

## 4. Aufschlüsse

### 4.5 Methoden zur Bestimmung von P-Fraktionen bzw. Bindungsformen in Bodenproben

*Dana Zimmer, Karen Baumann*

Wie in Kapitel „1.1.1 P-Bindungsformen in Böden“ genauer dargelegt, liegt Phosphor im Boden zwar in der Regel als Phosphat, aber in ganz unterschiedlichen **organischen** und **anorganischen Verbindungen** vor. Anorganische Phosphate können z. B. in Orthophosphate, Pyrophosphate und Polyphosphate und organische Phosphate z. B. in Orthophosphatmonoester, Orthophosphatdiester und Phosphonate eingeteilt werden (Cade-Menun und Liu 2013, Turner et al. 2005). Diese unterschiedlichen P-Verbindungen können **an Bodenminerale** wie z. B. Fe- und Al(hydr)oxide oder Tonminerale sowie organo-mineralischen Komplexen **gebunden** sein. Die Art der P-Verbindung und ihre Bindung an die Bodenmatrix beeinflusst die **Umsetzbarkeit** und **Bioverfügbarkeit** der P-Verbindung für Bodenorganismen und Pflanzen. Verschiedene nasschemische Methoden wie die sequentielle P-Fraktionierung oder der DL-Extrakt werden genutzt, um die P-Bindungsformen und ihre Bioverfügbarkeit z. B. mit Blick auf die Pflanzenernährung oder auch die P-Auswaschung in Gewässer abzuschätzen. Generell wird unterstellt, dass die genutzten Extraktionsmittel bestimmte Zielverbindungen attackieren und so eine Abschätzung der Bindungsform und Bioverfügbarkeit erlauben. Es ist aber zu beachten, dass, im Gegensatz zu spektroskopischen Methoden wie der  $^{31}\text{P}$ -NMR, alle **nasschemischen Extraktionen** nur **operationell definiert** sind, sie neben den Zielverbindungen also auch noch andere Bindungsformen extrahieren bzw. die Zielverbindungen nur unvollständig in den Extrakt überführen und es durch das Extraktionsmittel selbst zu Veränderungen der Bindungsformen kommen kann (z. B. Bacon und Davidson 2008). Dieses ist insbesondere bei der Benennung und Interpretation der Extrakte zu beachten.

Bei etlichen (sequentiellen) Extraktionen wird/kann die P-Konzentration im Extrakt mittels ICP-OES (oder MS) und/oder photometrisch, z. B. mittels Molybdänblau (MB), bestimmt werden. Wird P in einem Extrakt mit beiden Methoden bestimmt, wird die P-Konzentration mittels ICP-OES (Kapitel 5.1) als Total-P ( $\mathbf{P_t}$ ) und die mittels MB als anorganische P ( $\mathbf{P_i}$ ) und die Differenz

*Handbuch zur Auswahl der Aufschluss- und Bestimmungsverfahren für Gesamtphosphor in Umweltproben*

aus beiden als organisches P ( $P_o$ ) im Extrakt interpretiert. Es ist allerdings davon abzuraten, diese Bestimmung so 1 zu 1 zu interpretieren, da durch das saure Milieu des MB-Reagenzes ein unbekannter Anteil des labilen organischen P zu Phosphat umgewandelt werden und somit der Anteil von  $P_i$  über- und der von  $P_o$  unterschätzt werden. Alternativ liegen unbekannte Anteile von nicht-reaktiven anorganischen P vor, welches zu einer Unterschätzung des  $P_i$  und Überschätzung des  $P_o$  führt (z. B. Cade-Menun und Liu 2013, Condrón und Newman 2011). Aus diesem Grund ist die Bezeichnung **Molybdat-reaktives P** und **nicht-reaktives P** die bessere Bezeichnung (Haygarth und Sharpley 2000, Felgentreu et al. 2018).

### 4.5.1 Sequentielle P-Fraktionierung von Bodenproben

*Dana Zimmer, Karen Baumann*

#### Prinzip und Eignung der sequentiellen P-Fraktionierung

Im Boden ist Phosphor an unterschiedliche Bodenbestandteile gebunden und damit auch unterschiedlich mobilisierbar und bioverfügbar. Es gibt im P-Pool des Bodens verschiedene anorganische und organische P-Fraktionen, die aus Sicht der **P-Pflanzenverfügbarkeit** als **labile, moderat labile, relative unlösliche** und **stabile (langfristig verfügbar) P-Pools** angesehen werden können. Um diese P-Formen zu unterscheiden, wurden verschiedene Fraktionierungsmethoden entwickelt. Die meisten sequentiellen P-Fraktionierungen extrahieren zuerst eine „**schwach gebundene**“ Fraktion mit einer **Salzlösung** (z. B.  $NH_4Cl$ ), gefolgt von einer Extraktion von **Fe- und Al-gebundenem P** mit einem **alkalischen Extraktionsmittel** (z. B.  $NaOH$ ) und zuletzt einer **sauren Extraktion** (z. B.  $HCl$ ), um **Ca-gebundenes P** zu extrahieren (Condrón and Newman, 2011). Außerdem wird in den einzelnen Fraktionen z. T. zwischen organischem und anorganischem P mittels P-Bestimmung über Molybdänblau (MB) und ICP-OES/-MS unterschieden. Wird P in den Extrakten mit beiden Methoden bestimmt, wird die P-Konzentration mittels ICP-OES bzw. -MS als Total-P ( $P_t$ ) und die mittels MB als anorganische P ( $P_i$ ) und die Differenz aus beiden als organisches P ( $P_o$ ) interpretiert. Da durch das saure Milieu des MB-Reagenzes ein unbekannter Anteil des labilen organischen Ps zu Phosphat umgewandelt werden und somit der Anteil von  $P_i$  überschätzt werden oder alternativ unbekannte Anteile von nicht-reaktivem anorganischen P vorliegen, welches zu einer Unterschätzung des

P<sub>i</sub> führt (z. B. Cade-Menun und Liu 2013, Condron und Newman 2011), ist die Bezeichnung **Molybdat-reaktives P** und **nicht-reaktives P** die bessere Bezeichnung (Haygarth und Sharpley 2000, Felgentreu et al. 2018).

Eine der häufigsten sequentiellen P-Fraktionierungen ist die Fraktionierung nach Hedley et al. (1982) bzw. Thiessen and Moir (1993) (Alamgir and Marschner 2013 a, b). Die **modifizierte Hedley-Fraktionierung**, wie sie in den AGs Pflanzenbau und Bodenkunde der AUF (Uni Rostock) durchgeführt wird, umfasst nacheinander folgende Extraktionsschritte (F1) Wasser-Anionenharz, (F2) NaHCO<sub>3</sub>, (F3) NaOH und (F4) HCl oder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Hinweis:

- ▶ Diese P-Fraktionierung wird normalerweise für landwirtschaftlich genutzte Böden angewandt, ist aber generell für terrestrische Mineralböden geeignet. Wird sie für semiterrestrische (z. B. Gleye), semisubhydrische (z. B. Watt) und subhydrische (z. B. Gytjtja) Böden, Moore, marine Sedimente oder Substrate wie Güllen angewandt, sind die Ergebnisse mit noch größerer Vorsicht zu interpretieren, da in diesen Substraten stark von den terrestrischen Böden abweichende pH- und Eh-Werte (siehe Kapitel 2.3) sowie Bindungspartner für P (z.B. Konzentration organischer Substanz) vorliegen können.

### Interpretation der Ergebnisse

In dieser sequentiellen P-Fraktionierung können die Fraktionen generell wie folgt interpretiert werden, wobei zu beachten ist, dass, wie bei allen sequentiellen Fraktionierungen, die Fraktionen operationell definiert sind und nicht zu 100 % den Interpretationen entsprechen (Bacon and Davidson 2008).

- ▶ **F1:** Harz-P (labiles P): austauschbares P, oberflächlich sorbiert, gut pflanzenverfügbar, spiegelt durch Entzug des Phosphats aus dem Extraktionswasser durch das Anionenaustauscherharz, den Entzug durch die Pflanzenwurzeln wider (im Vergleich zu einem Kaltwasserextrakt, bei dem sich schneller ein Löslichkeitsgleichgewicht zwischen der Bodenprobe und dem Extraktionswasser einstellt).
- ▶ **F2:** NaHCO<sub>3</sub>-P (labiles P), leicht mineralisierbares, pflanzenverfügbares P (simuliert Wurzelatmung: Bildung von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> aus CO<sub>2</sub> -Abgabe)
- ▶ **F3:** NaOH-P ist moderat labiles P und damit mittel- oder längerfristig verfügbar, NaOH-P gilt als an Al-Fe- oder Huminstoffe gebundenes P
- ▶ **F4:** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-P: in Ca bzw. Carbonat gebundenes P

- ▶ **F5:** residuales P = Gesamt-P (TP aus Königswasserextrakt der Bodenprobe und ICP-OES-Messung) minus der Summe der Fraktionen F1...F4 (P aus ICP-OES-Messungen); oder TP im Extraktionsrückstand bestimmen, nur langfristig verfügbares P

Am ICP-OES wird Gesamt-P im jeweiligen Extrakt gemessen, während mit der MB-Methode das reaktive Phosphat-P und damit annähernd der anorganische P-Anteil ( $P_i$ ) im Extrakt erfasst werden kann. Die Differenz zwischen beiden Messungen ergibt ungefähr den organischen P-Anteil ( $P_o$ ). Es ist zu beachten, dass bereits durch die Verwendung von HCl und  $H_2SO_4$  in Zuge der Extraktion Teile von organischen P-Verbindungen in freies Phosphat-P umgewandelt werden können. Daher sollten generell, anstatt  $P_i$  und  $P_o$ , die Bezeichnungen Molybdat-reaktives P und nicht-reaktives P verwendet werden (Cade-Menun and Liu 2013, Haygarth and Sharpley, 2000).

Die photometrische P-Bestimmung bei der Molybdän-Blau Methode ist nur an farblosen, ungetrübten Extrakten möglich! Insbesondere in Bodenproben mit hohen Konzentrationen an organischer Substanz (z. B. Torfe) sind die Extrakte häufig dunkel gefärbt (insbesondere der NaOH-Extrakt); damit ist die P-Bestimmung mit MB nicht sinnvoll. Es kann versucht werden, die Extrakte entsprechend zu verdünnen, sodass sich die Extrakte entsprechend aufhellen.

## **Protokoll für die sequentielle P-Fraktionierung**

### Benötigtes Material und Chemikalien für 24 Proben + 2 Blindwerte + Lösungen für ICP-OES Standards

- ▶ Es sind ausreichend Lösungen für die Extraktionen selbst sowie das Ansetzen der Standards für die ICP und ggf. MB-Messung herzustellen.
- ▶ Werden mehrere Durchgänge der sequentiellen P-Fraktionierung oder eine höhere Probenzahl geplant, sollten entsprechend größere Chemikalienmengen angesetzt werden, um für alle Extrakte sowie für die Standards für die Kalibriergeraden die gleichen Lösungen zu nutzen.

### Präparation der Harzstreifen

- ▶ Anionen-Austauscher-Membrane BDH #55164 2S, in 12 Streifen von je 6 x 2 cm schneiden

- ▶ Lagerung in Reinstwasser (RW) im Kühlschrank
- ▶ 2 L 0,5 M  $\text{NaHCO}_3$  herstellen und in zwei 1-Liter-Bechergläser füllen
- ▶ Harzstreifen für 1 h in erstes Becherglas geben, mit Pinzette für 1 h in zweites Becherglas überführen
- ▶ Harzstreifen 3 Mal waschen, indem sie in Bechergläser mit RW gelegt werden (mit Pinzette bewegen, Pinzette vor Benutzung in RW einlegen)
- ▶ Lagerung in Reinstwasser (RW) im Kühlschrank (24 h vor Nutzung, nach Vorbereitung mit  $\text{HCO}_3^-$ )

### Ansatz der Chemikalien

#### **2 Liter 1 M HCl (Waschung der Harzstreifen) für F1**

- ▶ 2 Liter-Kolben bis auf ca. 1,7 L mit RW füllen, 166 ml 37 % HCl zugeben
- ▶ nach Abkühlen mit RW auf 2 Liter auffüllen

#### **5 Liter 0,5 M $\text{NaHCO}_3$ (pH 8,5) für F2**

- ▶ 210 g  $\text{NaHCO}_3$  in 5-L-Kolben geben und mit RW auf ca. 4 Liter auffüllen
- ▶ pH-Wert mit 1 M NaOH einstellen (ungefähr 50 bis 100 ml nötig)
- ▶ mit RW auf 5 Liter auffüllen

#### **1 Liter 1 M NaOH für pH-Einstellung**

- ▶ 1-Liter-Kolben mit ca. 700 ml RW füllen, 40 g NaOH-Pellets dazu geben, mit RW unvollständig auffüllen
- ▶ abkühlen lassen, auf 1 Liter mit RW auffüllen

#### **3 Liter 0,1 M NaOH für F3: 1 Liter + 2 Liter ansetzen** (wenn kein 3-Liter-Kolben vorhanden)

- ▶ 1-Liter-Kolben bis auf ca. 700 ml mit RW füllen, 4 g NaOH-Pellets zugeben, nach Abkühlen auf 1 Liter mit RW auffüllen
- ▶ 2 Liter-Kolben bis auf ca. 1.5 L mit RW füllen, 8 g NaOH-Pellets zugeben, nach Abkühlen auf 2 Liter mit RW auffüllen

#### **3 Liter 1 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ für F4: 1 Liter + 2 Liter ansetzen** (wenn kein 3-Liter-Kolben vorhanden)

- ▶ 1-Liter-Kolben mit ca. 700 ml RW füllen und 55 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95-97 %) zugeben
- ▶ Am nächsten Tag nach Abkühlen auf 1 L mit RW auffüllen
- ▶ 2-Liter-Kolben mit ca. 1.5 Liter RW füllen und 110 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95-97 %) zugeben,
- ▶ Am nächsten Tag nach Abkühlen auf 2 L mit RW auffüllen

### Probenvorbereitung:

- ▶ Bodenproben trocknen (siehe Kapitel 2.4 und 3.1)
- ▶ Bodenproben <2 mm sieben und die <2 mm Fraktion (Feinboden) verwenden
- ▶ In einer Teilprobe Gesamtelementkonzentrationen bestimmen (z. B. mittels Königswasserextrakt, siehe Kapitel 4.1.2)
- ▶ Es muss am Montag mit der sequentiellen Extraktion gestartet werden, damit die vierte Fraktion am Freitag fertig ist
- ▶ Die Probeneinwaage kann auch in der Vorwoche erfolgen.
- ▶ Anionenaustauscherharz vorbereiten (siehe oben: Präparation der Harzstreifen)

### Durchführung:

- ▶ Pro Bodenprobe mindesten 3 Replikate und pro 10 Extraktionsproben mindestens 1 Blindwert ansetzen.
- ▶ 0,5 g Feinboden in 50 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen
- ▶ **Für F1:** 30 ml Reinstwasser und einen Streifen Anionenaustauscherharz zugeben, 18 Stunden über Kopf schütteln (Start ca. 14.00 Uhr)
- ▶ Harzstreifen mit einer Pinzette entfernen, anhaftende Bodenpartikel mit Reinstwasser (RW; Spritzflasche) zurück in Zentrifugenröhrchen spülen
- ▶ P von Harzstreifen mit max. 45 ml 1 M HCl über Trichter mit Filter (P-frei) in 50 ml Maßkolben waschen
- ▶ Harzstreifen in Bechergläser mit RW legen, später in den Kühlschrank stellen
- ▶ Maßkolben mit 1 M HCl auf 50 ml auffüllen (**F1**)
- ▶ Aliquote in ICP-Gefäße abfüllen ((1.) Bestimmung  $P_t$  am ICP und wenn nötig (2.)  $P_i$  photometrisch, Differenz =  $P_o$ )
- ▶ **Für F2:** 30 ml 0,5 M  $\text{NaHCO}_3$  zur Bodenprobe geben, kurz durchmischen und für 18 h über Kopf schütteln (Start ca. 14.00 Uhr)
- ▶ Bei 2500 x g für 20 min zentrifugieren
- ▶ Überstand in 100 ml Maßkolben filtrieren (Trichter + Filter)
- ▶ Zum Waschen erneut 30 ml 0,5 M  $\text{NaHCO}_3$  zur Bodenprobe zugeben, per Hand durchmischen und bei 2500 x g für 20 min zentrifugieren
- ▶ Überstand ebenfalls in den Maßkolben geben (Filtrate vereinen) und mit 0,5 M  $\text{NaHCO}_3$  auf 100 ml auffüllen, gut schütteln

- ▶ 10 ml des Extrakts in Erlmeyerkolben füllen und unter dem Abzug langsam! 1 ml konz. HCl zugeben, um für die ICP-Messung  $\text{HCO}_3^-$  zu zerstören!
- ▶ Erlmeyerkolben zur Ausgasung über Nacht unter dem Abzug stehen lassen und am nächsten Tag 9 ml RW zur Probe (für ICP-Messung) in den Erlmeyerkolben geben (labiles  $\text{P}_t$  am ICP)
- ▶ wenn nötig, labiles  $\text{P}_i$  photometrisch (zweites Röhrchen) mit MB bestimmen, Differenz zu  $\text{P}_t = \text{P}_o$ ); zu dieser Probe keine Zerstörung mit HCl vornehmen
- ▶ **Für F3:** 30 ml 0,1 M NaOH zur Bodenprobe ins Zentrifugenröhrchen geben, für 18 h über Kopf schütteln (Start ca. 14.00 Uhr)
- ▶ bei 2500 x g für 20 min zentrifugieren
- ▶ Überstand in 100 ml Maßkolben filtrieren
- ▶ Zum Waschen erneut 30 ml 0,1 M NaOH zur Bodenprobe geben, per Hand durchmischen und erneut bei 2500 x g für 20 min zentrifugieren
- ▶ Überstand ebenfalls in den Maßkolben filtrieren und mit 0,1 M NaOH auf 100 ml auffüllen (**F3**)
- ▶ Aliquote in ICP-Gefäße abfüllen ((1.) Bestimmung  $\text{P}_t$  in NaOH am ICP und wenn nötig (2.)  $\text{P}_i$  photometrisch, Differenz =  $\text{P}_o$ )
- ▶ **Für F4:** unter dem Abzug 30 ml 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zur Bodenprobe ins Zentrifugenröhrchen geben, 18 h über Kopf schütteln (Start ca. 14.00 Uhr)
- ▶ Extrakt in 100 ml Kolben filtrieren. Da  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Dämpfe die Zentrifuge verätzt, nicht zentrifugieren!
- ▶ Kolben mit 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf 100 ml auffüllen (**F4**)
- ▶ Aliquote in ICP-Gefäße abfüllen ((1.) Bestimmung  $\text{P}_t$  in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  am ICP und wenn nötig (2.)  $\text{P}_i$  photometrisch, Differenz =  $\text{P}_o$ )
- ▶ **Für F5:** entweder den Extraktionsrückstand trocknen und die Gesamtelementkonzentrationen darin mittels Königswassers und ICP-OES bestimmen oder die Summe der Fraktionen F1 bis F4 von der Gesamtelementkonzentration (z. B. im Königswasserextrakt) der unbehandelten Bodenproben subtrahieren.

#### Hinweise:

- ▶ Wird F5 im Extraktionsrückstand bestimmt, sollte die Summe der P-Konzentrationen von F1 bis F5 theoretisch der Gesamtelementkonzentration in der unbehandelten Bodenprobe nach Königswasserextrakt entsprechen. Es kann aber sein, dass die Summe der 5 Fraktionen größer ist als die der Gesamtelementkonzentration. Dies wird dadurch

verursacht, dass Königswasserextrakte nur sogenannte Pseudototalkonzentrationen liefern (Silikate werden nicht aufgeschlossen) und durch die sequentielle P-Fraktionierung evtl. höhere Anteile von P freigesetzt werden können. Daher wird F5 meist als Differenz aus der Gesamt-P-Konzentration und der Summe von F1 bis F4 als residuales P berechnet.

- ▶ Es werden nur Aliquote der Fraktionen zur P-Bestimmung benötigt. Die Rückstelleproben der Extrakte sollten bis zum Ende aller Analysen eingefroren werden, falls Wiederholungsmessungen nötig sind.
- ▶ Die Laugen und die Säuren sind unter dem Abzug anzusetzen!
- ▶ Insbesondere für das Arbeiten mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist auf die entsprechende Schutzkleidung zu achten.

Die sequentielle P-Fraktionierung wird in den AGs Bodenkunde und Pflanzenbau (beide Agar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät der Universität Rostock) durchgeführt.

## Referenzen

- Bacon JR, Davidson CM (2008) Is there a future for sequential chemical extraction? *Analyst*, 133, 25–46, DOI: [10.1039/b711896a](https://doi.org/10.1039/b711896a)
- Cade-Menun B and Liu CW (2013) Solution Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of soils from 2005 to 2013: A review of sample preparation and experimental parameters. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 78, 19–37, DOI: [10.2136/sssaj2013.05.0187dgs](https://doi.org/10.2136/sssaj2013.05.0187dgs)
- Condon LM, Newman S (2011) Revisiting the fundamentals of phosphorus fractionation of sediments and soils. *J Soils Sediments* 11, 830–840, DOI: [10.1007/s11368-011-0363-2](https://doi.org/10.1007/s11368-011-0363-2)
- Felgentreu L, Nausch G, Bitschowsky F, Nausch M, Schulz-Bull D (2018) Colorimetric chemical differentiation and detection of phosphorus in eutrophic and high particulate waters: advantages of a new monitoring approach. *Frontiers in Marine Science* 5, article 212, DOI: [10.3389/fmars.2018.00212](https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00212)
- Haygarth PM, Sharpley AN (2000) Terminology for phosphorus transfer. *Environ. Qual.* 29, 10–1, DOI: [10.2134/jeq2000.00472425002900010002x](https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900010002x)
- Turner BL, Cade-Menun BJ, Condon LM, Newman S (2005) Extraction of soil organic phosphorus. *Talanta* 66: 294–306, DOI: [10.1016/j.talanta.2004.11.012](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.11.012)

**For citation:** Zimmer D, Baumann K (*year of download*) Kapitel 4.5.1 Sequentielle P-Fraktionierung von Bodenproben (Version 1.0) in Zimmer D, Baumann K, Berthold M, Schumann R: *Handbuch zur Auswahl der Aufschluss- und Bestimmungsverfahren für Gesamtphosphor in Umweltproben*. DOI: 10.12754/misc-2018-0001

*Handbuch zur Auswahl der Aufschluss- und Bestimmungsverfahren für Gesamtphosphor in Umweltproben*