

**Zemědělský výzkum, spol. s r.o.
Mendelova univerzita v Brně**

Uplatněná certifikovaná metodika č. 55/22

Metodika aktivace stabilní organické hmoty pomocí inokulace komerčních mikrobiálních inokul

Ing. Tereza Hammerschmiedt

Ing. Jiří Holátko, Ph.D.

Ing. Antonín Kintl

Ing. Vladěna Ondrisková

Mgr. Eliška Kobzová

Ing. Martin Brtnický

Březen 2022

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory Technologické agentury České republiky v rámci projektu TH03030319: Podpora funkční diverzity půdních organismů aplikací klasických a modifikovaných stabilních organických hmot při zachování produkčních vlastností půd.

Certifikace:

Metodika byla certifikována Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským v Brně osvědčením č. UKZUZ 053960/2022 ze dne 30.3.2022.

Oponovali:

Prof. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D., Vysoké učení technické v Brně

RNDr. Jiří Čuhel, Ph.D., Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Vydavatel:

© Zemědělský výzkum, spol. s r.o.

Zahradní 1, 664 41 Troubsko

© Mendelova univerzita v Brně

Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno

ISBN: 978-80-88000-36-5 (Zemědělský výzkum, spol. s r.o.)

Obsah

Abstrakt	4
Cíl metodiky.....	5
Úvod	6
Vlastní popis metodiky	7
Aktivace biouhlu.....	7
Pokusná plocha	8
Agrotechnické postupy, osevní plán, stanovení výnosů.....	9
Odběr a analýzy půdních vzorků	10
Výsledky pokusů.....	11
Srovnání „novosti postupů“	15
Popis uplatnění certifikované metodiky	15
Ekonomické aspekty.....	15
Nevyčíslitelné neekonomické aspekty	16
Souhrn	17
Seznam použité související literatury.....	18
Seznam publikací, které předcházely metodice.....	19

Abstrakt

Biouhel je v zemědělství využíván jako půdní aditivum na bázi stabilní organické hmoty pro zlepšení kvality a zdraví půdy a zvýšení jejího produkčního potenciálu. Tato metodika představuje technologii aktivace biouhlu pomocí „Zařízení pro kapalnou semi-emerzní aktivaci půdních aditiv“ (užitný vzor č. 34650), která využívá komerčních zdrojů živin a mikroflóry. Za účelem ověření vhodnosti této aktivace byl v letech 2019-2021 na pokusné ploše poblíž Troubska sledován maloparcelkový pokus, v němž byly sledovány následující varianty: negativní kontrola, neaktivovaný biouhel, mikrobiální inokulant Biogen Rewital Pro+, kombinace neaktivovaného biouhlu a Rewitalu a biouhel aktivovaný pomocí inkubace Rewitalu. V rámci osevního postupu byly pěstovány kukuřice, pšenice a řepka. Celkové hodnocení výhodnosti zvoleného agrotechnického managementu zahrnovalo jeho vliv nejen na ekonomiku produkce, ale také na kvalitu půdního prostředí. Proto se jako optimální volba pro zachování produkčních i mimoprodukčních vlastností agrosystému jeví aplikace biouhlu aktivovaného komerční mikroflórou přípravku Rewital.

Klíčová slova:

Biouhel, komerční mikroflóra, aktivace, půdní respirace, enzymatické aktivity, výnos plodin.

Abstract

Biochar is used in agriculture as a soil additive based on stable organic matter to improve the quality and health of the soil and increase its production potential. This methodology presents a biochar activation technology using the "Liquid Semi-Emergent Soil Additive Activation Device" (Utility Model No. 34650), which uses commercial sources of nutrients and microflora. In order to test the suitability of this activation, a small-plot experiment was monitored in 2019-2021 at an experimental site near Troubsko, in which the following variants were monitored: negative control, non-activated biochar, microbial inoculant Biogen Rewital Pro+, combination of non-activated biochar and Rewital, and biochar activated by incubation with Rewital. Maize, wheat and canola were grown in the rotation. The overall evaluation of the benefits of the chosen agrotechnical management included its impact not only on the economics of production but also on the quality of the soil environment. Therefore, the application of biochar activated with the commercial microflora of Rewital appears to be the optimal choice for maintaining the production and non-production properties of the agro-system.

Key words:

Biochar, commercial microflora, activation, soil respiration, enzymatic activities, crop yield.

Cíl metodiky

Cílem vypracované metodiky je poskytnout zemědělcům a pěstitelům návod, jak díky aplikaci biouhlu aktivovaného pomocí kapalného aktivačního média obsahujícího komerční zdroje živin a komerční mikrobiální inokula podpořit funkční diverzitu půdních mikroorganismů, která se odráží ve zdraví půdy a má přímý vliv na zachování produkčních vlastností půd.

Úvod

Půdní aditiva na bázi stabilní organické hmoty, jako je například biouhel, jsou v zemědělství využívána pro zlepšení půdních vlastností a zvýšení produkčního potenciálu obhospodařovaných pozemků. Biouhel je produktem pyrolýzy organických materiálů, které jsou často odpadními produkty zemědělství, lesnictví či zpracovatelského průmyslu. Jedná se o materiál schopný vázat na svém povrchu chemické látky, např. živiny pro rostliny a půdní organismy, nebo sloužit jako nosič pro kolonizaci půdními mikroorganismy. V současné době bývá biouhel aplikován do půdy přímo bez úpravy či po předchozí úpravě pomocí řízeného obohacování živinami, kompostování nebo smíchání se statkovými hnojivy.

V případě smíšení biouhlu se statkovými hnojivy, kompostem či digestátem dochází k jeho obohacování sorpcí živin i mikroorganismů obsažených v těchto organických hnojivech na povrch biouhlu. Společné zrání takovýchto směsí dále zlepšuje (aktivuje) vlastnosti a přínos biouhlu pro kvalitu půdy a výživu pěstovaných plodin. Avšak aktivace biouhlu smísením s organickými hnojivy vyžaduje aplikaci biouhlu pouze ve vzniklé směsi. Složení a vlastnosti výsledného produktu jsou určeny typem použitého organického materiálu. Aplikace takovéto směsi také prodražuje manipulační a logistické náklady.

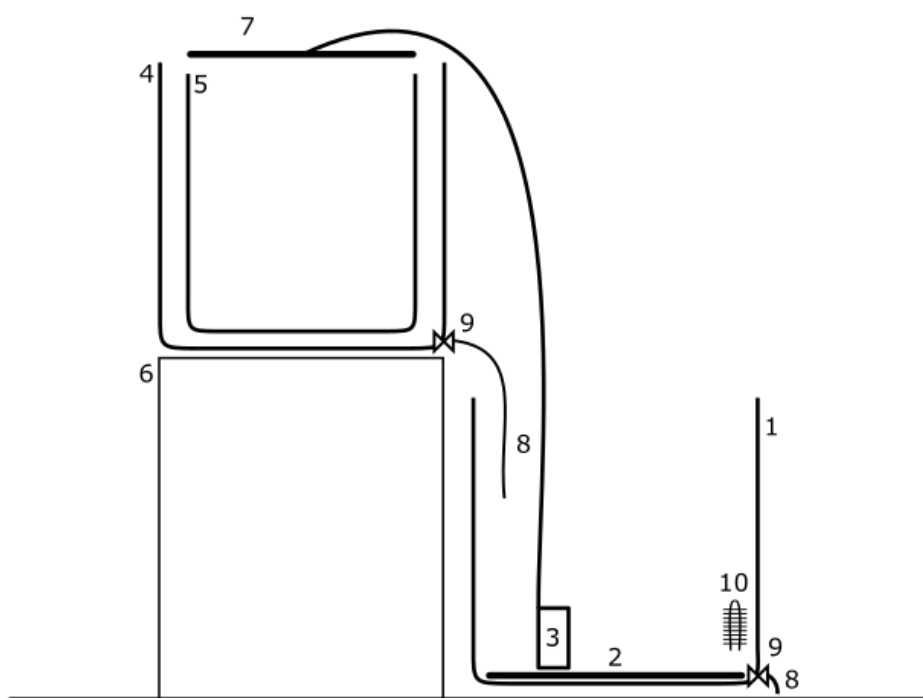
Tato metodika je věnuje představení technologie, která umožňuje aktivaci biouhlu bez nutnosti následné aplikace spolu s aktivačním médiem, využívá komerčních zdrojů živin a mikrobiálních inokul a vede k produkci do značné míry homogenního produktu. Tato technologie je snadno automatizovatelná, avšak v současnosti není známa nebo prakticky využívána.

Vlastní popis metodiky

Aktivace biouhlu

Biouhel byl aktivován pomocí „Zařízení pro kapalnou semi-emerzní aktivaci půdních aditiv“, které je dokumentováno užitným vzorem č. 34650. Technické řešení je dále zobrazeno na Obr. 1, který schematicky znázorňuje aktivační kolonu pracovně nazvanou „sprcha“.

1. Spodní nádrž
2. Aerační rošt
3. Čerpadlo s hladinovým spínačem
4. Horní (aktivační) nádrž
5. Aktivační koš
6. Nosná kovová konstrukce
7. Otočné skrápěcí zařízení
8. Odtokové potrubí
9. Ventil na odtokovém potrubí
10. Topné těleso s termostatem



Obr. 1: Schématické znázornění aktivačního zařízení

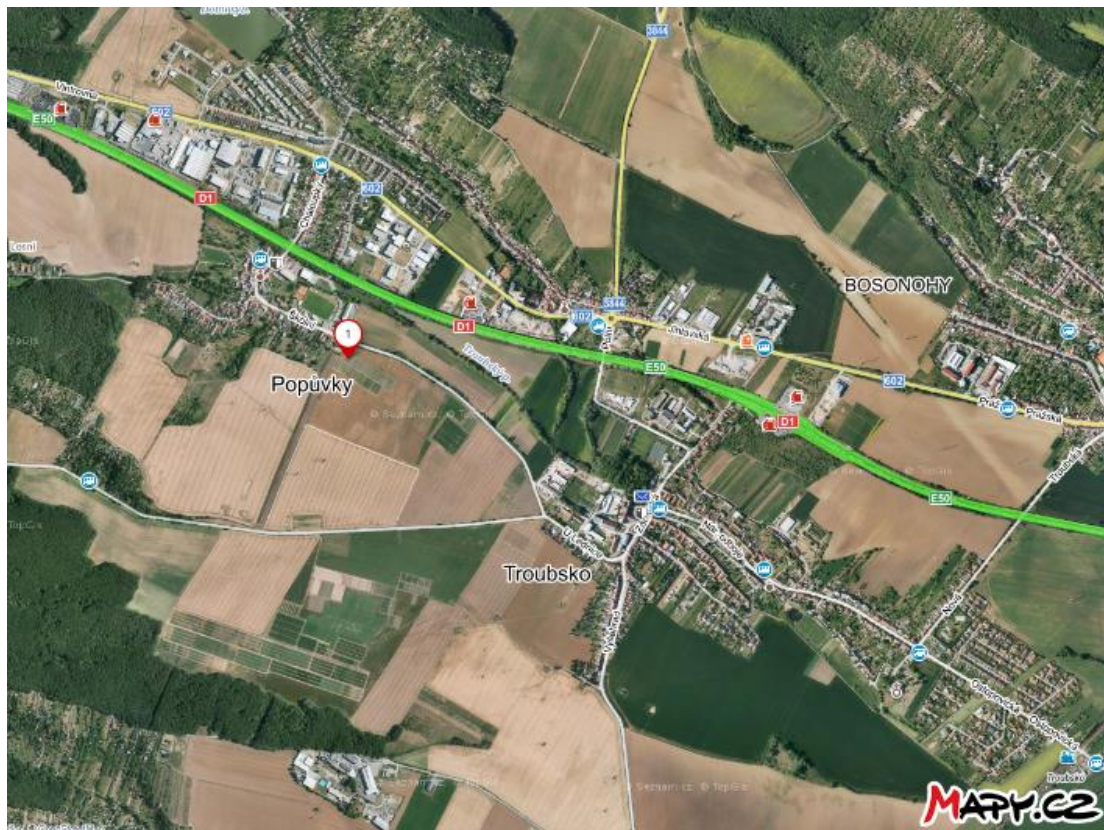
Aktivační médium bylo připraveno ze směsi minerálních hnojiv, konkrétně 2,5 kg fosforečného hnojiva s vápníkem FOSMAG (25 % P_2O_5 , 40 % CaO, 7 % S), 0,54 kg močoviny (46 % N), 0,25 kg draselné soli (60 % K_2O), a 0,5 kg řepné melasy (42 % cukru) jako zdroje energie pro mikroorganismy. Směs hnojiv byla rozpuštěna v barelu obsahujícím 50 litrů vody a obohacena o 1,7 ml komerčního inokula obsahující půdě prospěšné mikroorganismy Biogen

Rewital Pro+ (BIO-GEN, Polsko). Takto připravené aktivační médium bylo inkubováno po dobu tří dnů za intenzivní aerace při teplotě 20 °C.

Horní nádrž aktivačního zařízení byla naplněna 155 kg biouhlu připraveného ze zemědělských odpadů (85 % obilné a slunečnicové slupky, 10 % dřevní štěpky a 5 % ovocné dužiny) při 600 °C (Sonnenerde GmbH, Riedlingsdorf, Rakousko). Biouhel byl prolit vodou, přebytečná voda protékla do spodní nádrže, do které bylo přelito inkubované inokulum, které bylo obohaceno o dalších 2,5 kg FOSMAGu, 1,2 kg močoviny, 0,25 kg draselné soli a 5,5 kg řepné melasy. Následně byl obsah spodní nádrže dopuštěn vodou na 600 litrů. Aktivační médium bylo čerpáno ze spodní do horní nádrže jednou za 6 hodin. Ve spodní nádrži bylo aktivační médium aerováno a ohříváno na 20 °C. Aktivace biouhlu probíhala po dobu 7 dnů. Na konci aktivace byl biouhel vyjmut z aktivačního zařízení a po odstranění přebytečné aktivační kapaliny byl převezen na pokusný pozemek, kde byl aplikován na povrch půdy.

Pokusná plocha

Pro testování možností podpory funkční diverzity půdních organismů aplikací klasických a modifikovaných stabilních organických hmot při zachování produkčních vlastností půd byl vybrán pozemek firmy Zemědělský výzkum, spol. s r.o. v Troubsku, viz Obr. 2. Pokus byl založen poblíž obce Popůvky při okraji půdního bloku č. 7201/2.



Obr. 2: Lokalizace maloparcelových pokusů s aktivovaným biouhlem na stanovišti Troubsko (na mapě bod 1)

Z hlediska agroekologického členění se pokusná plocha nachází v řepařském výrobním typu, v klimatickém okrsku mírně teplém, mírně suchém s nadmořskou výškou 287 m n. m. Geologickým podkladem území je spraš a sprašová hlína Českého masivu, půdní typ je

hnědozem modální (<http://www.geology.cz/extranet>). Na počátku pokusu byl obsah celkového uhlíku v půdě $1,38 \pm 0,06$ % a celkového dusíku $0,17 \pm 0,01$ %. Detailní klimatická charakteristika je uvedena v Tab. 2 a 3. Zeměpisné souřadnice dané lokality jsou $49^{\circ}10'30''N$, $16^{\circ}29'30''E$.

Tab. 2: Měsíční úhrn srážek (mm) na stanovišti Troubsko

Rok	Úhrn srážek / Měsíc												Úhrn za rok	Úhrn za veg. období
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.		
2019	23,0	17,2	26,5	16,9	78,1	65,4	60,4	55,9	72,6	30,4	40,1	42,9	529,4	349,3
2020	8,5	27,1	25,7	20,3	65,4	87,2	59,0	105,9	81,6	130,1	23,4	36,8	671,0	419,4
2021	36,3	30,8	21,0	16,4	58,0	66,8	100,3	130,2	15,0	10,9	40,4	39,2	565,3	386,7
1981-2010	25,0	23,9	31,5	32,0	60,5	68,7	71,6	63,7	48,2	32,1	36,4	32,0	525,6	344,7

Pozn.: Vegetační období 1. 4.–30. 9.; dlouhodobý 30-letý průměr (1981–2010). Zdroj: ČHMÚ

Tab. 3: Průměrná měsíční teplota vzduchu (°C) na stanovišti Troubsko

Rok	Teplota / Měsíc												Průměr za rok	Průměr za veg. období
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.		
2019	-0,9	2,4	6,7	11,1	12,2	22,0	20,4	20,8	14,6	9,9	6,8	2,0	10,7	16,9
2020	-0,2	4,6	5,3	9,9	12,6	18	19,2	20,6	15	10,1	4,5	2,4	10,2	15,9
2021	-0,1	0	3,5	7,1	12,7	20,2	20,8	17,9	15,6	8,8	4,7	1,2	9,4	15,7
1981-2010	-1,7	-0,3	3,8	9,5	14,6	17,4	19,5	18,8	14,1	8,8	3,5	-0,6	9,0	15,7

Pozn.: Vegetační období 1. 4.–30. 9.; dlouhodobý 30-letý průměr (1981–2010). Zdroj: ČHMÚ

Agrotechnické postupy, osevní plán, stanovení výnosů

V roce 2018, byla na vybraném pozemku pěstována jako předplodina ozimá pšenice (*Triticum aestivum* L.). Po její sklizni následovalo zpracování půdy pomocí diskového podmiťáče do hloubky 8 cm. Po vzejití výdrolu byla provedena opětovná podmiťka.

V dubnu 2019 byly na pokusné ploše o celkovém rozměru 100 x 50 m založeny pokusné varianty, každá ve 3 opakováních o rozměrech 7 x 3 m, tedy 21 m², které byly umístěny náhodně po celé ploše a odděleny vzájemně ochranným pásmem o šíři 1 m. Ničím neošetřené plochy sloužily jako negativní kontrola (K). Pro zhodnocení účinnosti aktivace byl aplikován neaktivovaný biouhel (NA2) a na další plochy biouhel aktivovaný výše uvedeným způsobem (RS2). Pro porovnání výhodnosti aktivace biouhlu pomocí komerčního inokula byla také vytvořena varianta se samostatným přípravkem Rewital (R1) v dávce odpovídající 1 l/ha doporučené výrobcem a kombinace neaktivovaného biouhlu s inokulantem Rewital (R1 + NA2). Aplikační dávka všech typů biouhlu odpovídala 2 tunám neaktivovaného biouhlu na hektar.

Biouhel aplikovaný na povrch půdy byl zapraven do hloubky 10 cm pomocí půdní frézy o záběru 3 metry totožné se šířkou jednotlivých pokusných variant, při pojezdu z jedné strany tak, aby nedošlo k posunu zeminy a aplikovaného biouhlu. Před setím kukuřice byla aplikována močovina v dávce 120 kg/ha. 26. 4. 2019 byl prostřednictvím secího stroje Kinze 3500 vyset hybrid kukuřice seté (*Zea mays* L.) KOLETIS FAO Zrno 300 - Siláž 290 ve výsevku 90 tis. j./ha při meziřádkové vzdálenosti 0,75 m do hloubky 8 cm. Tři dny po vysetí byl aplikován postřik STOMP AQUA v dávce 3,5 l/ha. Během vyvinutí 2. až 3. listu (BBCH: 12-13) byl aplikován přípravek LAUDIS v dávce 2,25 l/ha. Bohužel použitá herbicidní ochrana nebyla dostatečná a v průběhu vegetačního období došlo k velmi silnému nerovnoměrnému zaplevelení pozemku. Z tohoto důvodu nebylo možné objektivně vyhodnotit výnos jednotlivých variant, proto jsou v ekonomice za rok 2019 započteny pouze náklady na pěstování kukuřice, nikoliv zisk.

V následujícím roce byla předseťová příprava provedena pomocí půdní frézy o záběru 3 metry totožné se šířkou jednotlivých pokusných variant, při pojezdu z jedné strany tak, aby nedošlo k posunu zeminy a aplikovaného biouhlu. Před předseťovou přípravou byly aplikovány 2/3 dusíku (80 kg č.ž./ha) ve formě ledku amonného. 20. 3. 2020 byla zaseta pšenice setá (*Triticum aestivum* L.; odrůda Jarissa C1), při výsevku 200 kg/ha. Kvalitativní přihnojení bylo provedeno na konci sloupkování opět ledkem amonným v dávce 40 kg č. ž./ha, což odpovídá 1/3. V rámci herbicidní ochrany byl použit přípravek MUSTANG FORTE (Dow AgroSciences s.r.o.) POST 1. dubna, 29–32 BBCH v dávce 0,8 l/ha. Sklizeň byla provedena 11. 8. 2020 malo-parcelovým kombajnem Sampo-Rosenlew. Produkce zrna z každé parcely byla zvážena a byla změřena vlhkost. Výnos byl následně přepočten na 1 ha při vlhkosti 12 %.

Po sklizni pšenice v roce 2020 byla na pokusné ploše provedena podmítka pomocí půdní frézy o záběru 3 metry, totožné se šířkou jednotlivých pokusných variant, při pojezdu z jedné strany tak, aby nedošlo k posunu zeminy a aplikovaného biouhlu. Ozimá řepka (*Brassica napus* L. var. napus) odrůdy Kuga byla vyseta 21. 8. 2020 prostřednictvím bezorebného secího stroje Kinze 3500 při meziřádkové vzdálenosti 0,375 m a výsevku 450 tis. j./ha. Následující den byl na plochu pokusu aplikován postřik herbicidu AUTOR v dávce 1,5 l/ha. Dne 26. 9. 2020 byly aplikovány postřiky FURY v dávce 0,1 l/ha proti dřepčikům a herbicid GALLERA PODZIM v dávce 0,2 l/ha. Hnojení před setím proběhlo pomocí močoviny v dávce 40 kg č.ž./ha. 18. 2. 2021 bylo provedeno regenerační hnojení ledkem amonným v dávce 60 kg č.ž./ha. 15.3.2021 byla aplikována druhá dávka regeneračního hnojení v totožné dávce 60 kg č.ž./ha. Ve vývojové fázi 51 BBCH bylo provedeno ošetření přípravkem PICTOR 0,6-1 l/ha. Při dosažení BBCH 60 proběhlo ošetření přípravkem VOODO v dávce 0,2 l/ha. Sklizeň byla provedena 11. 8. 2021 malo-parcelovým kombajnem Sampo-Rosenlew, produkce zrna byla přepočítána na výnos z 1 ha a vlhkost 8 %.

Odběr a analýzy půdních vzorků

V experimentu byl hodnocen vliv rozdílně upraveného (aktivovaného) biouhlu na půdní pH, chemické i biologické vlastnosti půdy a na funkční diverzitu půdní mikrobioty. Z chemických vlastností byl stanoven obsah půdního draslíku, hořčíku a fosforu, z biologických parametrů byly stanoveny: půdní enzymatické aktivity – dehydrogenasasa (DHA), β -glukosidasa (GLU), N-acetyl- β -D-glukosaminidasa (NAG), arylsulfatasa (ARS), fosfatasa (Phos), – a bazální (BR) a

substrátem (D-glukosa, kys. protokatechoová, D-trehalosa, N-acetyl- β -D-glukosamin, D-mannosa, L-alanin) indukované respirace.

Půdní vzorky byly odebrány po sklizni řepky ozimé v roce 2021. Vzorky půdy byly odebrány z hloubky 0-10 cm jako směsný vzorek z pokusné parcelky (7 x 3 m) tvořený 3 dílčími vzorky. Každá varianta byla odebrána ze 3 parcelek. Odebraná půda byla přesáta přes síto s velikostí ok 2 mm a skladována po dobu 14 dní při teplotě 4 °C (DHA a půdních respirace), lyofilizována (GLU, NAG, ARS, Phos) nebo usušena na vzduchu do konstantní hmotnosti pro chemické analýzy (pH, obsah živin).

Metodiky pro provedení stanovení byly odvozeny od následujících: pH stanoveno podle ISO 10390 (2005), dehydrogenázová aktivita (Casida, Klein and Santoro 1964), bazální a indukovaná respirace měřená pomocí zařízení MicroResp (Campbell et al. 2003) a protokolu výrobce (Technical Manual v2.1, The James Hutton Institute), enzymatické aktivity (β -glukosidasa, N-acetyl- β -D-glukosaminidasa, arylsulfatasa, fosfatasa) byly měřeny podle normy ISO 20130 (2018). Výsledky byly podrobeny statistické analýze rozptylu ANOVA s Tukey HSD post hoc testem. Grafické znázornění hodnot vlastností pro jednotlivé varianty v sloupcových grafech s různými písmeny vyjadřuje staticky významné rozdíly na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

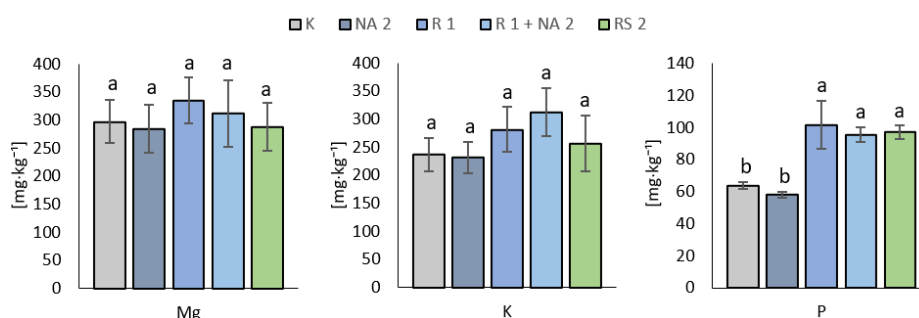
Výsledky pokusů

Z hlediska hodnocení výnosů sledovaných plodin vycházely v hodnocených letech nejlépe obě varianty s kombinací Rewitalu a biouhlu (Tab. 4). V prvním hodnoceném roce 2020 vykazoval aktivovaný biouhel významnější zvýšení výnosu než neaktivovaný biouhel koaplikovaný s Rewitalem. V následujícím roce se zvýšení výnosů oproti kontrole u těchto dvou variant vyrovnalo. To může být způsobeno spotřebováním snadno přístupných živin z aktivovaného biouhlu anebo zvýšením přístupnosti vázaného uhlíku a živin na neaktivovaném biouhlu vlivem mikrobiálního „zvětrávání“. Výrazný rozdíl mezi variantami biouhlu se však v průběhu času stírá, a i samostatný neaktivovaný biouhel začíná třetí rok od zapravení do půdy vykazovat pozitivní vliv na výnos sledované plodiny. Ale po celou dobu lze pozorovat jasný pozitivní vliv mikrobiálního obohacení půdy přídatkem Rewital na výnos sledovaných plodin ve všech variantách.

Tab. 4: Průměrný výnos zrna sledovaných plodin přepočítaný na jednotnou vlhkost: 12 % u pšenice a 8 % u řepky \pm směrodatná odchylka

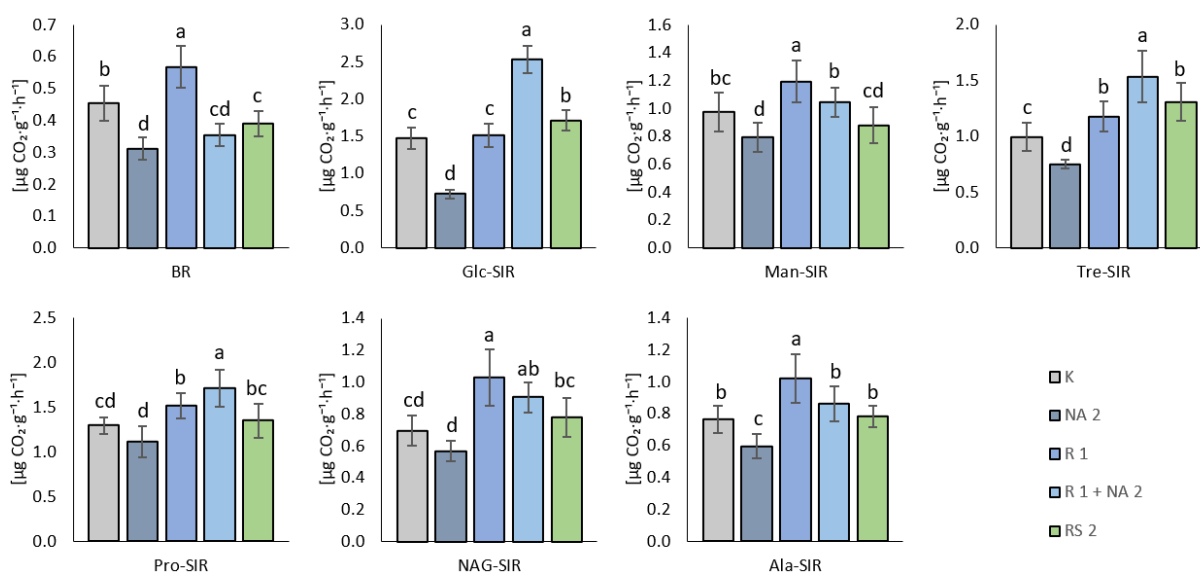
Varianta / Výnosy zrna		Pšenice 2020		Řepka 2021	
		t/ha	t/ha vs K	t/ha	t/ha vs K
K	kontrola (pouze NPK)	3,737 \pm 0,589	0,000	2,708 \pm 0,196	0,000
NA 2	neaktivovaný biouhel 2 t/ha	3,349 \pm 0,626	-0,388	2,985 \pm 0,259	0,277
R 1	Rewital 1 l/ha	4,084 \pm 0,461	0,347	3,056 \pm 0,322	0,348
R 1 + NA 2	Rewital 1 l/ha + neaktivovaný biouhel 2 t/ha	4,321 \pm 0,546	0,584	3,357 \pm 0,260	0,649
RS 2	biouhel aktivovaný ve sprše Rewitalem 2 t/ha	4,926 \pm 0,500	1,189	3,418 \pm 0,106	0,710

Ze stanovených chemických parametrů odebraných půdních vzorků byly statisticky nevýznamně variabilní hodnoty obsahu přístupného hořčíku a draslíku v půdě.



Obr. 3: Obsah přístupných živin v půdě (chybové úsečky představují směrodatnou odchylku)

Přístupný fosfor byl signifikantně zvýšen oproti kontrolní půdě ve variantách R1, R1+NA2 a RS2 (Obr. 3). Předpokládáme, že hlavní vliv na zvýšení obsahu přístupného fosforu v půdě měla činnost fosfát-solubilizujících bakterií (PSB), stimulovaná obohacením půdy o kmeny ze zdrojového inokula Rewital (např. *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*). Tato zvýšená aktivita PSB mohla přispět k sekvestraci fosforu v podobě mikrobiálního fosfátu, též asociovaného s biouhlem (Gul and Whalen 2016).



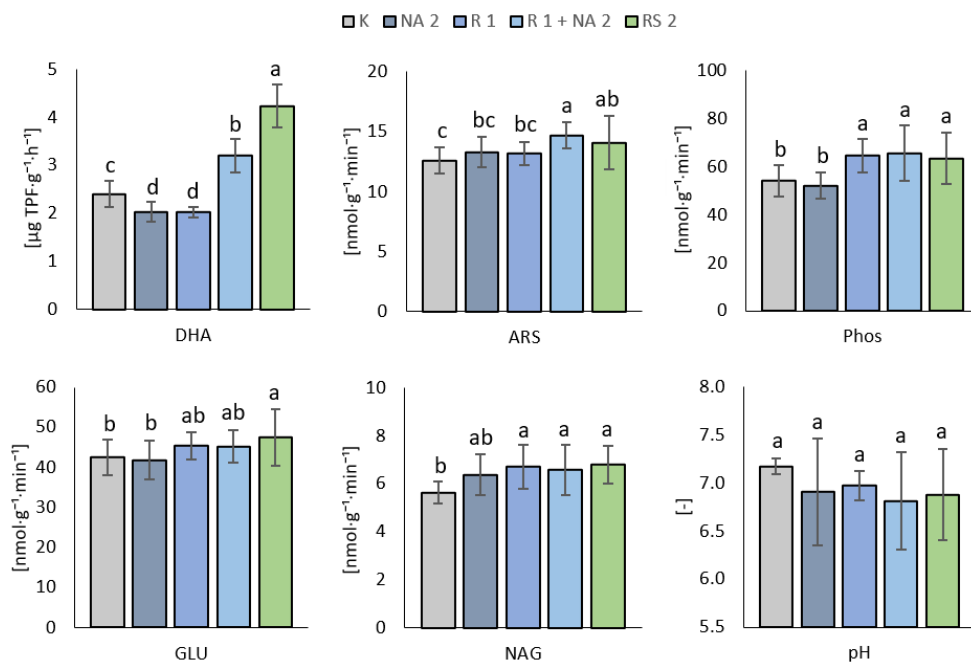
Obr. 4: Bazální a substrátem indukované respirace v půdě (chybové úsečky představují směrodatnou odchylku)

Bazální půdní respirace (BR) je ukazatelem mikrobiální aktivity v půdě, substrátem indukované respirace (SIR) odráží změny ve funkční diverzitě půdního mikrobiomu (Anderson and Domsch 1978). BR byla ve srovnání s kontrolou signifikantně zvýšena ve variantě R1, zatímco ostatní varianty s biouhlem (NA2, R1+NA2, RS2) měly BR signifikantně sniženu (Obr. 4). Vyšší BR půdy u varianty R1 způsobilo obohacení aerobními mikroorganismy mikrobiálního inokula Rewital, podobně jako ve studii (Naiman et al. 2009), která popisuje změnu v utilizaci zdrojů uhlíku po inokulaci půdy bakteriemi podporujícími růst rostlin (PGPR). Naopak negativní efekt biouhlu na půdní BR mohl být způsoben tím, že jeho vysoký obsah pro organismy nedostupného stabilního organického uhlíku snížil podíl využitelného uhlíku v půdní organické

hmotě. Biouhel mohl také přispět ke stabilizaci dalších živin vazbou na svůj povrch. Tyto efekty byly pravděpodobně výraznější než prospěšný účinek mikrobiálního inokula.

Respirace indukovaná D-glukosou (Glc-SIR), univerzálním rychlým zdrojem energie a uhlíku, odráží maximální aerobní katabolický potenciál půdní mikroflóry a je úměrná celkové mikrobiální půdní biomase. Glc-SIR byla v porovnání s kontrolou u varianty R1 nezměněná, zatímco u variant RS2 a R1+NA2 signifikantně zvýšena, přičemž u R1+NA2 byla signifikantně nejvyšší (Obr. 4). Nejvyšší respirační potenciál, a tedy pravděpodobně i nejvyšší celková mikrobiální biomasa, ve variantě R1+NA2 naznačují, že neaktivovaný biouhel posloužil po přidání do půdy jako účinná matrice pro kolonizaci mikroorganismy, buď z přidaného komerčního inokula, nebo půdními autochtonními kmeny. Tyto výsledky jsou ve shodě s četnými studiemi (Quilliam et al. 2013; Bertola et al. 2019). Také již kolonizovaný biouhel varianty RS2 dále podpořil nárůst celkové půdní mikrobiální biomasy. Mikrobiální hnojení (R1) na základě získaných výsledků nezvýšilo celkovou mikrobiální biomasu signifikantně, pouze přispělo k obohacení o aerobní respiračně aktivní frakci (BR) v celkovém mikrobiálním společenstvu.

Velmi podobné výsledky jako Glc-SIR ukázaly i respirace indukované dalšími uhlíkatými substráty – Tre-SIR, Pro-SIR – u obou těchto parametrů byla signifikantně nejvyšší hodnota ve variantě R1+NA2, vyšší v porovnání s R1 a RS2, jejichž hodnoty byly vyšší než kontrola a NA2, jehož respirace byla signifikantně nejnižší (Obr. 4). Protokatechoová kyselina (Pro-SIR) je intermediátem degradace ligninu a ukazatelem aktivity mikroorganismů zúčastněných v degradaci rostlinné odpadní biomasy. D-trehalosa (Tre-SIR) a N-acetyl- β -D-glukosamin (NAG-SIR) jsou v půdě nejhojnější formy sacharidů a jsou ukazatelem procesů dekompozice fungální biomasy. Neaktivovaný biouhel spolu s inokulem mikrobiálního hnojiva nejúčinněji podměnily pravděpodobný vzrůst biomasy hub a degradátorů ligninu, mezi nimiž je řada fungálních taxonů. Pro zvýšení respirační degradace chitinu (ukazatel NAG-SIR) a hemicelulos (Man-SIR) byly naopak nejúčinnější inokulace pouze Rewitalem, varianta R1 byla signifikantně nejvyšší, varianta R1+NA2 byla signifikantně (ne u NAG-SIR) vyšší než RS2 a tato byla signifikantně (ne u NAG-SIR) vyšší než kontrola (Obr. 4). Pravděpodobně tedy mikrobiální obohacení nejvíce zvýšilo biomasu zejména bakteriálních degradátorů chitinu a rostlinné biomasy. Stejně trendy mezi výsledky L-alaninem indukované respirace (Ala-SIR), jako u Man-SIR a NAG-SIR, jednotlivých variant jsou vysvětlitelné tím, že tak jako chitin, jsou i půdní aminokyseliny ukazateli mineralizace jak uhlíku, tak i dusíku. Mikrobiální hnojení (R1) tedy mělo pozitivní vliv na mineralizaci dusíku.



Obr. 5: Enzymatické aktivity v půdě a pH (chybové úsečky představují směrodatnou odchylku)

Dehydrogenasová aktivita (DHA) je indikátorem dekompoziční aktivity půdního mikrobiomu (Wolinska and Stepniensk 2012; Elbl et al. 2019). DHA byla signifikantně nejvyšší u RS2 a dále zvýšena ve srovnání s kontrolou ve variantě R1+NA2, naopak hodnoty NA2 a R1 byly signifikantně sníženy (Obr. 5). Vzhledem k částečně anaerobní aktivitě půdních dehydrogenas je tento rozpor mezi výsledky Glc-SIR a DHA vysvětlitelný tím, že RS2 stimulovalo nárůst biomasy všech půdních mikroorganismů, nejen aerobního mikrobiomu. Arylsulfatasa (ARS) je enzym zúčastněný v mineralizaci síry: jeho hodnoty byly v porovnání s kontrolou signifikantně vyšší ve variantách R1+NA2 a RS2, tj. v půdách obohacených mikrobiálním inokulem v kombinaci s biouhlem. Větší míra mineralizace síry může být způsobena větším množstvím organicky vázané síry v biouhlu a indukci její mineralizace mikrobiálními kmeny použitého komerčního inokula. β -glukosidasa (GLU) přímo souvisí s množstvím a kvalitou organických látek v půdě a je indikátorem zejména bakteriální frakce v půdním mikrobiálním společenstvu. N-acetyl- β -D-glukosaminidasa (NAG) katalyzuje reakci degradační dráhy chitinu (klíčového polysacharidu buněčné stěny hub) a je také indikátorem mineralizace dusíku. Aktivita NAG byla signifikantně zvýšena oproti kontrole ve všech variantách s mikrobiálním inokulem (R1, R1+NA2, RS2) a GLU pouze u RS2 (Obr. 5). Tyto výsledky naznačují, že stimulace mikrobiální mineralizace organického uhlíku půdní organické hmoty byla neúčinnější pomocí mikrobiálního společenstva získaného inkubační aktivací biouhlu. Výsledky stanovení aktivity fosfatasy (Phos), která podmiňuje míru mineralizace organického fosforu, odpovídají výsledkům stanovení obsahu fosforu v půdě. V porovnání s kontrolou a NA2 byla fosfatasa aktivnější ve všech variantách s cíleným obohacením mikrobiomu o mikroorganismy PSB pomocí inokulace přípravkem Rewital. Půdní pH bylo u všech variant v porovnání s kontrolou sníženo pouze nesignifikantně (Obr. 5).

Srovnání „novosti postupů“

Postupy uvedené v metodice jsou originální a nelze je jako celek porovnávat s žádnou jinou metodikou, protože podobná metodika nebyla vydána u nás ani v zahraničí.

Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena zemědělským podnikům zaměřeným na rostlinnou výrobu či producentům biouhlu. Metodika může být využita akreditovanými poradci v oblasti zemědělské výroby a ekonomiky, pracovníky decizní sféry v působnosti Ministerstva zemědělství včetně Oddělení regionálních odborů a Státního zemědělského intervenčního fondu, profesními organizacemi (Agrární komora ČR, Zemědělský svaz ČR aj.), pracovníky zemědělského výzkumu, studenty středních a vysokých škol orientovaných na zemědělskou problematiku, pedologii a ochranu životního prostředí.

Ekonomické aspekty

Ekonomický dopad byl vyhodnocen rozdílem vícenákladů na pořízení, aktivaci a aplikaci biouhlu v rámci dané varianty a výnosů z ocenění produkce pšenice a řepky ve vztahu ke kontrolní variantě.

Tab. 5: Kalkulace výnosů dle jednotlivých plodin v letech 2019-2021

Varianta / Výnosy zrna		2019	Pšenice 2020			Řepka 2021			Suma	Výnosy
		Nehodnoceno	t/ha	t/ha vs K	Kč/ha vs K	t/ha	t/ha vs K	Kč/ha vs K	Kč/ha vs K	Kč/ha/rok vs K
K	kontrola (pouze NPK)		3,737	0	0	2,708	0	0	0	0
NA 2	neaktivovaný biouhel 2 t/ha		3,349	-0,388	-1619	2,985	0,277	3263	1643	548
R 1	Rewital 1 l/ha		4,084	0,347	1448	3,056	0,348	4099	5547	1849
R 1 + NA 2	Rewital 1 l/ha + neaktivovaný biouhel 2 t/ha		4,321	0,584	2437	3,357	0,649	7644	10081	3360
RS 2	biouhel aktivovaný ve sprše Rewitalem 2 t/ha		4,926	1,189	4962	3,418	0,710	8362	13324	4441

Tab. 6: Kalkulace nákladů dle jednotlivých plodin v letech 2019-2021

Varianta		Vícenáklady	2019	2020	2021	SUMA	Náklady
		Aplikace Kč/ha	Biouhel Kč/ha	Biouhel Kč/ha	Biouhel Kč/ha	Kč/ha	Kč/ha/rok
K	kontrola (pouze NPK)	0	0	0	0	0	0
NA 2	neaktivovaný biouhel 2 t/ha	1000	1267	1267	1267	4801	1600
R 1	Rewital 1 l/ha	1000	300	300	300	1900	633
R 1 + NA 2	Rewital 1 l/ha + neaktivovaný biouhel 2 t/ha	2000	1567	1567	1567	6701	2234
RS 2	biouhel aktivovaný ve sprše Rewitalem 2 t/ha	1000	1733	1733	1733	6199	2066

Kalkulované výnosy:

- Ocenění produkce (dle průměrné ceny ČSU v daném roce sklizně):
 - Pšenice zrno (2020): 4 173 Kč/t
 - Řepka zrno (2021): 11 778 Kč/t

Kalkulované náklady:

- Vícenáklady aplikaci biouhlu při uvedené dávce 2 t/ha: 1 000 Kč/ha
- Vícenáklady aplikaci Rewitalu při uvedené dávce 1 l/ha: 1 000 Kč/ha
- Roční vícenáklady na biouhel při dávce 2 t/ha a na Rewital při dávce 1 l/ha:
 - Neaktivovaný biouhel (využitelnost 30 let): 1267 Kč/ha
 - Aktivovaný biouhel (využitelnost 30 let): 1773 Kč/ha
 - Rewital (využitelnost 3 roky): 300 Kč/ha

Tab. 7: Souhrnná kalkulace výnosů a vícenákladů v letech 2019-2021 a celkový přínos

Varianta		Výnosy		Náklady		Rozdíl
		Kč/ha vs K	Kč/ha/rok vs K	Kč/ha vs K	Kč/ha/rok vs K	Kč/ha/rok vs K
K	kontrola (pouze NPK)	0	0	0	0	0
NA 2	neaktivovaný biouhel 2 t/ha	1643	548	-4801	-1600	-1053
R 1	Rewital 1 l/ha	5547	1849	-1900	-633	1216
R 1 + NA 2	Rewital 1 l/ha + neaktivovaný biouhel 2 t/ha	10081	3360	-6701	-2234	1127
RS 2	biouhel aktivovaný ve sprše Rewitalem 2 t/ha	13324	4441	-6199	-2066	2375

Z ekonomického hlediska se jeví jako nejvýhodnější aplikace biouhlu aktivovaného inkubační aktivací přípravkem Rewital obsahujícím komerční mikroflóru, která dosahovala nejvyššího rozdílu mezi průměrnými ročními výnosy a náklady. Také další dvě varianty ošetřené tímto mikrobiálním inokulantem dosahovaly výrazně lepších ekonomických výsledků než kontrolní varianta a neaktivovaný biouhel, který během sledovaného období vykazoval negativní finanční bilanci. Varianta s koaplikací Rewitalu a biouhlu dosahovala ve třetím produkčním roce velmi podobných výnosů jako aktivovaný biouhel. Samotný Rewital dosahoval podobných hodnot rozdílu mezi průměrnými ročními výnosy a náklady jako kombinace Rewitalu a neaktivovaného biouhlu, což vychází především z velmi nízkých vstupních nákladů pořízení a aplikaci tohoto komerčního mikrobiálního inokula. Jeho aplikaci je však nutné opakovat každé tři roky. Při aplikaci aktivovaného biouhlu lze očekávat delší dobu pozitivního vlivu na výnos plodin. V kalkulaci celkového přínosu je uvažovaná využitelnost biouhlu po dobu 30 let. Ze získaných dat však nelze predikovat, jak výrazný pozitivní účinek na výnos plodin lze po celou tuto dobu očekávat. Ale vzhledem k tomu, že se jedná o stabilní organickou hmotu, předpokládáme, že přetrvá minimálně pozitivní vliv na fyzikální vlastnosti půd, tedy zlepšení infiltrace vody, schopnosti zadržet vláhu, zvýšení stability agregátů a provzdušnění půdy.

Neekonomické (environmentální) aspekty

Výsledky pokusu ukázaly, že na celkovou i dílčí specifické mikrobiální aktivity půdy a transformační procesy živin má významný pozitivní efekt obohacení půdy mikroorganismy z komerčního inokula Biogen Rewital Pro+. Jehož účinek byl podpořen kombinací s neaktivovaným biouhlem ve vlastnostech Glc-, Tre-, Pro-SIR, DHA a ARS, a inkubační aktivací s biouhlem ve vlastnostech Glc-SIR, DHA, ARS a GLU. Tyto parametry dokládají četnost a vitalitu půdních mikroorganismů, které jsou součástí zdravé a úrodné půdy.

Souhrn

Celkové hodnocení výhodnosti zvoleného agrotechnického managementu musí komplexně zahrnovat jeho vliv nejen na ekonomiku produkce, ale také na kvalitu půdního prostředí. Proto se jako optimální volba pro zachování produkčních i mimoprodukčních vlastností agrosystému jeví aplikace biouhlu aktivovaného komerční mikroflórou přípravku Biogen Rewital Pro+. Aplikací aktivovaného biouhlu byl do půdy aplikován nejen biouhel, který jako stabilní organická hmota poskytuje životní prostor pro půdní biotu, ale také půdě prospěšné kmeny bakterií. Vitalita půdních mikroorganismů se odráží i v úrodnosti půdy. Pozitivní vliv aplikace aktivovaného biouhlu na ekonomicko-environmentální parametry dokládá průměrné zvýšení zisku o 2 375 Kč/ha/rok v porovnání s kontrolou.

Seznam použité související literatury

- Anderson, J. P. E. and Domsch, K. H. (1978). "A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils." *Soil Biology and Biochemistry* **10**(3): 215-221. 10.1016/0038-0717(78)90099-8
- Bertola, M., Mattarozzi, M., Sanangelantoni, A. M., Careri, M. and Visioli, G. (2019). "Pgp colonizing three-year biochar-amended soil: Towards biochar-mediated biofertilization." *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **19**(4): 841-850. 10.1007/s42729-019-00083-2
- Campbell, C. D., Chapman, S. J., Cameron, C. M., Davidson, M. S. and Potts, J. M. (2003). "A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(6): 3593-3599. 10.1128/AEM.69.6.3593-3599.2003
- Casida LE, Klein DA, Santoro T. (1964) "Soil dehydrogenase activity." *Soil Science* **98**(6):371–6. 10.1097/00010694-196412000-00004
- Elbl, J., Maková, J., Javoreková, S., Medo, J., Kintl, A., Lošák, T. and Lukas, V. (2019). "Response of microbial activities in soil to various organic and mineral amendments as an indicator of soil quality." *Agronomy* **9**(9). 10.3390/agronomy9090485
- Gul, S. and Whalen, J. K. (2016). "Biochemical cycling of nitrogen and phosphorus in biochar-amended soils." *Soil Biology & Biochemistry* **103**: 1-15. 10.1016/j.soilbio.2016.08.001
- ISO 10390 (2005). Soil quality — determination of pH
- ISO 20130 (2018). Soil quality — Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates.
- Naiman, A. D., Latrónico, A. and de Salamone, I. E. G. (2009). "Inoculation of wheat with azospirillum brasilense and pseudomonas fluorescens: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora." *European Journal of Soil Biology* **45**(1): 44-51. 10.1016/j.ejsobi.2008.11.001
- Quilliam, R. S., Glanville, H. C., Wade, S. C. and Jones, D. L. (2013). "Life in the 'charosphere' - does biochar in agricultural soil provide a significant habitat for microorganisms?" *Soil Biology & Biochemistry* **65**: 287-293. 10.1016/j.soilbio.2013.06.004
- Wolinska, A. and Stepniewska, Z. (2012). Dehydrogenase activity in the soil environment. In *Dehydrogenases*, Canuto, R. A (ed.). London, UK: IntechOpen, pp: 183-210. 10.5772/48294

Seznam publikací, které předcházely metodice

- Holatko J., Hammerschmiedt T., Kintl A., Danish S., Skarpa P., Latal O., et al. (2021). „Effect of carbon-enriched digestate on the microbial soil activity.“ *PLoS ONE* **16**(7): e0252262. 10.1371/journal.pone.0252262
- Brtnicky, M., Hammerschmiedt, T., Elbl, J., Kintl, A., Skulcova, L., Radziemska, M., Latal, O., Baltazar, T., Kobzova, E., Holatko, J. (2021). „The Potential of Biochar Made from Agricultural Residues to Increase Soil Fertility and Microbial Activity: Impacts on Soils with Varying Sand Content.“ *Agronomy* **11**: 1174. 10.3390/agronomy11061174
- Hammerschmiedt, T., Holatko, J., Pecina V., Huska D., Latal O., Kintl A., Radziemka M., Muhammad S., Gusiatin Z.M., Kolackova M., Nasir M., Baltazar T., Ahmed N., Brtnicky M. (2021). „Assessing the potential of biochar aged by humic substances to enhance plant growth and soil biological activity.“ *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* **8**: 46. 10.1186/s40538-021-00242-7
- Brtnicky, M., Datta R., Holatko J., Bielska L., Gusiatin Z.M., Kucerik J., Hammerschmiedt, T., Danish S., Radziemka M., Mravcova L., Fahad S., Kintl A., Sudoma M., Amed N., Pecina V. (2021). „A critical review of the possible adverse effects of biochar in the soil environment.“ *Science of the Total Environment* **796**: 148756. 10.1016/j.scitotenv.2021.148756
- Holatko J., Hammerschmiedt T., Datta R., Baltazar T., Kintl A., Latal O., Pecina V., Sarec P., Novak P., Balakova L., Danis S., Zafar-ul-Hye M., Fahad S., Brtnicky M. (2020). „Humic Acid Mitigates the Negative Effects of High Rates of Biochar Application on Microbial Activity.“ *Sustainability* **12**: 9524. 10.3390/su12229524
- Brtnicky, M., Dokulilova, T., Holatko, J., Pecina, V., Kintl, A., Latal, O., Vyhnanek, T., Prichystalova, J., Datta, R. (2019). „Long-Term Effects of Biochar-Based Organic Amendments on Soil Microbial Parameters.“ *Agronomy* **9**: 747. 10.3390/agronomy9110747