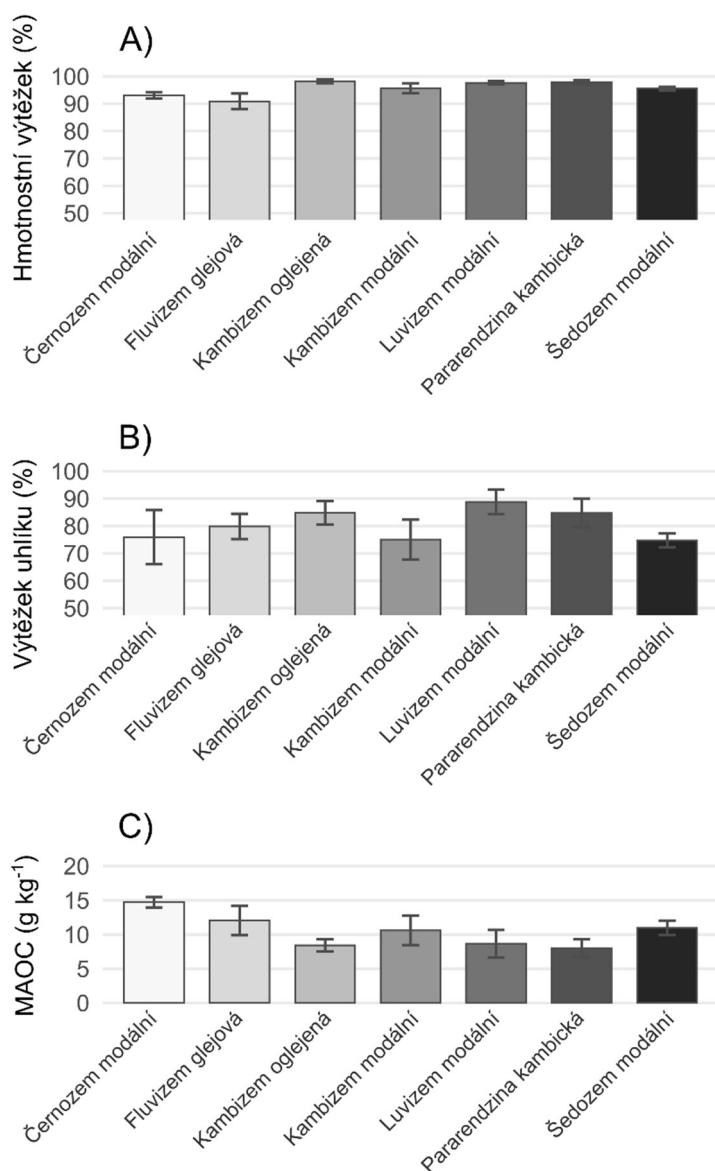
Pro detailní vyhodnocení případného vlivu půdního typu na hmotnostní výtěžek a výtěžek uhlíku, byly vzorky analyzovány dle půdního typu lokality, ze které vzorky pocházejí. V tabulce 2 jsou uvedeny pro jednotlivé lokality odběru vzorků půdní typy, stanovené průměrné hodnoty MAOC, $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$, SOC a obsah jílu, prachu a písku, včetně uvedených směrodatných odchylek pro 4 samostatně odebrané a analyzované vzorky z dané lokality.

Tabulka 2 Souhrnná tabulka vzorkovaných lokalit, s uvedenými půdními typy, průměrnými hodnotami MAOC, $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$, SOC, a obsahu jílu, prachu a písku. Za průměrnými hodnotami jsou uvedeny směrodatné odchylky od průměru pro 4 vzorky samostatně odebrané a analyzované z dané lokality.

Lokalita	půdní typ	MAOC	$\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$	Cox/SOC	Jíl	Prach	Písek
		g kg^{-1}	-		-----%-----		
Banín (Babička)	pararendzina kambická	8.1±1.4	6.4±0.2	1.5±0.2	14.4±1.1	54.6±6.8	31±7.6
Banín (Větrolam)	kambizem oglejená	8.5±0.9	6.2±0.2	1.2±0.1	20.1±0.3	53.9±1.5	26±1.5
Veselíčko u Lipníka nad Bečvou	šedozem modální	10.5±0.7	6.2±0.8	2±0.2	16.1±1	64.3±1.9	19.7±1.7
Hrušovany u Brna	černozem modální	14.8±1	7.4±0.2	2.6±0.4	19.4±0.6	51.5±1.5	29.3±1.9
Vojkovice	černozem modální	14.7±0.8	7.3±0.2	2.3±0.2	23.6±2.4	59.8±5.3	16.8±4.4
Doubravník	kambizem modální	10.7±2.2	6.7±0.7	2.5±0.7	10.4±2.5	35±3	54.7±4
Troubky (levý)	fluvizem glejová	12.2±0.4	7±0.3	1.9±0.2	27.5±1.5	53.7±6.8	19±7.9
Troubky (pravý)	fluvizem glejová	14.5±0.6	7.1±0.1	2.1±0.1	28.8±2.1	57.8±3.2	13.6±3.5
Krásné Pole	luvizem modální	8.7±2.1	6.1±0.2	1.2±0.3	10.2±1.2	69±2.4	21±3.5
Rokytnice (ZS Pobečví)	fluvizem glejová	9.7±1.2	6.6±0.3	1.5±0.2	19.8±2.9	48.8±6.8	31.6±8.9
Rokytnice (Za humny)	šedozem modální	11.5±1.3	6.1±0.1	1.9±0.3	17.9±1.5	63.7±2.3	18.5±1.9

Výsledky ukazují, že nižšího hmotnostního výtěžku na úrovni těsně nad 90% bylo dosaženo u fluvizemě glejové a černozemě modální (obrázek 11). Tyto půdy byly rovněž charakteristické vysokým podílem MAOC, vyšším pH a u fluvizemě také vyšším podílem jílovitých částic. Naproti tomu výtěžek uhlíku vykazoval odlišné rozložení napříč půdními typy, přičemž nejnižší výtěžek byl zjištěn u kambizemě modální, šedozemě modální a také černozemě modální, u kterých byl zaznamenán výtěžek uhlíku pod 80% zatímco u zbývajících půd se pohyboval mezi 80-90%. Pravděpodobně jediným jednotícím prvkem pro tyto rozdíly je obsah SOC, který u půd s vyšším obsahem SOC znamená nižší výtěžek uhlíku.

Ačkoliv výsledky částečně indikují, u jakých frakcí dochází ke ztrátám, není jednoznačný podíl těchto frakcí na ztrátách, a tudíž nelze v tuto chvíli doporučit dopočet do plné hmotnosti či celkového obsahu uhlíku. Současně je důležité, aby při frakcionaci byl vyhodnocen hmotnostní výtěžek a ideálně i výtěžek uhlíku, a to zejména pokud se pracuje s půdními vzorky s rozdílným zrnitostním složením, a také u vzorků, které vykazují velké rozdíly v obsahu SOC, a tento výtěžek uvádět společně s hodnotami MAOC. Po dalším ověření lze ale usuzovat, že bude možné s malou chybou provádět dopočet na hmotnostní ztráty v případě MAOC, protože tyto ztráty jsou spojeny s vyšším obsahem jílovitých částic.



Obrázek 11 Hmotnostní výtěžek frakcionace (A), výtěžek uhlíku (B), a MAOC (C) pro skupiny vzorků dle půdních typů. Sloupce představují průměry, chybové úsečky střední chybu průměru.

Významným limitujícím faktorem tohoto protokolu je doba trvání metody. Na základě výše popsaného experimentálního postupu dokáže jeden člověk zpracovat šest vzorků půdy za jeden pracovní den. Příprava vzorků a lyofilizace před a po frakcionaci vyžadují dalších ~100 hodin. Na rozdíl od frakcionace založené výhradně na velikosti je tento protokol časově náročnější, nicméně přináší vyšší přesnost rozdělení frakcí, která může být významná zejména při porovnání půd s rozdílnou strukturou (rozdílným obsahem jemných minerálních částic – jílu a prachu). Při frakcionaci pouze na základě velikosti částic dochází k částečné kontaminaci POMu frakcí MAOM, což vede k podhodnocení stabilní frakce uhlíku MAOC. U půd s vyšším podílem jemné frakce (jíl a prach) se kontaminace zvyšuje. Naopak u půd s vysokým podílem jemné frakce POM pod 50 μm přechází tato frakce do MAOC.

Podobně může vzniknout problém při nedostatečné desintegraci makroagregátů, které při hustotní frakcionaci spadají do frakce MAOM, ale při frakcionaci podle velikosti jsou vyhodnoceny nesprávně jako frakce POM. Výběr vhodné metody by měl vycházet z konkrétních výzkumných cílů a dostupných zdrojů. Ačkoli zde navržená metoda umožňuje přesné oddělení frakcí SOC, je méně vhodná pro velké soubory vzorků a může vyžadovat optimalizaci, pokud vzorky půdy vykazují vysokou variabilitu v obsahu jemných minerálů.

2.7.6 Opakovatelnost postupu

Opakovatelnost frakcionační metody byla ověřena šestinásobnou analýzou téhož půdního vzorku (pararendzina kambická). Hodnocena byla variabilita hmotnosti jednotlivých frakcí (CHAOM, MAOM, POM), celkového součtu frakcí, rozdílu mezi součtem frakcí a původní hmotností vzorku a hmotnostním výtěžkem. Jako ukazatel opakovatelnosti byl použit variační koeficient (CV, %).

Metoda vykazovala velmi dobrou opakovatelnost pro frakci CHAOM, kde bylo dosaženo CV = 0,99 %, a rovněž pro frakci MAOM (CV = 2,62 %). U frakce POM byla zjištěna vyšší relativní variabilita (CV = 9,39 %), což je v souladu s obecně vyšší citlivostí této lehké a objemově malé frakce na dílčí kroky separace a manipulace se vzorkem. Přesto lze i tuto úroveň variability považovat za přijatelnou pro manuálně prováděnou frakcionační proceduru.

Tabulka 3 Opakovatelnost frakcionační metody – hmotnostní bilance a variabilita jednotlivých frakcí (n = 6)

	CHAOM (g)	MAOM (g)	POM (g)	Součet frakcí (g)	Původní hmotnost (g)	Ztráta (g)	Hmotnostní výtěžek (%)
1. opakování	3.779	1.009	0.026	4.814	5.000	0.186	96.27
2. opakování	3.848	1.003	0.021	4.872	5.000	0.128	97.43
3. opakování	3.842	0.995	0.025	4.862	5.000	0.138	97.23
4. opakování	3.807	1.067	0.023	4.896	5.000	0.104	97.92
5. opakování	3.823	1.002	0.024	4.849	5.000	0.151	96.98
6. opakování	3.889	1.004	0.027	4.921	5.000	0.079	98.41
Průměr	3.831	1.013	0.024	4.869	5.000	0.130	97.37
SD	0.03787	0.02659	0.00228	0.03730	0.00000	0.03730	0.74605
CV (%)	0.99	2.62	9.39	0.77	0.00	28.42	0.77

Rozdíl mezi původní hmotností vzorku a součtem získaných frakcí dosahoval v průměru 0,130 g, což odpovídá průměrné relativní ztrátě 2,63 %. Variabilita této ztráty byla vyšší (CV = 28,42 %), což ukazuje, že velikost hmotnostních ztrát se mezi jednotlivými opakováními mírně lišila. Tyto ztráty lze přičíst především nevyhnutelným ztrátám materiálu během separačních a přelévacích kroků.

Průměrná hmotnostní výtěžnost dosáhla 97,37 % a velmi nízké variability (CV = 0,77 %), což potvrzuje celkovou stabilitu a reprodukovatelnost separačního postupu.

Celkově výsledky prokazují vysokou opakovatelnost metody, zejména pro frakce CHAOM a MAOM a pro celkovou hmotnostní bilanci. Vyšší variabilita frakce POM a rozdílu hmotností odpovídá charakteru této frakce a nepředstavuje zásadní omezení reprodukovatelnosti metody.

2.7.7 Časté problémy

Tabulka 3 Shrnutí problémů pozorovaných při vývoji metodiky, jejich pravděpodobných příčin, a doporučení pro jejich eliminaci

Pozorování	Pravděpodobná příčina	Doporučení
Ztráta části půdního vzorku při lyofilizaci	Vylétání drobných půdních částic při vzniku podtlaku v lyofilizační komoře	Povrch půdního vzorku postříkejte malým množstvím vody, zamrazte a lyofilizujte.
SPT neprotéká přes filtr s POMem	Filtr se ucpává velkým množstvím POMu	Poklepáváním na stěnu nálevky usnadníte protékání SPT přes filtr. Můžete také použít filtr s větší plochou, kde se POM lépe rozprostře.
Problémy s resuspendováním MAOMu a CHAOMu po centrifugaci	Příliš vysoká centrifugační síla	Snižte rychlost centrifugy a úměrně prodlužte čas centrifugace.
	Vysoký obsah jílu a prachu, které vytváří pevné shluky	Přidejte do zkumavky před centrifugací několik skleněných kuliček (~4mm), které usnadní resuspendování.
Nízký výtěžek jednotlivých frakcí	Na použitých nástrojích zůstává neopláchnutý materiál	Pečlivě splachujte zbytky vzorku ze všech nástrojů a nádob, kdykoli vzorek přenášíte do nové nádoby.
	Při promývání MAOMu se vyplachuje příliš mnoho jílu	Snižte počet proplachovacích cyklů, čímž omezíte ztrátu nesedimentovaného jílu.
	Při promývání POMu dochází k lámání částic a jejich vyplachování skrz nylonovou tkaninu	Při promývání POMu si počínejte velmi opatrně, abyste minimalizovali lámání částic. Se zkumavkou netřepte.
Výtěžek překračuje 100 %	Kontaminace vzorku zbytkovým SPT	Po separaci je zapotřebí všechny frakce důkladně promýt.
Po lyofilizaci jsou ve vzorku přítomny bílé krystaly	Kontaminace vzorku zbytkovým SPT	Po separaci je zapotřebí všechny frakce důkladně promýt.
Malé množství uhlíku v získaných frakcích oproti původnímu vzorku	Ztráty většího množství jemného POMu (<50 µm)	Jemný POM vyseparujte z SPT pomocí jemnějšího filtru.
	Nadměrné vymývání jílu při promývání MAOMu	Použijte větší centrifugační sílu a/nebo delší čas centrifugace

	v kombinaci s kontaminací SPT. To vede k očekávanému hmotnostnímu výtěžku MAOMu ale se sníženým obsahem uhlíku	pro dosažení lepší sedimentace. Přefiltrujte oplachovou vodu přes velmi jemný filtr, který zachytí jemné jílové částice, které špatně sedimentují.
Nečekaně velké množství MAOMu s nízkým obsahem uhlíku	Drobné kamínky byly při přípravě vzorku pomlety na jemný písek a prach.	Před analýzou půdy za mokra prosejte přes 2 mm síto. Po prosátí půdu usušte při 40 °C v horkovzdušné sušárně.

2.8 Vliv pěstitelské technologie na zvyšování obsahu stabilní frakce MAOC

V rámci víceletých polních maloparcelkových experimentů zaměřených na dlouhodobé ukládání uhlíku v půdě bylo provedeno ověřování funkčnosti a interpretovatelnosti metodiky frakcionace organického uhlíku v půdě. Pro ověřování byly použity varianty, u kterých je na základě dosavadních znalostí předpokládán největší efekt technologie na ukládání uhlíku do stabilního zásobníku (MAOC). Vzorky půd byly z těchto variant odebrány po 5-letém režimu uplatňování jednotlivých technologických postupů a jejich kombinací. V rámci tohoto ověřování byly zvoleny vzorky z variant adaptační technologie (AT) spočívající v bezorebném zakládání porostů s pěstováním druhově bohatých meziplodin (rovněž zakládáných bezorebně), které jsou porovnávány s konvenční technologií založenou na orbě bez pěstování meziplodin (CT). Dále byly použity varianty aplikace kompostu a kompostovaného biouhlu (na začátku experimentu) porovnáváné s kontrolou, a také varianty s aplikací dusíku v doporučené dávce k dané plodině, a bez aplikace dusíku.

2.8.1 Materiál a metody

Polní maloparcelkový experiment zaměřený na testování perspektivních technologií pro zvyšování stabilní frakce uhlíku v půdě (MAOC) byl proveden na dvou lokalitách v blízkosti obce Banín (lokality Babička a Větrolam) během pěti vegetačních období 2019–2023. Lokality jsou charakteristické půdními typy „rendzic leptosol“ pro lokalitu Babička a „gleyic cambisol“ pro lokalitu Větrolam podle systému WRB FAO (WRB, 2024). Dlouhodobý průměr teploty a úhrnu srážek v této lokalitě (2000–2020) je 8,0 °C a 621 mm. Průměrný obsah jílu, hlinitých částic (prachu) a písku byl 14,4, 54,6 a 31 % na lokalitě Babička a 20,1, 53,9 a 26 % na lokalitě Větrolam. Podle klasifikace půdní struktury USDA to odpovídá “silty loam” (prachová hlína půda dle Taxonomického klasifikačního systému půd ČR) půdě na obou lokalitách. Analýzy půdy z ornice (0–20 cm) při extrakci činidlem Mehlich III odhalily výrazně vyšší obsah fosforu (P) v lokalitě Babička (průměr: 168,7 mg kg⁻¹) ve srovnání s lokalitou Větrolam (průměr: 55,4 mg kg⁻¹). Ostatní parametry, jako je draslík (K), vápník (Ca), organický uhlík v půdě (Cox), celkový dusík

(Nt) a pH, byly také nižší v lokalitě Větrolam, ale rozdíly byly výrazně menší. Konkrétně obsah K byl 132,5 mg kg⁻¹ a 120,5 mg kg⁻¹, Ca byl 1667,8 mg kg⁻¹ a 1492,0 mg kg⁻¹, Cox byl 1,27 % a 1,11 %, Nt byl 0,136 % a 0,125 % a pH bylo 6,0 a 5,6 na lokalitách Větrolam a Babička. Na druhé straně lokalita Větrolam měla mírně vyšší hodnoty obsahu hořčíku (Mg) (71 mg kg⁻¹ na lokalitě Babička a 80 mg kg⁻¹ na lokalitě Větrolam) a kationtové výměnné kapacity (CEC) (12.3 cmolc kg⁻¹ na lokalitě Babička a 12.9 cmolc kg⁻¹ na lokalitě Větrolam).

Na každé experimentální lokalitě byly založeny v roce 2017 čtyři bloky představující opakování, každý o rozměrech 100 × 5,2 m a oddělené 4 m širokými travnatými pásy. Roky 2017-2018 představovaly přípravnou fázi experimentu ve které byly na vytyčených parcelách o velikosti 10 m x 5.2 m provedeny aplikace kompostu (C) a kompostovaného biouhlu – do kompostu byl při zakládce přidán biouhel (CB), a to vždy ve dvou variantách (bez následné aplikace dusíku N0 a s následnou aplikací dusíku N100), stejně jako u kontrolní varianty bez aplikace kompostu či kompostovaného biouhlu. Varianty s aplikacemi kompostu/kompostovaného biouhlu a dusíku byly plně randomizovány v blocích. V tomto přípravném období byly na vytyčených blocích pěstovány ozimá pšenice (2017) a ozimé žito (2018). Aplikace kompostu a kompostovaného biouhlu proběhly ve třech dělených dávkách v letech 2017 a 2018 (15.3.2017, 26.9.2017 a 10.10.2018) a to v celkové dávce 27 t ha⁻¹ (3 x 9 t ha⁻¹). Bloky byly podélně rozděleny na podzim 2018 na dva pruhy každý o šířce 2,4 m oddělené uličkou 40 cm: jeden s konvenční technologií (orba bez meziplodin; CT) a druhý s adaptační technologií (bezorebné setí a druhově bohaté meziplodiny; AT). Od roku 2018 pak byly založeny parcely se dvěma úrovněmi aplikace dusíku ke každé plodině a to pro všechny (N0 – bez hnojení dusíkem, N100 – plná dávka dusíku odpovídající dané plodině). Dávky dusíku u variant N100 činily pro ozimou pšenici 140 kg N ha⁻¹, jarní ječmen a jarní triticales 100 kg N ha⁻¹ a pro zrnovou kukuřici 150 kg N ha⁻¹. V roce 2019 byla na obou lokalitách pěstována ozimá pšenice (odrůda Tigran), v roce 2020 jarní ječmen (odrůda Bojos), v roce 2021 zrnová kukuřice (odrůda Jaipur), v roce 2022 jarní triticales (odrůda Mamut), a v roce 2023 ozimá pšenice (odrůda Avenue). Varianty AT byly sety přímo do nezpracované půdy pomocí secího stroje Väderstad Rapid 300 (v letech 2019, 2020, 2022 a 2023) a Amazone ED-6000-2 C (v roce 2021). Na variantách CT byla provedena vždy na podzim orba do hloubky 20 cm a před setím provedena příprava půdy do hloubky 5-7 cm. Druhově bohaté meziplodiny byly vysévány ihned po sklizni hlavní plodiny u varianty AT bezorebně secím strojem Väderstad Rapid 300 na konci července až začátku srpna 2018, 2019, 2021 a 2022. V roce 2022 nebyla meziplodina vzhledem k pozdní sklizni kukuřice vysévána. Směs meziplodin obsahovala 25 kg ha⁻¹ směsi Fitsoil Nitro (9 druhů) a 15 kg ha⁻¹ směsi Greening 5 (5 druhů).



Obrázek 12 Setí kukuřice secím strojem Amazone ED-6000-2 C u varianty CT (připravená půda vlevo) a AT (vymrzlá meziplodina vpravo) současně (levý snímek). Bezorebné setí meziplodiny secím strojem Väderstad Rapid 300 do strniště sklizené hlavní plodiny u technologie AT (pravý snímek).



Obrázek 13 Pás adaptační technologie (AT) se vzrostlou mezipločinou (vlevo). Detail druhového složení mezipločiny s vysokým zastoupením druhů z čeledi bobovité (vpravo).

Odběry vzorků půdy byly prováděny na podzim v roce 2023 z hloubkového profilu 0-20 cm. Z každé parcely (opakování) byly odebrány 3 dílčí vzorky, které byly smíseny, vysušeny v sušárně při teplotě 40 °C, homogenizovány a přesáty na síť 2 mm. Stanovení Cox probíhalo kolorimetricky po oxidaci dichromanem draselným v prostředí H_2SO_4 (Walkley–Black). Frakcionace MAOC a POC probíhala na základě měrné hmotnosti části pomocí polywolframanu sodného o měrné hmotnosti 1.86 g cm^{-3} a následně mokřím sítováním podle velikosti částic, dle dříve popsané metodiky. Čistá frakce MAOC byla vysušena v lyofilizátoru a použita pro následné analýzy C a N pomocí prvkového analyzátoru (Dumasova metoda) Vario PyroCube ve spojení s izotopovým hmotnostním spektrometrem IsoPrime 100 pro stanovení izotopů uhlíku ^{12}C a ^{13}C . Uhlík oxidovatelný v roztoku manganistanu draselného (POxC) byl stanoven spektrofotometricky pomocí 0.02 M KMnO_4 a následného měření absorbance při 550 nm (Culman et al., 2012).

Pro statistické vyhodnocení výsledků bylo použito třífaktorové analýzy variance (ANOVA) s faktory hnojení dusíkem, aplikace kompostu a kompostovaného biouhlu a technologie. ANOVA byla provedena pro každou ze dvou experimentálních lokalit samostatně. Normalita rozložení byla testována Shapiro-Wilk testem a v případě že nebyla potvrzena normalita byla provedena Box-Coxova

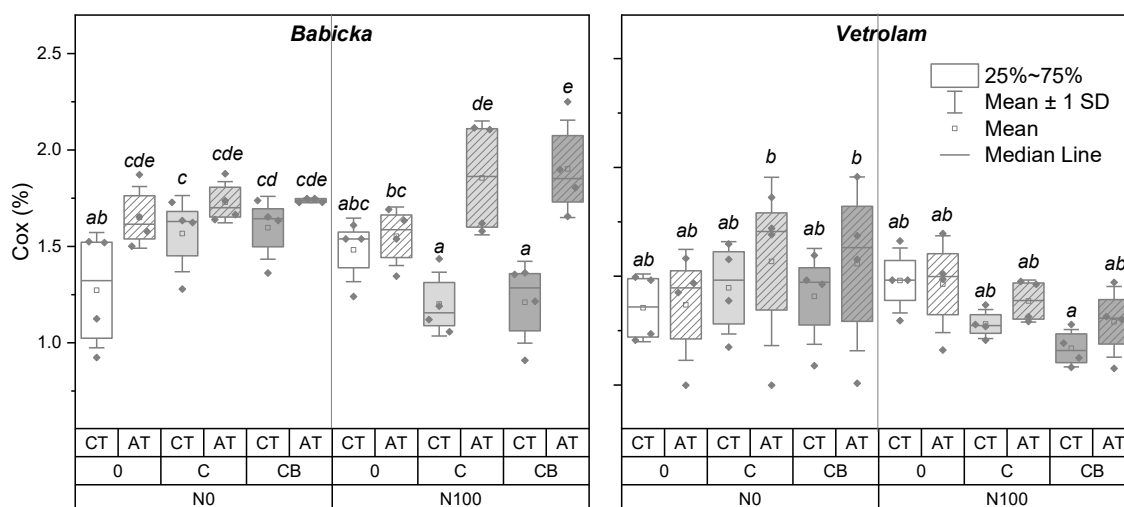
transformace. Homogenita rozptylu byla testována pomocí Leveneho testu. Pro vyhodnocení průkaznosti rozdílů mezi průměry bylo provedeno následné testování pomocí Fisherova LSD post-hoc testu. Statistické analýzy byly provedeny v software Statistica 14. Grafy byly zpracovány v software Origin Pro 2025.

2.8.2 Výsledky a diskuse

Výsledky stanovení Cox prokazují poměrně nejednoznačný efekt experimentálních variant na tento parametr (obr. 14). Na základě ANOVA nebyl na lokalitě Větrolam zjištěn průkazný efekt žádného ze sledovaných faktorů, zatímco na lokalitě Babička byl zjištěn vysoce průkazný efekt pouze u technologie ($p < 0,01$), přičemž efekt adaptační technologie (AT) se projevil obecně ve zvýšení Cox, nicméně tento efekt byl při testování rozdílů mezi průměry statisticky průkazný především při srovnání kontrastní varianty konvenční technologie (CT) bez hnojení dusíkem (N0) a bez aplikace kompostu (0) a varianty s adaptační technologií (AT) hnojené dusíkem (N100) s aplikací kompostu (C) nebo kompostovaného biouhlu (CB). Průkazný efekt technologie (rozdíl mezi CT a AT) byl rovněž zjištěn pro varianty hnojené dusíkem (N100) v kombinaci s aplikací kompostu (C) a kompostovaného biouhlu (CB). To potvrzuje také průkazná interakce mezi technologií a hnojením dusíkem a také trojitá interakce mezi technologií, hnojením dusíkem a aplikací kompostu nebo kompostovaného biouhlu. Rozdíl u těchto variant je ovšem dán také mírným poklesem obsahu Cox u konvenční technologie, což indikuje, že aplikace kompostu nebo kompostovaného biouhlu v kombinaci s orbou a hnojením dusíkem může vést k priming efektu (Kuzyakov, 2010), projevujícím se poklesem Cox, zatímco aplikace kompostu nebo kompostovaného biouhlu bez zapravení vede k vyšší stabilitě a mírnému navýšení Cox v půdě. Kromě samotné aplikace kompostu nebo kompostovaného biouhlu se na zvýšení priming efektu může podílet také aplikace dusíku, protože průkazný efekt na snížení obsahu Cox u CT byl pozorován pouze u variant hnojených dusíkem. Bei et al. (2022) dokazují že kombinace přidání slámy se zvýšenou nabídkou dusíku zvyšuje primingový efekt v průměru o 18.1 % a rozklad slámy o 17.1 %, což vede k rozkladu organického uhlíku v půdě. Dokladují to rovněž aktivací mikroorganismů jako důsledek přidání slámy a zvýšené nabídky dusíku.

Pozitivní efekt na obsah Cox u AT technologie poukazuje na pomalejší dekompozici organické hmoty a příspěvek biomasy druhově bohatých meziplodin. Při přepočtu celkové zásoby organického uhlíku v půdě na jednotku plochy na základě objemové hmotnosti by zřejmě došlo ke zvýšení efektu AT na obsah Cox (vzhledem k očekávanému zvýšení objemové hmotnosti půdy u AT technologie), což ale platí i pro všechny následně uváděné parametry. Toto navýšení zásoby organického uhlíku v půdě při přepočtu na objemovou hmotnost dokumentují i některé krátkodobé studie především pro no-til technologie a v menší míře i pro meziplodiny (Farina et al., 2024; Veenstra et al., 2007). Obvykle je v nich ale obtížné odlišit efekt změny objemové hmotnosti a skutečného (zejména pak dlouhodobého)

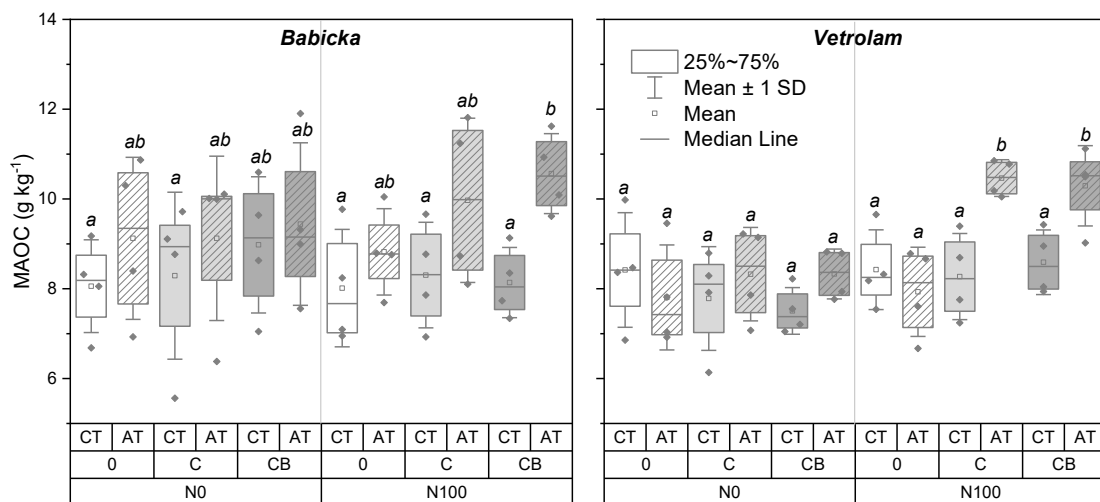
uložení uhlíku ve formě MAOC. Protože parametr objemové hmotnosti redukované je poměrně dynamický nejen u variant s orbou, ale i u bezorebných technologií (kdy nejprve dochází k navýšení, ale následně klesá se zvyšujícím se podílem makropórů), měl by být přepočet množství uloženého uhlíku na plochu pomocí objemové hmotnosti redukované používán a interpretován uvážlivě. Zhutnění půdy nebo naopak nakypření půdy tak může být nesprávně interpretováno jako navýšení nebo pokles množství uloženého uhlíku na jednotku plochy, i když se obsah uhlíku na jednotku hmotnosti půdy nemění. Z pohledu posouzení změn v čase je proto správnější používat k porovnání vyjádření na jednotku hmotnosti půdy.



Obrázek 14 Vliv hnojení dusíkem (N0 – bez hnojení N, N100 – plná dávka N dle plodiny), aplikace kompostu/kompostovaného biouhlu (0 – bez aplikace, C – aplikace kompostu, CB – aplikace kompostovaného biouhlu) a technologie (CT – konvenční technologie založená na orbě bez pěstování mezplodin, AT – adaptační technologie založená na bezorebném setí a pěstování druhově bohatých mezplodin) na množství organického (oxidovatelného) organického uhlíku stanoveného ve vzorku půdy kolorimetricky po oxidaci dichromanem draselným v prostředí H_2SO_4 (Walkley–Black). Boxy znázorňují 25-75% percentil, chybové úsečky směrodatné odchylky od průměru. Průměr je znázorněn prázdným bodem a medián čarou uvnitř boxu. Šedé body označují naměřené hodnoty za jednotlivá opakování. Písmena vyjadřují příslušnost průměrů variant k homogenním skupinám na základě následného testu třífaktorové ANOVA s využitím Fisherova LSD testu pro $p=0,05$ (rozdílná písmena indikují statisticky průkazné rozdíly mezi dvěma průměry).

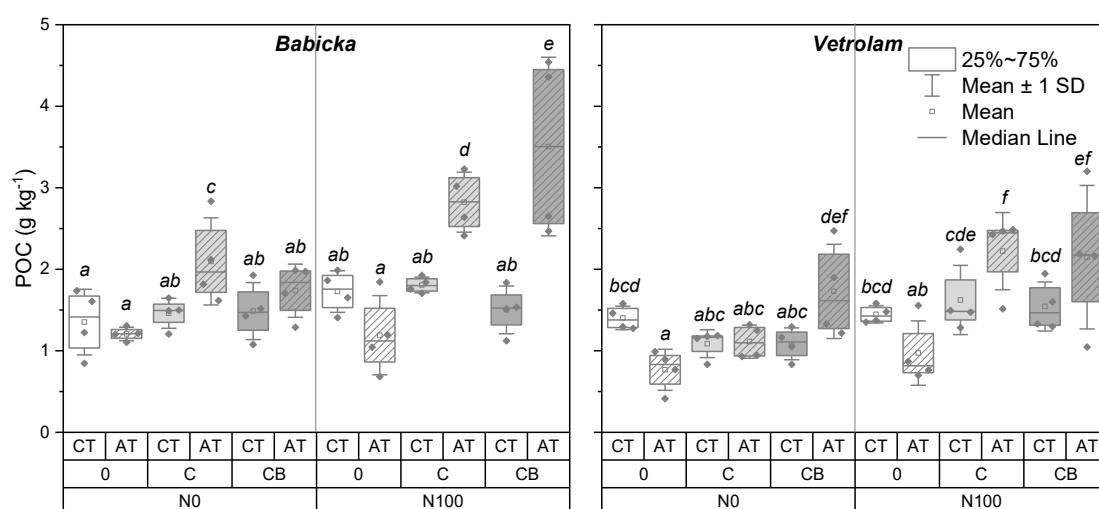
Výtěžek frakce pro stanovení MAOC byl vyhodnocen u kontrolní varianty (N0 CT), přičemž hmotnostní výtěžek na lokalitě Babička činil $97.9 \pm 0.7\%$ a na lokalitě Větrolam $98.2 \pm 0.7\%$, a výtěžek uhlíku činil na lokalitě Babička $84.7 \pm 5.2\%$ a na lokalitě Větrolam $84.8 \pm 4.3\%$. Množství uhlíku poutaného na jemnou minerální frakci půdy (jíl a prach/hlinité částice) – MAOC byl naproti tomu na obou lokalitách dle vícefaktorové ANOVA ovlivněn statisticky průkazně technologií a na lokalitě Větrolam navíc také hnojením dusíkem (obr. 15). Na lokalitě Větrolam byla rovněž zaznamenána významná interakce vlivu technologie a aplikace kompostu/kompostovaného biouhlu. Vedle efektu lokality je

tedy zřejmé, že pro formování MAOC má zásadní význam zejména technologie a pak také interakce technologie s aplikací kompostu/kompostovaného biouhlu. Ačkoliv je na obou lokalitách patrné, že AT zvyšuje množství uhlíku poutaného v jemné minerální frakci půdy, průkazný je na základě testování rozdílů mezi průměry pomocí Fisherova LSD testu tento efekt na lokalitě Babička pouze u aplikace kompostovaného biouhlu (CB) a hnojení dusíkem (N100), a na lokalitě Větrolam u aplikace kompostu (C), kompostovaného biouhlu (CB) opět pro variantu hnojenou dusíkem (N100). Z těchto výsledků na obou lokalitách vyplývá že formování MAOC je podporována zejména kombinací adaptační technologie (AT), aplikace kompostu či kompostovaného biouhlu, a hnojení dusíkem. Bezorebná technologie v kombinace s meziplodinami má tendenci stimulovat proces formování MAOC tím, že: i) zvyšuje a zajišťuje nepřetržitý přísun organických látek z rhizosféry ať již ve formě kořenových exsudátů tak i ve formě odumřelé biomasy kořenů hlavní plodiny a meziplodiny; ii) dochází k omezenému narušování půdní struktury, především pak půdních makroagregátů, které chrání organickou hmotu před rychlým rozkladem a zajišťují vhodné podmínky pro půdní mikroorganismy (zejména půdní houby) podílející se velmi pravděpodobně na formování MAOC; iii) udržuje vyšší vlhkost půdy díky mulči rostlinných zbytků a jsou tak vytvářeny vhodné podmínky pro dostatečnou produkci organických látek rostlinami a jejich transformaci půdními mikroorganismy (Farina et al., 2024; Murage et al., 2007).



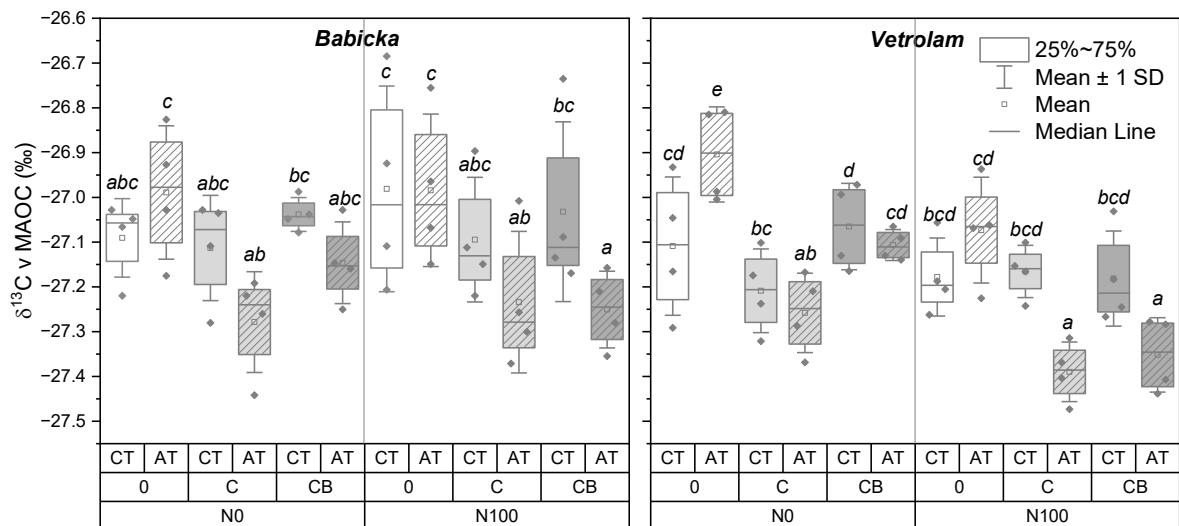
Obrázek 15 Vliv hnojení dusíkem (N0 – bez hnojení N, N100 – plná dávka N dle plodiny), aplikace kompostu/kompostovaného biouhlu (0 – bez aplikace, C – aplikace kompostu, CB – aplikace kompostovaného biouhlu) a technologie (CT – konvenční technologie založená na orbě bez pěstování meziplodin, AT – adaptační technologie založená na bezorebném setí a pěstování druhově bohatých meziplodin) na množství na minerály poutaného organického uhlíku v půdě (MAOC). Boxy znázorňují 25-75% percentil, chybové úsečky směrodatné odchylky od průměru. Průměr je znázorněn prázdným bodem a medián čarou uvnitř boxu. Šedé body označují naměřené hodnoty za jednotlivá opakování. Písmena vyjadřují příslušnost průměrů variant k homogenním skupinám na základě následného testu třífaktorové ANOVA s využitím Fisherova LSD testu pro $p=0,05$ (rozdílná písmena indikují statisticky průkazné rozdíly mezi dvěma průměry).

Množství lehkého částicového uhlíku v půdě (POC), který představuje převážně labilní frakci byl na lokalitě Babička zaznamenán průkazný efekt všech tří faktorů nezávisle (technologie, aplikace kompostu/kompostovaného biouhlu a hnojení dusíkem) a také interakce hnojení dusíkem s technologií, aplikace kompostu/kompostovaného biouhlu s technologií a interakce všech tří faktorů. Naproti tomu na lokalitě Větrolam byl zaznamenán průkazný efekt pouze u hnojení dusíkem a aplikace kompostu a kompostovaného biouhlu, a pak také u interakce aplikace kompostu/kompostovaného biouhlu a technologie. Při vzájemném porovnání rozdílů mezi průměry pak byl průkazný efekt zjištěn zejména u variant s aplikací kompostovaného biouhlu a kompostu v kombinaci s adaptační technologií a hnojením dusíkem (N100) (obr. 16). Frakce POC je tedy zjevně navyšována aplikací kompostu a kompostovaného biouhlu, nicméně podobně jako v případě Cox je tento efekt výrazně nižší a statisticky neprůkazný u orby a také u variant nehnojených dusíkem. To indikuje jednak vyšší rozklad kompostu či kompostovaného biouhlu v případě orby, ale také významný podíl zbytků kořenů meziplodin i hlavní plodiny pro navyšování tohoto zásobníku, které pravděpodobně kompenzují rozklad organické hmoty kompostu. Naopak zapravení posklizňových zbytků do půdy orbou (AT) se projevuje na frakci POC jen málo, a efekt na mírné zvýšení oproti AT byl patrný pouze u variant bez aplikace kompostu či kompostovaného biouhlu.



Obrázek 16 Vliv hnojení dusíkem (N0 – bez hnojení N, N100 – plná dávka N dle plodiny), aplikace kompostu/kompostovaného biouhlu (0 – bez aplikace, C – aplikace kompostu, CB – aplikace kompostovaného biouhlu) a technologie (CT – konvenční technologie založená na orbě bez pěstování meziplodin, AT – adaptační technologie založená na bezorebném setí a pěstování druhově bohatých meziplodin) na množství lehkého částicového uhlíku v půdě (POC). Boxy znázorňují 25-75% percentil, chybové úsečky směrodatné odchylky od průměru. Průměr je znázorněn prázdným bodem a medián čarou uvnitř boxu. Šedé body označují naměřené hodnoty za jednotlivá opakování. Písmena vyjadřují příslušnost průměrů variant k homogenním skupinám na základě následného testu třífaktorové ANOVA s využitím Fisherova LSD testu pro $p=0,05$ (rozdílná písmena indikují statisticky průkazné rozdíly mezi dvěma průměry).

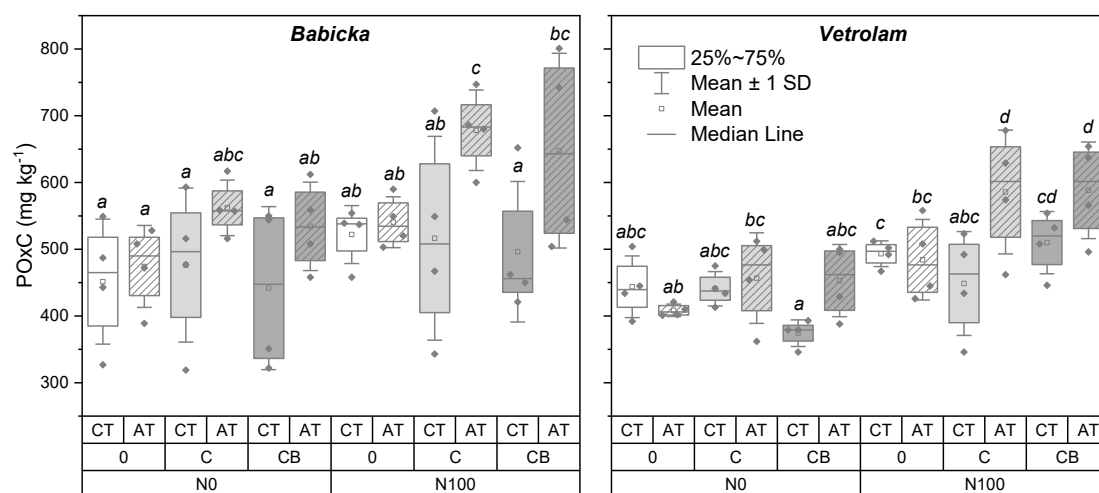
Frakce MAOC v půdě byla dále analyzována na izotopovou diskriminaci izotopu ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$), která v podmínkách se stejným osevním sledem může být indikátorem podílu mikrobiální aktivity na formování MAOC (obr. 17). ANOVA potvrdila významný efekt technologie a aplikace kompostu/kompostovaného biouhlu na změnu $\delta^{13}\text{C}$ ve frakci MAOC. Navíc na lokalitě Větrolam byl pozorován průkazný vliv hnojení N. Z výsledků je zřejmé, že efekt technologie na $\delta^{13}\text{C}$ závisí na aplikaci kompostu/kompostovaného biouhlu. Zatímco bez aplikace kompostu/kompostovaného biouhlu je patrné obecně snížení diskriminace vlivem AT (méně záporné hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ – statisticky průkazný efekt pouze na lokalitě Větrolam bez hnojení N), po aplikaci kompostu a kompostovaného biouhlu je naopak patrné zvýšení diskriminace vlivem AT. Tento efekt byl statisticky průkazný na lokalitě Babička pro variantu hnojenou dusíkem (N100) v kombinaci s aplikací kompostovaného biouhlu (CB) a na lokalitě Větrolam opět u variant hnojených dusíkem s aplikací kompostu (C) i kompostovaného biouhlu (CB). Menší diskriminace ^{13}C (méně záporné $\delta^{13}\text{C}$) poukazuje na vyšší mineralizaci organické hmoty působením bakterií, protože při tomto procesu je přednostně mineralizován lehčí izotop ^{12}C a v mikrobiálně transformované půdní organické hmotě se tak navyšuje podíl izotopu ^{13}C (Angers et al., 1995). Převaha tohoto procesu je patrná u konvenční technologie (CT) vyjma variant bez aplikace kompostu/kompostovaného biouhlu. Je tedy zřejmé, že orba v kombinaci s aplikací kompostu a kompostovaného biouhlu podporuje dekompozici organické hmoty. Naopak vyšší diskriminace ^{13}C (více záporné $\delta^{13}\text{C}$) může být indikátorem vyšší aktivity hub (jak saprotrofních tak i mykorhizních) v jejichž tělech dochází ke zvýšené diskriminaci ^{13}C zejména u lipidů (Kohl et al., 2015). Výsledky tak ukazují že kombinace adaptační technologie (AT), aplikace kompostu či kompostovaného biouhlu (C, CB) a hnojení dusíkem (N100) zvyšuje podíl hub na formování MAOC.



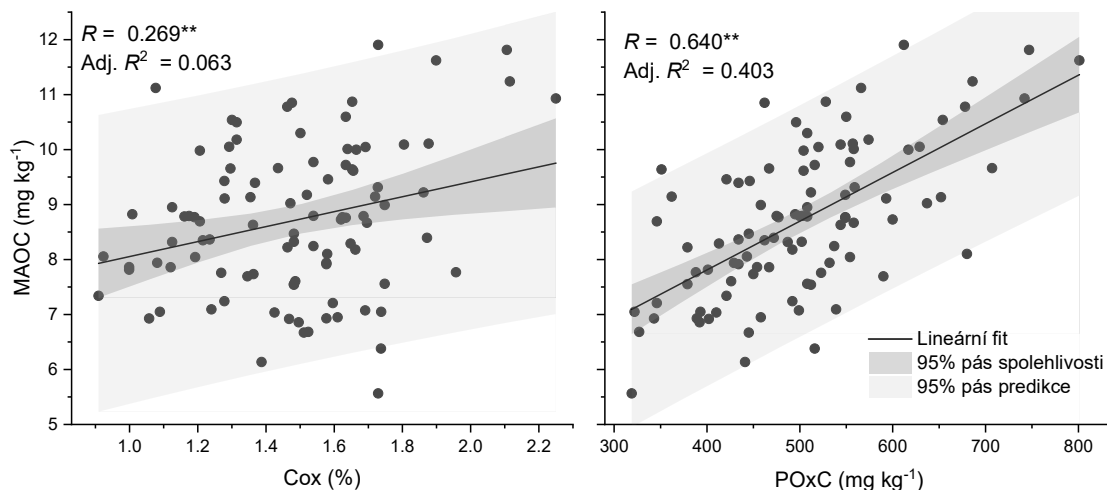
Obrázek 17 Vliv hnojení dusíkem (N0 – bez hnojení N, N100 – plná dávka N dle plodiny), aplikace kompostu/kompostovaného biouhlu (0 – bez aplikace, C – aplikace kompostu, CB – aplikace kompostovaného biouhlu) a technologie (CT – konvenční technologie založená na orbě bez pěstování mezplodin, AT – adaptační technologie založená na bezorebném setí a pěstování druhově bohatých mezplodin) na diskriminaci izotopu uhlíku ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) v MAOC. Boxy znázorňují 25-75% percentil, chybové úsečky směrodatné odchylky od průměru. Průměr je znázorněn prázdným bodem a medián čarou uvnitř boxu. Šedé body označují naměřené hodnoty za jednotlivá opakování. Písmena vyjadřují příslušnost průměrů variant k homogenním skupinám na základě následného testu třífaktorové ANOVA s využitím Fisherova LSD testu pro $p=0,05$ (rozdílná písmena indikují statisticky průkazné rozdíly mezi dvěma průměry).

Vzhledem k tomu, že frakcionace organického uhlíku dle měrné hmotnosti a velikosti na MAOC a POC je značně zdlouhavá a pracná, bylo naší snahou nalézt parametry, které by představovaly alespoň hrubé indikátory stabilní frakce MAOC v půdě. Jak již bylo uvedeno výše, je zřejmé, že parametr Cox nekoresponduje dostatečně s frakcí MAOC v půdě, což dokumentuje také slabá závislost mezi Cox a MAOC (obr. 19). Ačkoliv je tato závislost statisticky vysoce průkazná, nízká hodnota Pearsonova korelačního koeficientu ($R = 0.269$) a zejména hodnota adjustovaného R^2 , která indikuje spolehlivost predikce jen okolo 6%, prokazují že Cox není možné použít ani jako hrubý indikátor obsahu MAOC. Z řady parametrů, které byly použity pro odhad MAOC v půdě je patrné, že nejlepších hodnot spolehlivosti predikce je dosahováno pro parametr POxC (Permanganate Oxidisable Carbon) (obr. 18). Spolehlivost predikce pomocí POxC dosahuje na základě vyhodnocení adjustovaného R^2 64% (obr. 19), což je dostačující pro hrubý odhad rozdílů v obsahu MAOC. Ačkoliv nejsou k dispozici studie, které by potvrzovaly mechanistickou souvislost mezi POxC a formováním MAOC, řada studií potvrzuje že POxC je možné považovat za vhodný ukazatel zdraví půdy (Culman et al., 2012; Hurisso et al., 2016). POxC měří především fenolické a polyfenolické sloučeniny v půdě, které nejsou přímo spojeny s mikrobiálními procesy, ale vypovídají o půdních procesech zprostředkovaných rostlinami. Díky tomu je

POxC cenným nástrojem pro hodnocení zdraví půdy a potenciálu pro tvorbu MAOM, protože odráží přítomnost organické hmoty, která může přispívat k sekvestraci uhlíku v půdě (Culman et al., 2012).



Obrázek 18 Vliv hnojení dusíkem (N0 – bez hnojení N, N100 – plná dávka N dle plodiny), aplikace kompostu/kompostovaného biouhlu (0 – bez aplikace, C – aplikace kompostu, CB – aplikace kompostovaného biouhlu) a technologie (CT – konvenční technologie založená na orbě bez pěstování mezplodin, AT – adaptační technologie založená na bezorebném setí a pěstování druhově bohatých mezplodin) na hodnoty POxC. Boxy znázorňují 25-75% percentil, chybové úsečky směrodatné odchylky od průměru. Průměr je znázorněn prázdným bodem a medián čarou uvnitř boxu. Šedé body označují naměřené hodnoty za jednotlivá opakování. Písmena vyjadřují příslušnost průměrů variant k homogenním skupinám na základě následného testu třífaktorové ANOVA s využitím Fisherova LSD testu pro $p=0,05$ (rozdílná písmena indikují statisticky průkazné rozdíly mezi dvěma průměry).



Obrázek 19 Lineární závislosti pro vztah mezi obsahem Cox v půdě a MAOC (vlevo) a mezi obsahem POxC a MAOC (vpravo). Tmavě šedá plocha vyznačuje 95% pás spolehlivosti a světle šedá plocha 95% pás predikce. V grafech jsou dále uvedeny hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu R a adjustované R^2 , které vyjadřuje spolehlivost predikce MAOC. ** indikuje statisticky vysoce průkaznou závislost ($p < 0.01$).

2.8.3 Závěr

Výsledky pětiletého experimentu s technologiemi regenerativního zemědělství (AT) ukazují, že změny směřující k dlouhodobé akumulaci organického uhlíku v půdě jsou obtížně detekovatelné prostřednictvím běžně využívaného parametru Cox. Množství stabilně uloženého uhlíku je proto vhodnější vyhodnocovat jako organický uhlík poutaný na minerální částice - MAOC. Technologie regenerativního zemědělství ovšem v takto krátkodobém horizontu zvyšují MAOC statisticky průkazně pouze v kombinaci s hnojením dusíkem a aplikací kompostu nebo kompostovaného biouhlu. Na základě izotopové diskriminace $\delta^{13}\text{C}$ lze rovněž usuzovat, že na akumulaci MAOC se ve zvýšené míře podílí houby, zatímco u konvenční technologie s orbou indikuje $\delta^{13}\text{C}$ převahu bakteriální mineralizace organické hmoty. Vzhledem k náročnosti stanovení MAOC je na základě zjištěných výsledků možné považovat za vhodný indikátor jeho akumulace v půdě POxC.

3 Shrnutí dosažených výsledků a přínosy pro praxi

Předložená metodika se zaměřuje na vyhodnocení stabilních forem uhlíku v půdě pomocí frakcionace a popisuje základní rozdíly v mechanismech ukládání a době setrvání v půdě. Metodika detailně popisuje optimalizovanou metodu frakcionace organického uhlíku v půdě dle měrné hmotnosti a velikosti částic na stabilní frakci MAOC – organický uhlík poutaný na jemné minerální částice (jíl a prach/hlinité částice) a snadno odbouratelný uhlík POC - lehký částicový uhlík reprezentovaný fragmenty částečně degradovaných zbytků rostlin a půdních živočichů. V metodice jsou popsány kroky vedoucí k optimalizaci celého procesu frakcionace i možné problémy, které mohou při implementaci metody nastat.

Dále metodika zahrnuje testování metody na půdních vzorcích z víceletého experimentu, zaměřeného na zvyšování obsahu organického uhlíku v půdě a zvyšování jeho stability prostřednictvím ukládání do frakce MAOC. K navýšení obsahu frakce MAOC dochází zejména u kombinace faktorů adaptační technologie (AT – bezorebné zakládání porostů s pěstováním druhově bohatých meziplodin), hnojení dusíkem a aplikace kompostu či kompostovaného biouhlu, zatímco u jednotlivých faktorů uplatňovaných samostatně je efekt nízký. Z pohledu praxe je proto nutné podporovat zejména ucelené technologie, kde se jednotlivé prvky technologie vzájemně synergicky potencují v pozitivním efektu na ukládání uhlíku ve frakci MAOC, zatímco efekt dílčích prvků technologie je výrazně pomalejší.

Výsledky rovněž ukazují, že mezi standardním parametrem obsahu organického uhlíku v půdě – Cox a frakcí MAOC existuje pouze velmi slabá závislost, a tudíž není možné Cox považovat za indikátor stability uložení uhlíku. Naopak predikční spolehlivost MAOC se výrazně zvyšuje pro parametr POxC, který poukazuje na tzv. aktivní uhlík v půdě a úlohu rostlin v kombinaci s mikrobiálními procesy, které jsou důležité pro formování MAOC. To rovněž potvrzuje izotopová diskriminace $\delta^{13}\text{C}$ v MAOC, která indikuje, že bezorebné technologie s meziplodinami v kombinaci s aplikací kompostu, kompostovaného biouhlu a hnojení dusíkem přispívají k většímu podílu hub na ukládání uhlíku v MAOC.

4 Srovnání novosti postupů

Frakcionace půdy podle velikosti částic a hustoty je v současné době jedním z nejmodernějších přístupů k charakterizaci organické hmoty v půdě. Metody fyzikální frakcionace půdního organického uhlíku (SOC) nahrazují původní metody, které hodnotily stabilitu SOC pouze na základě jejich chemických vlastností (např. obsahu huminových kyselin a fulvokyselin). Tento původní koncept však neodrážel skutečnou podstatu stability SOC a fyzikální mechanismy její stabilizace v půdě (Lehmann and Kleber, 2015; Schmidt et al., 2011). Hlavní předností frakcionace je, že během analýzy zůstává fyzická a chemická integrita půdy do značné míry zachována. Díky tomu lze jednotlivé získané frakce interpretovat s vysokou mírou jistoty, pokud jde o jejich funkci a původ (Lavallee et al., 2020).

Při vývoji protokolu frakcionace byly postupy optimalizovány tak že byly záměrně vynechány postupy, které nebyly nezbytné pro kvalitu nebo interpretovatelnost jednotlivých frakcí. Například byl vyloučen krok sonikace (ultrazvukové desintegrace), který se často používá k rozrušení agregátů, ale může způsobit artefakty a zbytečnou variabilitu výsledků (Kaiser and Asefaw Berhe, 2014). Byl vyloučen také chemický krok disperze půdy roztokem hexametafosfátu sodného (Na-HMP), protože zvyšuje pracovní zátěž a vede k další ztrátě SOC (Just et al., 2021). Kromě toho bylo zefektivněno několik provozních kroků, včetně filtrace půdních suspenzí a recyklace polywolframanu sodného (SPT), čímž se výrazně snížila finanční a časová náročnost postupu.

Dalším přínosem této metodiky je zahrnutí podrobného návodu pro sestavení filtračního a vakuového odsávacího systému. Takové zařízení lze snadno sestavit z běžně dostupných komponentů, ale na českém trhu není komerčně dostupné. Díky přesným montážním pokynům umožňuje tato metoda laboratořím s omezeným vybavením a rozpočtem provádět přesné vícestupňové frakcionování podle velikosti a hustoty spolehlivě a reprodukovatelně.

Metodika rovněž na konkrétním experimentu prokazuje jednak praktický význam frakcionace při posouzení různých metod hospodaření z pohledu stability uložení organického uhlíku v půdě, a potvrzuje rovněž některé předpoklady, které dosud nebyly jednoznačně prokázány, tedy především, že kombinace opatření, jako je bezorebné zakládání porostů hlavní plodiny i meziplodin, pěstování druhově bohatých meziplodin, aplikace kompostu nebo kompostovaného biouhlu, a dostatečná nabídka dusíku vykazují synergický účinek na formování stabilního zásobníku MAOC, zatímco jejich individuální použití má obecně nízký a často neprůkazný efekt na množství MAOC v půdě.

5 Popis uplatnění metodiky

Frakcionace půdního organického uhlíku na MAOC (mineral-associated organic carbon) a POC (particulate organic carbon) je klíčová pro důvěryhodné certifikační schéma plateb za uložený uhlík v tzv. uhlíkovém zemědělství (carbon farming), protože obě frakce se liší perzistencí, nasyceností a rizikem ztráty. Významnou skupinu uživatelů této metodiky proto tvoří tvůrci politik zabývající se monitorováním a zvyšováním zásob uhlíku v půdě. MAOC představuje obecně stabilnější a modelovatelnou zásobu vázanou na minerální povrchy, zatímco POC je citlivější na disturbance (spojenou zejména se zpracováním půdy), a proto také rychleji reaguje na změny hospodaření. Proto samotné sumární množství celkového organického uhlíku v půdě (SOC, Cox) nedokáže spolehlivě odlišit krátkodobé změny (toky) od dlouhodobého uložení uhlíku, což je zásadní pro vyhodnocení skutečného nárůstu a setrvalosti v certifikaci ukládání uhlíku v půdě. Frakcionace organického uhlíku v půdě naopak umožňuje v MRV (Monitoring, Reporting and Verification) systémech parametrizovat a validovat procesní modely na frakčně měřitelných veličinách (POC/MAOC), místo neurčitých zásobníků (SOC, Cox), čímž se snižuje nejistota predikcí a zvyšuje auditovatelnost výsledků pro výplaty uhlíkových kreditů.

Pro dálkový průzkum a nepřímé analytické metody, které jsou rovněž hojně využívány v certifikačních systémech, je znalost podílu MAOC vůči POC důležitá proto, že satelitní odhady SOC trpí (vedle odhadu nepřesné veličiny z pohledu dlouhodobého uložení uhlíku) také heterogenní metodikou, vlivem povrchové vlhkosti, vegetačního krytu a absencí standardních protokolů. Frakční informace pak slouží jako „ground truth“ pro škálování a cross-kalibrace s přístupy dálkového průzkumu, procesového modelování a strojového učení.

Z pohledu evropského rámce CRCF (Carbon Removal and Carbon Farming Certification Framework — nařízení EU č. 2024/3012, které vytváří první dobrovolný, jednotný rámec certifikace ukládání uhlíku půdě, lesích i produktech a navazujících MRV iniciativ (FAO GSOC, JRC/ISRIC) dává frakcionace praktický nástroj pro definici kvality a permanence ukládání (např. oddělené reportování POC a MAOC, jejich nejistot a rizik rychlého odbourávání uloženého uhlíku), a tím i pro výkonově založené platby a nezávislou verifikaci.

Další klíčovou skupinu uživatelů tvoří zemědělci. Frakcionace poskytuje informativnější ukazatel stavu uhlíku v půdě než samotný celkový obsah uhlíku (Just et al., 2021). Na základě posouzení relativního poměru POC a MAOC mohou zemědělci a agronomové přesněji vyhodnotit účinnost technologií a opatření z pohledu efektu na dlouhodobé ukládání uhlíku v půdě (Chen et al., 2019; Georgiou et al., 2022). Tyto informace mohou sloužit jako vodítko pro praktická rozhodnutí vedoucí ke zlepšení fyzikálních a chemických vlastností půdy, její úrodnosti a dlouhodobé odolnosti vůči erozi a

klimatickým extrémům (Paustian et al., 2016). Mimo to, tato metodika částečně ukazuje, jaké praktické postupy a zejména jaké kombinace postupů mají perspektivu z pohledu ukládání uhlíku do stabilního zásobníku MAOC. Jedná se zejména o kombinace bezorebných technologií, pěstování druhově bohatých meziplodin, dostatečného zásobení dusíkem a aplikace kompostu.

Lze očekávat také významné rozšíření metodiky v dalším výzkumu, který je zaměřený na dynamiku půdního SOC a procesy vedoucí ke jeho stabilizaci či naopak destabilizaci. Získaná data mohou napomáhat lepšímu porozumění procesu stabilizace uhlíku v půdě, včetně lepšího pochopení mechanismů setrvávání a přeměn půdního uhlíku a dalších biogenních prvků za různých environmentálních podmínek a antropogenních zásahů (Lavalley et al., 2020; Zhou et al., 2024). Dalším odvětvím výzkumu, kde najde metodika uplatnění, je půdní ekologie. Frakce POM obsahuje biologicky relevantní materiál, například spory arbuskulárně mykorrhizních hub – významnou, avšak historicky přehlíženou skupinu symbiotických půdních mikroorganismů. Frakce MAOM je tvořena organickými látkami pevně asociovanými s minerálními povrchy a zahrnuje typické produkty mikrobiální aktivity či rozkladu, jako jsou aminocukry nebo nízkomolekulární organické kyseliny (Liang and Zhu, 2021; Tao et al., 2023). Analýza těchto markerů v této frakci může poskytnout důležité informace o půdních procesech, koloběhu živin a stabilitě agroekosystémů (Kästner et al., 2021; Li et al., 2021).

6 Ekonomické aspekty uplatnění metodiky

Klíčovým dlouhodobým přínosem této metodiky je její potenciál ke zlepšení účinnosti programů zprostředkujících platby (kredity) za dlouhodobé uložení uhlíku v půdě a později i předpokládané platby za emisní povolenky z plánovaného systému obchodování s emisemi ze zemědělství (AgETS), nebo evropských či národních dotací na sekvestraci uhlíku v půdě a na zlepšování půdní úrodnosti. Sekvestrace uhlíku v půdě má totiž vedle přínosů pro mitigaci klimatické změny také řadu dalších benefitů, které spočívají ve vyšší schopnosti půdy zadržet vodu v půdě, schopnosti filtrovat vodu, snižovat erozní ohrožení půd, zvyšovat diverzitu půdních organismů a také poskytovat stabilnější a z dlouhodobého hlediska i vyšší výnosy v podmínkách zvyšující se klimatické variability a extremity. Mnoho běžně používaných analytických přístupů má tendenci nadhodnocovat množství uhlíku uloženého v půdě, především proto, že nerozlišují mezi nedávno přidanými organickými vstupy a uhlíkem, který je stabilizován v na povrchích půdních částic (Saifuddin et al., 2024). Pomocí této metodiky lze tento stabilněji uložený organický uhlík v půdě – MAOC kvantifikovat. Vzhledem k tomu, že MAOC je frakce, která nejvíce přispívá k dlouhodobé perzistenci uhlíku v orné půdě, existuje silný ekonomický důvod pro to, aby se motivační mechanismy zakládaly na množství uhlíku uloženého ve frakci MAOC, a nikoli pouze na měření celkového obsahu uhlíku v půdě (Paul et al., 2023).

Takový přístup by výrazně omezil možnosti manipulace v rámci různých certifikačních systémů a dotací. Například přidání hnoje nebo rostlinné biomasy do půdy krátce před odběrem vzorků může uměle zvýšit celkové hodnoty uhlíku v půdě, avšak tento přidaný materiál by byl detekován téměř výlučně ve frakci POM, nikoli ve frakci MAOM (Qi et al., 2023). Rozlišením mezi těmito dvěma zásobníky pomocí frakcionace umožňuje transparentnější, spravedlivější a ekologicky smysluplnější hodnocení výsledků sekvestrace uhlíku (Cotrufo et al., 2019).

Druhý ekonomicky relevantní aspekt se týká hodnocení složení mikrobiální komunity a jejich podílu na tvorbě zásobníků POM a MAOM. Tyto komunity podporují vedle stabilizace uhlíku v půdě další klíčové ekosystémové funkce, včetně koloběhu živin a získávání živin rostlinami. Například dlouhodobé používání hnojiv s vysokým obsahem fosforu, intenzivní obdělávání půdy a absence meziplodin mohou snížit početnost klíčových taxonů arbuskulárně mykorrhizních hub, které usnadňují příjem fosforu a dusíku rostlinami (George and Ray, 2023). V takových případech ztráta této funkční symbiózy a biodiverzity zvyšuje požadavky na hnojiva, což představuje kvantifikovatelné ekologické a ekonomické náklady (Fan et al., 2023; Liu et al., 2023). Vzhledem k tomu že formování zásobníku MAOC je úzce spojeno s přítomností a aktivitou mykorrhizních hub tak lze očekávat společně se sekvestrací uhlíku také posilování schopnosti rostlin si prostřednictvím mykorrhizních hub osvojovat živiny, které jsou v půdě

přístupné jen v omezené míře. Frakcionace tak poskytuje rámec pro identifikaci vzniku takových funkčních ztrát, než se projeví poklesem produktivity nebo zvýšením vstupních nákladů.

Rozšíření metodiky frakcionace půdního organického uhlíku do akreditovaných laboratoří, provádějících půdní analýzy přispěje do značné míry ke zvýšení efektivity hospodaření na zemědělské půdě, protože zemědělci budou mít robustní zpětnou vazbu o tom, která opatření fungují a dochází k navýšování stabilních forem uhlíku v půdě, a naopak při jakém způsobu hospodaření dochází k pokračujícímu poklesu obsahu organického uhlíku v půdě. To jim umožní dlouhodobě zlepšovat půdní úrodnost, a především pak budovat výnosovou stabilitu pro budoucí nepříznivé podmínky spojené s klimatickými extrémami, zejména pak s epizodami sucha a vysokých teplot.

7 Seznam použité související literatury

- Adhikari, S., Moon, E., Paz-Ferreiro, J., Timms, W., 2024. Comparative analysis of biochar carbon stability methods and implications for carbon credits. *Sci. Total Environ.* 914, 169607. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169607>
- Adil, M., Yao, Z., Zhang, C., Lu, S., Fu, S., Mosa, W.F.A., Hasan, M.E., Lu, H., 2022. Climate change stress alleviation through nature based solutions: A global perspective. *Front. Plant Sci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1007222>
- Ameloot, N., Graber, E.R., Verheijen, F.G.A., De Neve, S., 2013. Interactions between biochar stability and soil organisms: review and research needs. *Eur. J. Soil Sci.* 64, 379–390. <https://doi.org/10.1111/ejss.12064>
- Amelung, W., Zech, W., 1999. Minimisation of organic matter disruption during particle-size fractionation of grassland epipedons. *Geoderma* 92, 73–85. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(99\)00023-3](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(99)00023-3)
- Angers, D.A., Voroney, R.P., Côté, D., 1995. Dynamics of Soil Organic Matter and Corn Residues Affected by Tillage Practices. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59, 1311–1315. <https://doi.org/10.2136/sssaj1995.03615995005900050016x>
- Angst, G., Angst, Š., Frouz, J., Jabinski, S., Jílková, V., Kukla, J., Li, M., Meador, T.B., Angel, R., 2024. Stabilized microbial necromass in soil is more strongly coupled with microbial diversity than the bioavailability of plant inputs. *Soil Biol. Biochem.* 190, 109323. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2024.109323>
- Angst, G., Mueller, K.E., Kögel-Knabner, I., Freeman, K.H., Mueller, C.W., 2017. Aggregation controls the stability of lignin and lipids in clay-sized particulate and mineral associated organic matter. *Biogeochemistry* 132, 307–324. <https://doi.org/10.1007/s10533-017-0304-2>
- Aufdenkampe, A.K., Hedges, J.I., Richey, J.E., Krusche, A.V., Llerena, C.A., 2001. Sorptive fractionation of dissolved organic nitrogen and amino acids onto fine sediments within the Amazon Basin. *Limnol. Oceanogr.* 46, 1921–1935. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.8.1921>
- Basile-Doelsch, I., Balesdent, J., Pellerin, S., 2020. Reviews and syntheses: The mechanisms underlying carbon storage in soil. *Biogeosciences* 17, 5223–5242. <https://doi.org/10.5194/bg-17-5223-2020>
- Bei, S., Li, X., Kuyper, T.W., Chadwick, D.R., Zhang, J., 2022. Nitrogen availability mediates the priming effect of soil organic matter by preferentially altering the straw carbon-assimilating microbial community. *Sci. Total Environ.* 815, 152882. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152882>
- Bramble, D.S.E., Ulrich, S., Schöning, I., Mikutta, R., Brandt, L., Poll, C., Kandeler, E., Mikutta, C., Konrad, A., Siemens, J., Yang, Y., Polle, A., Schall, P., Ammer, C., Kaiser, K., Schrumpf, M., 2024. Formation of mineral-associated organic matter in temperate soils is primarily controlled by mineral type and modified by land use and management intensity. *Glob. Change Biol.* 30, e17024. <https://doi.org/10.1111/gcb.17024>
- Chen, S., Arrouays, D., Angers, D.A., Martin, M.P., Walter, C., 2019. Soil carbon stocks under different land uses and the applicability of the soil carbon saturation concept. *Soil Tillage Res., Soil Carbon and Climate Change: the 4 per Mille Initiative* 188, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.11.001>
- Connin, S.L., Feng, X., Virginia, R.A., 2001. Isotopic discrimination during long-term decomposition in an arid land ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 33, 41–51. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00113-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00113-9)
- Cotrufo, M.F., Ranalli, M.G., Haddix, M.L., Six, J., Lugato, E., 2019. Soil carbon storage informed by particulate and mineral-associated organic matter. *Nat. Geosci.* 12, 989–994. <https://doi.org/10.1038/s41561-019-0484-6>
- Cotrufo, M.F., Wallenstein, M.D., Boot, C.M., Denef, K., Paul, E., 2013. The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter

- stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Glob. Change Biol.* 19, 988–995. <https://doi.org/10.1111/gcb.12113>
- Culman, S.W., Snapp, S.S., Freeman, M.A., Schipanski, M.E., Beniston, J., Lal, R., Drinkwater, L.E., Franzluebbers, A.J., Glover, J.D., Grandy, A.S., Lee, J., Six, J., Maul, J.E., Mirsky, S.B., Spargo, J.T., Wander, M.M., 2012a. Permanganate Oxidizable Carbon Reflects a Processed Soil Fraction that is Sensitive to Management. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 76, 494–504. <https://doi.org/10.2136/sssaj2011.0286>
- Culman, S.W., Snapp, S.S., Freeman, M.A., Schipanski, M.E., Beniston, J., Lal, R., Drinkwater, L.E., Franzluebbers, A.J., Glover, J.D., Grandy, A.S., Lee, J., Six, J., Maul, J.E., Mirsky, S.B., Spargo, J.T., Wander, M.M., 2012b. Permanganate Oxidizable Carbon Reflects a Processed Soil Fraction that is Sensitive to Management. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 76, 494–504. <https://doi.org/10.2136/sssaj2011.0286>
- David Wayne, White, J., 2019. Thermal Analysis and Loss-On-Ignition Techniques, in: *The Plutonium Handbook*, Volume 6. American Nuclear Society, pp. 3167–3200.
- Fan, K., Chu, H., Eldridge, D.J., Gaitan, J.J., Liu, Y.-R., Sokoya, B., Wang, J.-T., Hu, H.-W., He, J.-Z., Sun, W., Cui, H., Alfaro, F.D., Abades, S., Bastida, F., Díaz-López, M., Bamigboye, A.R., Berdugo, M., Blanco-Pastor, J.L., Grebenc, T., Duran, J., Illán, J.G., Makhalyane, T.P., Mukherjee, A., Nahberger, T.U., Peñaloza-Bojacá, G.F., Plaza, C., Verma, J.P., Rey, A., Rodríguez, A., Siebe, C., Teixido, A.L., Trivedi, P., Wang, L., Wang, J., Yang, T., Zhou, X.-Q., Zhou, X., Zaady, E., Tedersoo, L., Delgado-Baquerizo, M., 2023. Soil biodiversity supports the delivery of multiple ecosystem functions in urban greenspaces. *Nat. Ecol. Evol.* 7, 113–126. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01935-4>
- Fang, Y., Singh, B., Singh, B.P., Krull, E., 2014. Biochar carbon stability in four contrasting soils. *Eur. J. Soil Sci.* 65, 60–71. <https://doi.org/10.1111/ejss.12094>
- Farina, R., Piccini, C., Di Bene, C., Fornasier, F., Francaviglia, R., Pennelli, B., Vanino, S., Russo, M., Cerasuolo, M., Troccoli, A., 2024. No tillage and leguminous cover crop improve soil quality in a typical rainfed Mediterranean system. *Can. J. Soil Sci.* 104, 257–272. <https://doi.org/10.1139/cjss-2023-0106>
- Fulton-Smith, S., Cotrufo, M.F., 2019. Pathways of soil organic matter formation from above and belowground inputs in a Sorghum bicolor bioenergy crop. *GCB Bioenergy* 11, 971–987. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12598>
- Gao, J., Jansen, B., Cerli, C., Helmus, R., Mikutta, R., Dultz, S., Guggenberger, G., Vogel, C., Kalbitz, K., 2018. Organic matter coatings of soil minerals affect adsorptive interactions with phenolic and amino acids. *Eur. J. Soil Sci.* 69, 613–624. <https://doi.org/10.1111/ejss.12562>
- George, N.P., Ray, J.G., 2023. The inevitability of arbuscular mycorrhiza for sustainability in organic agriculture—A critical review. *Front. Sustain. Food Syst.* 7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1124688>
- Georgiou, K., Jackson, R.B., Vinduškova, O., Abramoff, R.Z., Ahlström, A., Feng, W., Harden, J.W., Pellegrini, A.F.A., Polley, H.W., Soong, J.L., Riley, W.J., Torn, M.S., 2022a. Global stocks and capacity of mineral-associated soil organic carbon. *Nat. Commun.* 13, 3797. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31540-9>
- Georgiou, K., Jackson, R.B., Vinduškova, O., Abramoff, R.Z., Ahlström, A., Feng, W., Harden, J.W., Pellegrini, A.F.A., Polley, H.W., Soong, J.L., Riley, W.J., Torn, M.S., 2022b. Global stocks and capacity of mineral-associated soil organic carbon. *Nat. Commun.* 13, 3797. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31540-9>
- Howell, A., Helmkamp, S., Belmont, E., 2022. Stable polycyclic aromatic carbon (SPAC) formation in wildfire chars and engineered biochars. *Sci. Total Environ.* 849, 157610. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157610>
- Hurisso, T.T., Culman, S.W., Horwath, W.R., Wade, J., Cass, D., Beniston, J.W., Bowles, T.M., Grandy, A.S., Franzluebbers, A.J., Schipanski, M.E., Lucas, S.T., Ugarte, C.M., 2016. Comparison of Permanganate-Oxidizable Carbon and Mineralizable Carbon for Assessment of Organic Matter

- Stabilization and Mineralization. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 80, 1352–1364. <https://doi.org/10.2136/sssaj2016.04.0106>
- Jia, J., Zhai, G., Jia, Y., Feng, X., 2025. Fast Decomposition of Nitrogen-Rich Mineral-Associated Organic Matter in Soils. *Glob. Change Biol.* 31, e70448. <https://doi.org/10.1111/gcb.70448>
- Jilling, A., Keiluweit, M., Contosta, A.R., Frey, S., Schimel, J., Schneck, J., Smith, R.G., Tiemann, L., Grandy, A.S., 2018. Minerals in the rhizosphere: overlooked mediators of soil nitrogen availability to plants and microbes. *Biogeochemistry* 139, 103–122. <https://doi.org/10.1007/s10533-018-0459-5>
- Just, C., Poeplau, C., Don, A., van Wesemael, B., Kögel-Knabner, I., Wiesmeier, M., 2021. A Simple Approach to Isolate Slow and Fast Cycling Organic Carbon Fractions in Central European Soils—Importance of Dispersion Method. *Front. Soil Sci.* 1. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2021.692583>
- Kaiser, M., Asefaw Berhe, A., 2014. How does sonication affect the mineral and organic constituents of soil aggregates?—A review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 177, 479–495. <https://doi.org/10.1002/jpln.201300339>
- Kästner, M., Miltner, A., Thiele-Bruhn, S., Liang, C., 2021. Microbial Necromass in Soils—Linking Microbes to Soil Processes and Carbon Turnover. *Front. Environ. Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.756378>
- Kleber, M., Eusterhues, K., Keiluweit, M., Mikutta, C., Mikutta, R., Nico, P.S., 2015. Chapter One - Mineral–Organic Associations: Formation, Properties, and Relevance in Soil Environments, in: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 1–140. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.10.005>
- Klink, S., Keller, A.B., Wild, A.J., Baumert, V.L., Gube, M., Lehndorff, E., Meyer, N., Mueller, C.W., Phillips, R.P., Pausch, J., 2022. Stable isotopes reveal that fungal residues contribute more to mineral-associated organic matter pools than plant residues. *Soil Biol. Biochem.* 168, 108634. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108634>
- Kohl, L., Laganière, J., Edwards, K.A., Billings, S.A., Morrill, P.L., Van Biesen, G., Ziegler, S.E., 2015. Distinct fungal and bacterial $\delta^{13}\text{C}$ signatures as potential drivers of increasing $\delta^{13}\text{C}$ of soil organic matter with depth. *Biogeochemistry* 124, 13–26. <https://doi.org/10.1007/s10533-015-0107-2>
- Kramer, M.G., Sollins, P., Sletten, R.S., Swart, P.K., 2003. N Isotope Fractionation and Measures of Organic Matter Alteration During Decomposition. *Ecology* 84, 2021–2025. <https://doi.org/10.1890/02-3097>
- Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1363–1371. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.003>
- Lavallee, J.M., Soong, J.L., Cotrufo, M.F., 2020. Conceptualizing soil organic matter into particulate and mineral-associated forms to address global change in the 21st century. *Glob. Change Biol.* 26, 261–273. <https://doi.org/10.1111/gcb.14859>
- Lehmann, J., Kleber, M., 2015. The contentious nature of soil organic matter. *Nature* 528, 60–68. <https://doi.org/10.1038/nature16069>
- Leuthold, S., Lavallee, J.M., Haddix, M.L., Cotrufo, M.F., 2024. Contrasting properties of soil organic matter fractions isolated by different physical separation methodologies. *Geoderma* 445, 116870. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2024.116870>
- Li, H., Bölscher, T., Winnick, M., Tfaily, M.M., Cardon, Z.G., Keiluweit, M., 2021. Simple Plant and Microbial Exudates Destabilize Mineral-Associated Organic Matter via Multiple Pathways. *Environ. Sci. Technol.* 55, 3389–3398. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04592>
- Liang, C., Zhu, X., 2021. The soil Microbial Carbon Pump as a new concept for terrestrial carbon sequestration. *Sci. China Earth Sci.* 64, 545–558. <https://doi.org/10.1007/s11430-020-9705-9>
- Liu, S., Plaza, C., Ochoa-Hueso, R., Trivedi, C., Wang, J., Trivedi, P., Zhou, G., Piñeiro, J., Martins, C.S.C., Singh, B.K., Delgado-Baquerizo, M., 2023. Litter and soil biodiversity jointly drive ecosystem functions. *Glob. Change Biol.* 29, 6276–6285. <https://doi.org/10.1111/gcb.16913>

- Luo, Z., Viscarra Rossel, R.A., Shi, Z., 2020. Distinct controls over the temporal dynamics of soil carbon fractions after land use change. *Glob. Change Biol.* 26, 4614–4625. <https://doi.org/10.1111/gcb.15157>
- Lutfalla, S., Abiven, S., Barré, P., Wiedemeier, D.B., Christensen, B.T., Houot, S., Kätterer, T., Macdonald, A.J., van Oort, F., Chenu, C., 2017. Pyrogenic Carbon Lacks Long-Term Persistence in Temperate Arable Soils. *Front. Earth Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/feart.2017.00096>
- Meyer, N., Kaldun, J., Rodionov, A., Amelung, W., Lehdorff, E., 2024. Turnover of soil microaggregate-protected carbon and the challenge of microscale analyses. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 187, 143–152. <https://doi.org/10.1002/jpln.202300154>
- Murage, E.W., Voroney, P.R., Kay, B.D., Deen, B., Beyaert, R.P., 2007. Dynamics and Turnover of Soil Organic Matter as Affected by Tillage. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71, 1363–1370. <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0196>
- Pallasser, R., Minasny, B., McBratney, A.B., 2013. Soil carbon determination by thermogravimetrics. *PeerJ* 1, e6. <https://doi.org/10.7717/peerj.6>
- Paul, C., Bartkowski, B., Dönmez, C., Don, A., Mayer, S., Steffens, M., Weigl, S., Wiesmeier, M., Wolf, A., Helming, K., 2023. Carbon farming: Are soil carbon certificates a suitable tool for climate change mitigation? *J. Environ. Manage.* 330, 117142. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.117142>
- Paustian, K., Lehmann, J., Ogle, S., Reay, D., Robertson, G.P., Smith, P., 2016. Climate-smart soils. *Nature* 532, 49–57. <https://doi.org/10.1038/nature17174>
- Poeplau, C., Andersen, M.S., Vos, C., 2025. How biased is size fractionation derived mineral-associated organic carbon? *Geoderma* 463, 117584. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2025.117584>
- Poeplau, C., Don, A., Six, J., Kaiser, M., Benbi, D., Chenu, C., Cotrufo, M.F., Derrien, D., Gioacchini, P., Grand, S., Gregorich, E., Griepentrog, M., Gunina, A., Haddix, M., Kuzyakov, Y., Kühnel, A., Macdonald, L.M., Soong, J., Trigalet, S., Vermeire, M.-L., Rovira, P., van Wesemael, B., Wiesmeier, M., Yeasmin, S., Yevdokimov, I., Nieder, R., 2018. Isolating organic carbon fractions with varying turnover rates in temperate agricultural soils – A comprehensive method comparison. *Soil Biol. Biochem.* 125, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.06.025>
- Prairie, A.M., King, A.E., Cotrufo, M.F., 2023. Restoring particulate and mineral-associated organic carbon through regenerative agriculture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 120, e2217481120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2217481120>
- Qafoku, O., Andersen, A., Zhao, Q., Mergelsberg, S.T., Kew, W.R., Eder, E.K., Resch, C.T., Graham, E.B., Qafoku, N.P., 2024. Synergetic Effects of Soil Organic Matter Components During Interactions with Minerals. *Environ. Sci. Technol.* 58, 23018–23030. <https://doi.org/10.1021/acs.est.4c07380>
- Qi, P., Chen, J., Wang, X., Zhang, R., Cai, L., Jiao, Y., Li, Z., Han, G., 2023. Changes in soil particulate and mineral-associated organic carbon concentrations under nitrogen addition in China—a meta-analysis. *Plant Soil* 489, 439–452. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06030-6>
- Ren, Z., Han, X., Han, Z., Tian, W., Li, J., Lv, J., Shen, Y., Xie, Y., Ma, G., Li, G., Zhao, Y., Wang, C., 2024. Long-Term Minimum Tillage and Straw Retention Promote Macroaggregate Formation, Carbon and Nitrogen Sequestration under Wheat-Maize Rotation in Northern China. *Agriculture* 14, 1659. <https://doi.org/10.3390/agriculture14091659>
- Saifuddin, M., Abramoff, R.Z., Foster, E.J., McClelland, S.C., 2024. Soil carbon offset markets are not a just climate solution. *Front. Ecol. Environ.* 22, e2781. <https://doi.org/10.1002/fee.2781>
- Schmidt, H.-P., Kammann, C., Hagemann, N., Leifeld, J., Bucheli, T.D., Sánchez Monedero, M.A., Cayuela, M.L., 2021. Biochar in agriculture – A systematic review of 26 global meta-analyses. *GCB Bioenergy* 13, 1708–1730. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12889>
- Schmidt, M.W.I., Torn, M.S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I.A., Kleber, M., Kögel-Knabner, I., Lehmann, J., Manning, D.A.C., Nannipieri, P., Rasse, D.P., Weiner, S., Trumbore, S.E., 2011. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 478, 49–56. <https://doi.org/10.1038/nature10386>

- See, C.R., Keller, A.B., Hobbie, S.E., Kennedy, P.G., Weber, P.K., Pett-Ridge, J., 2022. Hyphae move matter and microbes to mineral microsites: Integrating the hyphosphere into conceptual models of soil organic matter stabilization. *Glob. Change Biol.* 28, 2527–2540. <https://doi.org/10.1111/gcb.16073>
- Singh, B.P., Cowie, A., 2010. The mean turnover time of biochar in soil varies depending on biomass source and pyrolysis temperature.
- Singh, B.P., Cowie, A.L., Smernik, R.J., 2012. Biochar Carbon Stability in a Clayey Soil As a Function of Feedstock and Pyrolysis Temperature. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11770–11778. <https://doi.org/10.1021/es302545b>
- Singh, B.P., Fang, Y., Boersma, M., Collins, D., Zwieten, L.V., Macdonald, L.M., 2015. In Situ Persistence and Migration of Biochar Carbon and Its Impact on Native Carbon Emission in Contrasting Soils under Managed Temperate Pastures. *PLOS ONE* 10, e0141560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141560>
- Six, J., Schultz, P.A., Jastrow, J.D., Merckx, R., 1999. Recycling of sodium polytungstate used in soil organic matter studies. *Soil Biol. Biochem.* 31, 1193–1196. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00023-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00023-1)
- Sokol, N.W., Sanderman, J., Bradford, M.A., 2019. Pathways of mineral-associated soil organic matter formation: Integrating the role of plant carbon source, chemistry, and point of entry. *Glob. Change Biol.* 25, 12–24. <https://doi.org/10.1111/gcb.14482>
- Souza, I.F., Archanjo, B.S., Hurtarte, L.C.C., Oliveros, M.E., Gouvea, C.P., Lidizio, L.R., Achete, C.A., Schaefer, C.E.R., Silva, I.R., 2017. Al-/Fe-(hydr)oxides–organic carbon associations in Oxisols — From ecosystems to submicron scales. *CATENA* 154, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.02.017>
- Stewart, C.E., Paustian, K., Conant, R.T., Plante, A.F., Six, J., 2007. Soil carbon saturation: concept, evidence and evaluation. *Biogeochemistry* 86, 19–31. <https://doi.org/10.1007/s10533-007-9140-0>
- Stoner, S., Trumbore, S.E., González-Pérez, J.A., Schrumpf, M., Sierra, C.A., Hoyt, A.M., Chadwick, O., Doetterl, S., 2023. Relating mineral–organic matter stabilization mechanisms to carbon quality and age distributions using ramped thermal analysis. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* 381, 20230139. <https://doi.org/10.1098/rsta.2023.0139>
- Tang, N., Siebers, N., Leinweber, P., Eckhardt, K.-U., Dultz, S., Nischwitz, V., Klumpp, E., 2022. Implications of Free and Occluded Fine Colloids for Organic Matter Preservation in Arable Soils. *Environ. Sci. Technol.* 56, 14133–14145. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c01973>
- Tao, F., Huang, Y., Hungate, B.A., Manzoni, S., Frey, S.D., Schmidt, M.W.I., Reichstein, M., Carvalhais, N., Ciais, P., Jiang, L., Lehmann, J., Wang, Y.-P., Houlton, B.Z., Ahrens, B., Mishra, U., Hugelius, G., Hocking, T.D., Lu, X., Shi, Z., Viatkin, K., Vargas, R., Yigini, Y., Omuto, C., Malik, A.A., Peralta, G., Cuevas-Corona, R., Di Paolo, L.E., Luotto, I., Liao, C., Liang, Y.-S., Saynes, V.S., Huang, X., Luo, Y., 2023. Microbial carbon use efficiency promotes global soil carbon storage. *Nature* 618, 981–985. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06042-3>
- Veenstra, J.J., Horwath, W.R., Mitchell, J.P., 2007. Tillage and Cover Cropping Effects on Aggregate-Protected Carbon in Cotton and Tomato. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71, 362–371. <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0229>
- Verheijen, F.G.A., Graber, E.R., Ameloot, N., Bastos, A.C., Sohi, S., Knicker, H., 2014. Biochars in soils: New insights and emerging research needs. <https://doi.org/10.1111/ejss.12127>
- Villarino, S.H., Pinto, P., Jackson, R.B., Piñeiro, G., 2021. Plant rhizodeposition: A key factor for soil organic matter formation in stable fractions. *Sci. Adv.* 7, eabd3176. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd3176>
- von Lützow, M., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Flessa, H., Guggenberger, G., Matzner, E., Marschner, B., 2007. SOM fractionation methods: Relevance to functional pools and to stabilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2183–2207. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.03.007>

- Vorrath, M.-E., Amann, T., Meyer zu Drewer, J., Hagemann, N., Aldrich, C., Börker, J., Seedtke, M., Becker, J.N., Hagens, M., Eschenbach, A., Hartmann, J., 2025. Pyrogenic carbon and carbonating minerals for carbon capture and storage (PyMiCCS) part II: organic and inorganic carbon dioxide removal in an Oxisol. *Front. Clim.* 7. <https://doi.org/10.3389/fclim.2025.1592454>
- Wang, H., Nan, Q., Waqas, M., Wu, W., 2022. Stability of biochar in mineral soils: Assessment methods, influencing factors and potential problems. *Sci. Total Environ.* 806, 150789. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150789>
- Wang, J., Xiong, Z., Kuzyakov, Y., 2016. Biochar stability in soil: meta-analysis of decomposition and priming effects. *GCB Bioenergy* 8, 512–523. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12266>
- Whalen, E.D., Grandy, A.S., Sokol, N.W., Keiluweit, M., Ernakovich, J., Smith, R.G., Frey, S.D., 2022. Clarifying the evidence for microbial- and plant-derived soil organic matter, and the path toward a more quantitative understanding. *Glob. Change Biol.* 28, 7167–7185. <https://doi.org/10.1111/gcb.16413>
- Witzgall, K., Vidal, A., Schubert, D.I., Höschen, C., Schweizer, S.A., Buegger, F., Pouteau, V., Chenu, C., Mueller, C.W., 2021. Particulate organic matter as a functional soil component for persistent soil organic carbon. *Nat. Commun.* 12, 4115. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24192-8>
- World Reference Base for Soil Resources. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps, 2024. . LCC MAKs Press. <https://doi.org/10.29003/m4174.978-5-317-07235-3>
- Xiao, J., He, X., Hao, J., Zhou, Y., Zheng, L., Ran, W., Shen, Q., Yu, G., 2016. New strategies for submicron characterization the carbon binding of reactive minerals in long-term contrasting fertilized soils: implications for soil carbon storage. *Biogeosciences* 13, 3607–3618. <https://doi.org/10.5194/bg-13-3607-2016>
- Zhang, Y., Lavalley, J.M., Robertson, A.D., Even, R., Ogle, S.M., Paustian, K., Cotrufo, M.F., 2021. Simulating measurable ecosystem carbon and nitrogen dynamics with the mechanistically defined MEMS 2.0 model. *Biogeosciences* 18, 3147–3171. <https://doi.org/10.5194/bg-18-3147-2021>
- Zhou, Z., Ren, C., Wang, C., Delgado-Baquerizo, M., Luo, Y., Luo, Z., Du, Z., Zhu, B., Yang, Y., Jiao, S., Zhao, F., Cai, A., Yang, G., Wei, G., 2024. Global turnover of soil mineral-associated and particulate organic carbon. *Nat. Commun.* 15, 5329. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49743-7>

8 Seznam publikací které předcházely metodice

- Holub, P., Klem, K., Tůma, I., Vavříková, J., Surá, K., Veselá, B., Urban, O., Záhora, J., 2020. Application of organic carbon affects mineral nitrogen uptake by winter wheat and leaching in subsoil: Proximal sensing as a tool for agronomic practice. *Science of The Total Environment* 717, 137058. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137058>
- Darenova, E., Holub, P., Bednařík, A., Klem, K., 2023. Responses of soil CO₂ efflux and microbial activity to water deficit under conventional and adaptation technology. *Soil and Tillage Research* 234, 105856. <https://doi.org/10.1016/j.still.2023.105856>
- Darenova, E., Findurova, H., Holub, P., Klem, K., 2022. Soil CO₂ Efflux Response to Combined Application of Adaptation Technologies, Nitrogen Fertilization, and External Carbon Amendment in Wheat and Barley Field. *Front. Environ. Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.920247>