

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Porovnání oxidačních a hydrolytických metod frakcionace půdní organické
hmoty v přirozených humusových horizontech s metodou
klasické alkalické extrakce**

Ing. Eduard Strosser

2015

Školitel: doc. Ing. Jan Horáček, CSc.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Rád bych poděkoval vedoucímu disertační práce **doc. Ing. Janu Horáčkovi, CSc.**, za pomoc a rady, které mi poskytoval v průběhu doktorandského studia.

Dále bych rád poděkoval **Ing. Věře Čechové** za metodickou pomoc při přípravě půdních vzorků a zpracování chemických analýz.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne

Abstrakt

Záměrem práce bylo porovnání a zhodnocení čtyř metod frakcionace půdní organické hmoty (POH) u vybraných vzorků nadložních forem humusu lesních půd Šumavy anhydrogenního a hydrogenního charakteru. Jako kontrolní srovnávací vzorek byla použita černozem z oblasti Modřic u Brna.

Odzkoušeny byly dvě metody oxidace POH na mokré cestě, a to dichromanem draselným v prostředí kyseliny sírové v prvním případě a manganistanem draselným ve druhém, dále kyselá hydrolyza za použití kyseliny sírové a „klasická“ extrakce humusových látek směsným roztokem hydroxidu sodného a pyrofosfátu sodného. U vzorků byly také stanoveny vybrané ukazatele POH: celkový organický uhlík C_{org} , horkovodorozpuštěný uhlík C_{hws} , uhlík mikrobiální biomasy C_{BM} , jedenadvacetidenní biochemická spotřeba kyslíku BSK_{21} , vypočten stupeň humifikace S_H a poměr huminových kyselin k fulvokyselinám HK:FK.

U čtyř frakcionačních postupů bylo porovnáno množství zastoupení získaných jednotlivých frakcí POH a byly hodnoceny jejich vzájemné korelační vazby. Dále byly zkoumány korelační vztahy získaných frakcí s ukazateli půdního uhlíku vzorků, s jejich výměnnou půdní reakcí pH_{KCl} a výměnnou kationtovou sorpční kapacitou T .

Z výsledků analýz bylo zjištěno, že při oxidačních postupech se POH humusových horizontů chová jinak než při hydrolyze. Obě metody k sobě mají antagonistický vztah a jejich výsledky nelze zaměňovat. Nelze také obecně charakterizovat oxidovanou, hydrolyzovanou nebo extrahovanou část POH jako „labilní“ podíl bez ohledu na aplikovanou metodu frakcionace.

Metodu oxidace manganistanem draselným nelze doporučit k frakcionaci POH organogenních půd pro značnou uniformitu, malé množství získaných labilních frakcí a nízkou citlivost ve vztahu k vybraným stanoveným ukazatelům půdního uhlíku.

Hodnocení POH uvedených humusových horizontů pomocí „klasické“ alkalické extrakce není univerzálně použitelné a zvláště problematické se jeví při aplikaci na silně organogenní vzorky. Vykazuje však nejtěsnější vztahy se stanovenými ukazateli půdního uhlíku v odebraných vzorcích a také s výměnnou kationtovou sorpční kapacitou půdy. Touto metodou neextrahovatelný podíl nemusí být vždy inertní, pokud absentují vazby na minerální matici půdy a může být významný i svou sorpční schopností.

Anhydrogenní a hydrogenní podmínky tvorby a akumulace POH se projevily vyšší oxidovatelností této POH při současné vyšší míře odolnosti vůči kyselé hydrolyze i alkalické extrakci.

U všech metod s výjimkou alkalické extrakce bylo shledáno průkazné rozlišení mezi hydrogenním a anhydrogenním původem frakcí POH, nejvyšší pak u kyselé hydrolýzy. Proto při výběru metody pro charakterizaci organogenní POH je vhodné zohlednit i pedogenetický vývoj příslušného půdního profilu.

Frakcionace POH oxidací dichromanem draselným se ukázala jako nejvhodnější metoda ze čtyř odzkoušených postupů ke stanovení „labilní“ části POH – frakce F1 a F2 pozitivně koreluje se stanovenými ukazateli „labilního“ půdního uhlíku.

Z parametrů charakterizujících POH vybraných humusových horizontů se jako nejméně vhodné ukázalo stanovení množství biomasy mikroorganismů, a to kvůli vysoké variabilitě stanovených hodnot a problematicky hodnotitelným vztahům k získaným frakcím POH i k ostatním parametrům půdního uhlíku vzorků.

Ve značné části vztahů mezi frakcemi POH stanovenými jako „labilní“ nelze nalézt žádnou těsnou vazbu. Z toho plyne, že použité metody nejsou konzistentní a jimi získané frakce POH nelze dosti dobře vzájemně porovnávat. Pro hodnocení resp. charakteristiku vybraných organogenních horizontů půd Šumavy a patrně i pro jiné silně organogenní půdy nelze doporučit žádnou z metod použitých v této práci.

Klíčová slova: půdní organická hmota, frakcionace půdní organické hmoty, labilní frakce, oxidace na mokré cestě, kyselá hydrolýza, alkalická extrakce, formy nadložního humusu lesních půd

Abstract

The aim of the study was a comparison and evaluation of four soil organic matter (SOM) fractionation procedures on selected anhydrogenous and hydrogenous types of humus forms of forest soils from Šumava region. As a reference control sample was taken a sample of Chernozem from Modřice location near Brno.

There were applied two methods of wet oxidation (oxidation with sodium dichromate in the first case and oxidation with sodium permanganate in the second one), next procedure was acid hydrolysis (with sulphuric acid) and the “classic” alkaline extraction of humic substances (with solution of sodium hydroxide and sodium pyrophosphate) in the last one. Also the soil organic carbon parameters were determined: total organic carbon (C_{org}), hot-water-soluble carbon (C_{hws}), microbial biomass carbon (C_{BM}) and twenty-one-day biochemical oxygen demand (BOD_{21}), also were calculated the degree of humification (S_H) and humic acid to fulvic acid ratio (HA:FA). The sizes of the obtained fractions were compared to each other and their reciprocal correlations were evaluated. Furthermore, correlations of the obtained fractions with soil organic carbon parameters, soil reaction (pH_{KCl}) and cation-exchange capacity were investigated (T).

The results indicate that the SOM of humus horizons perform differently under wet oxidation and acid hydrolysis treatment. These two procedures are of antagonistic relation and their results cannot be substituted. Also general characterization of SOM as “labile” pool if obtained by wet oxidation, acid hydrolysis or alkaline extraction cannot be established without considering the type of treatment. The permanganate oxidation we do not recommend due to uniformity of obtained values, low size of “labile” fractions and poor relation to soil organic carbon parameters. Evaluation of SOM by “classic” alkaline extraction is not applicable in general cases, particularly questionable is application on samples with high organic content. However, its correlation with SOM parameters and cation-exchange-capacity are the closest of all methods. Alkaline extraction recalcitrant pool indicates not to be always inert, especially when mineral matrix of the soil is missing. It can provide an important sorption capacity too.

Anhydrogenous and hydrogenous conditions of SOM production and accumulation manifest higher capability to oxidation and resistance to both acid hydrolysis and alkaline extraction simultaneously. All of the applied methods with the exception of alkaline extraction clearly demonstrate differentiation between hydrogenic and anhydrogenic origin of

SOM, acid hydrolysis the best of all. Microbial biomass carbon appeared as the poorest parameter for characterization of SOM of forest soil humus forms, due to weekly reliable results and questionable evaluation of relations to both obtained fractions and other SOM parameters. Oxidation with dichromate consider to be the most suitable procedure for estimation of “labile” SOM, fractions F1 and F2 reached decent correlations with “labile” SOM parameters.

In considerable part of correlations among the “labile” SOM fractions was not found any closer relation. Consequently, the applied methods are not consistent and the SOM fractions obtained by them are hardly comparable. We do not recommend any of the used methods for characterization or evaluation of humus horizons of Šumava forest soils and probably even for any other highly organogenic soils.

Keywords: soil organic matter, fractionation of soil organic matter, labile fraction, wet oxidation, acid hydrolysis, alkaline extraction, humus forms of forest soils

Obsah

1. ÚVOD	9
2. PŘEHLED LITERATURY	11
2.1 Půdní organická hmota – pojem, význam a funkce.....	11
2.2 Složení a třídění půdní organické hmoty.....	12
2.3 Koncepce stability a rozložitelnosti POH	14
2.4 Metody frakcionace a posuzování rozložitelnosti nebo stability POH	16
2.4.1 Fyzikální metody frakcionace POH	17
2.4.1.1 Frakcionace POH na základě zrnitostního složení půdy	18
2.4.1.2 Frakcionace POH na základě rozdílné stability půdních agregátů.....	20
2.4.1.3 Frakcionace POH na základě rozdílné hustoty půdních částic (densitometrie).....	21
2.4.1.4 Frakcionace POH na základě rozdílné pevnosti vazeb s Fe oxidy v magnetickém poli.....	23
2.4.1.5 Frakcionace POH na základě rozdílného povrchového napětí půdních částic.....	23
2.4.2 Chemické metody frakcionace a rozkladu POH.....	24
2.4.2.1 Oxidační metody	24
2.4.2.2 Hydrolytické metody.....	30
2.4.2.3 Extrakční metody	32
2.4.2.4 Metody s využitím destrukce minerální složky půdy.....	38
2.4.3 Termická analýza POH.....	39
2.4.4 Biochemické metody frakcionace a stanovení rozložitelnosti (stability) POH.....	40
2.4.4.1 Stanovení rozložitelnosti POH pomocí půdní respirace a biochemické spotřeby kyslíku.....	40
2.4.4.2 Stanovení „aktivní“ POH určením množství uhlíku mikrobiální biomasy	41
2.4.5 Kombinované metody frakcionace a stanovení rozložitelnosti (stability) POH	42
2.4.5.1 Kombinace dělení dle hustoty půdních částic a chemické frakcionace	43
2.4.5.2 Kombinace zrnitostní a chemické frakcionace.....	43
2.4.6 Shrnutí metod dělení a posuzování rozložitelnosti (stability) POH	45
3. CÍL PRÁCE.....	46
4. MATERIÁL A METODIKA	47
4.1 Půdní vzorky	47
4.2 Stanovení ukazatelů půdního uhlíku	48
4.3 Metody frakcionace POH.....	49
4.4 Statistika.....	52
5. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	53
5.1 Výsledky frakcionace POH humusových horizontů půd Šumavy	54
5.2 Vztahy frakcí POH s vybranými parametry POH.....	65
5.3 Hodnocení korelačních vztahů mezi frakcemi POH a ostatními vybranými půdními vlastnostmi	68
6. ZÁVĚR.....	71
7. LITERATURA	73
8. PŘÍLOHY.....	79

1. ÚVOD

Půdní organická hmota hraje nezastupitelnou úlohu v globálních cyklech prvků (především uhlíku), má velký význam pro půdní úrodnost, poskytuje živiny pro půdní ekosystémy. Z hlediska zemědělství a produkce potravin má vliv na zdraví půdy (přítomnost potenciálně patogenních organismů) a následně na kvalitu produkovaných potravinových zdrojů (zachycování reziduí pesticidů a xenobiotik). Velký význam půdní organické hmoty potvrzuje pozornost, která je jí dlouhodobě věnována, dříve především z hlediska zemědělského, v současné době pak také v souvislosti s problematikou globálního oteplování, respektive uvolňování či ukládání (sekvestrace) atmosférického CO₂ v půdní organické hmotě. Přesto, že na téma půdní organické hmoty bylo publikováno již velké množství studií, nejsou transformační procesy organických látek v půdě dodnes jednoznačně definované a měřitelné.

Množství organických látek v půdě se celosvětově odhaduje na 1500 mil. t C, což je více než ve veškeré biomase rostlin a ostatních živých organismů a atmosféře dohromady. Pedosféra je tedy po oceánech druhým největším rezervoárem uhlíku na Zemi. Dlouhodobými pokusy je dokázáno, že obsah uhlíku lze významně ovlivnit způsobem obhospodařování půdy, avšak mechanismy jeho stabilizace v půdě, nutné pro dlouhodobou a efektivní sekvestraci CO₂, nejsou dodnes dostatečně objasněny. Badatelské úsilí v posledních letech směřuje právě k co největšímu porozumění těmto mechanismům stabilizace a přeměn půdní organické hmoty tak, aby bylo možno navrhnout vhodný management půdy, který povede k efektivní sekvestraci CO₂. Synergickým efektem by pak byly i lepší fyzikální a chemické vlastnosti půd vedoucí k jejich vyšším produkčním schopnostem a plnění dalších mimoprodukčních funkcí.

V současné době se při hodnocení stabilizace půdní organické hmoty upouští od klasické frakcionace na humusové látky (humusové kyseliny, fulvokyseliny a huminy), neboť definování těchto skupin látek je v podstatě pracovní, tedy založené na procesu jejich extrakce z půdy. Chemická charakterizace těchto frakcí je pak záležitostí velmi obtížnou a v řadě případů i selhává. Makromolekulární charakter těchto látek, který byl považován mnoho desetiletí za platný, byl nedávno zpochybněn a již z principu extrakce musí tyto frakce obsahovat i látky chemicky jednoznačně definovatelné, jako např. sacharidy, polysacharidy či aminokyseliny.

Klíčovým pojmem se tedy nyní stává stabilita půdní organické hmoty, pod kterou můžeme rozumět jak její přímou odolnost vůči metabolizaci (biochemická stabilita), tak i schopnost

dlouhodobě setrvávat v půdě a nepodléhat rychle fyzikálním a chemickým přeměnám (schopnost fyzikální protekce, tvorby organo-minerálních komplexů, odolnost vůči oxidaci, hydrolýze apod.). Ústředním bodem stabilizace půdní organické hmoty je přeměna labilních frakcí, jejichž poločas setrvání v půdě je v řádech měsíců až jednotlivých let, ve frakce stabilní, s poločasem rozkladu a přeměny v řádech desetiletí až staletí.

Zatímco v oblastech zkoumání fyzikální protekce a tvorby organo-minerálních komplexů panuje poměrně dobrá názorová shoda o jejich funkci a způsobech hodnocení, biochemickou stabilitu je mnohem obtížnější definovat- kvůli silné heterogenitě půdní organické hmoty. Existuje celá řada přístupů k hodnocení chemické stability, mezi něž patří především oxidovatelnost, hydrolyzovatelnost a rozpustnost v různých výluzích. Avšak i v každé této skupině metod existuje velká variabilita v použitých procedurách a jejich modifikacích (široká škála chemických činidel a jejich koncentrace, variace času, po který je vzorek vystaven jejich účinkům, různé teplotní podmínky). Navíc nejasný vztah mezi oxidovatelností a hydrolyzovatelností půdní organické hmoty brání v porovnávání již dosažených výsledků různých studií, neboť jejich autoři často preferují pouze jednu skupinu metod a existuje jen velmi malé množství prací, kde bylo na stejném vzorku půd použito jak oxidačních, tak hydrolytických způsobů frakcionace.

Cílem této práce je prohloubit pochopení vztahu mezi oxidačními a hydrolytickými způsoby frakcionace půdní organické hmoty, přispět k lepší schopnosti oddělit a stanovit jasně definované a relativně vnitřně homogenní frakce půdního uhlíku, a tím umožnit přesnější měření celkové dynamiky transformačních procesů organických látek v půdě.

2. PŘEHLED LITERATURY

2.1 Půdní organická hmota – pojem, význam a funkce

Přeměny organických látek v půdě patří k nejdůležitějším globálním ekologickým procesům. Přestože se půdní organické hmotě (dále jen POH) věnuje pozornost badatelů již více než dvě stě let (jedna z prvních prací např.: De Saussure, 1804), její celkové dynamice i dynamice jejích jednotlivých částí jsme dosud dostatečně neporozuměli (Sollins et al., 1996).

Již samotné jednoznačné a plné definování pojmu půdní organická hmota je problematické a vznikají rozdíly nejen mezi jednotlivými autory, nýbrž i mezi teoretickým pojetím a laboratorní praxí.

Definic půdní organické hmoty a toho, co se za ni považuje, existuje celá řada. Většinou se za ni považují všechny neživé organické látky v půdě, případně i na jejím povrchu, v různém stádiu rozkladu a přeměn, ať již v pevné fázi půdy či v půdním roztoku. Obvykle se do POH řadí i biomasa mikroorganismů, někteří autoři za POH považují i živé podzemní části rostlin, avšak jiní nikoli, v některých případech pojem POH zahrnuje i všechny živé organismy. Česká, dříve československá, pedologická tradice vychází z definice POH podle Sotákové (1982): „POH představuje složitý, heterogenní, polydisperzní soubor organických látek různého původu, s proměnlivým složením, stupněm disperzity a aktivity a tím i vztahem k ostatním složkám půdy a prostředí.“

Množství POH nacházející se v pedosféře se odhaduje až 1500 mil. t C (Batjes, 1996) a tvoří obrovský celosvětový rezervoár organického uhlíku a tím hraje důležitou roli v globálním cyklu tohoto prvku. Existence POH je produktem ale i podmínkou života na Zemi.

Půdní organická hmota přispívá k produkčním schopnostem půdy svými fyzikálními i chemickými vlastnostmi jako např. zdroj makro- i mikroprvků pro výživu rostlin, zdroj energie pro půdní mikroorganismy, zlepšování struktury půdy, příznivě ovlivňuje půdní reakci a zvyšuje iontovýměnnou kapacitu (Stevenson, 1994). V současné době se dostávají do popředí zájmů i mimoprodukční funkce půdy a to především možnost ovlivnění globálního klimata sekvestrací (uložením) uhlíku v POH (Torn et al., 2013). Další významnou environmentální funkcí POH je detoxifikace škodlivých sloučenin, které přicházejí do půdy převážně činností člověka (zachycení a rozklad reziduí pesticidů a xenobiotik, vázání těžkých kovů).

2.2 Složení a třídění půdní organické hmoty

Protože do půdy vstupují těla a tkáně odumřelých rostlin, živých tvorů i různé produkty jejich metabolismu, můžeme v půdě nalézt v podstatě veškeré organické sloučeniny vyvinuté přírodou. Navíc v půdě probíhají procesy rozkladu a opětovné syntézy, takže v ní vznikají i látky nové, tzv. specifické i nespecifické. Z kvantitativního hlediska tvoří největší část vstupního materiálu lignocelulózová biomasa rostlinného původu z opadu či posklizňových zbytků. Z hlediska celkového složení POH, tvoří obvykle značnou část vlastní humusové látky, ale najdeme zde i sacharidy a polysacharidy, peptidy, aminokyseliny, aminocukry, vosky, lignin, suberin, kutin, fyтин, organické kyseliny, tuky a fosfolipidy a řadu dalších látek.

POH je možno třídit na základě různých hledisek, např. podle funkce, kterou v půdě plní, podle formy, morfologických znaků, podle původu a způsobu vzniku, dle chemického složení a vlastností či stáří (Kononovová, 1966; Flaig et al., 1975; Alexandrovová, 1970; Stevenson 1994). Třídění a studium POH má dlouholetou tradici (Tjurin, 1937; Najmr, 1958), a také svůj vývoj ovlivněný tím, jak postupně narůstaly znalosti o POH. Přehled dřívějších způsobů členění POH uvádí Sotáková (1982). Za asi nejdůležitější způsob nahlížení na POH je nutnost rozlišovat dvě nejzákladnější skupiny organických látek v půdě, a to (Kolář et al., 2009):

- 1) primární organickou hmotu
- 2) humus

Obě složky se liší téměř ve všech výše jmenovaných hlediscích. Primární organická hmota představuje relativně čerstvý vstupní materiál s nízkou iontovýměnnou kapacitou a snadno podléhá mineralizaci. Má vysoký poměr C:N, vysoký podíl nízkomolekulárních látek (sacharidů, aminokyselin) a je obvykle lehce hydrolyzovatelná.

Naproti tomu humus či humusové látky jsou považovány za stabilní, mají důležitý podíl na celkové sorpční a iontovýměnné kapacitě půdy a jsou tvořeny složitým komplexem vysokomolekulárních sloučenin polyfenolového a aromatického charakteru, mají vyšší obsah dusíku, tvoří chelátové a organominerální vazby. Často se k těmto dvěma složkám přidává ještě třetí, představující přechodný stav mezi nimi, tedy meziprodukty rozkladu a syntézy (Stevenson, 1994).

Humusové látky (HL) se dále dělí na tzv. huminové kyseliny (HK), fulvokyseliny (FK) a huminy (dříve se ještě uváděly zvlášť hymatomelanové kyseliny a huminové kyseliny se dělily na šedé a černé). Předpokládá se, že jsou to vysokomolekulární sloučeniny polyfenolového charakteru. Studiu těchto látek bylo věnováno ohromné úsilí a přehledně jsou

uspořádány zejména v následujících monografiích (např. Stevenson, 1994; Sotáková, 1982; Piccolo, 2002), a jen podrobné zkoumání jejich chemismu by vystačilo na samostatnou studii.

Protože výše uvedené dělení humusových látek na jednotlivé frakce je primárně založeno na rozpustnosti daných látek v alkalickém a kyselém prostředí a protože se v posledních letech studia POH objevuje zcela nový náhled na porozumění humusovým látkám (Piccolo, 2002), přestávají někteří autoři používat tohoto členění, a posuzují jednotlivé frakce POH spíše podle funkce, kterou v půdě plní, podle mechanismu, kterým je daná frakce v půdě stabilizována a také podle použité metody frakcionace, která vůbec nemusí být založena na rozpustnosti daných látek. Teoreticky se tedy vyčleňují tři základní části POH (Christensen, 1996; Strosser, 2011):

Aktivní/labilní - tato část POH má nejkratší dobu obratu v půdě (od okamžitě spotřebovaných látek po dobu setrvání v měsících až několika málo letech). Slouží především jako zdroj energie pro půdní mikroorganismy, většina této frakce je mineralizována nebo inkorporována do těl mikroorganismů. Není výrazněji stabilizována, tvoří ji převážně čerstvé zbytky rostlin a živočichů, polysacharidy, sacharidy, aminokyseliny a další nízkomolekulární látky. Mnoho z těchto látek se nachází přímo v půdním roztoku, je proto také možná jejich ztráta vyplavením. Mírně až středně se podílí na tvorbě půdní struktury. Jen malá část látek této frakce je postupně stabilizována a přechází do frakce stabilní.

Stabilní/pasivní - tato část POH je stabilizována jedním nebo více stabilizačními mechanismy, z nichž převládá tvorba organominerálních vazeb. Doba obratu látek této frakce se počítá na roky až řadu desetiletí. Slouží především jako dlouhodobá zásobárna organických látek a tedy udržuje dlouhodobě půdní úrodnost. Po chemické stránce je více aromatická a kondenzovaná (podle chemického členění by sem patřila část fulvokyselin a huminové kyseliny). Má vysokou strukturotvornost a sorpční kapacitu. Její malá část je postupně uvolňována a přechází do aktivní frakce.

Inertní - tato část POH je velmi silně stabilizována, je velmi obtížné ji z půdy vůbec izolovat. Je téměř nehydrolyzovatelná, nepodílí se nijak významným způsobem ani na fyzikálním stavu půdy ani na probíhajících chemických pochodech. Předpokládá se, že je tvořena zuhelnatělými částicemi (v anglicky psané literatuře se používá termín „black carbon“) a velmi těžce rozložitelnými organickými látkami, které jsou navíc vázány v jílových minerálech. Doba jejich obratu v půdě se odhaduje na staletí až tisíciletí.

2.3 Koncepce stability a rozložitelnosti POH

Rozložitelností se rozumí poddajnost dané látky k rozkladu ze složitější látky na látku nebo látky jednodušší. Za termín opačný k pojmu rozložitelnost můžeme považovat stabilitu, tj. odolnost látky vůči působení fyzikálních, chemických a biologických podmínek způsobujících její rozklad.

Rozložitelnost organické hmoty v půdě (labilitu) můžeme posuzovat z širšího nebo užšího hlediska. V užším hledisku chápeme pojem labilita čistě chemicky, tedy jako odolnost látky vůči rozkladu danou jejím chemickým složením a v případě organických látek především její strukturou. Ze širšího hlediska chápeme labilitu organické hmoty v celé souvislosti půdních podmínek, to znamená, že na rychlosti jejího rozkladu mají vliv nejen chemické vlastnosti rozkládaných látek ale i celkové primární podmínky pro rozklad (ovlivňující především činnost mikroorganismů) jako teplota, vlhkost, půdní reakce, ale i fyzická dostupnost – organické látky mohou být například uzavřeny uvnitř půdních agregátů či se nacházet v pórech příliš malých na to, aby do nich mohly vniknout mikroorganismy, a v neposlední řadě jsou ovlivněny také tvorbou organominerálních komplexů.

Z hlediska pedochemie se tedy rozložitelností organické hmoty rozumí především rozklad organických látek vstupujících do půdy (tzv. čerstvá, primární organická hmota) z různých zdrojů (z hlediska kvantity převažuje rostlinný původ) na látky jednodušší. Charakter rozkladného procesu může být různě hluboký. Proces rozkladu organických látek může být zastaven na různých úrovních, neboť rozkládané látky mohou vstoupit do jiných procesů (metabolismus mikro a makroorganismů = mineralizace a imobilizace, syntéza a resyntéza složitějších látek = humifikace, tvorba organominerálních komplexů, ulmifikace) nebo může rozklad ustát vlivem nepříznivých podmínek (nízká teplota, nepříznivé pH, nedostatek O₂ aj.). Pokud rozklad probíhá až do stavu, kdy výsledným produktem jsou anorganické látky (voda, CO₂, NH₃, oxidy dusíku a minerální ionty, resp. soli), hovoříme o mineralizaci, jejíž poslední fáze probíhá uvnitř organismů jakožto metabolický proces dýchání.

Dříve se stabilita POH posuzovala především podle jejího chemického složení, klasickým příkladem bylo rozdělení na huminové kyseliny, fulvokyseliny a huminy, přičemž jejich stabilita byla odvozována od jejich chemického složení a struktury. Jedním z prvních autorů, kteří začali uvažovat o stabilizaci POH v jemných půdních částicích byl Körschens (1980). Ne že by byl do té doby neznámý vznik organominerálních komplexů, ale spíše se věnovala pozornost chemickým vlastnostem humusových látek. Později - při pokusech o sjednocení a

revizi dosavadních poznatků o POH - vznikl současný koncept, který rozlišuje tři hlavní mechanismy stabilizace POH (Sollins et al., 1996; Six et al., 2002):

- 1) fyzikální protekce (nemožnost přístupu mikroorganismů k POH)
- 2) interakce POH s minerální fází půdy - tvorba organominerálních komplexů
- 3) biochemická stabilita vlastních organických látek daná jejich složením a strukturou

Fyzikální protekce

POH nacházející se uvnitř makro i mikroagregátů je chráněna před rozkladem z několika důvodů. Jedním z nich je vlastní fyzická nedostupnost prostor uvnitř agregátů, neboť mikropóry v nich a mezi nimi mají menší velikost než samotné buňky mikroorganismů (van Veen a Kuikman, 1990). Dalším důvodem je omezená difúze kyslíku, bez něhož mineralizace nemůže probíhat, dále také celkově omezená difúze látek v roztoku a povrchové napětí, které omezuje pronikání extracelulárních enzymů. Mikroagregace chrání látky, které jinak slouží jako snadno rozložitelný substrát, typický je tento jev např. pro polysacharidy, které díky své lepivosti na svůj povrch nabalují jemné minerální částičky, takže vzniklý agregát má nedostupné organické jádro s neprostupným minerálním obalem (Sollins et al., 1996).

Tvorba organominerálních vazeb

Studium tohoto stabilizačního mechanismu POH má delší tradici (Körschens, 1980, 1990). Pozitivní korelaci mezi zastoupením jemných zrnitostních frakcí a obsahem C v nich vázaného dokládá celá řada prací a o důležitosti tohoto stabilizačního mechanismu není pochyb (Schulten a Leinweber, 2000). Jako potvrzení toho, že uvedené korelace se zakládají skutečně na kauzálním vztahu, je možno uvést fakt, že při přechodu přirozeného ekosystému na intenzívně obdělávaný obvykle klesá obsah POH kvůli zvýšené mineralizaci, ovšem podíl C vázaného v jemných zrnitostních frakcích na celkovém obsahu C_{org} v tomto případě stoupá (Kleber et al., 2007).

Biochemická stabilita (recalcitrance)

Biochemická stabilita je dána v první řadě samotným charakterem vstupního materiálu a dále je pak ovlivňována biochemickými procesy v půdě, především kondenzací a komplexními reakcemi (Six et al., 2002). Ve většině přirozených ekosystémů i obhospodařovaných půd tvoří hlavní část vstupního substrátu materiál rostlinného původu a to z velké části lignocelulózový komplex. Rozložitelnost vstupního substrátu je možno hodnotit z různých hledisek, kromě základního poměru C:N se uplatňuje např. poměr

lignin:N, kdy rychlost rozkladu klesá při vyšší hodnotě tohoto poměru, nebo má vliv také obsah taninu (Anderson a Paul, 1984). Základním procesem při rozkladu POH je oddělení ligninu od celulózy; obě složky mají jak jiné schéma rozkladu (na rozklad ligninu se specializují saprotrofní houby, které disponují enzymy jako Mn-peroxidáza, lakáza, lignin-peroxidáza, zatímco celulózou disponuje širší spektrum mikroorganismů) a i okolní podmínky působí na jejich rozklad rozdílně. Zatímco vyšší obsah N v substrátu způsobuje rychlejší rozklad celulózy, jeho účinek u ligninu je přímo opačný. Rozložitelnost celulózy je ovlivněna mírou její krystaličnosti a právě mírou inkrustace ligninem (Oades a Waters, 1991).

Biochemickou stabilitu POH je možno na molekulární úrovni vyjádřit chemickým složením (hlavně poměrem C:N a dále přítomností některých kationtů výrazně ovlivňujících celkovou reaktivitu výsledné sloučeniny – Ca^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}), dále zastoupením jednotlivých funkčních skupin a molekulární konformací (Sollins et al., 1996).

Mikroorganismy rozkládají POH selektivně - preferují snáze rozložitelné látky, pokud jsou přítomny v dostatečném množství. Tím se v půdě hromadí látky více odolné rozkladu a stoupá jejich stáří.

Moderní instrumentální techniky jako např. ^{13}C -NMR umožňují zjistit relativní zastoupení jednotlivých funkčních skupin (alkylů, *o*-alkylů, karboxylů, aromatických jader) v POH. Ukazuje se, že značná část POH je tvořena sloučeninami s alifatickými řetězci, přičemž se předpokládá, že jsou tyto řetězce tvořeny přímými zbytky rostlinných a houbových tkání a nejsou výsledkem stabilizačních procesů v půdě. U aromatických jader se předpokládá jejich ligninový a polyfenolový původ, ale nemusí tomu tak být vždy, jak se ukázalo přidáním glukózy značené uhlíkem ^{13}C do půdního vzorku. Po inkubaci se v tomto případě objevilo zvýšené množství ^{13}C nejprve v *o*-alkylech, následované aromatickými jádry a až nakonec v alkylech. Aromatická jádra s vyšším obsahem ^{13}C musela být tedy čerstvým produktem mikrobiální syntézy (Baldock a Nelson, 2000).

Za mikrobiálně odolné jsou tradičně považovány humusové látky - HK, FK, ale i metabolické produkty mikroorganismů mohou vykazovat podobnou míru odolnosti, především melaniny a některé bakteriální polysacharidy (Sollins et al., 1996).

2.4 Metody frakcionace a posuzování rozložitelnosti nebo stability POH

Na výše uvedené teoretické vymezení jednotlivých složek POH by mělo navazovat i jejich kvantitativní experimentální stanovení. Různorodost definic POH odráží i problémy, které

nastávají již při odběru a analytickém zpracování vzorků půd. Při odběru vzorků půdy záleží, zda je do ní zahrnut i případný rostlinný opad či živé kořínky (tato skutečnost do jisté míry závisí na odběrném místě a účelu výzkumu). Složení POH ve vzorku dále ovlivňuje průběh jeho zpracování – transport, vysoušení a prosévání. Během transportu lze nechtěné procesy omezit či zcela utlumit řádným uzavřením a chlazením vzorků. Při prosévání (strojovém i manuálním) se většinou odstraňují hrubé rostlinné zbytky (von Lützow et al., 2007).

K laboratorním analýzám se obvykle používá na vzduchu vysušená půda. Při tomto procesu určitá část POH mineralizuje a je tedy ještě před samotným začátkem experimentu ochuzena o nejlabilnější složky. Toho se lze v některých případech, pokud to analýza umožňuje, vyvarovat použitím čerstvých vzorků (např. pro stanovení půdní respirace).

Během transportu a vysoušení vzorku dochází též k odumírání původně živého mezoedafonu, takže se uhlík biomasy těchto organismů stává součástí POH.

Samostatnou kapitolu pak tvoří mikroedafon. Jeho změny se projevují ve dvou směrech. Za prvé je to již výše zmíněná mineralizace nejlabilnější složky POH a za druhé část původně volné POH přechází do biomasy těchto mikroorganismů během manipulace se vzorkem při jeho přípravách k analýze (transport, sušení). Též dochází ke změně druhového složení společenstva, což je však pro kvantitativní analýzu nepodstatné.

Následující přehled uvádí hlavní metody dělení a zjišťování jednotlivých složek POH (frakcionaci a detekci). Metody vycházejí z různých hledisek a v přehledu jsou rozděleny podle převažujícího principu stanovení.

2.4.1 Fyzikální metody frakcionace POH

Frakcionace POH pomocí fyzikálních metod vychází z předpokladu, že agregace půdních částic a jejich prostorové uspořádání hraje klíčovou roli v dynamice POH, neboť prostorová dostupnost POH je prvním předpokladem pro její rozklad (Maia et al., 2013).

Fyzikální frakcionace zahrnuje celou řadu postupů na různých technologických úrovních od prosévání (za sucha i mokra), rozplavování, přes ultrazvukovou dispergaci až po separaci usazováním částic rozdílné hustoty (Cambardella a Elliot, 1994; Christensen, 2001).

Metody fyzikální frakcionace v přísném smyslu této definice zahrnují primárně separaci organominerálních komplexů v celém půdním vzorku na základě velikosti půdních částic a jejich hustoty, přičemž půdní agregáty jsou zanedbávány (Christensen, 1996).

Organominerální komplexy jsou následně rozrušeny disagregací (disperzí), přičemž efektivita této operace je kritická pro oba tyto principy frakcionace.

Jednoduché mechanické třepací metody a chemické disperze se nedoporučují pro izolaci předem nerozrušených organominerálních komplexů. Většina badatelů v této oblasti spoléhá na užití ultrazvuku dokončujícího úplnou dispergaci. V řadě prací se třepání kombinuje s užitím ultrazvuku (Balesdent et al., 1998), avšak Christensen (2001) ve své práci dokazuje, že v jen relativně malém počtu případů se podařilo půdu plně dispergovat.

Chenu a Plante (2006) kvantifikovali rozdíl mezi samotnými půdními částicemi a agregáty podobné velikosti v prachové frakci, neboť se domnívají, že se tyto dvě skupiny liší ve schopnosti stabilizovat POH. Současně potvrdili pomocí transmisní elektronové mikroskopie, že většina mikroagregátů v jílové frakci ($< 2 \mu\text{m}$) zůstává neporušena po aplikaci fyzikálních disperzních metod. Z toho vyvozují závěr, že na pravé organominerální komplexy musí být při těchto metodách nahlíženo pouze konceptuálně, protože energie nutná k rozrušení výše zmíněných mikroagregátů by vedla k rozpadu nejen původně celistvých organominerálních částic, ale i částic čistě minerálních, což by samozřejmě vedlo k nesprávným závěrům.

2.4.1.1 Frakcionace POH na základě zrnitostního složení půdy

Tato metoda je založena na předpokladu, že minerální částice různé velikosti jsou různého minerálního původu a složení a proto reagují s POH odlišným způsobem (Bruun et al., 2010). V kategorii středního a jemného písku dominuje především křemen, který působí na POH jen v omezené míře, zatímco částice prachu a jílu se vyznačují velkou povrchovou plochou, která umožňuje výrazně vyšší sorpci POH, což je považováno za významný stabilizační mechanismus, který zabraňuje mikroorganismům v přístupu k tomuto zdroji energie a tím i rozkladu této frakce POH (Kaiser a Guggenberger, 2003; Kleber et al., 2007). Bruun et al. (2010) upozorňují, že však neexistuje žádná jednoznačná a definitivní hranice mezi jednotlivými zrnitostními kategoriemi a přechod od větších částic obsahujících převážně křemen k jílovým minerálům je tedy spíše plynulý nežli diskrétní.

Maia et al. (2013) dokládají, že jednotlivé zrnitostní frakce mohou obsahovat složky s velkým rozpětím času potřebného k rozkladu. Tento rozpor a nejednoznačnost ve stanovení stáří jednotlivých frakcí by bylo možné odstranit kontinuální separací s přesnějším rozlišením zrnitostních frakcí, anebo využít k třídění další doplňující parametr.

V oblasti frakcionace koloidních částic se též užívá celá řada metod, které mohou kontinuálně navazovat na oddělování jemných prachových a jílových frakcí. Měření distribuce POH v celém spektru zrnitostních frakcí půdy tak vyžaduje kombinaci metod pro odlišné zrnitostní kategorie. Teoreticky je možné zvýšit rozlišení mezi frakcemi užitím většího počtu sít, technicky však lze uplatnit jen určitý omezený počet sít v jedné soustavě (ulpívání částí vzorku na každém síti) (Bruun et al., 2010).

Prosévání na sítích lze užít do velikosti částic přibližně 20 - 40 μm , v závislosti na půdním druhu a typu. Největší množství POH se však nachází ve frakcích ještě menších částic (Christensen, 1996). K roztrídění těchto menších částic je možno použít filtraci či ultrafiltraci, s jejichž pomocí lze dosáhnout i izolace koloidů až do velikosti 100 μm - 1 nm. Aby se zabránilo interakci koloidů s povrchem membrány, případně jejich koagulace, doporučuje se použít tangenciální filtraci (Bruun et al., 2010).

Sedimentace ve vodní suspenzi, centrifugace či ultracentrifugace může být též použita pro izolaci velmi malých částic, nevýhodou těchto metod je však to, že působí současně na principu jak velikosti částic tak i jejich hustoty. Sedimentace se obvykle provádí na bázi hustoměrného měření podle Stokesova vzorce, přičemž jednotlivé frakce jsou ze suspenze postupně odebírány. Pro separaci dostatečného počtu konzistentních velikostních frakcí bude však vhodné aplikovat některé nové metody.

Jednou z takových metod je Split Flow Thin Cell (SPLITT) – technika frakcionace vyvinutá původně pro rozdělení heterogenních materiálů a směsí do homogenních jednotek, kterou na studium POH aplikovali Kiem a Kögel-Knabner (2003). Další možností představuje Size Exclusion Chromatography and Capillary Hydrodynamic Fractionation (DosRamos a Silebi, 1990), kterou je možno aplikovat na částice pod 0,1 μm . Velmi slibnou metodou se ukazuje také Field Flow Fractionation (FFF) (Fraunhofer and Winter, 2004), která využívá nucený tok kapaliny plochým kanálkem skrze indukované pole některé fyzikální síly (obvykle se užívá odstředivé síly vložením průtokového kanálku do centrifugy). Částice v kapalině procházející tímto polem se usazují podél stěn kanálku, přičemž malé částice podléhají Braunovu pohybu snáze než ty větší, a tím difundují proti působení pole zpět do roztoku dříve, a jsou pak zachycovány. Bruun et al. (2010) shledávají velký potenciál této metody při frakcionaci jílových a koloidních částic po předchozí separaci větších frakcí pomocí SPLITT.

2.4.1.2 Frakcionace POH na základě rozdílné stability půdních agregátů

POH je možné separovat i v závislosti na jejím vztahu k půdním agregátům. Volná POH představuje samostatné organické částičky volně přístupné pro půdní mikroorganismy, zatímco POH vázaná či vstřebaná v půdních agregátech je před rozkladem chráněná. Předpokládá se, že frakce volné POH představuje aktivní (labilní) část POH, podléhající rychlé výměně látek a koloběhu uhlíku, zatímco POH v makroagregátech zastupuje frakci střednědobou a konečně POH vázaná v mikroagregátech frakci pasivní (von Lützow et al., 2007).

Postupy pro izolace jednotlivých skupin agregátů jsou obdobné jako při oddělování zrnitostních frakcí, používá se prosévání za sucha i mokra a různé varianty rozplavování ve vodě. Podle Oades a Waterse (1991) jsou agregáty menší než 20 μm velmi stabilní a lze je rozrušit pouze pomocí ultrazvuku, avšak podle Chenu a Planteho (2006) agregáty menší než 2 μm přetrvávají i po této operaci. Six et al. (2000) navrhuje dokonce celý propracovaný systém prosévání a třepání za mokra, s jehož pomocí lze identifikovat jednotlivé složky POH s odlišnou úrovní stabilizace, přičemž dochází k úplnému rozpadu makroagregátů, zatímco mikroagregáty (53 – 250 μm) zůstávají nedotčeny. Odstupňování jednotlivých izolovaných frakcí podle kvalitativních parametrů (množství C_{org} , chemické složení, hydrofobicita, množství mikrobiální biomasy atd.) je pak možno stanovit po manuálním zpracování (drcení, drobení) nebo pomocí metody pneumatického drobení půdní agregátů (Bruun et al., 2010).

U většiny povrchových horizontů půd mírného pásma se agregáty obvykle nerozplavují přímo na primární půdní částice, ale pouze na menší jednotky. To znamená, že existuje určité hierarchické uspořádání agregátů (Oades a Waters, 1991). V takovýchto půdách makroagregáty (> 250 μm) často obsahují více POH než mikroagregáty (< 250 μm), neboť makroagregáty obsahují ony mikroagregáty obohacené navíc o POH, která slouží jako spojovací agens (Cambardella a Elliot, 1994; Jastrow et al., 1996; Six et al., 2000). Téměř 90 % POH v povrchových horizontech půd bývá obsaženo v agregátech, z čehož 20 - 40 % se nachází v mikroagregátech (Jastrow et al., 1996). McLaughlan a Hobbie (2004) dokládají pomocí rostlinných zbytků značených ^{14}C , že stupeň rozloženosti stoupá s klesajícím rozměrem agregátů. Dále se zmenšováním velikosti agregátů klesá i poměr C:N z asi 20:1 u makroagregátů na přibližně 8:1 u mikroagregátů (Gregorich et al., 2003). Při sledování rozdělení izotopů ^{13}C a ^{15}N mezi mikro a makroagregáty během rozkladu pšeničné slámy v polních podmínkách, nastává absorbování POH v mikroagregátech až po té, co byla POH vstřebána v makroagregátech. Doba obratu POH v makroagregátech je odhadována v rozmezí

15 – 50 let, pro POH v mikroagregátech se tento údaj pohybuje mezi 100 – 300 lety (John et al., 2005; Six et al., 2002).

Von Lützow et al. (2007) vyvozují, že stabilizační procesy, které se uplatňují v různých úrovních agregace, směřují od biogenních procesů u makroagregátů k abiotickým u mikroagregátů. Biogenní stabilizační procesy považují spíše za přechodné a tak obsah POH v aktivní nebo středně rozložitelné frakci lze ovlivnit způsobem obhospodařování půdy, zatímco abiotickou stabilizaci ovlivňují spíše dlouhodobě působící půdotvorné procesy jako například zvětrávání jílových minerálů nebo tvorba sesquioxidů.

Za rozdíly v poločase rozkladu mezi POH v makro a mikroagregátech může být odpovědná též rozdílná chemická rozložitelnost (McLauchlan a Hobbie, 2004). V důsledku těchto zjištění je nutno konstatovat, že jednotlivé frakce POH izolované na základě frakcionace agregátů nejsou stabilizovány čistě jedním procesem a nejsou tedy zcela funkčně jednotné, avšak tyto metody frakcionace mohou být užitečné jako předpříprava pro získání homogennějších frakcí před aplikací dalších analýz, zvláště těch zabývajících se chemickou rozložitelností (Six et al., 2002; Maia et al., 2013).

2.4.1.3 Frakcionace POH na základě rozdílné hustoty půdních částic (densitometrie)

Frakcionace na základě rozdílné hustoty (měrné hmotnosti) půdních částic se používá pro izolaci POH, která není pevně spojena s půdními minerály. Takto definovaná (teoreticky) či separovaná (prakticky) část se označuje jako tzv. lehká frakce (LF). Část POH vázaná v organominerálních komplexech se považuje za tzv. těžkou frakci. Princip této metody je založen na rozdílnosti hustoty látek organických (obvykle do $1,6 \text{ g.cm}^{-3}$) a minerálních (průměrně okolo $2,6 \text{ g.cm}^{-3}$). Frakce mezi $1,6 - 2,0 \text{ g.cm}^{-3}$ je označována jako přechodná s POH částečně vázanou na minerály. Lehká frakce obsahuje převážně částičky rostlinných zbytků, stejně jako tzv. „partikulované organické látky“, označované v anglicky psané literatuře zkratkou POM (Particulate Organic Matter). POM může být izolována pouze podle velikosti (Gregorich et al., 2006) či kombinací metod hustoměrných a prosévání (Balesdent et al., 1998). Pojmy LF a POM jsou často používány jako synonyma (Strosser, 2011). Ačkoli POM a LF jsou si v určitých ohledech podobné, nejsou tyto frakce vzájemně ekvivalentní. Liší se např. v obsahu C, N nebo *o*-alkylových skupin, a proto by neměly být zaměňovány (von Lützow et al., 2007).

Frakcionace na základě hustoty vychází historicky z použití organických rozpouštědel (tetrabrommethan $C_2H_2Br_4$ – 2,96 $g.cm^{-3}$; bromoform $CHBr_3$, 2,88 $g.cm^{-3}$; tetrachlormetan CCl_4 1,59 $g.cm^{-3}$), avšak tyto toxické halogenderiváty byly postupem času nahrazeny vodnými roztoky anorganických solí ($MgSO_4$, $ZnBr_2$, NaI či v poslední době velmi oblíbený $Na_6(H_2W_{12}O_{40})$ sodium polytungstate (SPT). V současné době se nejčastěji používá SPT díky možnosti získat s jeho pomocí roztoky o širokém rozpětí hustot (1,0 – 3,1 $g.cm^{-3}$) (Six et al., 2002).

Nejobvyklejší metodou densitometrické frakcionace je centrifugace vzorků v roztoku SPT, přičemž sekvenčním opakováním je možné separovat až osm frakcí odstupňovaných podle hustoty (Sollins et al., 2006, 2009). Protože sekvenční centrifugace je velmi zdlouhavá, nabízí se možnost využít centrifugaci se vzrůstajícím gradientem hustoty (Density Gradient Centrifugation = DGC). Tato metoda sice ještě není široce používána pro frakcionaci POH, ale je celkem běžnou záležitostí v půdní mikrobiologii při oddělování mikroorganismů od původního půdního substrátu (Stevens a Jaykus, 2004).

Velikost LF silně kolísá, von Lützow et al. (2007) uvádějí obsah POH v LF v širokém rozmezí 10 – 70 % z C_{org} v půdách mírného pásma. U těžkých frakcí POH byl zjištěn poměr C:N nižší než u LF. Vyšší obsah ^{13}C a ^{15}N svědčí o vyšším stupni rozkladu POH v těžších frakcích vázaných s organominerálními komplexy (Baisden et al., 2002). Oproti tomu lehká frakce sestává hlavně ze směsi relativně čerstvých rostlinných zbytků s ještě rozeznatelnou strukturou původních tkání a z více rozloženého materiálu, jak usuzuje ze sníženého obsahu sacharidů a nezměněné úrovně aminokyselin Poirier et al. (2005). Tito autoři dále nachází nižší obsah ligninu v těžké frakci, zatímco obsah monosacharidů v těžké i lehké frakci je stejný, což odráží aktivní stabilizaci sacharidů. Podobné chemické složení frakcí různé hustoty na základě infračervené spektroskopie uvádějí i Maia et al. (2013).

Síla vazby mezi POH a minerální fází se mění kontinuálně, takže nelze stanovit jednoznačnou hodnotu hustoty, která by definitivně dělila volnou POH od minerálně vázané. Vázanost POH s minerální fází je spíše závislostí spojitou nežli diskrétní (Christensen, 1996).

Baisden et al. (2002) uvádějí dobu setrvání v půdě pro POH v lehké frakci travnatých porostů mírných pásů méně než 10 let. Pomalejší dobu obratu pro organominerální frakce může též způsobovat chemická nerozložitelnost a aktivní stabilizace vstřebáním do agregátů.

Obvykle je LF považována za dobrý indikátor aktivní části POH, avšak Skjemstad et al. (1999) upozorňují, že LF může obsahovat zuhelnatělé organické látky a proto by neměla být používána pro studium stáří POH založeném na množství přítomného ^{13}C , tedy alespoň ne u půd, které podléhají přirozeným cyklům požárů rostlinných společenstev.

Je zřejmé, že i přes rozdíly v modifikaci jednotlivých metod hustoměrné frakcionace a uváděnou různou dobu obratu izolovaných frakcí, stabilita POH vzrůstá od nejlabilnější LF přes středně stabilní frakce až k nejstabilnějším těžkým frakcím, ve kterých je POH silně vázána na minerální složku půdy.

2.4.1.4 Frakcionace POH na základě rozdílné pevnosti vazeb s Fe oxidy v magnetickém poli (High - Gradient Magnetic Separation - HGMS)

Do popředí zájmu se v posledních letech dostává vztah mezi POH a oxidy železa, neboť Fe oxidy dokáží vytvořit velmi pevné spojení s POH díky koordinačně kovalentní vazbě a poskytují velkou povrchovou plochu v kyselých půdách (Kleber et al., 2007). Jílové frakce s rozdílným obsahem a krystalinitou Fe oxidů mohou být separovány na základě jejich odlišné reakce na různě silné magnetické pole (Shang a Tiessen, 2000).

Při této metodě se ponechá půdní suspenze proudit trubicí vyloženou ocelovou vatou za působení regulovaného magnetického pole tak, že lehce zmagnetizovatelné částice jsou přitom zachyceny. Nastavením zvyšující se intenzity magnetického pole lze rozdělit průchozí substrát na více frakcí s odstupňovanými magnetickými vlastnostmi (Bruun et al., 2010).

Ve studii Shanga a Tiessena (2000) byly u nejvíce zmagnetizovatelných frakcí zjištěny jen nízké koncentrace POH, ačkoli obsah Fe byl nejvyšší. Tento fakt vysvětlili autoři vysokým stupněm krystalinity, při které mají Fe oxidy jen malou sorpční schopnost. Středně magnetické frakce měly velký potenciál stabilizovat POH, pravděpodobně díky nižší krystalinitě Fe oxidů. Rozdíly v poměru C:N mezi frakcemi naznačují, že magnetické frakce obsahují více stabilizované POH, zatímco rozložená POH (převážně mikrobiálního původu) je obsažena ve frakcích nemagnetických. Z radiokarbonové analýzy ^{14}C bylo odhadnuto průměrné stáří středně magnetizovaných frakcí (s nejvyšším obsahem POH) na 100 let.

Von Lützwow et al. (2007) konstatují, že vysoce krystalické a magnetické frakce mají sice nízkou sorpční schopnost, ale jejich vazba s POH je velmi stabilní a bohužel zatím existuje jen málo prací využívajících k hodnocení stability POH tuto metodu.

2.4.1.5 Frakcionace POH na základě rozdílného povrchového napětí půdních částic

Půdní organická hmota vázaná na minerální částice mění povrchové napětí těchto částic. Pokud se mění funkční skupiny na povrchu těchto částic během rozkladu POH, musí se měnit

i povrchové napětí celých částic. Bruun et al. (2010) navrhuje využít tuto skutečnost ke studiu stupně rozložení POH. K frakcionaci organominerálních částic na základě rozdílu v povrchovém napětí doporučují využít elektroforézu, při které se dříve začínají separovat částice s vyšším povrchovým napětím a zeta potenciálem.

2.4.2 Chemické metody frakcionace a rozkladu POH

Chemická frakcionace POH z hlediska stanovení labilních a stabilních látek zahrnuje celou škálu metod. Používají se různé postupy a chemická činidla. Do chemických metod můžeme zařadit oxidaci na mokré cestě, oxidaci UV zářením, hydrolyzu, extrakci horkou a studenou vodou či roztokem solí nebo organickými rozpouštědly, destrukci minerální složky půdy a částečně termickou analýzu.

Účinnost většiny chemických metod je ovlivněna fyzikálním stavem vzorku, především jeho úpravou - mletím či drcením. Zatímco v našich podmínkách se obvykle upravuje půdní vzorek pro frakcionaci POH tak, aby všechny jeho částice prošly sítím o velikosti ok 0,25 mm, řada zahraničních autorů nechává vzorky projít sítím o velikosti ok pouze 0,5 mm i více a výjimkou nebývá ani použití běžné jemnozeme pod 2 mm. Tuto okolnost je proto třeba brát v úvahu při porovnávání „výtěžnosti“ čili množství zoxidované, hydrolyzované či extrahované POH u jednotlivých metod a autorů.

2.4.2.1 Oxidační metody

K chemické oxidaci POH na mokré cestě se používá široké spektrum oxidačních činidel v různých koncentracích či oxidačních silách. Mezi hojně používaná oxidovadla patří H_2O_2 , $KMnO_4$, $K_2Cr_2O_7$, $Na_2S_2O_8$ a $NaClO$. Používání oxidace k určení labilních a stabilních frakcí POH vychází z předpokladu, že při prvotním (mimobuněčném) rozkladu POH v půdě se uplatňují především oxidativní enzymy mikroorganismů (Blair et al., 1995; Tirol-Padre a Ladha, 2004). Stabilita jednotlivých frakcí POH je odstupňována nárůstem oxidační účinnosti použitých roztoků (obvykle postupným zvyšováním koncentrace oxidovadla, případně doprovázeném zvýšením teploty) nebo prodlužující se dobou, po kterou se nechá reakce probíhat. Slabším koncentracím nebo v kratším čase podléhají oxidaci látky labilnější, stabilní zůstávají v původním vzorku po ukončení reakce (Mikutta et al., 2005, von Lützow et al., 2007).

Některé oxidační metody se specializují na izolaci zuhelnatělé POH (black carbon) (Schmidt et al., 1999; Simpson a Hatcher, 2004), která je považována za produkt hoření (přírodní požáry, spad sazí v průmyslových oblastech) a je biologicky nerozložitelná.

Je celkem dobře potvrzeno, že oxidaci podléhají čerstvější složky POH, zatímco starší zůstávají nezoxidované (Kleber et al., 2007; Eusterhues et al., 2005). Avšak pokusy ověřit, že tyto labilní frakce také dobře reagují na změny vstupu POH do půdy a různá další opatření, jak se obvykle předpokládá, nejsou zase až tolik úspěšné (Balesdent et al., 1998; Plante et al., 2004). Podle Bruuna et al. (2008) však oxidační metody nevytváří frakce, které by odpovídaly konceptuálně definovaným frakcím z hlediska funkce, kterou by měly v půdě plnit (labilní = energetický zdroj pro mikroorganismy, stabilní = iontovýměnná kapacita) a uvedení autoři dále považují rozdělení na pouhé dvě nebo tři frakce za nedostačující.

Oxidace POH pomocí manganistanu draselného $KMnO_4$

Frakcionace POH oxidací roztokem $KMnO_4$ byla představena prací Loginowa et al. (1987), kteří použili roztok o koncentracích 0,033 a 0,333 M. Blair et al. (1995) modifikovali metodu za použití pouze 333 mM $KMnO_4$ a vypracovali „C management index“ pro hodnocení kvality POH na základě změn v poměru labilních a stabilních frakcí. Používání této metody se poměrně rozšířilo (Tirol-Padre a Ladha, 2004).

Blair et al. (1995) uvádějí množství oxidovaného uhlíku v rozmezí 13 – 28 % z C_{org} . Avšak cukry, aminokyseliny a další organické sloučeniny, které jsou obvykle považovány za velmi lehce přístupný substrát pro půdní mikroedafon, reagují s roztokem $KMnO_4$ jen pozvolna, zatímco látky obsahující hůře stravitelné glykolové skupiny reagují rychle (von Lützow et al., 2007). Manganistan draselný také neoxiduje přednostně celulózu, avšak zoxidovaná frakce velmi dobře koreluje s obsahem ligninu (Tirol-Padre a Ladha, 2004). Dříve byla prokázána vysoká míra korelace mezi C_{PM} (*PerManganate Carbon* = uhlík oxidovaný $KMnO_4$) a C_{BM} (*Microbial Biomass Carbon* = uhlík mikrobiální biomasy), případně POM (Blair et al., 1995). S tím ovšem nesouhlasí Tirol-Padre a Ladha (2004), kteří uvedené korelace shledávají pouze velmi nízké a také zjišťují celkovou nízkou závislost hodnoty C_{PM} na C_{org} . Navíc již z dřívějšíka je známé využití $KMnO_4$ k oxidaci aromatických sloučenin a huminových látek (Stevenson, 1994), což vede spíše k závěru, že tato metoda není příliš vhodná ke stanovení skutečně labilních forem POH.

Frakcionace POH oxidací peroxidem vodíku H₂O₂

U oxidace POH pomocí H₂O₂ se předpokládá stanovení labilní (aktivní) části POH, kterou jsou v půdě schopny rozložit extracelulární enzymy (von Lützow et al., 2007). Ve srovnání s oxidací jinými činidly (např. NaClO, Na₂S₂O₈) je použití H₂O₂ méně efektivní ve svrchních (A) půdních horizontech kvůli jeho slabému disperznímu účinku na jílové mikroagregáty (Mikutta et al., 2005). Ve spodnějších horizontech (B_w a C), které se již nevyznačují tak vysokou mírou agregace, je účinek H₂O₂ vyšší než třeba Na₂S₂O₈ (Eusterhues et al., 2005). Množství POH, které není H₂O₂ schopen zoxidovat stoupá se zvyšující se hloubkou v půdním profilu a dosahuje podílu v rozmezí 25 – 58 % z C_{org} u C horizontu půd smíšených a listnatých lesů (kambisolů) (von Lützow et al., 2007). Účinnost oxidace výrazně stoupá se zmenšujícími se půdními částicemi, u zrnitostní frakce menší než 20 μm až na 90 % z C_{org} (Leifeld a Kögel-Knabner, 2001).

Resistentní vůči oxidaci H₂O₂ jsou složky POH převážně polymethylenového charakteru, pravděpodobně odvozené od přírodních vosků a dalších ochranných látek vyšších rostlin (Eusterhues et al., 2005; Leifeld a Kögel-Knabner, 2001). Výsledné množství zoxidované POH koreluje s výskytem funkčních skupin, které podle celkové reaktivity uvádí Peyton (1993) v následujícím pořadí: aromatická jádra > –CH₂ > –CO > –COOH. Dále byl u peroxidem vodíku neoxidovatelné části POH zjištěn vyšší obsah dusíkatých sloučenin a pyrogenních materiálů jako lignit, dřevěné uhlí nebo saze (Schmidt et al., 1999). Také POH výrazně organických horizontů jako například nadložních forem humusu lesních půd či humusových horizontů půd minerálních, jež se vyznačují vysokým obsahem čerstvého rostlinného materiálu převážně alifatického charakteru, je značně rezistentní vůči oxidaci H₂O₂ (Eusterhues et al., 2005), i když hromadění tohoto materiálu je způsobeno spíše nepříznivými podmínkami pro činnost půdních mikroorganismů, nežli jeho chemickou odolností (Kolář et al., 2009).

Na druhé straně Eusterhues et al. (2007) pomocí radiokarbonového datování ¹⁴C uvádí, že frakce rezistentní vůči H₂O₂ vykazovala o 500 – 3000 let vyšší stáří než byl průměr pro celý půdní vzorek. Tato hodnota stoupá s hloubkou půdy z asi 1000 let v horizontech A na 3250 – 5260 let v horizontech C. Podobné závěry uvádí i Theng (2012), což by naznačovalo, že ne vždy H₂O₂ oxiduje přednostně mladší (čerstvější) část POH.

Pro tuto nejednoznačnost a další výše uvedené diskutabilní body nemůžeme frakci oxidovanou peroxidem vodíku považovat za dobře měřitelnou stabilní část POH odpovídající teoretické koncepci.

Frakcionace POH pomocí oxidace peroxodisulfátem sodným Na₂S₂O₈

Peroxodisulfát sodný je považován za účinné agens pro oxidaci POH s vyloučením vlivu jílových minerálů a Fe oxidů. Účinnost Na₂S₂O₈ je považována za vyšší než H₂O₂ i než NaClO (Menegatti et al., 1999). Přesto Eusterhues et al. (2005) a Keim a Kögel-Knabner (2003) uvádějí rozsah oxidované části POH podobný jako u NaClO, tedy 16 – 99 %. Nízký účinek oxidace Na₂S₂O₈ byl pozorován u kyselých půd bohatých na sekundární minerály (Eusterhues et al., 2005). Velikost resistantní frakce se pro změnu pohybuje mezi 1 a 40 % z C_{org} v povrchových horizontech a stoupá až na 80 % v horizontech hlubších. Signifikantní pozitivní korelace mezi obsahem Fe extrahovaného metodou DCB (= Dithionite-Citrate-Bicarbona, směs dithioničitanu, citranu a hydrogenuhličitanu) a rezistentními frakcemi potvrzuje, že Na₂S₂O₈ oxiduje přednostně frakce POH bez vazby na minerální podíl. Také je uváděn vyšší obsah dlouhých alifatických řetězců v oxidované frakci (Zimmermann et al., 2007).

Protože při oxidaci pomocí Na₂S₂O₈ se používá NaHCO₃ jako pufrční činidlo, přítomnost přidaného uhlíku znemožňuje provádět přímé datování stáří POH na základě ¹⁴C. Avšak z negativní korelace mezi aktivitou ¹⁴C u původních půdních vzorků a velikostí resistantních frakcí lze usuzovat, že stejně jako v případě H₂O₂ oxiduje Na₂S₂O₈ mladší (čerstvější) části POH (Eusterhues et al., 2005).

Von Lützwow et al. (2007) považují oxidaci Na₂S₂O₈ za slibnou metodu ke kvalitativní charakterizaci vazeb mezi POH a minerálním podílem půdy.

Frakcionace POH pomocí oxidace chlornanem sodným NaClO

Chlornan sodný je oxidovadlo se širokou škálou uplatnění i mimo analýzu POH (čištění pitných vod od organických nečistot, desinfekční prostředek pro domácnosti i průmyslové použití). Patrně první, kdo použil NaClO k oxidaci POH, byl Anderson (1963), který jej využil k odstranění organických látek při studiu mineralogie jílu. Pro oxidaci POH je v posledních desetiletích jedním z nejčastěji používaných činidel (např.: Kaiser a Guggenberger, 2003; Mikutta et al., 2005; Siregar et al., 2005).

Výše uvedení autoři uvádějí rozpětí oxidovatelného množství POH u rozdílných půdních typů a druhů v hodnotách 26 – 96 % z C_{org}. U lehké frakce je oxidovatelný podíl obvykle vyšší, až 77 – 95 % (Kaiser a Guggenberger, 2003). Velikost resistantní frakce je pak analogická a například Siregar et al. (2005) uvádí její velikost v rozsahu 28 – 88 %. Účinek oxidace NaClO (podobně jako u Na₂S₂O₈) výrazně negativně koreluje s obsahem Fe a Al oxidů a dalších amorfních složek půdy, což znamená, že použití těchto oxidačních činidel lépe

postihuje labilní frakci POH (Mikutta et al., 2005). Avšak i čistě či téměř čistě organické materiály jako rašelina (ulmifikovaná POH) či izolované humusové kyseliny do značné míry odolávají oxidaci NaClO (Chefetz et al., 2002). Jiné studie (Simpson a Hatcher, 2004) poukazují na to, že NaClO přednostně oxiduje lignin, avšak jiné aromatické sloučeniny (silně kondenzované), zůstávají vcelku nedotčeny. V neoxidovatelné frakci v tomto případě údajně dominují též alkylové skupiny.

Radiokarbonové studie ^{14}C (Kleber et al., 2007) opět potvrzují vyšší stáří rezistentních frakcí (o 75 – 1880 let) oproti půdě v původním stavu a stejně tak stoupající stáří od horizontů A (čerstvá POH) směrem k horizontům C - až 2500 let (Kaiser a Guggenberger, 2003). Potvrzují tedy, že NaClO oxiduje spíše labilnější frakce POH.

Kvůli někdy vzájemnému protirečení si výše uvedených studií nelze jednoznačně rozhodnout, zda jsou frakce odolávající oxidaci stabilní díky zoxidování látek skutečně chemicky stabilních, či v jaké míře se na stabilizaci podílí vazby POH s minerální částí půdy.

Frakcionace POH pomocí UV fotooxidace

Oxidaci POH působením vysokoenergetického UV záření využili poprvé Skjemstad et al. (1993) jako metodu k rozdělení POH na labilní část (podléhající oxidaci při UV ozařování) a stabilní (nepodléhající oxidaci UV). Metoda využívá skutečnosti, že při ozařování zdrojem UV záření se z organických látek uvolňují volné radikály a současně dochází k ionizaci atomů kyslíku v okolí vzorku; tyto radikály pak vzájemně reagují. Protože životnost kyslíkových radikálů ve vodním roztoku je velmi krátká - asi 2 μs (Rabek a Randy, 1975) a tudíž je velmi omezena jejich difúze v porézních materiálech jako např. v půdních agregátech, je UV fotooxidace možná pouze na povrchu těchto agregátů. Tím je dosaženo možnosti oxidovat pouze látky bezprostředně přístupné pro půdní mikroorganismy, zatímco pro ně fyzicky nedostupné organické látky zůstávají neporušeny. Zatímco Skjemstad et al. (1993) pozorovali odstranění většiny POH bez ohledu na její rozdílnou chemickou stavbu, Bruun et al. (2008) zjistili, že rychleji se oxiduje starší POH nežli čerstvý rostlinný opad. Tento rozdíl zdůvodnili vyšším obsahem ligninu u čerstvé POH, přičemž lignin UV fotooxidaci odolává. I Skjemstad et al. později (1999) uvádějí za použití ^{14}C analýzy obdobné výsledky jako pro jiné oxidační postupy, tj. vyšší stáří rezistentní frakce, resp. její horší oxidovatelnost.

Skutečnost, že i přes vysokou účinnost UV oxidace (okolo 70 % C z C_{org}) mohou ve vzorku přetrvat i látky běžně metabolicky přístupné pro mikroorganismy jako např. peptidy, podporuje předpoklad, že jsou tyto neoxidované látky pro mikroorganismy nepřístupné prostorově (POH v mikroagregátech pod 20 μm a fylosilikátech či organické

makromolekuly obsahující zuhelnatělé (spálené) částičky fotooxidaci odolávají). Není tak zcela možné pomocí této metody rozlišit, zda je POH stabilizována vlastní chemickou odolností nebo jinými mechanismy (von Lützow et al., 2007).

Frakcionace POH pomocí oxidace dichromanem draselným $K_2Cr_2O_7$

Oxidace dichromanem draselným v prostředí kyseliny sírové představuje klasický způsob stanovení celkového obsahu POH resp. celkového uhlíku C_{org} . Chan et al. (2001) modifikovali původní metodu Walkley-Blacka (1934) (která v našich podmínkách představuje podobný etalon jako u nás používaná modifikovaná metoda dle Tjurina, 1951) rozšířením o další tři frakce aplikací více poměrů kyseliny a oxidovadla (kromě základního poměru 2:1 přidali poměr 1:1 a 0,5:1 a celkový neoxidovaný zbytek). Přesněji je tato metoda popsána v části 4.2. Celkem je tedy POH rozdělena do čtyř frakcí odstupňovaných dle odolnosti vůči působení oxidovadla. Zatímco jiní autoři (Majumder et al., 2008) zpětně zjednodušují metodu sdružením prvních dvou labilnějších frakcí a obdobně dvou stabilnějších frakce do jedné a spokojí se tak s dvoustupňovým rozdělením POH, existují naopak i snahy o co nejvyšší rozlišení frakcí - např. Partyka a Hamkalo (2010) dosahují počtu až 11 frakcí. Snahy o co nejplynulejší frakcionaci POH jsou podporovány i z teoretického hlediska (Bruun et al., 2010).

Velkým nedostatkem dichromanové oxidace je málo prozkoumaný charakter látek jednotlivých frakcí, neboť zatím nebyla provedena žádná spektroskopická analýza u této metody a totéž se týká radiokarbonového datování stáří získaných frakcí. Nicméně se tato metoda stává poměrně populární, což dokládá počet prací, které ji aplikují (Ghosh et al., 2010; Loss et al., 2009; Majumder et al., 2008; Wendling et al., 2010). K jejímu uplatnění dochází nejen v tradičních zájmech pedologie, ale i ve vědách o klimatu (Carvalo et al., 2010).

Alternativa této metody byla vyzkoušena i na ZF JU, kdy však docházelo jak ke změně koncentrace kyseliny sírové tak dichromanu draselného (Strosser, 2008). V tomto případě byla zjištěna lineární závislost množství zoxidovaných frakcí na koncentraci oxidovadla. Výraznější odlišnost byla shledána pouze u nejlabilnější frakce, která reagovala s roztokem velmi ochotně, a pro jejíž přesnější stanovení by bylo vhodné koncentraci oxidovadla ještě snížit.

2.4.2.2 Hydrolytické metody

Jedním z často používaných přístupů k hodnocení kvality POH - a v zahraničí již tradičním prostředkem - je její hydrolýza různě koncentrovanými roztoky silných minerálních kyselin, nejčastěji HCl (Paul et al., 2006) a H₂SO₄ (Rovira et al., 2012; Shirato a Yokozawa, 2006). Tato metoda vychází z principu, že organické látky jsou v různé míře poddajné kyselé hydrolýze v závislosti na jejich chemickém složení a především na struktuře, jak ukázal již Waksman (1938), který zjistil, že zatímco k hydrolýze hemicelulózy postačuje 2% HCl, krystalická celulóza je hydrolyzovatelná až za pomoci minimálně 80% H₂SO₄.

Metabolické procesy mikro i makroorganismů v první fázi trávení (v případě mikroorganismů již při mimotělním působení extracelulárních enzymů) vyžadují rozštěpení původního substrátu na menší jednoty, obvykle za pomoci enzymatické a kyselé hydrolýzy. Z tohoto faktu vycházejí hydrolytické metody hodnocení kvality POH, neboť látka, která bude vyžadovat ke svému rozštěpení použití koncentrovanější kyseliny či účinnějších podmínek hydrolýzy (teplota, doba působení) bude pravděpodobně i hůře přístupná pro metabolismus. Enzymatické hydrolytické štěpení má ovšem složitější mechanismus účinku, různá společenstva mikroorganismů disponují velkou škálou nejrůznějších enzymů, v reálných půdních podmínkách se uplatňují nejen hydrolytické enzymy, ale i oxidační, a tak použití jediné minerální kyseliny k celkovému hodnocení POH je pouze velmi přibližnou simulací (Rovira et al., 2010).

Princip klasického provedení kyselé hydrolýzy spočívá v tom, že se na vzorek půdy nechá působit určité množství minerální kyseliny za stanovených podmínek (čas, teplota), po té se oddělí supernatant s hydrolyzovanými látkami od zbytku půdy obvykle centrifugací a/nebo filtrací a v nehydrolyzovaném zbytku se stanoví obsah uhlíku. Modernější metody využívají možnost stanovit obsah uhlíku přímo v extrahovaném roztoku spalováním na přístrojích TOC (Rovira et al., 2012; Shirato a Yokozawa, 2006), což lze využít k vytvoření sekvenčních postupů s více než dvěma frakcemi (postupným zvyšováním účinnosti hydrolýzy a odebráním supernatantu u téhož vzorku).

Předpokládá se však, že snadno metabolizovatelné látky jako jednoduché cukry nebo aminokyseliny jsou rozpustné v slabých roztocích H₂SO₄ již za studena. Celulóza a ligninocelulóзовý materiál již musí být po několik hodin zahřívány v H₂SO₄ a odolné přírodní polymery jako lignin, suberin, kutin a některé vosky působení kyseliny odolávají (Shirato a Yokozawa, 2006). Při kyselé hydrolýze vzorku půdy dochází i k uvolnění polyvalentních kationtů z jílových koloidů a mikroagregátů (Oades a Waters, 1991).

Kyselá hydrolyza tak slouží především k hodnocení stability POH v chemickém významu tohoto slova, zatímco prostorovou přístupnost či vazbu s minerální fází půdy do značné míry zanedbává (von Lützow et al., 2007).

Většina metod kyselé hydrolyzy POH využívá roztoků HCl a H₂SO₄ o různých koncentracích, přičemž v dřívějších pracích byla použita pouze jedna koncentrace (např. Anderson a Paul, 1984; Leavitt et al., 1996), tzn., že POH byla rozdělena pouze na dvě frakce – hydrolyzovatelnou a nehydrolyzovatelnou (rezistentní). Později se začalo využívat víceúrovňových sekvenčních metod (Rovira et al., 2010; Shirato a Yokozawa, 2006), kde jsou jednotlivé frakce odstupňovány jak zvyšováním koncentrace kyseliny, tak změnou dalších podmínek při analýze - jako je zvýšení teploty, doby expozice apod.

Účinnost kyselé hydrolyzy je podle Paula et al. (1997) 30 – 87 % POH hydrolyzovatelné v 6 M HCl, Stevenson (1994) uvádí rozmezí 5 – 45 % za použití různě koncentrované H₂SO₄. Paul et al. (2006) dokládají pokles podílu POH u zbytku nehydrolyzovatelného kyselinou chlorovodíkovou z průměrných 50 % v povrchových horizontech na asi 30 % ve větší hloubce půdního profilu.

Podle radiokarbonového datování (Paul et al., 1997) jsou frakce POH hydrolyzovatelné HCl o přibližně 1500 let mladší než nehydrolyzovatelný zbytek. Rozdíly jsou ještě větší mezi horizonty jednotlivých půd, kdy u povrchu (0 - 30 cm) je stáří POH v rozmezí 3540 let pro hydrolyzované látky a 7600 let pro rezistentní, zatímco v hloubce 90 – 110 cm dosahuje 5420 let pro hydrolyzované a až 9035 ± 440 let pro nehydrolyzovaný zbytek.

Avšak jiné práce toto poměrně „staré“ datování zpochybňují. Například Anderson a Paul (1984) odhadují dobu obratu jimi stanovené rezistentní frakce v množství 26 % z C_{org} na pouhých cca 15 let. Paul et al. (2006) zase nachází významnou pozitivní korelaci mezi rezistentní frakcí a celkovým obsahem POH a navíc sledávají hydrolyzovatelnou frakci citlivou na agrotechnické zásahy a způsob obhospodařování, takže její velikost lze v krátké době ovlivnit. Balesdent et al. (1998) po aplikaci sekvenční hydrolyzy (H₂SO₄ nejprve za studena a poté za zvýšené teploty) na půdních vzorcích odebraných po změně vegetace z rostlin typu C3 na C4 konstatují, že kyselá hydrolyza neumožňuje rozlišení látek, které setrvávají v půdě déle od látek mladších.

Po shrnutí výše uvedených tvrzení nelze jednoznačně rozhodnout, nakolik spolehlivě je labilní část POH kyselou hydrolyzou stanovena a zda tato hydrolyzovatelná část odpovídá funkci a vymezení s konceptuálně definované labilní/aktivní POH.

Protože i hydrolyzovatelná frakce dosahuje značného stáří v hlubších vrstvách půdy, Paul et al. (1997) usuzují na stabilizaci těchto látek dalšími mechanismy, jako jsou

organominerální vazby, sorpce polyvalentními kationty či prostorová (fyzická) nedostupnost. I další práce (Kiem a Kögel-Knabner, 2003; Leifeld a Fuhrer, 2005) potvrzují, že látky hydrolyzovatelné za běžných okolností - jako polysacharidy, proteiny a aminokyseliny mohou být stabilizované ve frakci jemných půdních částic.

Z výše uvedených faktů vyplývá, že kyselá hydrolyza se vyznačuje reakční nespecifitou, hydrolyzuje i POH částečně stabilizovanou jinými mechanismy (než jen vlastní chemickou odolností) a na druhé straně zase ponechává v půdě látky za normálních podmínek lehce hydrolyzovatelné. Potom je možno souhlasit se závěry některých dřívějších prací (Balesdent et al., 1998; Trumbore et al., 1989; Trumbore a Zheng, 1996), že totiž kyselá hydrolyza nerozděluje POH na funkčně homogenní frakce, pokud je aplikována na půdní vzorek jako celek. Pokud ovšem kyselé hydrolyze předchází některý způsob fyzikální frakcionace (např. izolace POM nebo LF) dokáže být metodou velmi přínosnou. To již dokládají novější práce využívající kombinaci těchto metod (Rovira et al., 2012).

2.4.2.3 Extrakční metody

Frakcionace POH extrakcí vodou

Rozpustnost ve vodném roztoku je jedním z nejdůležitějších předpokladů přímé dostupnosti POH pro mikrobiologický rozklad (Körschens et al., 1990; Schulz, 1990, Kalbitz et al., 2003). Pro extrakci tzv. vodorozpustného uhlíku existuje celá řada metod a jejich modifikací, z principiálního hlediska můžeme však rozdělit všechny metody na dvě základní skupiny, a to na extrakci POH z půdního vzorku, který byl odebrán na pokusném místě a extrakce se provádí až v laboratoři, nebo na odběr vzorku půdního roztoku *in situ* a následné laboratorní stanovení obsahu C v tomto roztoku. Zatímco v prvním případě jde o stanovení potenciálu půdy z hlediska rozpustnosti POH ve vodním roztoku, v druhé metodě je zájem o zjištění aktuálního obsahu organických látek v půdním roztoku, který více odráží momentální půdní podmínky (von Lützow et al., 2007; Zsolnay, 1996).

První skupinu extrakce můžeme rozdělit ještě na dvě hlavní podskupiny podle podmínky, která nejvýrazněji ovlivňuje množství a charakter extrahovaných látek, a to na extrakci studenou vodou a na extrakci horkou vodou. Zde stojí za zmínku ještě označování těchto výluhů v literatuře. V české literatuře se nejčastěji používá indexované označení C_{cws} pro extrakci studenou a C_{hws} pro extrakci horkou vodou, metoda *in situ* (odběr půdního roztoku) se nepoužívá. V anglicky psané literatuře se obvykle užívá zkratk WEOC = Water

Extractable Organic Carbon všeobecně pro extrakci studenou vodou, HWEOC = Hot Water Extractable Organic Carbon pro metodu extrakce horkou vodou a DOC = Dissolved Organic Carbon pro metodu přímého odběru půdního roztoku.

Přestože vodorozpustný uhlík představuje velmi malou část z celkové POH a to 0,05 – 0,4 % u orných půd a 0,25 – 2 % u půd lesních (Haynes, 2005), mají extrakční podmínky výrazný vliv na charakter extrahovaných látek a u odběru roztoku *in situ* hraje významnou roli momentální půdní vlhkost (koncentrace C látek v roztoku) a další aktuální půdní podmínky (pH, teplota, nasycení sorpčního komplexu). Přehled vlivu jednotlivých parametrů extrakce na kvalitu a kvantitu extraktantů podávají Jones a Willett (2005) a Zsolnay (1996).

Extrakce POH studenou vodou (C_{cws})

Pokud se při extrakci POH použije pouze studená voda, je obsah rozpuštěného uhlíku logicky nižší než v extraktu C_{hws} . Typická koncentrace C_{cws} v půdě klesá s hloubkou z přibližně 5 – 100 mg/l u povrchu k 0,5 – 5 mg/l v horizontech B a C (Rovira et al., 2010).

C_{cws} může obsahovat nízkomolekulární látky i koloidní částice. Von Lützow et al. (2007) definují C_{cws} jako veškeré organické látky pocházející z POH menší než 0,45 μm nacházející se v roztoku získaném jak extrakcí, tak odběrem *in situ*. Někteří autoři využívají poměr hexozy k pentoze v C_{cws} jako indikátor mikrobiálního původu sacharidů (Haynes, 2005).

Ačkoli se již déle předpokládá (Körschens et al., 1990), že C_{cws} představuje labilní frakci POH a obsahuje látky snadno přístupné pro mikroorganismy, ukazuje se, že jen asi 10 – 40 % C_{cws} je biodegradabilních v respirometrickém testu (Haynes, 2005). Podobně John et al. (2005) v pokusech se změnou vegetačního pokryvu C3/C4 ukazují, že až 70 % C_{cws} pochází ze staré POH. Stabilita C_{cws} extrahovaného z materiálu o nízkém stupni humifikace (např. z čerstvých rostlinných zbytků) je nízká s dobou obratu v řádu týdnů až měsíců, zatímco C_{cws} získaný ze silně humifikovaných minerálních půd či naopak z tzv. ulmifikované POH rašelinového původu vykazuje nízkou rozložitelnost s odhadovaným časem obratu v desítkách let (Kalbitz et al., 2003).

Extrakce POH horkou vodou (horkovodorozpustný uhlík C_{hws})

Zatímco (C_{cws}) získaný extrakcí za studena bývá často nerozlišován od uhlíku rozpuštěných látek (DOC), označení C_{hws} bývá uváděno důrazněji, neboť účinky zvýšené teploty extrakce výrazně ovlivňují vlastnosti extraktantu. Von Lützow et al. (2007) řadí tuto metodu dokonce spíše mezi hydrolytické než mezi metody extrakční.

Určení C_{hws} se často používá jako metoda stanovení potenciálně mikrobiálně dostupné POH a tento výluh by měl tedy obsahovat snadno rozložitelné organické látky (Körschens et al., 1990; Schulz 1990, 2002; Sparling et al., 1998). Obsah C_{hws} se pohybuje v rozmezí přibližně 1 – 5 % z C_{org} a je tedy asi 18 krát vyšší než u extrakce studenou vodou (Haynes, 2005; Leinweber et al., 1995). Z hlediska provedení extrakce se nejčastěji užívá teplota varu destilované vody za normálního tlaku (100 °C, např. Körschens et al., 1990), Ghani et al. (2003) extrahují pouze při 80 °C, zatímco Balesdent et al. (1998) zvýšením teploty na 120 °C v autoklávu dosahují až o 30 % většího výtěžku rozpustných látek). Pro lepší uvolnění organických látek z agregátů se někdy přidávají do roztoku soli (např. $MgSO_4$) (Körschens et al., 1990).

Pro charakterizaci látek obsažených v C_{hws} využili Leinweber et al. (1995) ^{13}C -NMR spektroskopii a ionizační pyrolytickou spektrometrii a zjistili, že z velké části je C_{hws} složen ze sacharidů a dusíkatých látek, a to zejména aminokyselin a amidů pravděpodobně pocházejících z tkání mikroorganismů. Protože většina těchto látek vykazovala vytékání již při relativně nízkých teplotách pyrolýzy, Leinweber et al. (1995) usuzují, že tyto látky nejsou sorbovány minerální fází půdy či humusovými látkami. V laboratorních inkubačních testech se prokázala i vyšší biodegradabilita C_{hws} (až 80%) nežli u C_{cws} (pouze 50 – 60%). Avšak průběh rozkladu C_{hws} v inkubačním testu více odpovídal modelu II. řádu, kdy pomalá frakce vykazovala dobu obratu v měsících, což značí, že C_{hws} nepředstavuje homogenní frakci. Ale i přesto se považuje C_{hws} za užitečný indikátor odhadu lehce rozložitelné POH s vyšší jistotou stanovení než C_{cws} (Körschens et al., 1990).

Při vytváření matematických modelů popisujících dynamiku celkové POH i jejich jednotlivých frakcí se začalo přihlížet k jako prvnímu experimentálně stanovitelnému parametru právě k C_{cws} a C_{hws} . Avšak ani přes značné úsilí výzkumu věnovanému těmto frakcím POH není zcela jasná jejich charakteristika, komplexnost a působení jednotlivých parametrů, které na ně mají vliv, je obtížně kvantifikovatelné. Zatím není dost dobře možné parametricky stanovit zdroje C_{cws} a C_{hws} a jejich osud v půdě (Kalbitz et al., 2003). I přes relativně malé množství v půdě je význam těchto frakcí pro celkovou dynamiku POH nepopíratelný, bohužel výše uvedená nehomogenita brání jejich definování jako funkčních frakcí POH s jasně definovanými časy obratu.

Extrakce POH alkalickým roztokem pyrofosforečnanu sodného ($NaOH + Na_4P_2O_7$)

Metoda frakcionace POH směsným roztokem $NaOH + Na_4P_2O_7 \cdot 12 H_2O$ je nejstarší z používaných extrakčních postupů. Historicky je dána pedologickou tradicí a jako jediná

z uváděných metod má svou přímou souvztažnost s teoreticky definovanými stabilnějšími frakcemi POH – fulvokyselinami, huminovými kyselinami a huminy (Kubát et al., 2008), i když tyto pojmy jsou definovány především na základě dalšího frakcionačního postupu (rozpuštěnost či nerozpuštěnost v alkáliích a kyselinách). Přestože se dnes objevují hlasy volající po revizi znalostí o humusových látkách (Piccolo, 2002), je tato metoda stále široce používaná, neboť extrahuje poměrně značné množství POH a vzájemný poměr frakcí je citlivý k půdnímu typu (Stevenson, 1994; Olk, 2006). U českých půd však Kubát et al. (2008) nenašli tak těsný vztah humusových látek k půdnímu typu, vztah těchto látek k půdnímu druhu a nadmořské výšce byl shledán prakticky nevýznamný, z čehož tyto autoři dospívají k závěru, že množství a kvalita POH je spíše funkcí stanoviště.

Novější modifikace pracovních postupů frakcionace humusových látek (HL) se snaží před samotným stanovením HL nejprve o extrakci vodorozpuštěné POH (C_{cws} a C_{hws}) a současným oddělením makroskopické POH (LF a POM) pomocí prosévání či flotace a také s oddělením organických látek rostlinného či mikrobiologického původu a nehumusového charakteru. Humusové látky jsou stabilizovány tzv. humifikačním procesem a jsou považovány za chemicky stabilní, mikrobiálně jen velmi těžce až vůbec nepřístupné (zvláště huminy) a v konceptuálním schématu představují pasivní frakci POH (Baldock a Nelson, 2000; Kubát et al., 2008).

Během extrakce POH roztokem hydroxidu sodného bez přídavku pyrofosfátu jsou vodíkové můstky, které ji stabilizují, nahrazeny ionty Na^+ , což způsobuje vyšší rozpustnost extrahovaných složek a také přeskupení některých vazeb (Piccolo, 2002). Desorpce POH je dále podporována kompeticí mezi hydroxylovými anionty a záporně nabitými funkčními skupinami extrahovaných látek o adsorpční plochy v minerální fázi a také disociací některých funkčních skupin vyvolanou změnou pH. Vazby s vícevalentními kationty však NaOH neovlivňuje, ty mohou být narušeny pouze přidáním $Na_4P_2O_7$ (Schnitzer a Schuppli, 1989).

Extrakce samotným $Na_4P_2O_7$ při pH = 7 je doporučována k získání frakce POH vázané na jílové minerály vazbami s vícevalentními kationty a stabilizované tvorbou chelátových komplexů bez odstranění Fe a Al z původních matric v minerálech (Stevenson, 1994).

Hydroxidem sodným bez přídavku pyrofosfátu se extrahuje až 80 % POH, zatímco samotným $Na_4P_2O_7$ pouze okolo 30 % (Kononovová, 1966; Stevenson, 1994). Protože samotný 0,5 M NaOH extrahuje více C a N z hrubších zrnitostních frakcí než z jemnějších, doporučují jej Schnitzer a Schuppli (1989) jako metodu separující volnou POH, složením podobnou LF. Piccolo (2002) naznačuje, že roztok NaOH extrahuje více vysokomolekulárních látek než roztok $Na_4P_2O_7$ při pH = 7, zatímco roztokem pyrofosfátu

sodného je extrahováno větší množství POH z jemnějších částic. To by mohlo potvrzovat, že roztokem $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ je extrahována POH stabilizovaná v komplexních sloučeninách (Schnitzer a Schuppli, 1989). Nejčastěji se však pro extrakci humusových látek používá směsný roztok 0,1 M NaOH + 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (Stevenson, 1994).

V jílovitých půdách Anderson a Paul (1984) stanovili radiokarbonovou analýzou nejvyšší stáří u aromatických huminových kyselin (2820 ± 45 let), u huminů 2495 ± 45 a u POH nehydrolyzovatelné v 6 M HCl na 2455 ± 45 let. Avšak doba obratu huminů a huminových kyselin byla vyšší ve srovnání s nehydrolyzovaným zbytkem (54 %, 30 – 55 %, respektive 26 % za 15 let), což by naznačovalo nižší stabilitu humusových látek, než se obecně předpokládá. Naproti tomu Balesdent et al. (1998) považují výluh humusových látek za materiál nevhodný pro radiokarbonovou analýzu na základě předpokladu, že přirozený výskyt obohacených izotopů uhlíku ve všech frakcích bude obdobný, neboť lze očekávat podobnou kinetiku příjmu čerstvých organických látek i degradaci všech frakcí HL (HK, FK a huminů).

POH extrahovaná roztokem NaOH + $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ vykazuje přibližně o 100 let vyšší stáří než POH extrahovaná samotným NaOH při stejném pH. Toto zjištění zdůrazňuje důležitost amorfních minerálů při stabilizaci POH (Balesdent et al., 1998). Odhad poločasů rozkladu HL z alkalických extraktů je velmi variabilní a liší se v závislosti na půdním typu (Wattel-Koekkoek a Buurman, 2004).

Alkalický extrakt POH je výrazně nehomogenní frakcí, neboť extrakční proces postihuje současně jak organominerální interakce, tak i vnitřní a vzájemné vazby organických látek. Ionty Na^+ se také uplatňují při flokulaci jílových minerálů a způsobují jejich disagregaci (von Lützow et al., 2007). Sekvenováním procedury na první fázi extrakce roztokem NaOH a poté až $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ umožňuje účinněji izolovat POH stabilizovanou silnými organominerálními vazbami v jílových mikrostrukturách, avšak extrakce pyrofosfátem sodným neposkytuje žádné informace o tom, jakou měrou se jednotlivé kovové ionty podílejí na stabilizaci POH. Není také přesněji kvantifikováno množství Na pyrofosfátu potřebné k plnému nahrazení všech polyvalentních vazebných míst, zvláště u půd s vysokým obsahem amorfních minerálů (Stevenson, 1994).

Výše uvedená fakta lze shrnout konstatováním, že podobně jako jinými chemickými metodami frakcionace, i alkalickou extrakcí je postihováno současně více stabilizačních mechanismů POH, a metoda tak neposkytuje rozdělení na homogenní frakce s jednoznačně příslušnou funkcí a dobou setrvání v půdě. Na druhou stranu je výhodou této metody široká základna poznatků (i když někdy protichůdných) získaná během řady desetiletí při zkoumání

humusových látek a cenná často dohledatelnou souvislostí s půdními druhy a typy a jejich produkční i mimoprodukční hodnotou (Horáček et al., 2014).

Frakcionace POH pomocí extrakce organickými rozpouštědly

Historicky existují i pokusy extrahovat různé frakce POH organickými rozpouštědly (Hayes, 1985). Alkany a vyšší mastné kyseliny, které jsou považovány za zvláště nerozložitelný materiál, mohou být z půdy extrahovány n-hexanem (Derenne a Largeau, 2001). Chloroform je zase doporučován pro extrakci mastných kyselin, vyšších alkoholů, vosků a esterů (Schnitzer a Schuppli, 1989). Novější studie pracují se zlepšenými a částečně automatizovanými postupy využívajícími Soxhletovu aparaturu či zrychlenou dichlorometan/metanolovou extrakci pro izolaci lipidů z POH (Wiesenberg et al., 2004).

Odhaduje se, že organické látky s alkylovými skupinami, charakteristické nerozpustností v organických rozpouštědlech, jako např. kutin či suberin, a také tuky a vosky tvoří asi 25 % v POH povrchových horizontů půd. Samotné tuky, jejichž obsah bývá v rozmezí 2 – 6 % z C_{org} , jsou považovány za velmi důležitý prvek při stabilizaci POH (Baldock et al., 2004), neboť se podílejí na různých stabilizačních mechanismech, a to například tím, že obalují snadněji rozložitelné látky nebo je uzavírají do agregátů, a tak je chrání před rozkladem. Samotný tukový obal je značně stabilní díky vazbám C – C, povrchové hydrofobitě a nízké reaktivitě s chemickým prostředím půdy (von Lützow et al., 2007).

Avšak pokusy využívající změny vegetačního pokryvu z rostlin typu C3 na C4 ukazují, že doba obratu tukové frakce činí pouze 60 let ve srovnání s 250 lety pro celkovou POH (Wiesenberg et al., 2004).

Wattel-Koekkoek a Buurman (2004) zjistili pozitivní korelaci mezi obsahem alkylových skupin a aktivitou ^{14}C , což opět dokazuje, že vysoký obsah alkylových skupin je spojen s relativně čerstvými frakcemi POH. Tento výsledek odráží ale také to, že alifatické části POH jsou velmi heterogenní. Pro charakterizaci jednotlivých frakcí POH s odlišnými funkčními skupinami považují von Lützow et al. (2007) za nezbytné sledovat rozdělení jednotlivých typů látek za pomoci izotopického značení pro každou skupinu zvlášť.

2.4.2.4 Metody s využitím destrukce minerální složky půdy

Destrukce minerální složky půdy pomocí kyseliny fluorovodíkové HF

Kyselina fluorovodíková je používána k izolaci POH vázané na minerální složku půdy díky své schopnosti rozpouštět hydratované křemičité minerály a komplexní sloučeniny Fe a Al (Stevenson, 1994). V hlubších půdních horizontech lze po aplikaci HF získat až 80 % POH (Eusterhues et al., 2005), což znamená, že jde o uvolnění organominerálních vazeb a může tedy být tato metoda používána k separaci minerálně vázané POH od volné (Gelinas et al., 2001).

Při destrukci těžkých frakcí půdy ($> 2 \text{ g.cm}^{-3}$) pomocí HF zjistili Eusterhues et al. (2007), že rozpuštění minerálně vázané POH není úplné a že toto rozpuštěné množství silně závisí na půdním typu a odběrové hloubce půdního profilu. Dále bylo zjištěno, že velmi silný organický povlak na jílových minerálech u některých půd neumožňuje kontakt HF s minerálem uvnitř a tím brání rozpuštění minerální fáze a uvolnění této vázané POH (Eusterhues et al., 2007).

Významnou nevýhodou aplikace HF je skutečnost, že ve značné míře ovlivňuje a mění složení získané POH. Ukazuje se, že ztráty organického uhlíku jsou 10 až 30 % z C_{org} (Rumpel et al., 2006), přičemž vyšší ztráty jsou pozorovány u vzorků s převahou organického podílu jako je rostlinný opad, humusové horizonty lesních půd nebo výrazně humusové povrchové horizonty půd minerálních. U těchto vzorků však dochází k menšímu ovlivnění struktury a složení POH, zatímco u hlubších horizontů s převahou minerálního podílu, jako např. u podzolového horizontu Bs, dochází přednostně k rozpouštění labilních *o*-alkylových skupin a karboxylových skupin (Gelinas et al., 2001; Schmidt a Gleixner, 2005). V kyselých lesních půdách mění HF složení POH dokonce podstatně; se vzrůstající hloubkou stoupá obohacení rozpustné frakce o *o*-alkyly, alkyly a karbonyly ve srovnání s frakcí rezistentní vůči HF (Eusterhues et al., 2007).

Gelinas et al. (2001) předpokládají, že POH v podílu rozpuštěném v HF sestává z vlastních vodorozpustných, hydrofilních látek, které jsou před rozkladem chráněny adsorpcí v minerální fázi půdy.

Radiokarbonovou metodou ^{14}C se odhaduje, že POH izolovaná HF v horizontech A je o 100 – 200 let starší než frakce rezistentní. Naproti tomu v hlubších horizontech kyselých půd je rozpustná frakce o 75 – 3200 let mladší než frakce rezistentní vůči HF. Celkově se odhaduje nejvyšší stáří frakce POH izolované HF na 3500 let, zatímco frakce označené jako rezistentní na 5800 let (Eusterhues et al., 2007). Tato data (především rozdíl ve stáří izolované a rezistentní frakce POH) se do značné míry podobají údajům uváděným pro frakce

hydrolyzovatelné HCl případně H₂SO₄, takže lze předpokládat, že při aplikaci HF se uplatňuje ve významné míře i hydrolyza organické hmoty, nejen destrukce minerální fáze. Eusterhues et al. (2007) přisuzují vyšší stáří nedestruované frakce vyšší míře prostorové nedostupnosti POH v hlubších horizontech, což poukazuje na význam abiotické mikroagregace při stabilizaci POH (POH uzavřenou v agregátech považují za nerozpustnou v HF).

Uvedená fakta lze shrnout konstatováním, že složení, hydrofobicita a stáří půdní organické hmoty datované ¹⁴C je u frakce izolované HF ve značné míře závislé na pedogenezi zkoumaných půd. Pro výběr vhodnějších podmínek, kdy by bylo výhodné použít HF k uvolnění minerálně vázané POH, je nutné lépe charakterizovat POH obsaženou jak v izolované tak v rezistentní frakci u vybraných a definovaných půdních typů a horizontů. Tato charakterizace by byla také nezbytná v případě, kdy bychom chtěli použít tuto metodu jako aproximaci funkční (resp. minerálně vázané) frakce POH (von Lützow et al., 2007). Před samotnou aplikací HF by však bylo nutné odstranit ze vzorku volnou POH, neboť tato volná POH musí být přítomná v extraktu HF, což se jistě odráží i v protikladných tvrzeních o stáří frakcí POH rozpuštěných v HF po destrukci minerální složky půdy.

2.4.3 Termická analýza POH

Při termické analýze je vzorek půdy zahříván za určitého teplotního režimu (obvykle s lineárním vzrůstem teploty), přičemž je měřena a zaznamenávána určitá fyzikální veličina - nejčastěji hmotnost zkoumaného vzorku - tedy termogravimetrická analýza TGA. Během zahřívání přecházejí postupně jednotlivé složky vzorku z pevného stavu do plynného, takže hmotnost vzorku se s rostoucí teplotou snižuje. Složení vznikajících plynů je následně možné detekovat různými, nejčastěji spektroskopickými metodami (Schulten a Leinweber, 1999; Plante et al., 2009). Minimálně je však nutné detekovat alespoň uvolňovaný uhlík, aby bylo možno odlišit reakci organických látek od anorganického uhlíku v půdě. Problém při odlišení může nastat při teplotách nad 550 °C, pokud vzorek obsahuje významnější množství uhličitánů, které se při této teplotě začínají rozkládat.

Z pohledu termické analýzy je možno považovat za labilní látky ty, které vytěkají při nižších teplotách, zatímco pro termický rozklad stabilních látek je nutné dosáhnout vyšších teplot, a tedy vyšších energií. Termickou analýzu v různých modifikacích využívá při studiu POH řada prací (Schulten a Leinweber, 1999; Siewert, 2004; Bruun et al., 2008), přičemž jsou identifikovány "píky" pro jednotlivé typy organických sloučenin jako cukry, ligninové

monomery a dimery, alkyly, aromatická jádra, tuky a dusíkaté sloučeniny. Přesto však zůstávají mezery v interpretaci a kvantifikaci naměřených dat (Plante et al., 2009).

2.4.4 Biochemické metody frakcionace a stanovení rozložitelnosti (stability) POH

Předností biochemických metod je, že přímo pracují s činiteli odpovědnými za rozklad POH, tedy půdními mikroorganismy. Nevýhodou může být ovlivnění výsledků inkubačních testů tím, že během přípravy vzorků přechází část POH, která byla v původním stavu nedostupná, do stavu přístupného pro mikroorganismy - především jde o POH absorbovanou v agregátech, které se přípravou vzorku někdy rozruší (Bruun et al., 2010).

2.4.4.1 Stanovení rozložitelnosti POH pomocí půdní respirace a biochemické spotřeby kyslíku

Skutečnou aktivní/labilní část POH je možno stanovit jako CO_2 uvolněný dýcháním mikroorganismů během jejich inkubace v půdním vzorku. Množství respirovaného CO_2 lze stanovit různými analytickými koncovkami, např. titračně, manometricky, interferometricky a podobně. Vývojem a modifikací inkubačních testů se v české pedologické tradici zabýval především Novák (1966).

Určitou modifikací inkubačních testů je využití stanovení biochemické spotřeby kyslíku (BSK), kdy se inkubovaná půda převede do dobře provzdušněné vodní suspenze (Kolář et al., 2003). Při využití kontinuálního manometrického měření BSK je možné sledovat i kinetiku rozkladu a z jejího průběhu vypočítat i rychlostní konstantu k_I za předpokladu, že jde o kinetiku I. řádu. Zatímco celková naměřená hodnota BSK udává velikost aktivní frakce POH, rychlostní konstanta udává její rozložitelnost (kvalitu). Výhodou této metody je možnost i její aplikace na vodní výluhy půdy (C_{hws} a C_{cws}). Ideální by bylo zkombinovat tuto metodu i s jinými frakcemi POH získanými pomocí chemických metod, ovšem kontaminace vzorku použitými chemickými činidly (oxidovadla, kyseliny) to neumožňuje ani při opětovné inokulaci (Strosser, 2008).

Nevýhodou inkubačních pokusů je především jejich časová náročnost. Možnou alternativou by mohla být enzymatická digesce. Existuje celá řada enzymatických postupů, umožňujících velmi rychle za zvýšené teploty rozložit organické sloučeniny. Tato metoda by podle Bruun et al. (2010) mohla být využita jako relativně přesná předpověď respirovatelné POH po kalibrování s inkubačními testy. Překážkou tohoto přístupu se však jeví vysoký obsah

ligninu v čerstvém materiálu rostlinného původu, neboť ani izolované ligninolytické enzymy nedokáží rozložit lignin zcela (Kiem a Kögel-Knabner, 2003).

Inkubačních testů se obvykle užívá jako kontrolního stanovení, ke kterému se vztahují výsledky získané aplikací jiných, především chemických metod.

2.4.4.2 Stanovení „aktivní“ POH určením množství uhlíku mikrobiální biomasy

Mikrobiální biomasa ovlivňuje všechny přeměny POH a je považována za řídicí prvek přeměn aktivní části POH (Smith et al., 2002). Při stanovení množství uhlíku mikrobiální biomasy (*Microbial Biomass Carbon* = C_{BM}) se používají různé techniky, ovšem za jediné přímé stanovení množství C_{BM} lze považovat metodu na základě chloroformové fumigace vyvinutou Jenkinsonem (1976) a upravenou Vancem et al. (1987b). Klíčovou roli při kvantifikaci C_{BM} hraje kalibrační faktor k_c , který udává podíl mineralizovaného uhlíku z celkového C_{BM} , který je uvolněn po 24 hodinové fumigaci chloroformem. Hodnota k_c leží obvykle v intervalu 0,12 – 0,47 (Sparling et al., 1990). Vance et al. (1987b) udávají střední hodnotu k_c 0,38.

Doba obratu C_{BM} je odhadována pomocí izotopicky značeného substrátu (např. ^{14}C - nebo ^{13}C -glukózy), nebo modelováním inkubace podle kinetiky I. řádu (Chaussod et al., 1988).

Celkově představuje C_{BM} asi 0,3 – 7 % z C_{org} . V půdách lesních ekosystémů se rozmezí množství C_{BM} pohybuje mezi 0,5 – 0,9 % v horizontech O a 1,6 – 3,6 v horizontech A. V kulturních půdách se toto množství pohybuje okolo 0,3 – 4 %. Vyšší hodnota C_{BM} a obsah POH v jílovitých půdách (Parton et al., 1987) je vysvětlován tím, že jemná zrnitostní frakce chrání mikroorganismy před predací a díky vyšší míře organominerálních vazeb tato POH odolává rozkladu (von Lützow et al., 2007). V důsledku toho bývá u těchto půd doba potřebná k celému obratu C_{BM} delší (Gregorich et al., 2003) a s nižším množstvím respirovaného CO_2 v přepočtu na jednotku množství C_{BM} (Kaiser et al., 1992).

Výhodou stanovení množství C_{BM} proti respiračním testům je také nezávislost na aktuální aktivitě mikrobiálních společenstev, která závisí na jejich přirozených biologických cyklech (Vance et al., 1987a). Na druhé straně zase nebere v úvahu složení těchto společenstev, neboť různé typy mikroorganismů používají různě specializované enzymy (Adamczyk et al., 2009). Přestože se často vyzdvihuje stanovení C_{BM} jako jeden z nejlepších ukazatelů aktivní/labilní frakce POH, Broos et al. (2007) poukazují na to, že i použití této metody má své limity. Při analýze dat z velkého množství půdních vzorků se ukázalo, že místní nevyrovnanost půdních

podmínek by pro dodržení dostatečné statistické relevantnosti dat vyžadovalo odběr příliš velkého množství vzorků s nadměrně nákladným a zdlouhavým zpracováním.

Díky krátké době obratu C_{BM} v půdě (1 – 5 let, von Lützow et al., 2007) je tento ukazatel považován za hlavní část aktivní/labilní frakce POH a je i často využíván v matematických modelech transformace POH (např. model CENTURY – Parton et al., 1987). Množství C_{BM} je snadno měřitelné a oproti jiným frakcím, což je velmi významné, kineticky homogenní (Smith et al., 2002). Protože se však odlišně chová C_{BM} ve (fyzikálně) chráněných a nechráněných prostředích nebo během různých fází rozkladu, některé modely zahrnují dvě odlišené mikrobiální frakce (Petersen et al., 2005). Pro modely, které dělí C_{BM} na tyto dvě frakce, je nutné provést experimentální ověření a kvantifikaci těchto dvou funkčně odlišných frakcí, avšak chybí vhodný experimentální postup pro jejich stanovení (Christensen, 1996; von Lützow et al., 2007).

Využití biomarkerů (např. zásobních triglyceridů) v kombinaci s izotopickým značením a následnou radiokarbonovou analýzou může pomoci kvantifikovat vliv C_{BM} nebo mikrobiálních metabolitů na stabilizační procesy POH, jakými jsou zvýšená či snížená agregace nebo odlišný charakter (složení, původ) různých funkčních skupin POH (Lundberg et al., 2001).

2.4.5 Kombinované metody frakcionace a stanovení rozložitelnosti (stability) POH

Protože chemické metody frakcionace POH se vyznačují většinou destrukčními účinky na získané složky a jsou aplikovány na celistvý půdní vzorek, jednotlivé frakce POH, které jsou stabilizovány odlišnými mechanismy (prostorovým uspořádáním organominerálních komplexů či uzavřením POH uvnitř agregátů) nemohou být od sebe rozlišeny, pokud dvě a více těchto funkčních frakcí podléhají účinkům chemického činidla. Proto tyto heterogenní frakce získané pouze chemickými metodami nemohou být považovány za funkčně jednotné a také nemohou být také zahrnuty do modelování transformací POH (von Lützow et al., 2007).

Na jedné straně tedy máme metody fyzikální frakcionace, které postihují prostorové uspořádání primárních a sekundárních organominerálních částic, avšak neberou v úvahu chemické složení POH v jednotlivých frakcích, přičemž chemické složení má stále značný vliv na rozložitelnost jednotlivých frakcí POH a tím i na funkci a čas potřebný k transformaci organických látek (Olk a Gregorich, 2006). Na druhé straně jsou k dispozici chemické metody

frakcionace, které postihují vlastnosti POH na molekulární úrovni, ale nerozlišují mezi jednotlivými funkcemi, které dané frakce v půdě plní (Olk a Gregorich, 2006).

Proto novější práce zabývající se POH využívají pro její frakcionaci obou uvedených přístupů (chemický a fyzikální) a vytvářejí tak samostatnou kategorii kombinovaných metod. Nejčastějším postupem je rozdělení POH nejprve některou z fyzikálních metod (zrnitostní nebo denzitometrickou frakcionací) následované chemickou metodou hydrolyzy (Rovira et al., 2010; Trumbore a Zheng; 1996; Trumbore et al., 1989), oxidace (Leifeld a Kögel-Knabner, 2001; Plante et al., 2005) nebo extrakce (Six et al., 2002; Wattel-Koekkoek a Buurman, 2004). V první fázi se tedy oddělí LF nebo hrubé zrnitostní frakce reprezentující převážně čerstvý organický materiál, zbylé frakce pak obsahují stabilnější (transformovanou) POH a jsou mnohem více relevantní vůči pedogenetickým pochodům (Kögel-Knabner, 2000).

2.4.5.1 Kombinace dělení dle hustoty půdních částic a chemické frakcionace

Při hydrolyze pomocí HCl se rozkládají v těžších frakcích půd obsahujících POH sesquioxidy a uvolňují se labilní organické látky z Fe a Al komplexů. V těžších frakcích půd mírného pásu tvoří nehydrolyzovatelný zbytek extrémně stabilní nerozložitelnou POH, jejíž množství může být považováno za minimální velikost pasivní frakce a její radiokarbonové datování za průměrnou dobu jejího setrvání v půdě. Avšak kombinace různé hustoty frakcí a hydrolyzy nebyla úspěšná při separaci pasivní frakce POH v tropických půdách. Předpokládá se, že kyselá hydrolyza může rozpustit i část velmi stabilního uhlíku nebo umožnit výměnu starších funkčních skupin za mladší u této nejstabilnější části POH. I když rozpětí stáří této nejstabilnější frakce při datování ^{14}C je užší, stále je svou povahou heterogenní a její stabilizační mechanismy nejsou dosud zcela dobře prozkoumány. (Torn et al., 2013).

2.4.5.2 Kombinace zrnitostní a chemické frakcionace

Wattel-Koekkoek a Buurman (2004) kombinují separaci jílové frakce s následnou extrakcí humusových látek. Při tom zjistili, že humusová jílová frakce je starší nežli původní POH v půdě a než frakce extrahovatelná alkalickým roztokem, ovšem je mladší ve srovnání s frakcí extrahovanou pyrofosfátem. Není jasné, zda POH této jílové frakce je vázána uvnitř fylosilikátů typu 2:1, či zda je povahy alifatické (kutin, suberin) a zda je vázána na povrchu minerálů silnými nikoli však iontovými vazbami (Derenne a Largeau, 2001).

Dlouhá doba obratu humusových látek získaných extraktů (360 – 2000 let) a současně část POH vázaná na smektity naznačuje, že fylosilikáty typu 2:1 s permanentním nábojem stabilizují POH hlavně díky silným kationtovým můstkům (Wattel-Koekkoek a Buurman, 2004). Kaolinové fylosilikáty s nízkou sorpční kapacitou jsou neutrální a mohou POH stabilizovat pouze slabšími vazbami. Toto zjištění potvrzuje dřívější závěry Schnitzera a Schuppliho (1989), že NaOH extrahuje volnou nebo jen slabě vázanou POH, avšak stáří této POH je v širokém rozpětí, což naznačuje, že je tím díky uvolnění koordinační vazby extrahována i POH vázaná silnými vazbami na hranách fylosilikátů.

Při studiu podzolů uvádí Theng (2012) nejvyšší radiokarbonově stanovené stáří u POH resistantní vůči oxidaci H_2O_2 ve frakci jílových minerálů typu 2:1 a to 6716 ± 524 let, (průměrné stáří veškeré POH udává tento autor 4930 let) a považuje tuto frakci za inertní část POH. Autoři dále uvažují, že tato POH je vázána mezi jednotlivými vrstvami jílových minerálů 2:1. Avšak ani u kyselých půd nebyly nalezeny žádné známky, že by toto vmezeření mělo nějaký výrazný vliv na celkovou stabilizaci POH (Eusterhues et al., 2005). Ani při porovnání jílových frakcí rezistentních vůči oxidaci u půd s klesajícím obsahem POH nepřekračuje frakce resistantní vůči oxidaci H_2O_2 12 % z C_{org} a hlavně se nezvyšuje u půd s nízkým obsahem POH (Plante et al., 2005), což by podle výše uvedeného předpokladu mělo být.

Množství rezistentní jílové frakce POH je také velmi nízké a jiní autoři pro pasivní či inertní frakce udávají obsahy mezi 15 – 59 % z C_{org} (von Lützow et al., 2007). Podobně ani Leifeld a Kögel-Knabner (2001) nenacházejí žádnou korelaci mezi obsahem jílu a množstvím POH rezistentní vůči oxidaci. Tato fakta hovoří spíše pro skutečnost, že neoxidovatelná frakce POH není chráněna vazbami s jílovými minerály, ale spíše je uzavřena v hydrofobních makromolekulách nebo zuhelnatělém materiálu a obsahuje více hydrofobních alifatických struktur (Eusterhues et al., 2005). Práce Leifelda a Kögel-Knabnera (2001) nebo Planteho et al. (2005) proto uvádějí, že neoxidovatelná frakce POH v jemných zrnitostních frakcích půdy je stabilizována nesespecifickými mechanismy.

Závěrem této kapitoly lze říci, že kombinací fyzikálních a chemických metod frakcionace POH jsou stále ještě izolovány heterogenní frakce a ani těmito kombinacemi není možno zcela rozlišit POH podle typu jejího stabilizačního mechanismu v půdě. Avšak tyto metody přinášejí lepší informace o kvalitě POH nežli samotná aplikace jen jednoho principu a určité zlepšení lze očekávat při dalším plném rozpracování, neboť často jsou používány pouze kombinace metod, se kterými mají dotyční autoři již dřívější zkušenosti, či je z nějakého důvodu preferují.

2.4.6 Shrnutí metod dělení a posuzování rozložitelnosti (stability) POH

Z výše uvedeného přehledu literatury vyplývá, že pouze několik málo metod je schopných prakticky stanovit v půdě homogenní frakce POH tříděné podle nových konceptů stabilizace POH. Přes velké množství přístupů a modifikací včetně jejich kombinací stále zůstává hlavním problémem nedostatečná specifická jednotlivých metod a relevance vůči stabilizačním mechanismům. Nejjednoznačnější pozitivní hodnocení mají ukazatele aktivní části POH, tedy C_{BM} a LF (pod $1,6 \text{ g.cm}^{-3}$), které lze považovat za skutečně adekvátní metody separace či frakcionace odpovídající konceptuálně definovaným frakcím (Maia et al., 2013). Jejich protipólem je stabilní či pasivní část POH, která je stále nedostatečně charakterizovaná, neboť na její stabilizaci se podílí více různých mechanismů. Při pokusech o frakcionaci této pasivní složky POH je zatím vždy výsledkem získání heterogenních frakcí.

Přesto je zde řada nových slibných metod od destrukce minerální složky půdy HF, přes frakcionaci POH pomocí HGMS, nebo využití extrakce DCB, a v neposlední řadě je to kombinace oxidačních a hydrolytických metod po předchozí fyzikální frakcionaci.

Odhady stáří či doby obratu jednotlivých frakcí v půdě pomocí radiokarbonové datace vykazují velmi široké rozpětí údajů, takže je téměř nemožné porovnávat výsledky různých autorů mezi sebou. Při tomto porovnávání je nutno vždy zohlednit přesnou modifikaci frakcionace, kterou daní autoři použili, ale většinou jsou tyto výsledky relevantní pouze pro porovnání frakcí v rámci jedné práce. Určité zlepšení v tomto směru je možné očekávat při využití izotopicky značených vstupních substrátů nebo mikrobiálních biomarkerů (Maia et al., 2013).

3. CÍL PRÁCE

Ověřit oxidační a hydrolytické postupy frakcionace POH a porovnat je s klasickou metodou alkalické extrakce ve vzorcích odebraných z humusových horizontů vybraných půd Šumavy a prohloubit pochopení jejich vzájemných vztahů. Pokusit se o zhodnocení rozložitelnosti jednotlivých humusových forem, vzájemně porovnat výsledky dosažené všemi použitými frakcionačními postupy a tyto výsledky dále porovnat s hodnotami získanými ze souběžné analýzy kontrolního vzorku Černoze a přispět k lepší schopnosti oddělit a stanovit jasně definované a relativně vnitřně homogenní frakce půdního uhlíku, a tím umožnit přesnější měření celkové dynamiky transformačních procesů organických látek v půdě.

Ověřit vztahy získaných frakcí POH k vybraným půdním ukazatelům, používaných v bilanci půdního uhlíku pro hodnocení produkčních a ostatních environmentálních funkcí půd.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Půdní vzorky

Pro účely této práce byly provedeny odběry nadložních forem humusu lesních půd Šumavy ve vybraných lokalitách v okolí Kvildy a Horské Kvildy (vzorky č. 1 – 6). Taxonomické zařazení a hlavní fyzikální a chemické charakteristiky půdních vzorků uvádí tabulka 1. Jako etalon pro porovnání byla vybrána černozem karbonátová z odběrné lokality Modřice u Brna (vzorek č. 7).

Půdní vzorky byly charakterizovány těmito stanoveními (viz tabulka 1):

Fyzikální vlastnosti: zrnitost podle Casagrande, objemová hmotnost redukována O_r .

Chemické vlastnosti: pH_{KCl} , kationtová sorpční výměnná kapacita T podle Sandhofa (Zbiral, 2011). Metodika stanovení obsah uhlíku C_{org} a C_{ox} viz kap.4.2

Zrnitostní složení humusových horizontů půd Šumavy s výjimkou vzorku č. 2 nebylo pro vysoký podíl organické hmoty stanoveno (pro účely práce se zde nepředpokládají významnější interakce POH s minerální maticí půdy). Orientačně jsou fyzikální vlastnosti charakterizovány stanovením objemové hmotnosti redukové (O_r).

Tabulka 1. Taxonomické zařazení podle Němečka et al. (2011) a vybrané fyzikální a chemické charakteristiky půdních vzorků

vzorek	humusový horizont	geneze humusového horizontu	zrnitostní složení	O_r [g/cm ³]	pH_{KCl}	T [mg _{ekv} /100g]	C_{org} [%]	C_{ox} [%]
1	drnový mor Hh	anhydrogenní	není stanoveno	0,59	3,67	128	17,7	12,56
2	reziduální mor Hr	anhydrogenní	písek 82 %	1,11	3,39	47	5,6	4,36
3	drťový mor Hh	anhydrogenní	není stanoveno	0,53	2,7	196	24,7	18,32
4	fibrický mor Of	hydrogenní	bez minerální fáze	0,24	3,14	265	46,3	37,47
5	hydromor Hh	hydrogenní	není stanoveno	0,71	6,57	43	9,4	7,21
6	fibrický mor Of	hydrogenní	není stanoveno	0,48	2,98	117	17,6	14,42
7	Černozem karbonátová ČM ^k	-	prachová hlína	1,60	7,21	19,6	1,86	1,52

4.2 Stanovení ukazatelů půdního uhlíku

Celkový organický uhlík C_{org}

Celkový organický uhlík C_{org} byl stanoven přístrojovou analýzou (PrimacsSLC, SKALAR, Holandsko). Stanovení vychází z výpočtu $C_{org} = TC - IC$, tedy rozdílu mezi obsahem celkového uhlíku vzorku ($TC = \text{Total Carbon}$) a případným obsahem uhlíku anorganického ($IC = \text{Inorganic Carbon}$), pokud vzorek obsahuje karbonáty. Obě měření vychází ze zjištění množství CO_2 ve spalinách (softwarová integrace křivky zaznamenávající průběžnou koncentraci CO_2 detekovanou infračerveným senzorem) vzniklého spálením (čistý O_2 je dodáván z tlakové nádoby) suchého půdního vzorku při teplotě $1100^\circ C$ v případě TC , respektive za teploty $550^\circ C$ po předchozím přidání 20 % kyseliny fosforečné ke vzorku (H_3PO_4) v případě IC .

Celkový oxidovatelný uhlík C_{ox}

Stanovení oxidovatelného uhlíku probíhalo na mokré cestě oxidací chromsírovou směsí při zvýšené teplotě se zpětnou titrací nespotřebovaného dichromanu draselného odměrným roztokem Mohrovy soli (modifikovaná Tjurinova metoda). Navážka (0,1 – 0,3 g v závislosti na očekávaném obsahu uhlíku) půdního vzorku je po přidání 10 ml chromsírové směsi (0,066 M $K_2Cr_2O_7$ a koncentrovaná H_2SO_4 v poměru 1:1) vložena do sušárny na 45 min. při $125^\circ C$. Po ochlazení se nespotřebovaný dichroman draselný stanoví titrací 0,1 M Mohrovou solí o známém faktoru. Pro titraci byl použit automatický titrátor Mettler-Toledo DL 50 (Švýcarsko).

Horkou vodou rozpustný uhlík C_{hws}

Horkou vodou rozpustný uhlík C_{hws} byl extrahován podle standardizované metody Körschense (1990). Suspenze 10 g půdního vzorku jemnozeme (< 2 mm) v 50 ml destilované vody se přivede k teplotě varu ($100^\circ C$) a ponechá se tak po dobu 1 hodiny. Poté je suspenze ochlazená, supernatant se pročistí centrifugací a filtrací. Uhlík v supernatantu je po odpaření při $60^\circ C$ stanoven stejnou analytickou koncovkou jak uvedeno výše (u C_{ox}).

Stanovení uhlíku mikrobiální biomasy C_{BM}

Uhlík mikrobiální biomasy C_{BM} byl stanoven standardní extrakční/fumigační metodou dle Vance et al. (1987). Princip metody spočívá ve zjištění rozdílu mezi obsahem uhlíku v kontrolním a ve fumigovaném vzorku po inkubaci. Inkubace a fumigace půdních vzorků

navlhčených na 50 % retenční vodní kapacity probíhá po 24 h ve tmě za přítomnosti výparů chloroformu, který naruší buněčné stěny mikrobiální flóry, jejichž obsah tak přejde do půdního vzorku. Po inkubaci se vzorek protřepe v roztoku 0,5 M K_2SO_4 . Obsah uhlíku v tomto extraktu (po vysušení při 60°C) se stanoví stejně jako C_{ox} .

Biochemická spotřeba kyslíku BSK₂₁

Jedenadvacetidenní biochemická spotřeba kyslíku BSK₂₁ byla stanovena pomocí aparatury Oxi-Top® (Merck, Německo) podle metodiky Koláře et al. (2005). Půdní vzorky byly převedeny do vodní suspenze a inkubovány po 21 dní v aerobních podmínkách za použití inhibitoru nitrifikace. Spotřeba kyslíku pak byla vypočítána podle stavové rovnice ideálního plynu ($p \cdot V = n \cdot R \cdot T$) na základě měření poklesu tlaku v uzavřené nádobě piezoelektrickou měřicí hlavicí a předpokladu, že vyprodukovaný CO_2 je plně adsorbován pecičkami hydroxidu sodného umístěnými odděleně v plynné části nádoby.

4.3 Metody frakcionace POH

Frakcionace POH oxidací podle Chana et al. (2001)

Tato metoda oxidace POH mokrou cestou vychází z původního postupu Walkleyho-Blacka (1934) pro stanovení půdního uhlíku, kdy je organický uhlík oxidován roztokem dichromanu draselného po přidání koncentrované kyseliny sírové. Původní poměr 1:2 (10 ml oxidačního roztoku, 20 ml kyseliny) byl výše uvedenými autory rozšířen o poměry 1:1 (10 ml oxidačního roztoku a 10 ml kyseliny) a 1:0,5 (10 ml oxidačního roztoku a 5 ml kyseliny).

Navážka 0,3 – 0,5 g vzorku (jemnozern < 0,5 mm) v Erlenmayerově baňce je nejprve zalita 10 ml 0,167 M roztoku $K_2Cr_2O_7$, poté následuje přidání koncentrované (96–98%) H_2SO_4 dávkovačem přímo do suspence. Oxidační reakce probíhá v digestoři za vnější pokojové teploty, směs je však zahřáta teplem uvolněným při promíchávání směsi. Účinnost oxidace není dána jen vyšším účinkem roztoku dichromanu v kyselém prostředí, ale také vyšší teplotou, kterou způsobí větší množství přidané kyseliny. Reakce se nechá probíhat po dobu, než se teplota reakční směsi ustálí zpět na pokojové teplotě. Množství zoxidovaného uhlíku se vypočte z nespotřebovaného množství dichromanu, které je stanoveno titrací vzorku 0,2 M Mohrovou solí o stanoveném faktoru (zde je postup stejný jako při stanovení C_{ox} , včetně použitého titrátoru).

Ze třech samostatných stanovení pak lze výpočtem definovat přírůstek zoxidovaného uhlíku v závislosti na zvýšení oxidační účinnosti činidel. Po započtení celkového uhlíku C_{org} pak obdržíme následující 4 frakce:

F1....C zoxidovaný roztokem v poměru 1:0,5 (ml roztoků $K_2Cr_2O_7$ ku H_2SO_4)

F2....přírůstek C zoxidovaný roztokem v poměru 1:1

F3....přírůstek C zoxidovaný roztokem v poměru 1:2

F4....nezoxidovaný C stanovený výpočtem $F4 = C_{org} - (F1 + F2 + F3)$

Frakcionace POH oxidací podle Tirol-Padrehu a Ladhy (2004)

Druhý způsob frakcionace POH oxidací na mokré cestě používá jako oxidační činidlo neutrální roztok manganistanu draselného při pokojové teplotě. Účinnost oxidace (odstupňování stability POH) je dáno dobou, po kterou je vzorek vystaven účinkům oxidovadla.

Vzorek 0,1 – 0,3 g jemnozeme (< 0,5 mm) je zalit 25 ml roztoku 0,033 M $KMnO_4$ a je v uzavřené baňce zvolna protřepáván po dobu 1 h. Poté je vzorek centrifugován a přefiltrován tak, aby byl oddělen roztok manganistanu od zeminy. Množství zoxidovaného uhlíku je vypočteno z množství redukováného manganistanu za předpokladu, že v neutrálním pH se sedmivalentní mangan Mn^{VII} redukuje na čtyřvalentní Mn^{IV} . Úbytek Mn^{VII} se stanoví spektrofotometricky (Jenway 6100 Spectrophotometer, Bibby Scientific Limited, UK) jako pokles absorbance při vlnové délce 565 nm (absorbance je porovnávána s alikvotními vzorky čistého roztoku $KMnO_4$ o známém titru).

Takto stanovená frakce zoxidovaného uhlíku za dobu 1h je označena jako C_{PM-1h} (Carbon PerManganate – 1h), stabilnější frakce je připravena stejným způsobem, avšak vzorek se oxiduje 24 h (C_{PM-24h}). Třetí frakce, nezoxidovaný zbytek (Recalcitrant Pool), je opět kalkulován na základě vztahu $C_{PM-RP} = C_{org} - (C_{PM-1h} + C_{PM-24h})$.

Kyselá hydrolýza POH podle Shiraty a Yokozawy (2006)

Tato metoda vícefázové kyselé hydrolýzy využívá kyselinu sírovou a stanoví opět tři frakce POH odstupňované svou stabilitou, tj. odolností vůči účinkům kyseliny. Na rozdíl od obou oxidačních metod, všechny tři frakce jsou stanoveny u téhož vzorku, v průběhu analýzy nedochází k jeho znehodnocení.

Pro analýzu se použije navážka 0,3 g jemnozeme (< 0,5 mm) a nejlabilnější frakce (Labile Pool 1 = LP 1) se získá ve výluhu 25 ml 2,5 M H_2SO_4 zahříváním v sušárně při teplotě 105°C po dobu 30 min (vzorek s roztokem je neprodyšně uzavřen ve speciální nádobce

z borosilikátového skla). Po ochlazení se supernatant ze vzorku slije do zásobní odměrné baňky a původní vzorek je dvakrát dekantován přídatkem 2 x 25 ml destilované vody. Tento dekantát je poté také přidán k frakci LP 1. Koncentrace organického uhlíku v takto získaném roztoku je pak stanovena přístrojově (viz stanovení C_{org}) v modifikaci pro stanovení uhlíku v roztocích.

Původní vzorek po dekantaci je usušen při 70°C a je použit na stanovení středně stabilní frakce LP 2 (= Labile Pool 2). K plně vysušenému vzorku se přidají 2 ml 13 M H_2SO_4 a vzorek se ponechá při pokojové teplotě po 24h (opět v uzavřené nádobě). Poté se roztok zředí přídatkem 24 ml destilované vody (výsledná koncentrace kyseliny v roztoku je 1 M) a nechá se hydrolyzovat v sušárně 3 h při 105°C. Supernatant je opět slit a dvakrát dekantován 25 ml destil. vody. V supernatantu se opět stanoví koncentrace uhlíku, která se přepočte na navážku vzorku.

Třetí, nehydrolyzovaná frakce (RP = Recalcitrant Pool) je pak stanovena rozdílem $RP = C_{org} - (LP 1 + LP 2)$; případně se může provést kontrolní stanovení C_{org} přímo v nehydrolyzovaném zbytku vzorku.

Klasická frakcionace humusových látek (Stevenson, 1994)

Klasická frakcionace rozděluje půdní uhlík podle rozpustnosti či nerozpustnosti organických látek v alkalickém a kyselém prostředí. Jednotlivé frakce jsou definovány postupem extrakce. V této práci je pak dále s nimi i takto zacházeno, na frakci huminových kyselin (HK) a fulvokyselin (FK) nejsou kladeny žádné požadavky, co se týká barvy, komplexity, molekulové hmotnosti, aromaticity či dalších vlastností jaké často uvádí literatura.

Půdní vzorek je nejprve extrahován roztokem 0,1 M NaOH + 0,1 M $Na_4P_2O_7$. Přefiltrovaný extrakt se okyslí přídatkem 1 M H_2SO_4 na $pH < 2$ a vloží do sušárny při 60°C. Vzniklá sraženina se oddělí od původního extraktu filtrací do odměrné baňky a sraženina na filtru se rozpustí horkým 0,1 M NaOH do jiné odměrné baňky. V obou filtrátech (původní bez sraženiny a opětovně rozpuštěná sraženina) je po odpaření při 60°C stanoven obsah uhlíku jako C_{ox} . Uhlík v extraktu vysráženém v kyselém prostředí je považován za uhlík huminových kyselin (C_{HK}), uhlík v extraktu po filtraci HK za uhlík fulvokyselin C_{FK} . Uhlík, který nepřešel do extraktu je pak stanoven výpočtem $C_{org} - (C_{HK} + C_{FK})$ a označen jako C_{HS-RP} (Carbon of Humic Substances – Recalcitrant Pool).

Výsledky z této metody frakcionace byly použity i pro výpočet standardních ukazatelů kvality POH tedy poměru HK:FK a stupně humifikace S_H (tabulka 3). Tabulka 2 pak pro lepší

přehlednost uvádí značení a základní podmínky izolace jednotlivých frakcí u všech čtyř metod.

Tabulka 2. Přehled značení frakcí a jejich hlavní kritéria stanovení

Frakcionace POH oxidací na mokré cestě			
<i>Reference: Chan et al., 2001</i>		<i>Reference: Tirol-Padre a Ladha, 2004</i>	
Označení frakce	Kritérium stanovení	Označení frakce	Kritérium stanovení
F1	0,167 K ₂ Cr ₂ O ₇ + 98 % H ₂ SO ₄ v poměru 1:0,5	C _{PM-1h}	neutrální 0,033 M KMnO ₄ po dobu 1 h
F2	0,167 K ₂ Cr ₂ O ₇ + 98 % H ₂ SO ₄ v poměru 1:1	C _{PM-24h}	neutrální 0,033 M KMnO ₄ po dobu 24 h
F3	0,167 K ₂ Cr ₂ O ₇ + 98 % H ₂ SO ₄ v poměru 1:2	C _{PM-RP}	Neoxidovatelný zbytek
F4	Neoxidovatelný zbytek		
Frakcionace POH kyselou hydrolyzou		Frakcionace POH alkalickou extrakcí	
<i>Reference: Shirato a Yokozawa, 2006</i>		<i>Reference: Stevenson, 1994</i>	
Označení frakce	Kritérium stanovení	Označení frakce	Kritérium stanovení
LP 1	2,5 M H ₂ SO ₄ po 30 min. při 105 °C	C _{FA}	0,1 M NaOH + 0,1 M Na ₄ P ₂ O ₇
LP 2	13 M H ₂ SO ₄ po 24 h při 20°C, poté 1 M H ₂ SO ₄ po 3 h při 105 °C	C _{HA}	0,1 M NaOH + 0,1 M Na ₄ P ₂ O ₇ sraženo H ₂ SO ₄ při pH < 2
RP	Nehydrolyzovaný zbytek	C _{HS-RP}	Neextrahovatelný zbytek

4.4 Statistika

Korelační koeficienty, jejich hladina významnosti, testování rozdílnosti velikosti frakcí (dvojstranný nepárový t-test, včetně hodnocení rozptylu F-testem) byly počítány v aplikaci MS Excel 2010.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro splnění cílů práce bylo odebráno celkem šest vzorků z humusových horizontů půd Šumavy tak, aby byly charakterizovány různé stupně a podmínky přeměn jejich půdní organické hmoty. Zhruba lze říci, že vzorky č. 1 – 3 prošly více vývojem anhydrogenním, vzorky č. 4 – 6 lze označit za převážně hydrogenní a jejich souhrnnou charakteristiku uvádí tabulka 1. Z hodnot jednotlivých parametrů je patrná značná různorodost odběrných míst zejména v obsahu a "kvalitě" POH (tabulka 3), což byl i záměr práce.

Tabulka 3. Ukazatelé půdního uhlíku (C_{org} , C_{ox} , C_{hws} , C_{BM} a BSK_{21} v mg C/g; S_H v %)

Vzorek	horizont	C_{org}	C_{ox}	C_{hws}	C_{BM}	BSK_{21}	HK:FK	S_H
1	Hh	177,3	125,6	5,48	10,83	6,38	1,17	44,6
2	Hr	56,5	43,6	2,93	4,53	2,99	0,34	56,5
3	Hh	247,4	183,2	11,60	3,00	8,12	0,90	38,2
4	Of	462,9	374,7	17,94	11,87	13,83	1,12	11,5
5	Hh	93,9	72,1	6,92	17,19	5,29	0,89	46,7
6	Of	175,5	144,2	15,32	7,06	9,95	1,02	40,9
7	ČM ^k	18,6	15,2	0,63	0,48	0,88	1,32	38,8

Rozdíly hodnot stanovení celkového uhlíku C_{org} a uhlíku oxidovatelného mokrou cestou C_{ox} potvrzují všeobecně známou skutečnost (Bisutti et al., 2004), že oxidace půdního uhlíku na mokré cestě má nižší výtěžnost než přímé spálení, a z hodnot jednotlivých vzorků je dále možno usoudit, že účinnost mokré oxidace u našich vzorků dále klesá se zvyšujícím se obsahem uhlíku ve vzorku (tabulka 3). Obsahy horkovodorozpustného uhlíku C_{hws} charakterizující především tzv. labilní podíl POH jsou přibližně o řád vyšší, než lze běžně nalézt v humusových horizontech orných půd, a úměrné v průměru i o řád vyšším obsahům C_{org} u většiny odebraných vzorků, což znamená, že tvoří cca 4 – 8 % z C_{org} . Předběžné hodnocení kvality POH odebraných vzorků pomocí dosud nejčastěji používaných kritérií, tedy poměru HK:FK, stupně humifikace S_H a barevného kvocient Q4/6 (který ale nebyl stanoven), je poněkud rozporuplné a podporuje upozornění Horáčka (1995), že z těchto tří výše uvedených nejběžnějších kritérií je nutno použít vždy nejméně dvě pro objektivnější posouzení kvality POH. Poměrně překvapivé jsou vysoké hodnoty poměru HK:FK u všech vzorků s výjimkou reziduálního moru (vz. č. 2), neboť teoreticky, i vzhledem k nízkému pH, by zde měly ve skladbě humusových kyselin převažovat fulvokyseliny. Tato skutečnost by

žádala bližší ověření přesahující rámec této práce. Je možno však zmínit, že k podobným zjištěním došli i jiní autoři (Menšík, 2010). Rovněž stupeň humifikace u většiny vzorků s poměrem HK:FK nekoresponduje, nejvíce u vzorku č. 4 fibrického moru (relativně vysoký poměr HK:FK a velmi nízký S_H). Tento vzorek je však výjimečný i pro celý soubor zkoumaných půd svým vůbec nejvyšším obsahem celkového uhlíku, podstatně převyšujícím obsah C_{org} u ostatních vzorků - jde o vzorek vysloveně organogenní. Naopak vysoký stupeň humifikace a k tomu neadekvátně nízký poměr HK:FK vykazuje reziduální mor (vz. č. 2), kde však lze zdůvodnění hledat v nejnižším obsahu uhlíku a zároveň vysokém obsahu minerální složky, tvořené převážně zrnitostní kategorií písku (tabulka 1).

Výsledky ostatních stanovených parametrů, resp. ukazatelů, budou komentovány až dále, neboť práce je více zaměřena na jejich porovnání s jednotlivými frakcemi POH, získanými čtyřmi frakcionačními postupy.

5.1 Výsledky frakcionace POH humusových horizontů půd Šumavy

Velikostní zastoupení všech frakcionovaných složek uvádí tabulka 4, velikost je vždy uvedena jako procento z obsahu celkového uhlíku C_{org} . Vzorky 1 – 3 představují

Tabulka 4. Procentické zastoupení jednotlivých frakcí ze čtyř metod frakcionace POH a statistické zhodnocení významnosti rozdílu mezi skupinou anhydrogenních (vz. 1 – 3) a hydrogenních (vz. 4 – 6) horizontů. ($C_{org} = 100\%$; $n = 4$; hodnota T-testu uvádí hladinu významnosti α pro rozdílnost průměrů vzorků 1 – 3 a 4 – 6).

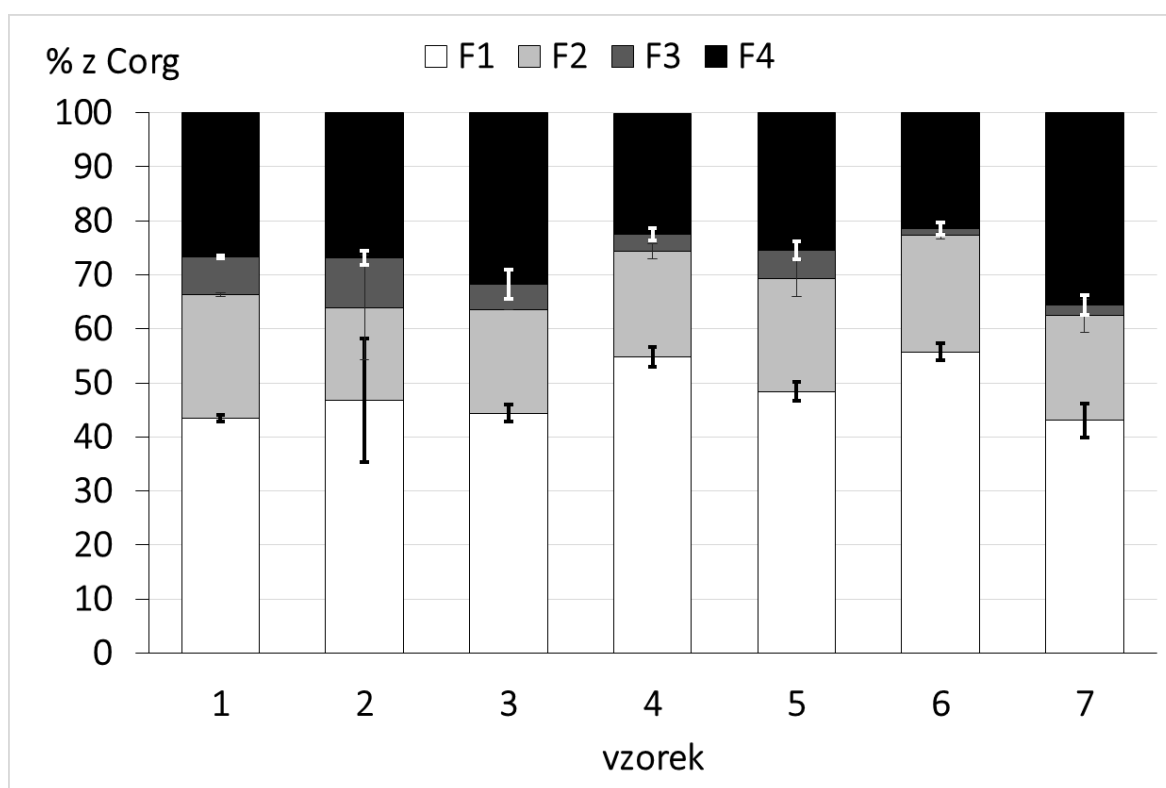
Frakce	vzorek							T-test
	1	2	3	4	5	6	7	
F1	43,42	46,77	44,40	54,85	48,43	55,75	43,08	0,055
F2	22,92	17,13	19,08	19,56	20,86	21,52	19,35	0,644
F3	6,94	9,23	4,76	3,09	5,27	1,35	2,04	0,096
F4	26,71	26,87	31,76	22,29	25,44	21,38	35,54	0,063
C_{PM-1h}	8,07	10,80	8,83	11,74	13,35	11,94	5,54	0,040
C_{PM-24h}	15,06	17,43	17,05	16,27	14,37	17,26	10,01	0,653
C_{PM-RP}	76,87	71,76	74,13	71,99	72,28	70,80	84,45	0,218
LP1	32,40	34,70	24,70	7,95	4,33	9,27	7,93	0,006
LP2	27,67	23,73	20,84	14,63	13,82	9,37	18,33	0,012
RP	39,94	41,57	54,46	79,40	81,85	81,35	73,37	0,014
C_{FA}	20,56	42,18	20,09	5,43	24,78	20,21	16,72	0,386
C_{HA}	24,03	14,34	18,12	6,08	21,94	20,64	22,05	0,846
C_{HS-RP}	55,41	43,48	61,79	88,50	53,28	59,15	61,23	0,455

anhydrogenní horizonty šumavských půd, čísla 4 – 6 reprezentují hydrogenní horizonty, číslem 7 je označena referenční černozem karbonátová. Toto označení zůstává platné pro všechny následující tabulky a grafy.

Frakcionace POH oxidací podle Chana et al. (2001)

Oxidačním postupem dle Chana et al. (2001) byly získány celkem čtyři frakce odstupňované dle intenzity oxidace od nejlabilnější F1 po neoxidovatelný zbytek F4.

Graf 1a. Procentické zastoupení frakcí při oxidaci dichromanem draselným podle Chana et al., 2001 (chybovými úsečkami vyznačená směrodatná odchylka, n = 4)



Z grafu 1a je patrné, že nejvyšší podíl z C_{org} tvoří frakce F1. To znamená, že již mírnější oxidací dichromanem draselným v prostředí kyseliny sírové je oxidována podstatná část POH (v průměru téměř polovina) včetně kontrolní černozemě karbonátové. Je možno si všimnout, že z celého souboru byl nejvyšší podíl POH zoxidován ve skupině hydrogenního humusu (viz dále graf 3), ale zároveň oxidované procento C není příliš závislé na celkovém obsahu C_{org} (korelační koeficient $r = 0,440$; tabulka 6), avšak částečně koresponduje s obsahy C_{hws} a C_{BM} . Průměrná velikost frakce F1 je ve skupině hydrogenních půd vyšší, než ve skupině POH anhydrogenních vzorků ($\alpha = 0,055$; tabulka 4). Nelze ale již nalézt vztah např. s výměnnou

sorpční kationtovou kapacitou T ($r = 0,284$; tabulka 7), ani s dalšími stanovenými charakteristikami vzorků. Frakci F1 je tak v tomto případě možno považovat za "labilní" část POH. Dalším důvodem pro to je, že u všech horizontů je podíl F1 vyšší než v černozemi, kde se předpokládá vyšší stabilita POH.

Vyšší koncentrace kyseliny sírové včetně vyšší teploty oxidace jí vyvolané u frakce F2 zvyšuje množství uhlíku oproti frakci F1 o cca 20 % z C_{org} . U jednotlivých vzorků nelze nalézt statisticky významný rozdíl v tomto přírůstku zoxidovaného uhlíku a rozdíl nelze nalézt ani mezi skupinami vzorků hydrogenní a anhydrogenní povahy POH (tabulka 4). Jediný závěr, který lze z této skutečnosti učinit je ten, že tímto způsobem se oxiduje, resp. dooxidovává podobná, relativně stálá (stabilní) skupina organických látek. Tento závěr podporuje i práce Majumdera et al. (2008), který rovnou navrhuje sumarizaci frakcí F1 + F2 do jedné souhrnné frakce labilní POH.

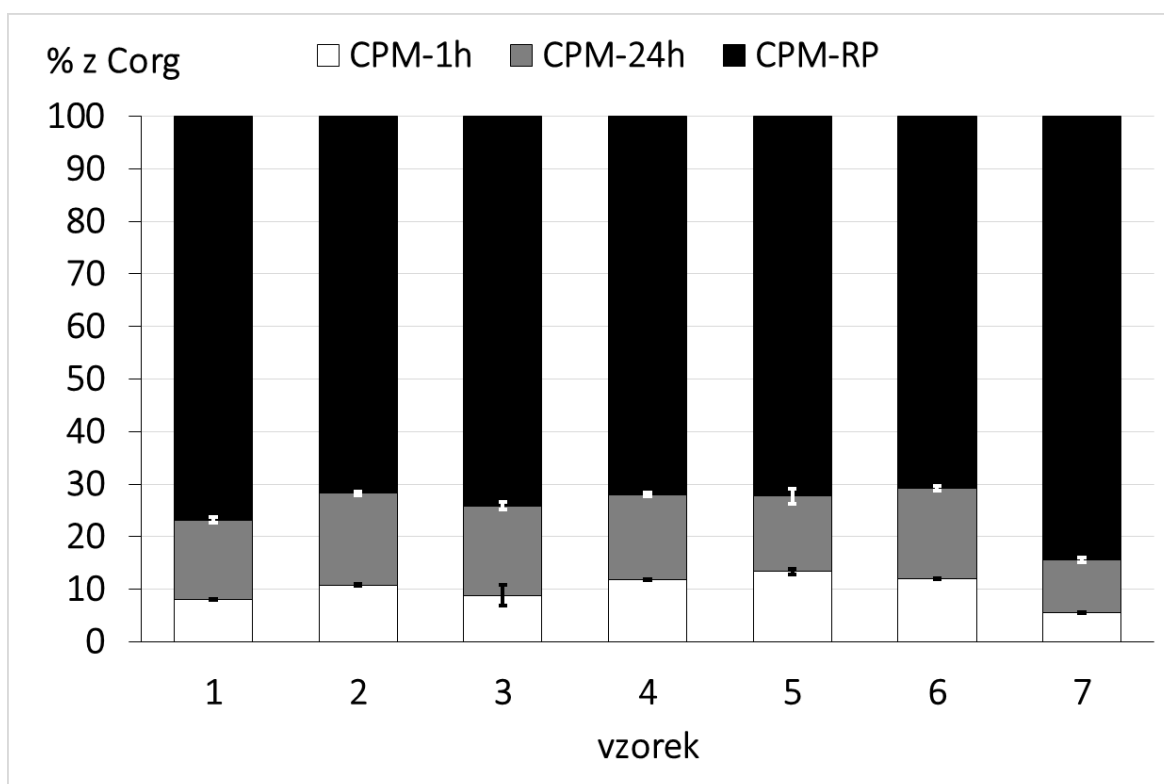
Další zvýšení koncentrace kyseliny sírové pro frakci F3 má za následek již jen nepatrné zvýšení zoxidovaného přírůstku POH. Tento přírůstek je v průměru nižší u hydrogenní skupiny půd, ale celkově se hodnoty těchto přírůstků vyznačují velkým rozptylem stanovených hodnot, statisticky jen omezeně využitelných.

Podíl nezoxidované frakce F4 činí v průměru 24 % z C_{org} . To znamená, že uvedeným postupem oxidace nedosáhneme ani při nejvyšší koncentraci kyseliny sírové, a tedy i teplotě oxidace, úplného „spálení“ oxidovatelného uhlíku POH, a dokonce se ani zdaleka nepřiblížíme hodnotám dosaženým při „klasickém“ stanovení C_{ox} v půdních vzorcích na mokré cestě (Bisutti et al., 2004). Přesto lze frakci F4 považovat za velmi stabilní látky patrně vysokomolekulárního charakteru (nebo lze uvažovat i o částečné karbonizaci), jejichž podíl je v průměru o něco nižší (průkazné na hladině významnosti $\alpha = 0,1$) ve vzorcích hydrogenních horizontů oproti anhydrogenním. Nejvyšší zastoupení F4 je opět u kontrolní černozemě (35,6 %), kde však lze tuto „stabilitu“ očekávat. Ve srovnání s jinými oxidačními činidly je procento nezoxidovaného uhlíku zhruba odpovídající frakci rezistentní vůči oxidaci NaClO (Jagadamma et al., 2010 uvádějí tuto hodnotu u orných půd v rozmezí 38 – 50 % z C_{org}).

Z hlediska porovnání s ostatními třemi frakcionálními postupy je z průměrného zastoupení jednotlivých frakcí (graf 2, tabulka 4) patrné, že podíly frakcí na celkovém uhlíku se od ostatních tří použitých postupů výrazně liší, jsou však pro tuto metodu charakteristické, jak ukázal detailnější rozbor Partykyové a Hamkala (2011).

Již při zběžném pohledu na výsledky frakcionace oxidací manganistanem draselným (graf 1b) je zřejmé, že tato metoda je jak co do účinku oxidace, tak i do rozlišení jednotlivých vzorků nejméně účinná. Při nejmírnější oxidaci (frakce C_{PM-1h}) je zoxidována v průměru pouze desetina z celkového uhlíku C_{org} . Jedná se o „nejlabilnější“ podíl POH, který je opět u vzorků hydrogenního původu POH vyšší (průkazné na hladině významnosti $\alpha = 0,05$) než u profilů anhydrogenních. Nejnižší množství této frakce je také podle očekávání u kontrolní černozemě.

Graf 1b. Procentické zastoupení frakcí při oxidaci manganistanem draselným podle Tirol-Padrehu a Ladhy, 2004 (chybovými úsečkami vyznačená směrodatná odchylka, $n = 4$)



Průměrné obsahy druhé, méně labilní frakce C_{PM-24h} , dosahují okolo 15 % z celkového C_{org} , a nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl mezi skupinou hydrogenních a anhydrogenních horizontů. Že se jedná o látky ne zcela stabilního charakteru, dokládá jejich nejnižší množství stanovené v černozemi.

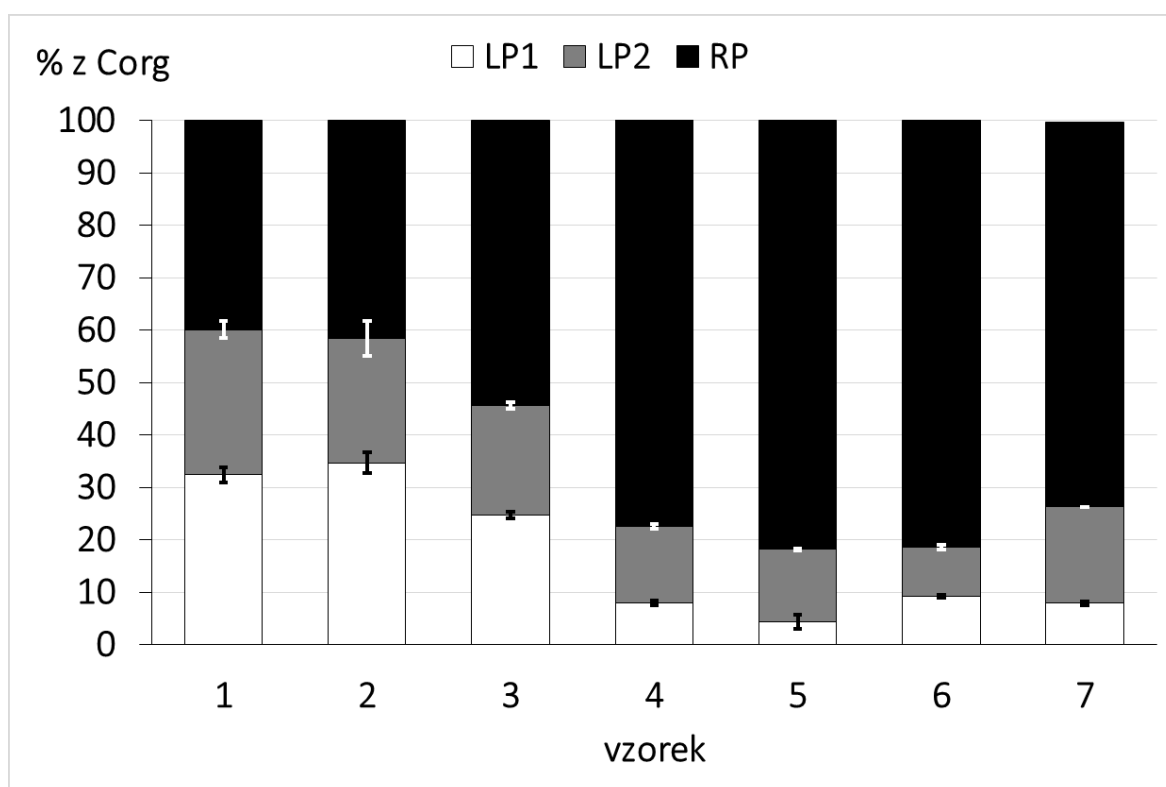
Nezoxidovaný zbytek C_{PM-RP} je u této metody cca 75 % z celkového C_{org} , kdy od průměru souboru se mírně liší vyšším obsahem této frakce drnový mor (vz. č. 1) a také, i když mnohem výrazněji, ale podle předpokladu, i obsah C_{PM-RP} v kontrolní černozemi. Lze říci, že

tato metoda je ze všech čtyř použitých nejvíce uniformní, nerozlišuje příliš mezi původem POH, výtěžky labilních frakcí POH jsou nízké (zejména C_{PM-1h}) a obecně ji tedy pro charakterizaci POH nelze doporučit.

Frakcionace POH kyselou hydrolýzou podle Shirata a Yokozawy (2006)

Metoda kyselé hydrolýzy (graf 1c) naopak jednotlivé vzorky humusových horizontů půd Šumavy a zvláště skupiny hydrogenního a anhydrogenního vývoje výrazně odlišuje. Významný (statisticky průkazný na hladině $\alpha = 0,005$) rozdíl vykazuje nejlabilnější frakce LP 1 v porovnání obou skupin půd, kdy obsahy této frakce u hydrogenních horizontů jsou oproti anhydrogenním mnohem nižší (o 23 % z C_{org}) a v průměru jsou pak nejnižší „labilní“ frakcí ze všech čtyř metod frakcionace. Hydromor (vz. č. 5) má nejen nejnižší obsah LP 1 v celém zkoumaném souboru, ale vůbec nejnižší stanovený „labilní“ uhlík vůbec. Statisticky významný rozdíl (opět $\alpha = 0,005$) je i mezi hydrogenní skupinou humusových horizontů (12,6 % z C_{org}) a skupinou anhydrogenní (24,1 % z C_{org}) i u středně stabilní frakce LP 2, blíží se hodnotám dosažených u oxidace dichromanem draselným (F2). Nejvíce frakce LP 2 obsahuje drnový mor (vz. č. 1), nejméně naopak fibrický mor (vz. č. 6).

Graf 1c. Procentické zastoupení frakcí při kyselé hydrolýze podle Shirata a Yokozawy, 2006 (chybovými úsečkami vyznačená směrodatná odchylka, n = 4)

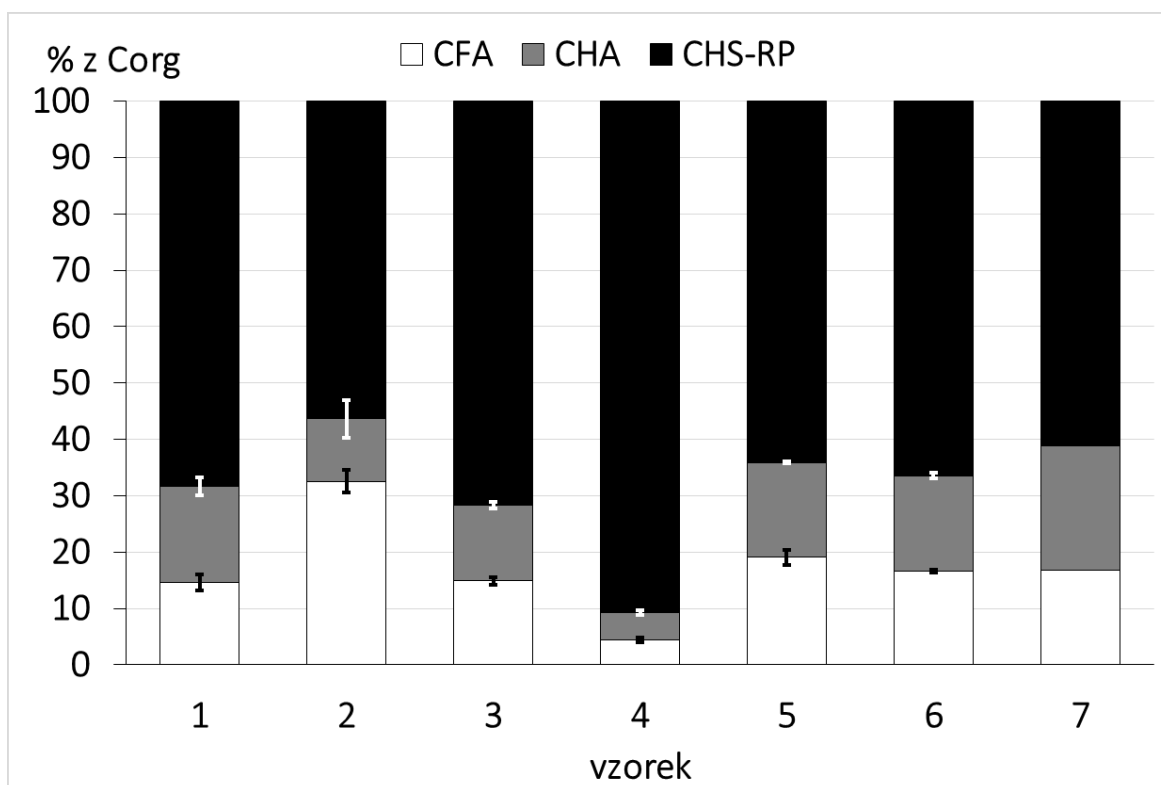


Podíly LP 2 u anhydrogenních horizontů jsou sice jak výše uvedeno srovnatelné s podíly F2, ale tyto podíly jsou u hydrogenních horizontů již nesrovnatelné a navíc relativně dosti nízké (nejnižší podíly z C_{org} ze všech metod). To znamená, že kyselá hydrolýza postihuje zcela odlišné skupiny organických látek jak původem, tak patrně i složením. Pro toto konstatování by však byla nutná analytická identifikační studie, která však velmi přesahuje rámec této práce. Výše uvedené konstatování potvrzují i hodnoty podílu zbytkového nezhydrolyzovaného uhlíku RP, které jsou sice ve skupině anhydrogenních horizontů relativně nízké (tedy z pohledu rozlišení frakcí POH vyhovující), ale ve skupině hydrogenních horizontů jsou rozdíly frakce RP vysoké (cca 80 % z C_{org}) a tedy z pohledu charakterizace POH nevyhovující. Protože podobná situace je i u kontrolní černozemě, nelze metodu kyselé hydrolýzy podobně jako oxidaci manganistanem draselným doporučit pro běžné půdy, a pro organogenní půdy jedině až po lepší charakterizaci získaných frakcí.

Frakcionace POH „klasickou“ alkalickou extrakcí

Tato klasická metoda doposud nejčastěji používaná pro charakteristiku POH zejména ve smyslu posouzení její kvality (Kubát et al., 2008) rozděluje organické sloučeniny v půdě rovněž na tři frakce a to na uhlík fulvokyselin (C_{FK}), uhlík huminových kyselin (C_{HK}) a neextrahovaný zbytek C_{HS-RP} většinou označovaný jako uhlík huminů. Výsledky alkalické extrakce uvádí graf 1d. Obsah nejlabilnější složky C_{FK} je srovnatelný s obsahem LP 1 u kyselé hydrolýzy, ale pouze v celkovém průměru (graf 2). Ve skupině hydrogenních horizontů je podíl C_{FK} sice vyšší než frakce LP 1, ale u anhydrogenních půd je tomu přesně naopak (LP 1 převažuje nad C_{FK}) (graf 3). Naprosto atypicky se chová fibrický mor (vz. č. 4), kde kromě nízkého podílu C_{FK} je nízký i podíl C_{HK} . Patrně i zde by bylo možno hledat souvislost s nejvyšším obsahem C_{org} ze všech vzorků. Jednoznačně nejvyšší obsah fulvokyselin vykazuje reziduální mor (vz. č. 2), což při současném nejnižším obsahu C_{HK} ze sledovaného souboru znamená i nejnižší poměr HK:FK (= 0,34). V podstatě tak jako jediné odběrné místo naplňuje teoretickou představu vlastností typických pro lesní humusové horizonty pod jehličnany (Němeček et al., 2011). Procentický podíl druhé frakce, tedy C_{HK} , činí v průměru 15 % a je také srovnatelný s velikostí frakce LP 2 u kyselé hydrolýzy a dokonce i s C_{PM-24h} u oxidace manganistanem draselným. Nejnižší obsah C_{HK} ze všech sledovaných horizontů vykazuje, jak už je výše uvedeno, fibrický mor (vz. č. 4) následovaný reziduálním morem (vz. č. 2).

Graf 1d. Průměrně zastoupení frakcí při alkalické extrakci podle Stevenson, 1994
(chybovými úsečkami vyznačená směrodatná odchylka, n = 4, vzorek 7 n = 2)

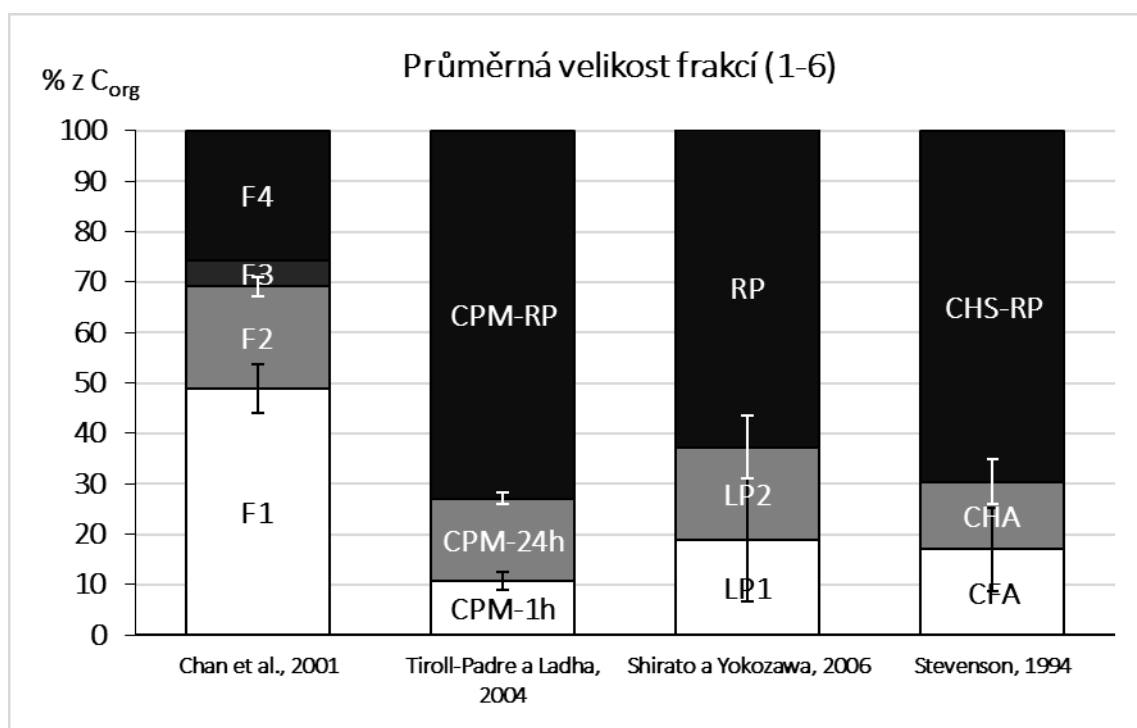


Zdánlivě překvapivým výsledkem u alkalické extrakce jsou vysoké podíly neextrahovatelného uhlíku C_{HS-RP} z celkového uhlíku C_{org} . V případě některých organogenních horizontů (drnový mor 1, drťový mor 3 a zejména fibrický mor 4) by bylo možno uvažovat o jistém stupni karbonizace, i když výsledky frakcionace kontrolní černozemě se v tomto případě nijak zvlášť výrazně neliší. Možno však dodat, že při původní analýze této černozemě v úpravě podle Horáčka (1986), byl dosažen vyšší extrahovaný podíl HK a FK (při vyšším poměru HK:FK = 1,74 oproti současným 1,32), ovšem za použití jemnějšího prosevu vzorku (< 0,25 mm) a nahrazení filtrace centrifugací. Tento postup by patrně mohl podíl neextrahovaného uhlíku snížit. Málo zdůvodnitelnou skutečností naopak zůstávají vysoké poměry HK:FK u všech organogenních horizontů šumavských půd s výjimkou reziduálního moru (vz. č. 2), který však nelze považovat za příliš organogenní (nízký obsah C_{org}). Proto ani postup klasické frakcionace POH alkalickou extrakcí a poté stanovení frakcí FK a HK spalováním na mokré cestě nelze pro organogenní horizonty příliš doporučit.

K závěru jisté srovnatelnosti výsledků podobných si frakcí získaných alkalickou extrakcí, kyselou hydrolyzou a oxidací manganistanem draselným bychom sice mohli dospět v případě

jednoduchého zprůměrování podílů jednotlivých frakcí na celkovém obsahu C_{org} ze všech vzorků analyzovaného souboru (graf 2). A to za předpokladu, že např. první extrahované nebo zoxidované frakce (F1, příp. F2, dále LP 1 a C_{FK}) budeme považovat za „labilní“ složku POH, zatímco třetí, resp. čtvrtou, zbytkovou frakci (neextrahovatelné RP a C_{HS-RP} , nezoxidovaná F4) za „stabilní“ složku POH.

Graf 2. Průměrné zastoupení frakcí humusových horizontů podle jednotlivých metod frakcionace POH (chybovými úsečkami vyznačená směrodatná odchylka, n = 6)

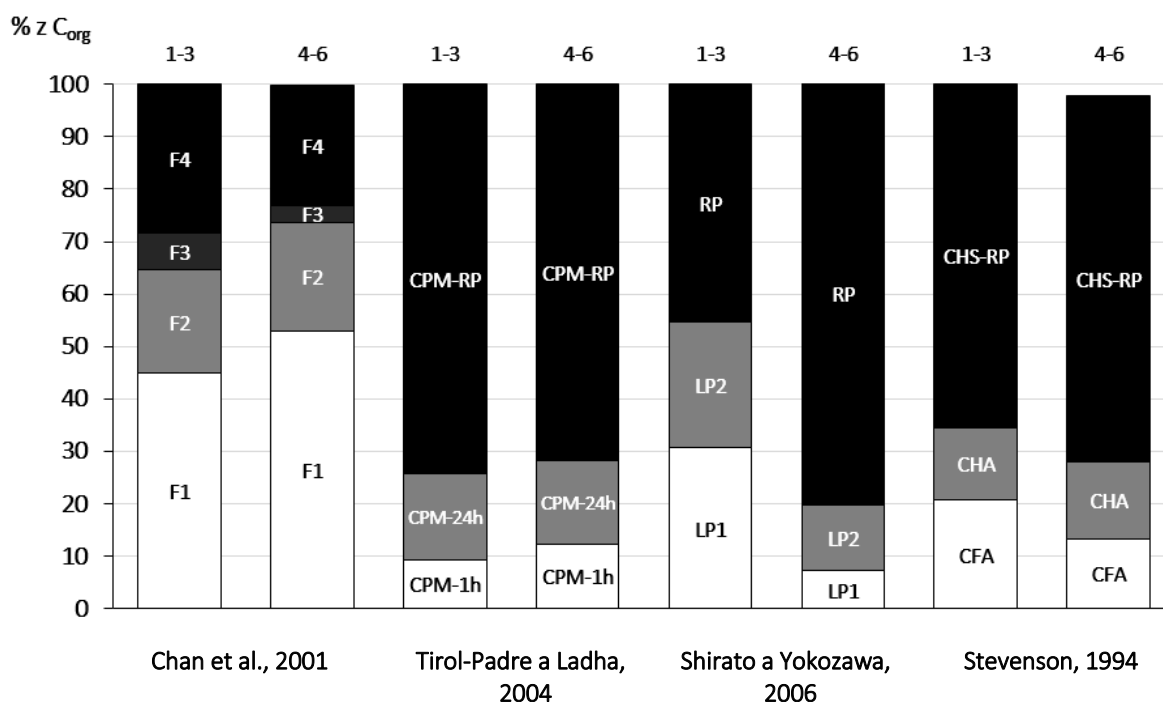


Avšak při rozdělení souboru na skupinu hydrogenních a anhydrogenních horizontů se ukazuje, že různými způsoby frakcionace jsou získány v každé skupině podobné množství podílů frakcí, ale vzájemně odlišné pro hydrogenní resp. anhydrogenní charakter humusu (graf 3).

Diskusi porovnání v práci použitých postupů frakcionace POH lze uzavřít tak, že to, jaké podíly z C_{org} budou jak kvantitativně, tak kvalitativně vyděleny, resp. vyextrahovány, zoxidovány nebo hydrolyzovány, záleží jednak na použité separační metodě a jednak na původu resp. složení zkoumané POH. Zároveň nelze najít uspokojivou shodu mezi použitými metodami frakcionace, resp. mezi získanými nebo zoxidovanými (hydrolyzovanými) podíly jednotlivých frakcí a nelze tedy dosti dobře rozhodnout o shodném nebo alespoň příbuzném charakteru rozdělovaných organických látek. Zde by samozřejmě velmi pomohla identifikace

jednotlivých organických sloučenin, o kterou se někteří autoři (Piccolo, 2002; Jagadamma et al., 2010; Rovira et al., 2012) v poslední době snaží. U oxidačních metod je však tato identifikace (alespoň prozatím) technicky téměř vyloučena a u ostatních způsobů (hydrolýza, extrakce) je komplikována např. narušením původních vazeb na minerální složku půdy i porušením některých vazeb ve vlastních organických látkách (Horáček, 1995)

Graf 3. Průměrná velikost frakcí POH anhydrogenních (vzorky 1 – 3) a hydrogenních (vzorky 4 – 6) horizontů Šumavských půd



Vzájemné vztahy mezi získanými frakcemi POH

Výše uvedené závěry podporuje i provedená vzájemná korelace mezi získanými frakcemi u použitých metod dělení POH (tabulka 5). I když se v této práci jedná o statistické vyhodnocení malého souboru vzorků a zjištěné korelační vztahy by třeba v případě rozsáhlejšího výzkumu nebyly tak markantní, podařilo se nalézt řadu zajímavých spojení. V první řadě je třeba také upozornit, že byly zkoumány korelace všech frakcí navzájem a tudíž vysoké negativní koeficienty mezi prvými extrahovanými, oxidovanými nebo hydrolyzovanými frakcemi a podíly neextrahovatelnými, neoxidovatelnými a nehydrolyzovatelnými u těchto metod lze z logického hlediska očekávat; jsou spíše kontrolou konzistence použité metody a nebudou tedy více diskutovány. Dále však byly nalezeny vztahy poněkud překvapivé oproti očekáváním (např. mezi lehce oxidovatelnou frakcí F1 a

Tabulka 5. Vzájemné korelační koeficienty frakcí (hodnocení statistické významnosti: * $\alpha \leq 0,005$; ** $0,005 < \alpha \leq 0,05$; * $0,05 < \alpha \leq 0,1$).**

Frakce	C_{HS-RP}	C_{HA}	C_{FA}	RP	LP2	LP1	C_{PM-RP}	C_{PM-24h}	C_{PM-1h}	F4	F3	F2	F1
F1	0,550	-0,470	-0,448	0,806**	-0,860**	-0,738**	-0,771**	0,252	0,688*	-0,871**	-0,756**	0,030	1
F2	0,081	0,621*	-0,447	0,190	-0,092	-0,248	0,462	-0,598	-0,129	-0,298	-0,384	1	
F3	-0,627*	0,118	0,741**	-0,810**	0,824**	0,775**	0,386	-0,098	-0,362	0,533	1		
F4	-0,371	0,254	0,336	-0,641*	0,651*	0,604	0,549	0,045	-0,631*	1			
C_{PM-1h}	0,117	-0,229	-0,024	0,815**	-0,807**	-0,799**	-0,823	-0,152	1				
C_{PM-24h}	-0,003	-0,398	0,224	-0,166	-0,078	0,292	-0,437	1					
C_{PM-RP}	-0,104	0,437	-0,107	-0,646*	0,780**	0,559	1						
LP1	-0,511	0,165	0,566	-0,991***	0,911**	1							
LP2	-0,373	0,176	0,382	-0,957***	1								
RP	0,503	-0,205	-0,534	1									
C_{FA}	-0,913**	0,315	1										
C_{HA}	-0,675*	1											
C_{HS-RP}	1												

neextrahovaným zbytkem $C_{HS-RP} = 0,550$), jejichž zdůvodnění je již obtížnější z hlediska současného paradigmatu, kdy huminová frakce je považována za inertní. Do hodnocení se promítá také výraznější rozdílnost metody oxidace dichromanem draselným (Chan et al., 2001), jejímž účinkům podlehla značná část C_{org} (obsahy frakce F4 jsou pouze 26 % v průměru šesti vzorků), oproti ostatním třem postupům, u kterých převažují složky rezistentní (RP, $C_{HS-RP} C_{PM-RP} > 50\%$ z C_{org} v průměru, graf 2)

Hlavním znakem charakterizujícím vztahy mezi frakcionačními postupy je velká rozdílnost mezi dynamikou oxidace a kyselé hydrolyzy. Z tabulky 5 vyplývá silně antagonistický vztah mezi „labilními“ frakcemi z hlediska oxidace a „labilními“ podíly po kyselé hydrolyze, což dokládají nalezené korelační koeficienty pro F1 a LP 1 ($r = -0,738$), či dokonce F1 a LP 2 ($r = -0,860$). Trend vztahu potvrzují i „stabilní“ frakce z těchto stanovení F4 a RP ($r = -0,641$). I bez možnosti přesné identifikace látek podléhajících hydrolyze nebo oxidaci je jasné, že účinkům oběma metod podléhá rozdílné spektrum látek.

Kromě nedostatku prací, které aplikují alespoň dvě frakcionační metody na stejný soubor vzorků, brání možnosti lepšího srovnání s výsledky ostatních autorů i používání odlišných činidel nebo jiných půd. Přesto byly zjištěny některé korelace podobné s údaji dalších autorů. Např. výše uvedený vztah mezi frakcí F4 (neoxidovatelný C_{org} dichromanem draselným) a frakcí RP (nehydrolyzovatelný C_{org}) vyšel podobný Paulovi et al. (2008) mezi neoxidovatelným zbytkem (ale v případě uvedených autorů při oxidaci chlornanem sodným) a nehydrolyzovanou částí POH (hydrolyza 6M HCl). Uvedeným autorům vyšel i velmi těsný vztah ($r = -0,954$) mezi neoxidovatelným zbytkem (opět NaClO) a neextrahovatelným zbytkem po extrakci pyrofosfátem sodným, zatímco v našem pokusu byl obdobný vztah méně těsný, statisticky neprůkazný (F4 a C_{HS-RP} , $r = -0,371$), ovšem u uvedených autorů nebyl použit jako v našem případě směsný roztok pyrofosfátu sodného a NaOH, ale pouze samotný roztok $Na_4P_2O_7$. Na druhé straně Zimmermann et al. (2007) nacházejí kladný vztah mezi podílem půdního uhlíku hydrolyzovatelným pomocí HCl a frakcí oxidovatelnou za použití NaClO ($r = -0,442$), ale mezi obdobnými frakcemi F1 a LP1 z této práce byl zjištěn korelační vztah opačný ($r = -0,738$).

Korelační koeficienty mezi frakcemi obou oxidačních metod odpovídají svým trendem očekáváním, tedy pozitivní korelace mezi „labilnějšími“ frakcemi F1 a C_{PM-1h} a mezi neoxidovatelnými F4 a C_{PM-RP} , avšak nejsou statisticky až tak významné ($r = 0,688$ pro první z uvedených vztahů a pouze $r = 0,594$ pro druhou korelaci, statistická významnost viz tabulka 5). Mezi „středními“ frakcemi F2, F3 a C_{PM-24h} jsou vztahy velmi volné. U manganistanové oxidační metody podle Tirol-Padreho a Ladhy (2004) se neprojevila

v podstatě žádná souvislost s metodou klasické alkalické extrakce, ale ve vztahu ke kyselé hydrolyze velmi dobře kopíruje silné negativní vztahy dichromanové oxidace s kyselou hydrolyzou ($r = -0,799$ pro C_{PM-1h} a LP 1; $r = -0,646$ pro C_{PM-RP} a RP), jak již bylo uvedeno výše. To opět dokládá již zmíněnou odlišnost oxidačního a hydrolytického přístupu k hodnocení POH, při kterém tedy nelze zaměňovat frakce izolované jako „labilní“ bez ohledu na užitou metodu. Při výběru frakcionační metody také nelze vždy libovolně volit mezi oxidací na mokré cestě a kyselou hydrolyzou. Při porovnání obou oxidačních metod hovoří výše uvedené skutečnosti opět ve prospěch metody oxidace dichromanem draselným z hlediska její vyšší citlivosti (absence vztahů u oxidace manganistanem draselným s alkalickou extrakcí).

Konečně srovnání metod kyselé hydrolyzy a alkalické extrakce naznačuje určitou podobnost výsledků těchto dvou postupů, avšak korelace dosažené v našem případě nejsou statisticky průkazné, pouze indikují trend ($r = 0,566$ pro vztah LP 1 a C_{FK} , resp. $r = 0,503$ pro RP a C_{HS-RP}). Metoda kyselé hydrolyzy pak také jeví největší vnitřní konzistenci doloženou vysokými zápornými korelacemi mezi „labilními“ frakcemi a neextrahovaným zbytkem RP ($r = -0,991$ pro LP 1 a $r = -0,957$ pro LP 2).

Antagonistický rozdíl v chování POH při oxidaci oproti extrakci a hydrolyze odráží i vzájemné korelace frakcí F4 a C_{HS-RP} ($r = -0,371$), resp. F4 a RP ($r = -0,641$). Tyto nálezy je možno přiřadit k trendu posledních let, kdy jsou v odborné literatuře revidovány (Piccolo, 2002; Bruun et al., 2008) novými poznatky a hlavně je revidována interpretace „klasických“ ukazatelů „kvality“ POH vypočtených po stanovení frakcí FK, HK a huminů.

5.2 Vztahy frakcí POH s vybranými parametry POH

Ze samotného vyhodnocení korelačních vztahů mezi frakcemi POH resp. C_{org} získanými z humusových horizontů různého původu vybraných půd Šumavy ještě nelze nalézt metodicky a prakticky využitelný vztah. Proto byly provedeny další doplňující analýzy, charakterizující podrobněji jejich půdní organickou hmotu a další vybrané analýzy, charakterizující půdu jako takovou.

Korelační koeficienty procentuálního zastoupení jednotlivých frakcí u různých postupů frakcionace s vybranými charakteristikami POH jsou uvedeny v tabulce 6. Uvedené vztahy se vyznačují nižší mírou statistické průkaznosti než u vzájemných vztahů frakcí, s výjimkou alkalické extrakce. Statisticky významné vztahy se podařilo nalézt především u vztahu frakcí s horkovodorozpustným uhlíkem C_{hws} , resp. respiračním testem BSK₂₁.

Tabulka 6. Korelační koeficienty jednotlivých frakcí POH s ukazateli celkového, aktivního a mikrobiálního uhlíku (hodnocení statistické významnosti: * $\alpha \leq 0,005$; ** $0,005 < \alpha \leq 0,05$; * $0,05 < \alpha \leq 0,1$)**

Frakce	Ukazatel půdního C				
	C _{org}	C _{ox}	C _{hws}	C _{BM}	BSK ₂₁
F1	0,440	0,500	0,762**	0,192	0,685*
F2	0,038	0,018	0,125	0,495	0,203
F3	-0,550	-0,573	-0,908**	-0,139	-0,815**
F4	-0,248	-0,306	-0,477	-0,442	-0,483
C _{PM-1h}	-0,057	0,007	0,252	0,536	0,130
C _{PM-24h}	0,082	0,100	0,258	-0,887**	0,136
C _{PM-RP}	0,005	-0,064	-0,378	0,023	-0,196
LP1	-0,352	-0,393	-0,652*	-0,606	-0,564
LP2	-0,230	-0,283	-0,687*	-0,289	-0,524
RP	0,348	0,394	0,694*	0,511	0,585
C _{FA}	-0,886**	-0,879**	-0,829**	-0,331	-0,917**
C _{HA}	-0,682*	-0,712*	-0,488	0,115	-0,540
C _{HS-RP}	0,982***	0,989***	0,855**	0,208	0,945***

Nejlepší korelace s uvedenými ukazateli dosáhla metoda frakcionace s využitím zvyšujícího se oxidačního účinku dichromanu draselného (frakce F1 má nejvyšší kladný korelační koeficient s C_{hws} a BSK₂₁ z „labilních“ frakcí), což odpovídá teoretickému předpokladu a v porovnání s ostatními metodami frakcionace, zvláště s druhou oxidační metodou, ji preferuje jako nejcitlivější. Obtížněji vysvětlitelná je relativně nízká korelace této frakce (F1) s C_{BM}, která je naopak nejvyšší u frakce F2. To by mohlo znamenat, že mikroedafonem jsou využívány jiné skupiny organických látek, nepatřící k úplně nejlabilnějšímu podílu POH, nebo by to též mohlo souviset i s jevem, který byl na našem pracovišti zjištěn i při jiné příležitosti (Horáček et al. 2007), kdy totiž i menší masa (hmotnost) mikroorganismů může produkovat větší množství oxidu uhličitého, resp. spotřebovat více kyslíku, než jiné větší množství mikroorganismů odlišného složení. Také je nutno dodat, že stanovené množství biomasy mikroorganismů vykazuje nejvyšší rozptyl výsledků ze všech prováděných testů a jeho spolehlivost je tedy nižší.

Frakce F3 se svými vysokými zápornými korelačními koeficienty ve vztahu k vybraným ukazatelům POH se vyděluje jako frakce „stabilní“ (opět dokládá oprávněnost názoru Majumdera et al., 2008, k sumarizaci F3 + F4). Nalezené vztahy jsou dokonce výraznější než pro frakci F4. Vyšší hodnoty záporných korelací s ukazateli aktivního uhlíku (C_{hws}, C_{BM} a

BSK₂₁), než s celkovým uhlíkem (C_{org} a C_{ox}) pak potvrzují, že se jedná o frakci mikrobiálně neaktivní, resp. pro mikroorganismy nedostupnou.

U druhé zkoušené metody (oxidace pomocí KMnO₄) byly nalezeny jen velmi slabé či téměř žádné vztahy k vybraným ukazatelům POH. Výjimku tvoří pouze nejlabilnější frakce C_{PM-1h} a to pouze ve vztahu k množství biomasy mikroorganismů ($r = 0,536$). Druhá získaná frakce C_{PM-24h} má naopak k C_{BM} výrazně záporný vztah ($r = -0,887$), což vzhledem k relativně nízkým hodnotám ostatních korelací nelze dosti dobře vysvětlit. Také vztahy zbytkové frakce C_{PM-RP} se stanovenými charakteristikami POH nejdou objektivně hodnotit a pozorovat v nich nějaký významnější vzájemný vztah. Tato konstatování potvrzují nevhodnost použití této mírné oxidační frakcionační metody pro nějakou charakterizaci POH.

Metoda kyselá hydrolyzy dle Shirata a Yokozawy (2006) vykázala překvapivé výsledky. Oproti očekávání jsou vztahy „labilních“ frakcí LP 1 a LP 2 s ukazateli aktivního uhlíku záporné. K podobným, i když méně průkazným zjištěním však dospěli i Rovira et al. (2010), kterým korelace LP 2 a uhlíku respirovaného po 45 dnech vyšla $r = -0,295$, zatímco v našem případě obdobný vztah LP 2 a BSK₂₁ byl dokonce $r = -0,524$. Interpretace těchto výsledků se tedy přiklání spíše k názoru, že pro rozklad POH jsou důležitější oxidační procesy než hydrolytické štěpení, což podporují i některé novější práce (Jagadamma et al., 2010).

U alkalicky neextrahovatelné frakce C_{HS-RP} (tedy huminů) bychom očekávali vysokou míru korelace s C_{org}, resp. s C_{ox}, která byla skutečně nalezena, neboť huminy jsou považovány za velmi stabilní složku POH nepodléhající výrazným změnám v čase (Stevenson, 1994). O něco nižší, avšak stále velmi vysoká míra korelace s ukazateli „labilní“ POH (C_{hws}, BSK₂₁) je však velice překvapivá a lze ji jen těžko zdůvodnit bez možnosti další identifikace látek. Částečné vysvětlení těchto vysokých čísel bychom mohli hledat v možné závislosti na celkovém obsahu organického uhlíku, který tyto „labilní“ frakce do jisté míry odráží (viz tabulka 3). Dalším důvodem by mohl být samotný charakter vzorků, neboť pokud by byla zařazena do korelačních vztahů i referenční černozem, poklesly by vypočtené korelační koeficienty frakce C_{HS-RP} s ukazateli půdního uhlíku z $r = 0,982$ na $r = 0,857$ pro C_{org}, z $r = 0,854$ na $r = 0,699$ pro C_{hws} a z $r = 0,945$ na $r = 0,741$ pro BSK₂₁. Výjimku představuje opět mikrobiální biomasa, kde jsou vztahy v případě alkalické extrakce zcela nevýrazné.

Opačného trendu, tedy záporné korelace s ukazateli půdního uhlíku, a to opět s výraznou statistickou průkazností, dosahuje frakce huminových kyselin (C_{HK}), frakce fulvokyselin (C_{FK}) vykazuje stejně orientovanou korelaci, avšak již slabší. To potvrzuje již v předchozí části diskuze naznačenou skutečnost, že extrakční a hydrolytický přístup k hodnocení POH poskytuje výsledky výrazně odlišné od metod oxidačních a podporuje to také nedávné

domněnky (Piccolo, 2002), že vlastnosti obou skupin alkalicky extrahovaných látek (FK a HK) si jsou podobnější, než se dříve předpokládalo, a zároveň je charakter huminových kyselin bližší fulvokyselinám nežli huminům.

Z uvedených výsledků vyplývá, že stabilitu POH nejlépe charakterizovala oxidace dichromanem draselným díky jednoznačné spojitosti labilních frakcí s ukazateli půdního uhlíku. Velmi citlivou se ukázaly jak klasická metoda alkalické extrakce, tak kyselá hydrolyza, ale u obou nastává problém v nejednoznačné interpretaci zjištěných výsledků. V rámci této práce není možné spolehlivě rozhodnout, zda se v případě těchto metod jedná o vliv způsobený výběrem netypického souboru vzorků, nebo by se tato jejich vlastnost projevila i u běžných zástupců orných půd. Zároveň je možno konstatovat, že množství biomasy mikroorganismů se jako charakterizující parametr pro podobnou POH, resp. pro podobný typ humusových horizontů, jaké byly použity v této práci, ukázalo z vybraných parametrů jako nejméně vhodné.

5.3 Hodnocení korelačních vztahů mezi frakcemi POH a ostatními vybranými půdními vlastnostmi

Hodnocení korelačních vztahů mezi získanými frakcemi POH a ostatními vybranými půdními ukazateli (tabulka 7) je v našem případě dosti obtížné, zejména proto, že se nejedná o humusové horizonty běžných půd, a také z důvodů uvedených již výše. Co se týká fyzikálních parametrů, nelze zde prakticky hodnotit vztahy k zrnitosti a údaje o objemové hmotnosti redukované O_r pouze odrážejí korelace s C_{org} (samozřejmě s opačným znaménkem) a nebudou tudíž dále diskutovány; ve výsledcích jsou uvedeny z důvodů jejich úplnosti.

Při hodnocení stanovených frakcí POH v souvislosti s chemickými ukazateli by se dal očekávat určitý vztah k půdní reakci. Hodnoty korelačních koeficientů výměnného pH s uvedenými frakcemi jsou však až na malé výjimky vesměs relativně nízké, a to patrně proto, že pH ve vzorcích vybraných humusových horizontů s výjimkou hydromoru (vzorek č. 5) je více méně uniformní. Vyšší hodnoty kladných korelačních koeficientů aktivní i výměnné půdní reakce u oxidace pomocí $KMnO_4$ s „labilní“ frakcí C_{PM-1h} by naznačovaly, že jsou v tomto podílu POH oxidovány spíše kyselější organické sloučeniny a naopak vyšší záporné hodnoty korelace u druhé frakce C_{PM-24h} by naznačovaly oxidaci spíše více alkalických organických sloučenin. Podobně lze hodnotit i vztah frakce LP 1 s půdní reakcí – jde o pravděpodobnost větší hydrolyzovatelnosti „alkaličtějších“ organických látek. Bez identifikace jednotlivých sloučenin v uvedených frakcích však nelze ani tuto úvahu brát za objektivní nebo více zobecňující.

Tabulka 7. Korelační koeficienty frakcí s vybranými fyzikálními a chemickými půdními ukazateli uhlíku (hodnocení statistické významnosti:

*** $\alpha \leq 0,005$; ** $0,005 < \alpha \leq 0,05$; * $0,05 < \alpha \leq 0,1$)

Frakce	ukazatel		
	O _r	pH _{KCl}	T
F1	- 0,491	- 0,115	0,284
F2	- 0,464	0,228	0,016
F3	0,819**	0,167	- 0,504
F4	0,347	- 0,083	- 0,050
C _{PM-1h}	- 0,010	0,562	- 0,272
C _{PM-24h}	0,123	- 0,804**	0,200
C _{PM-RP}	- 0,062	- 0,049	0,133
LP1	0,569	- 0,419	- 0,180
LP2	0,440	- 0,181	- 0,097
RP	- 0,553	0,332	0,183
C _{FA}	0,987***	0,169	- 0,835**
C _{HA}	0,264	0,366	- 0,597
C _{HS-RP}	- 0,881**	- 0,288	0,906**

Za ne zcela očekávaný lze považovat relativně slabý vztah výměnného pH k frakcím humusových kyselin, kdy tento vztah je dokonce slabší k frakci fulvokyselin C_{FA}, než k frakci kyselin huminových C_{HA}. Částečným vysvětlením je zde skladba humusových látek, resp. poměr HK:FK (viz výše), kdy s výjimkou reziduálního moru (vzorek č. 2) v odebraném souboru mírně převažují v průměru právě huminové kyseliny.

Nenaplnilo se ani očekávání ve významnějším vztahu podílů získaných, zvláště „labilnějších“ frakcí POH ke kationtové výměnné sorpční kapacitě KVK (Kolář et al., 2009), charakterizované v tomto případě hodnotou T stanovenou dle Sandhofa. Základní příčinou bude patrně nejen velké (až řádové) kolísání hodnot T u jednotlivých vzorků (viz tabulka 1), ale také skutečnost, že vzhledem k naprosto převažujícím podílům neextrahovatelné, nehydrolyzovatelné nebo neoxidovatelné POH vůči „labilním“ frakcím těmito postupy vydělenými, se mohou uplatňovat i jiné sorpční mechanismy. Korelační koeficienty hodnoty T se získanými frakcemi jsou většinou nízké a lze je těžko hodnotit. Výjimku tvoří u metody oxidace dichromanem draselným frakce F3, která svou hodnotou korelačního koeficientu ($r = -0,504$) potvrzuje svůj „inertní“ charakter, zmiňovaný již dříve.

Velmi vysoké hodnoty korelačních koeficientů s hodnotou T však nacházíme u klasické alkalické extrakce. U frakcí C_{FA} a C_{HA} jsou záporné hodnoty těžko zdůvodnitelné (snad kromě výše uvedeného) a lze říci, že neodpovídají teoretickému předpokladu. U frakce C_{HS-RP}

je možno (kromě také výše uvedeného zdůvodnění) se domnívat, že zatímco v běžných minerálních půdách je tato frakce spojena organominerálními vazbami s půdní matricí a proto neextrahovatelná a inertní, v případě humusových horizontů zkoumaných v této práci je těžiště sorpce právě v této frakci, a odpovídá tak nejlépe teoretickému konceptu biochemicky stabilizované POH, jak předpokládají Solins et al. (2002).

6. ZÁVĚR

U vybraných vzorků nadložních humusových horizontů půd Šumavy byla provedena frakcionace jejich půdní organické hmoty čtyřmi vybranými způsoby frakcionačních postupů. Z dosažených výsledků práce lze učinit následující závěry.

Při oxidačních postupech frakcionace se POH vybraných humusových horizontů chová jinak než při hydrolýze – výsledky z obou metod nelze zaměňovat, neboť mají antagonistický vztah.

Metodu oxidace manganistanem draselným nelze k frakcionaci POH organogenních půd doporučit pro značnou uniformitu, malé množství získaných labilnějších frakcí a nízkou citlivost ve vztahu k vybraným stanoveným ukazatelům půdního uhlíku těchto a podobných vzorků.

Hodnocení POH pomocí klasické alkalické extrakce není univerzálně použitelné. Zvláště problematické se jeví při aplikaci na silně organogenní vzorky, vykazuje však nejtěsnější vztahy se stanovenými ukazateli půdního uhlíku a s výměnnou kationtovou sorpční kapacitou odebraných vzorků. Touto metodou neextrahovatelný podíl však nemusí být vždy inertní pokud absentují vazby na minerální matici půdy a může být významný i svou sorpční schopností.

Anhydrogenní a hydrogenní podmínky tvorby a akumulace POH se projevily vyšší oxidovatelností této půdní organické hmoty při současné vyšší míře její odolnosti vůči kyselé hydrolýze i alkalické extrakci. U všech metod kromě alkalické extrakce bylo shledáno průkazné rozlišení mezi hydrogenním a anhydrogenním původem frakcí POH, nejvyšší pak u kyselé hydrolýzy. Proto při výběru metody pro charakterizaci organogenní POH je třeba zohlednit i pedogenetický vývoj příslušného půdního profilu.

Frakcionace POH pomocí oxidace dichromanem draselným se ukázala jako vhodná metoda ke stanovení „labilní“ části POH, neboť frakce F1 a F2 pozitivně korelují se stanovenými ukazateli půdního uhlíku odebraných vzorků.

Z parametrů charakterizujících POH vybraných humusových horizontů se ukázalo jako nejméně vhodné stanovení množství biomasy mikroorganismů, které nemělo výraznější vztah k žádné získané frakci POH ani u jedné z použitých metod frakcionace.

Dosažené výsledky jsou obtížně srovnatelné s výsledky jiných prací, a to kvůli použití odlišných vzorků půd a jiných modifikací metod frakcionace ostatními autory.

Ve značné části vztahů mezi frakcemi POH stanovenými jako „labilní“ nelze nalézt žádnou těsnou vazbu. Z toho plyne, že použité metody nejsou konzistentní a jimi získané frakce POH nelze dosti dobře vzájemně porovnávat.

Pro hodnocení resp. charakteristiku vybraných organogenních horizontů půd Šumavy a patrně i pro jiné silně organogenní půdy nelze doporučit žádnou z metod použitých v této práci.

7. LITERATURA

1. Adamczyk B., Kitunen V., Smolander A. (2009). Polyphenol oxidase, tannase and proteolytic activity in relation to tannin concentration in the soil organic horizon under silver birch and Norway spruce. *Soil Biol. Biochem.* 41:2085-2093.
2. Alexandrovová LN. (1970). [About nomenclature of soil humus matter. In: Soil humus (its genesis, properties and importance for pedogenesis and soil productivity)]. *Biol. Nauki*, p. 91-99, *Zap. LSCHI*, 231 p. (in Russian).
3. Anderson D.W., Paul E.A. (1984). Organo–mineral complexes and their study by radiocarbon dating. *Soil Science Society of America Journal* 48:298–301.
4. Anderson J.U. (1963). An improved pretreatment for mineralogical analysis of samples containing organic matter. *Clays Clay Mineralogy* 10:380–388.
5. Baisden W.T., Amundson R., Cook A.C., Brenner D.L. (2002). Turnover and storage of C and N in five density fractions from California annual grassland surface soils. *Global Biogeochemical Cycles* 16:117–132.
6. Baldock J.A., Masiello C.A., Gelinas Y., Hedges J.I. (2004). Cycling and composition of organic matter in terrestrial and marine ecosystems. *Marine Chemistry* 92:39–64.
7. Baldock J.A., Nelson P.N. (2000). Soil organic matter. In: Summer M. (Ed.) *Handbook of Soil Science*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 25–84.
8. Balesdent J., Besnard E., Arrouays D., Chenu C. (1998). The dynamics of carbon in particle-size fractions of soil in a forest-cultivation sequence. *Plant and Soil* 201:49–57.
9. Batjes N.H. (1996). Total C and N in soils of the world. *Eur. J. Soil Sci.* 47:151-163.
10. Blair G.J., Lefroy R.D.B., Lisle L. (1995). Soil carbon fractions based on their degree of oxidation, and the development of a carbon management index for agricultural system. *Australian Journal of Agricultural Research* 46:1459–1466.
11. Bisutti, I., Hilke, I., Raessler, M. (2004). Determination of total organic carbon—an overview of current methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 23:10, 716-726.
12. Broos K., Macdonald L.M., Warne M.S.J., Heemsbergen D.A., Barnes M.B., Bell M., McLaughlin M.J. (2007). Limitations of soil microbial biomass carbon as an indicator of soil pollution in the field. *Soil Biol. Biochem.* 39:2693-2695.
13. Bruun S., Ågren G.I., Christensen B.T., Jensen L.S. (2010). Measuring and modeling continuous quality distribution of soil organic matter. *Biogeosciences* 7:27-41.
14. Bruun S., Thomsen I. K., Christensen B. T., Jensen L. S. (2008). In search of stable soil organic carbon fractions: a comparison of methods applied to soils labelled with ¹⁴C for 40 days or 40 years. *Eur. J. Soil Sci.* 59:247–256.
15. Cambardella C.A., Elliott E.T. (1994). Carbon and nitrogen dynamics of soil organic matter fractions from cultivated grass-land soils. *Soil Sci. Soc. A. J.* 58:123-130.
16. Carvalo J.V.D., Mendoca E.D., Barbosa R.T. et al. (2010). Impact of expected global warming on C mineralization i maritime Antarctic soils results of laboratory experiments. *Antarctic Science* 22:579-593.
17. de Saussure T. (1804). *Recherches Chemiques sur la Végétation*, Paris
18. Derenne S., Largeau C. (2001). A review of some important families of refractory macromolecules: composition, origin, and fate in soils and sediments. *Soil Science* 166:833–847.
19. DosRamos J. G., Silebi C. A. (1990). The determination of particle size distribution of submicrometer particles by capillary hydrodynamic fractionation (CHDF). *J. Colloid. Interf. Sci.* 135:165–177.
20. Eusterhues K., Rumpel C., Kögel-Knabner I. (2005). Stabilization of soil organic matter isolated via oxidative degradation. *Organic Geochemistry* 36:1567–1575.
21. Eusterhues K., Rumpel C., Kögel-Knabner I. (2007). Composition and Radiocarbon Age of HF-resistant Soil Organic Matter in a Podzol and a Cambisol. *Organic Geochemistry* accepted.
22. Flaig W., Beutelspacher H., Rietz E. (1975). Chemical composition and physical properties of humic substances. In Giesecking J.E. (ed). *Soil Components Vol. 1: Organic Components*, Berlin, Springer, pp. 1–211.
23. Fraunhofer W., Winter G. (2004). The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceuticals and biopharmaceuticals, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58:369–383.

24. Gelinas Y., Baldock J.A., Hedges J.I. (2001). Demineralisation of marine and freshwater sediments for CP/MAS ¹³C NMR analyses. *Organic Geochemistry* 32:677–693.
25. Ghani A., Dexter M., Perrott K.W. (2003). Hot-water extractable carbon in soils; a sensitive measurement for determining impacts of fertilisation, grazing and cultivation. *Soil Biol. Biochem.* 35:1231-1243.
26. Ghosh S., Wilson B.R., Mandal B. et al. (2010). Changes in soil organic carbon pool in three long-term fertility experiments with different cropping systems and inorganic and organic soil amendments in the eastern cereal belt of India. *Australian Journal of Soil Research* 48:413-420.
27. Gregorich E.G., Beare M.H., McKim U.F., Skjemstad J.O. (2006). Chemical and biological characteristics of physically uncomplexed organic matter. *Soil Science Society of America Journal* 70:975–985.
28. Gregorich E.G., Beare M.H., Stoklas U., St-Georges P. (2003). Biodegradability of soluble organic matter in maize-cropped soils. *Geoderma* 113:237–252.
29. Guggenberger G., Kaiser K. (2003). Dissolved organic matter in soil: challenging the paradigm of sorptive preservation. *Geoderma* 113:293–310.
30. Hayes M.H.B. (1985). Extraction of humic substances from soils. In: MacCarthy P. (Ed.) *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization*. Wiley, New York, pp. 329–362.
31. Haynes R.J. (2005). Labile organic matter fractions as central components of the quality of agricultural soils: an overview. *Advances in Agronomy* 85:221–268.
32. Horáček J., Strosser, E., Čechová, V. (2014). Carbon fraction concentrations in a haplic Luvisol as affected by tillage. *Plant Soil Environment* 60 (6):262–266
33. Horáček J. (1995): Study of the organic matter exchanges and property in soil. Inaugural dissertation. ZF JU, České Budějovice, Czech Republic (in Czech)
34. Chan K. Y., Bowman A., Oates A. (2001). Oxidizable organic carbon fractions and soil quality changes in an oxic Paleustalf under different pasture leys. *Soil Sci.* 166:61-67.
35. Chaussod R., Houot S., Guiraud G., Hetier J.M. (1988). Size and turnover of the microbial biomass in agricultural soils: laboratory and field measurements. In: Smith K.A. (Ed.) *Nitrogen Efficiency in Agricultural Soils*. Elsevier applied Science, London, pp. 312–338.
36. Chefetz B., Salloum M.J., Deshmukh A.P., Hatcher P.G. (2002). Structural amounts of humic acids as determined by chemical modifications and carbon-13 NMR, pyrolysis-, and thermochemolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Soil Science Society of America Journal* 66:1159–1171.
37. Chenu C., Plante A.F. (2006). Clay-sized organo-mineral complexes in a cultivation chronosequence: revisiting the concept of the „primary organo-mineral complex“. *E. J. Soil Sci.* 57:596-607.
38. Christensen B.T. (1996). Matching measurable soil organic matter fractions with conceptual pools in simulation models of carbon turnover: revision of model structure. In: Smith J.U. (Ed.). *Evaluation of Soil Organic Matter Models*. Springer, Berlin, pp. 143-160.
39. Christensen B.T. (2001). Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *E. J. Soil Sci.* 52:345-353.
40. Jagadamma, S., Lal, R., Ussiri, D. A., Trumbore, S. E., Mestelan, S. (2010). Evaluation of structural chemistry and isotopic signatures of refractory soil organic carbon fraction isolated by wet oxidation methods. *Biogeochemistry*, 98 (1-3), 29-44.
41. Jastrow J.D., Boutton T.W., Miller R.M. (1996). Carbon dynamics of aggregate-associated organic matter estimated by carbon-13 natural abundance. *Soil Science Society of America Journal* 60:801–807.
42. Jenkinson D.S. (1976). The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—IV: the decomposition of fumigated organisms in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 8:203–208.
43. John B., Yamashita T., Ludwig B., Flessa H. (2005). Storage of organic carbon in aggregate and density fractions of silty soils under different types of land use. *Geoderma* 128:63–79.
44. Jones D.L., Willett W.B. (2005). Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biol. Biochem.* 38:991-999.
45. Kaiser E.-A., Mueller T., Joergensen R.G., Isam H., Heinemeyer O. (1992). Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 24:675–683.
46. Kaiser K., Guggenberger G. (2003). Mineral surfaces and soil organic matter. *European Journal of Soil Science* 54:219–236.

47. Kalbitz K., Schmerwitz J., Schwesig D., Matzner E. (2003). Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma* 113: 273–291.
48. Kiem R., Kögel-Knabner I. (2003). Contribution of lignin and polysaccharides to the refractory carbon pool in C-depleted arable soils. *Soil Biol. Biochem.* 35:101–118.
49. Kleber M., Sollins P., Sutton R. (2007). A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: self-assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry* 85:9–24.
50. Kögel-Knabner I. (2000). Analytical approaches for characterizing soil organic matter. *Organic Geochemistry* 31:609–625.
51. Kolář L., Klimeš F., Ledvina R., Kužel S. (2003). A method to determine mineralization kinetics of decomposable part of soil organic matter in the soil. *Plant Soil Environ.* 49:8-11.
52. Kolář L., Kužel S., Hanušová A., Gergel J., Ledvina R., Šindelářová M., Silovská Š., Štindl P. (2005). The use of Spectroquant Merck BOD photometric test to evaluate the stability of organic matters in soil. *Plant Soil Environ.* 51:46-50
53. Kolář L., Kužel S., Horáček J., Čechová V., Borová-Batt J., Peterka J. (2009). Labile fractions of soil organic matter, their quantity and quality. *Plant Soil Environ.* 55:245-251.
54. Kononovová M.M. (1966). *Soil Organic Matter*. Pergamon Elmsford, New York.
55. Körschens M. (1980). [Relations between the share of fine particles, Ct and Nt Contents in the soil]. *Arch. Acker Pflanzenb. Bodenkunde* 24:585–592 (in German).
56. Körschens M., Schulz E., Behm R. (1990). [Hot water extractable carbon and nitrogen of soils as a criterion for their ability of N-release]. *Zbl. Mikrobiol.* 145:305-311 (in German).
57. Kubát J., Cerhanová D., Mikanová O., Šimon T. (2008): Metodika hodnocení množství a kvality půdní organické hmoty v orných půdách. (A methodology for assessment of quantity and quality of soil organic matter in arable lands.) A methodology for the purpose of practice. Prague, The Crop Research Institute, v.v.i., page 34
58. Leavitt S.W., Follett R.F., Paul E.A. (1996). Estimation of the slow and fast cycling soil organic carbon pools from 6N HCl hydrolysis. *Radiocarbon* 38:230–231.
59. Leifeld J., Fuhrer J. (2005). The temperature response of CO₂ production from bulk soils and soil fractions is related to soil organic matter quality. *Biogeochemistry* 75:433–453.
60. Leifeld J., Kögel-Knabner I. (2001). Organic carbon and nitrogen in fine soil fractions after treatment with hydrogen peroxide. *Soil Biology & Biochemistry* 33:2155–2158.
61. Leinweber P., Schultern H.-R., Körschens M. (1995). Hot water extracted organic matter: chemical composition and temporal variations in a long-term field experiment. *Biology and Fertility of Soils* 20:17–23.
62. Loginow W., Wisniewski W., Gontet S.S., Ciescinska B. (1987). Fractionation of organic C based on susceptibility to oxidation. *Pol. J. Soil Sci.* 20:47-52.
63. Loss A., Pereira M.G., Ferreira E.P. et al. (2009). Oxidizable organic carbon fractions of an ultisol under an alley cropping system. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 33:867-874.
64. Lundberg P., Ekblad A., Nilsson M. (2001). ¹³C NMR spectroscopy studies of forest soil microbial activity: glucose uptake and fatty acid biosynthesis. *Soil Biology & Biochemistry* 33:621–632.
65. Maia, B. F. C. M., Novotny, E. H., Rittl, T. F., Hayes, B. M. H. (2013). Soil organic matter: chemical and physical characteristics and analytical methods. A review. *Current Organic Chemistry*, 17 (24), 2985-2990.
66. Majumder B., Mandal B., Bandyopadhyay P. K. (2008). Soil organic carbon pools and productivity in relation to nutrient management in a 20-year-old rice-berseem agrosystem. *Biol. Fertil. Soils* 44:451-461.
67. McLauchlan K.K., Hobbie S.E. (2004). Comparison of labile soil organic matter fractionation techniques. *Soil Science Society of America Journal* 68:1616–1625.
68. Menegatti A.P., Früh-Green G.I., Stille P. (1999). Removal of organic matter by disodium peroxodisulfate: effects on mineral structure, chemical composition and physicochemical properties of some clay minerals. *Clay Minerals* 34:247–257.
69. Menšík, L. (2010). Frakcionace humusových látek lesních půd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 210.

70. Mikutta R., Kleber M., Kaiser K., R. Jahn, R. (2005). Review: organic matter removal from soils using hydrogen peroxide, sodium hypochlorite and disodium peroxodisulfate. *Soil Science Society of America Journal* 69:120–135.
71. Najmr S. (1958). [System of soil organic matter classification]. *Rostl. Vým.* 31:661-692 (in Czech).
72. Němeček, J., Mühlhanslová, M., Macků, J., Vokoun, J., Vavříček, D., Novák, P. (2011). Czech Taxonomic Classification System of Soils. ČZU, Praha.
73. Novák B. (1966). [The relation between composition- and energy-turnover of organic matter during humification]. *Rostl. Vým.* 12:709-711 (in Czech).
74. Oades J.M., Waters A.G. (1991). Aggregate hierarchy in soils. *Australian Journal of Soil Research* 29:815–828.
75. Olk D.C. (2006). A chemical fractionation for structure–function relations of soil organic matter in nutrient cycling. *Soil Science Society of America Journal*, 1013–1022.
76. Olk D.C., Gregorich E.G. (2006). Overview of the symposium proceedings, “meaningful pools in determining soil carbon and nitrogen dynamics”. *Soil Science Society of America Journal* 70:967–974.
77. Parton W.J., Brookes P.C., Coleman K., Jenkinson D.S. (1987). Dynamics of C, N, S, and P in grassland soils: a model. *Biogeochemistry* 5:109–131.
78. Partyka T., Hamkalo Z. (2010). Estimation of oxidizing ability of organic matter of forest and arable soil. *Zemdirbyste-Agriculture* 97:33-40.
79. Paul, S., Veldkamp, E., & Flessa, H. (2008). Differential response of mineral-associated organic matter in tropical soils formed in volcanic ashes and marine Tertiary sediment to treatment with HCl, NaOCl, and Na₄P₂O₇. *Soil Biology and Biochemistry*, 40 (7), 1846-1855.
80. Paul E., Morris S.J., Conant R.T., Plante A.F. (2006). Does the acid hydrolysis–incubation method measure meaningful soil organic carbon pools? *Soil Science Society of America Journal* 70:1023–1035.
81. Paul E.A., Follett R.F., Leavitt S.W., Halvorson A., Peterson G.A., Lyon D.J. (1997). Radiocarbon dating for determination of soil organic matter pool sizes and dynamics. *Soil Science Society of America Journal* 61:1058–1067.
82. Petersen B.M., Bernsten J., Hansen S., Jensen L. (2005). CN-SIM—a model for the turnover of soil organic matter. I. Long-term carbon and radiocarbon development. *Soil Biology & Biochemistry* 37:359–374.
83. Peyton G.R. (1993). The free radical chemistry of persulfate based total organic carbon analysers. *Marine Chemistry* 41:91–103.
84. Piccolo A. (2002). The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy* 75:57–134.
85. Plante A.F., Fernández J.M., Leifeld J. (2009). Application of thermal analysis techniques in soil science. *Geoderma* 153:1–10.
86. Plante A.F., Chenu C., Balabane M., Mariotti A., Righi D. (2004). Peroxide oxidation of clay-associated organic matter in a cultivation chronosequence. *European Journal of Soil Science* 55:471–478.
87. Plante A.F., Pernes M., Chenu C. (2005). Changes in clay-associated organic matter quality in a C depletion sequence as measured by differential thermal analyses. *Geoderma* 129:186-199.
88. Poirier N., Sohi S.P., John L., Gaunt J.L., Mahieu N., Randall E.W., Powlson D.S., Evershed R.P. (2005). The chemical composition of measurable soil organic matter pools. *Organic Geochemistry* 36:1174–1189.
89. Rabek J.F., Randy B. (1975). Role of singlet oxygen in photo-oxidative degradation and photostabilization of polymers. *Polymer Engineering Science* 15:40–43.
90. Rovira, P., Romanyà, J., Duguy, B. (2012). Long-term effects of wildfires on the biochemical quality of soil organic matter: a study on Mediterranean shrublands. *Geoderma*, 179, 9-19.
91. Rovira P., Jorba M., Romanya J. (2010). Active and passive organic matter fractions in Mediterranean forest soils. *Biol. Fertil. Soils*. 46:355–369.
92. Rumpel C., Rabia N., Derenne S., Quenea K., Eusterhues K., Kögel-Knabner I., Mariotti A. (2006). Alterations of soil organic matter following treatment with 10% hydrofluoric acid (HF). *Organic Geochemistry* 37:1437–1451.
93. Shang C., Tiessen H. (2000). Organic Carbon turnover and carbon-13 natural abundance in organo–mineral fractions of a tropical dry forest soil under cultivation. *Soil Science Society of America Journal* 65:2149–2155.

94. Shirato Y., Yokozawa M. (2006). Acid hydrolysis to partition plant material into decomposable and resistant fractions for use in the Rothamsted carbon model. *Soil Biol. Biochem.* 38:812-816.
95. Schmidt M.W.I., Gleixner G. (2005). Carbon and nitrogen isotope composition of bulk soils, particle-size fractions and organic material after treatment with hydrofluoric acid. *European Journal of Soil Science* 56:407-419.
96. Schmidt M.W.I., Rumpel C., Kögel-Knabner I. (1999). Particle size fractionation of soil containing coal and combusted particles. *European Journal of Soil Science* 50:512-522.
97. Schnitzer M., Schuppli P. (1989). Method for the sequential extraction of organic matter from soils and soil fractions. *Soil Science Society of America Journal* 53:1418-1424.
98. Schulten H.R., Leinweber P. (1999). Thermal stability and composition of mineral-bound organic matter in density fractions of soil. *Eur. J. Soil Sci.* 50:237-248.
99. Schulten H.R., Leinweber P. (2000). New insights into organic-mineral particles: composition, properties and models of molecular structure. *Biology and Fertility of Soils* 30:399-432.
100. Schulz E. (1990). Die heißwasserextrahierbare C-Fraktion als Kenngröße zur Einschätzung des Versorgungszustandes der Böden mit organischer Substanz (OS). *Tagungsberichte der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften*, Berlin 295:269-275.
101. Schulz E. (2002). Influence of extreme management on decomposable soil organic matter pool. *Archiv Acker, Pflanze und Boden* 48:101-105.
102. Siewert C. (2004). Rapid screening of soil properties using thermogravimetry. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68:1656-1661.
103. Simpson M.J., Hatcher P.G. (2004). Determination of black carbon in natural organic matter by chemical and solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Organic Geochemistry* 35:923-935.
104. Siregar A., Kleber M., Mikutta R., Jahn R. (2005). Sodium hypochlorite oxidation reduces soil organic matter concentrations without affecting inorganic soil constituents. *European Journal of Soil Science* 56:481-490.
105. Six J., Conant R.T., Paul E.A., Paustian K. (2002). Stabilization mechanisms of soil organic matter: implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil* 241:155-176.
106. Six J., Elliott E.T., Paustian K. (2000a). Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *Soil Biology & Biochemistry* 32:2099-2103.
107. Skjemstad J. O., Taylor J. A., Smernik R. J. (1999). Estimation of charcoal (char) in soils. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 30:2283-2298.
108. Skjemstad J.O., Janik L.J., Head M.J., McClure S.G. (1993). High energy ultraviolet photo-oxidation: a novel technique for studying physically protected organic matter in clay- and silt-sized aggregates. *Journal of Soil Science* 44:485-499.
109. Smith J.U., Smith P., Monaghan R., McDonald A.J. (2002). When is a measured soil organic matter fraction equivalent to a model pool? *European Journal of Soil Science* 53:405-416.
110. Sollins P., Homann P., Caldwell B.A. (1996). Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma* 74:65-105.
111. Sollins P., Kramer M. G., Swanston C., Lajtha K., Filley T., Aufdenkampe A. K., Wagai R., Bowden R. D. (2009). Sequential density fractionation across soils of contrasting mineralogy: evidence for both microbial- and mineral-controlled soil organic matter stabilization. *Biogeochem.* 96:209-231.
112. Sollins P., Swanston C., Kleber M., Filley T., Kramer M., Crow S., Caldwell B.A., Lajtha K., Bowden R. (2006). Organic C and N stabilization in a forest soil: Evidence from sequential density fractionation. *Soil Biol. Biochem.* 38:3313-3324.
113. Sotáková S. (1982). *Organická hmota a úrodnost' pôdy*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, vydavateľstvo kníh a časopisov, n. p., 234 s.
114. Sparling G.P., Feltham C.W., Reynolds J., West A.W., Singleton P. (1990). Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the *k_{EC}*-factor. *Soil Biology & Biochemistry* 22:301-307.
115. Sparling G.P., Vojvodic-Vukovic M., Schipper L.A. (1998). Hot water soluble C as simple measure of labile soil organic matter: the relationship with microbial biomass C. *Soil Biology & Biochemistry* 30:1469-1472.
116. Stevens K.A., Jaykus L.A. (2004). Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: A review. *Crit. Rev. Microbiol.* 30:7-24.

117. Stevenson F.J. (1994). Humus chemistry. Genesis, composition, reactions. Second ed. Wiley, New York.
118. Strosser E. (2008). [Soil organic matter evaluation system based on hydrophilic fractionation and characterization of the fractions with differential thermic analysis]. Dipoloma thesis, ZF JU, České Budějovice (in Czech).
119. Strosser E. (2011). Methods for determination of labile soil organic matter: An overview. *Journal of Agrobiology* 28 (1).
120. Theng, B. K. G. (2012). Formation and properties of clay-polymer complexes (Vol. 4). Elsevier.
121. Tirol-Padre A., Ladha J.K. (2004). Assessing the reliability of permanganate oxidizable carbon as an index of soil labile carbon. *Soil Science Society of America Journal* 68:696–978.
122. Tjurin I.V. (1937). [Soil organic matter and its role in pedogenesis and soil productivity. Study of soil humus]. Moskva, Sel'skozgziz (in Russian).
123. Tjurin I.V. (1951). [Several results of study comparing humus composition in USSR soils]. *Trudy počv. inst.* 38:22-32 (in Russian).
124. Torn, M. S., Kleber, M., Zavaleta, E. S., Zhu, B., Field, C. B., Trumbore, S. E. (2013). A dual isotope approach to isolate carbon pools of different turnover times. *Biogeosciences*, 10, 8067-8081. doi:10.5194/bg-10-8067-2013.
125. Trumbore S.E., Vogel J.S., Southon J.R. (1989). AMS ^{14}C measurements of fractionated soil organic matter: an approach to deciphering the soil carbon cycle. *Radiocarbon* 31:644–654.
126. Trumbore S.E., Zheng S. (1996). Comparison of fractionation methods for soil organic matter ^{14}C analysis. *Radiocarbon* 38:219–229.
127. van Veen J.A., Kuikman P.J. (1990) Soil structural aspects of decomposition of organic matter by micro-organisms. *Biogeochemistry* 11:213–233.
128. Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S. (1987a). Microbial biomass measurements in forest soils: determination of kc values and tests of hypotheses to explain the failure of the chloroform fumigation-incubation method in acid soils. *Soil Biology & Biochemistry* 19:689–696.
129. Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S. (1987b). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology & Biochemistry* 19, 703–707.
130. von Lütow 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.
131. Waksman S.A. (1938). Humus—Origin, Chemical Composition and Importance in Nature. Second ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
132. Walkley A., Black I.A. (1934). An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37:29-38.
133. Wattel-Koekkoek E.J.W., Buurman P. (2004). Mean residence time of kaolinite and smectite-bound organic matter in Mozambiquan soils. *Soil Science Society of America Journal* 68:154–161.
134. Wendling B., Jucksch I., Mendonca E.S. et al. (2010). Organic-Matter Pools of Soil under Pines and Annual Cultures. *Comm. Soil Plant Anal.* 41:1707-1722.
135. Wiesenberg G.L.B., Schwarzbauer J., Schmidt M.W.I., Schwark L. (2004). Source and turnover of organic matter in agricultural soils derived from n-alkane/n-carboxylic acid compositions and C-isotope signatures. *Organic Geochemistry* 35:1371–1393.
136. Zbiral, J. Analýza půd: jednotné pracovní postupy. Vyd. 3., rozš. a přeprac. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2011, 230 s. ISBN 9788074010408.
137. Zimmermann, M., Leifeld, J., Abiven, S., Schmidt, M. W., Fuhrer, J. (2007). Sodium hypochlorite separates an older soil organic matter fraction than acid hydrolysis. *Geoderma*, 139 (1), 171-179.
138. Zsolnay A. (1996). Dissolved humus in soil waters. In: Piccolo A. (Ed.). *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, Amsterdam, pp. 171–224.

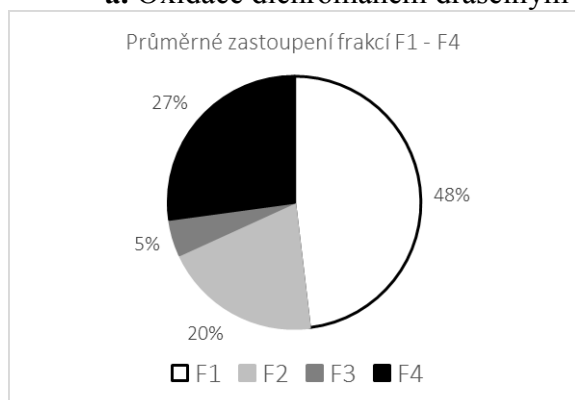
8. PŘÍLOHY

Seznam použitých zkratek a značek

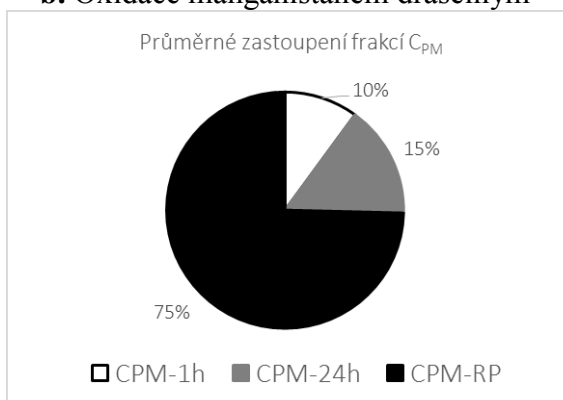
POH	půdní organická hmota
POM	Particulate Organic Matter
LF	Light Fraction, lehká frakce
TC	Total Carbon, celkový uhlík
IC	Inorganic Carbon, anorganický uhlík
TOC	Total Organic Carbon, celkový organický uhlík
WEOC	Water Extractable Organic Carbon, vodorozpustný organický uhlík
HWEOC	Hot Water Extractable Organic Carbon, horkovodorozpustný organický uhlík
DOC	Dissolved Organic Carbon, rozpustný organický uhlík
KVK	kationtová výměnná kapacita
TGA	Thermogravimetric Analysis, termogravimetrická analýza
DCB	Dithionite-Citrate-Bicarbona, směs dithioničitanu, citranu a hydrogenuhličitanu
SPT	sodium polytungstate $\text{Na}_6(\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40})$
FFF	Field Flow Fractionation
HGMS	High-Gradient Magnetic Separation
SPLITT	Split Flow Thin Cell
DGC	Density Gradient Centrifugation

Graf 4. Průměrné zastoupení frakcí POH (půdy 1 – 7).

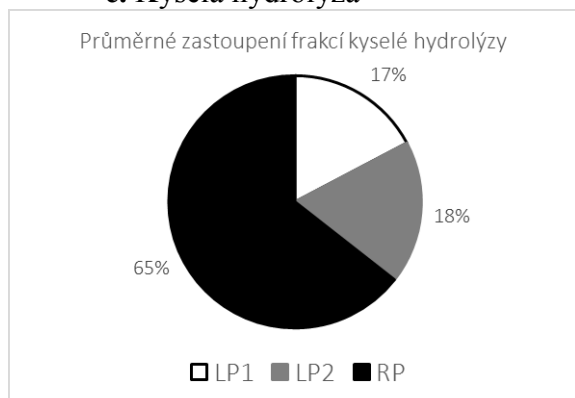
a. Oxidace dichromanem draselným



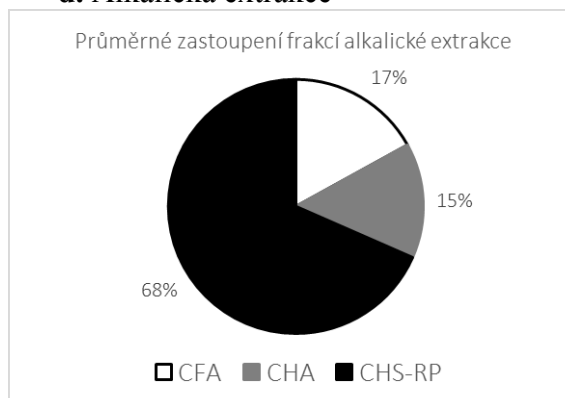
b. Oxidace manganistanem draselným



c. Kyselá hydrolyzá



d. Alkalická extrakce



Tabulka 8. Souhrn výsledků ze čtyř frakcionačních metod (podkladová data pro grafy 1 – 4; v % z C_{org}, ± směrodatná odchylka).

Frakce	vzorek										
	1	2	3	4	5	6	7	Průměr 1 - 6	Průměr 1 - 7	Průměr 1-3	Průměr 4-6
F1	43,42 ±0,58	46,77 ±11,45	44,40 ±1,63	54,85 ±1,80	48,43 ±1,77	55,75 ±1,64	43,08 ±3,14	48,94 ±4,78	48,10 ±4,88	44,87 ±1,41	53,01 ±3,26
F2	22,92 ±0,34	17,13 ±9,69	19,08 ±0,00	19,56 ±1,43	20,86 ±3,34	21,52 ±0,67	19,35 ±3,00	20,18 ±1,86	20,06 ±1,74	19,71 ±2,41	20,65 ±0,82
F3	6,94 ±0,24	9,23 ±1,35	4,76 ±2,70	3,09 ±1,08	5,27 ±1,66	1,35 ±1,12	2,04 ±1,83	5,11 ±2,54	4,67 ±2,59	6,98 ±1,83	3,23 ±1,60
F4	26,71 ±0,24	26,87 ±2,49	31,76 ±1,06	22,29 ±1,08	25,44 ±3,23	21,38 ±0,15	35,54 ±1,69	25,74 ±3,40	27,14 ±4,65	28,45 ±2,34	23,04 ±1,74
C _{PM-1h}	8,07 ±0,11	10,80 ±0,24	8,83 ±2,01	11,74 ±0,06	13,35 ±0,53	11,94 ±0,14	5,54 ±0,12	10,79 ±1,83	10,04 ±2,50	9,24 ±1,15	12,34 ±0,71
C _{PM-24h}	15,06 ±0,52	17,43 ±0,30	17,05 ±0,72	16,27 ±0,35	14,37 ±1,40	17,26 ±0,48	10,01 ±0,46	16,24 ±1,15	15,35 ±2,43	16,51 ±1,04	15,97 ±1,20
C _{PM-RP}	76,87 ±0,41	71,76 ±0,54	74,13 ±1,29	71,99 ±0,41	72,28 ±0,18	70,80 ±0,00	84,45 ±0,17	72,97 ±2,01	74,61 ±4,43	74,25 ±2,09	71,69 ±0,64
LP1	32,40 ±1,45	34,70 ±2,03	24,70 ±0,70	7,95 ±0,42	4,33 ±1,36	9,27 ±0,28	7,93 ±0,37	18,89 ±12,18	17,33 ±11,91	30,60 ±4,27	7,19 ±2,09
LP2	27,67 ±1,61	23,73 ±3,34	20,84 ±0,62	14,63 ±0,43	13,82 ±0,11	9,37 ±0,47	18,33 ±0,00	18,34 ±6,28	18,34 ±5,82	24,08 ±2,80	12,61 ±2,31
RP	39,94 ±2,25	41,57 ±1,58	54,46 ±0,59	79,40 ±3,37	81,85 ±1,25	81,35 ±0,19	73,37 ±0,37	63,10 ±18,37	64,56 ±17,38	45,32 ±6,49	80,87 ±1,06
C _{FA}	14,56 ±0,22	32,55 ±0,49	14,88 ±0,22	4,39 ±0,07	19,05 ±0,29	16,60 ±0,25	16,72 ±0,25	17,01 ±8,32	16,96 ±7,70	20,66 ±8,40	13,35 ±6,41
C _{HA}	17,03 ±0,87	11,07 ±0,66	13,42 ±0,24	4,92 ±0,26	16,86 ±0,25	16,96 ±0,26	22,05 ±0,33	13,37 ±4,38	14,61 ±5,07	13,84 ±2,45	14,67 ±5,65
C _{HS-RP}	68,41 ±0,15	56,39 ±0,04	71,70 ±0,06	90,69 ±0,12	64,09 ±0,96	66,44 ±1,00	61,23 ±0,92	69,62 ±10,53	68,42 ±10,18	65,50 ±6,58	69,72 ±12,02