

## 4. Aufschlüsse

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

*Dana Zimmer, Karen Baumann*

#### 4.5.2 Abschätzung von pflanzenverfügbarem P in Bodenproben

*Dana Zimmer, Karen Baumann*

Im Boden ist Phosphor an unterschiedliche Bodenbestandteile gebunden und nur ein geringer Anteil ist in der Bodenlösung gelöst. Damit ist in unterschiedlichen Böden P auch unterschiedlich mobilisierbar und bioverfügbar. Der Anteil von bio- oder pflanzenverfügbarem P hängt also nicht allein davon ab, wie hoch die P-Konzentration im Boden ist, sondern auch wie P von den Bodenpartikeln in die Bodenlösung nachgeliefert wird und so den Pflanzen überhaupt erst zur Verfügung steht (Abdu 2006, Zheng und Zhang 2012). Insbesondere der im Laufe einer Vegetationsperiode zur Verfügung stehende Anteil von Nährelementen wie P ist für die landwirtschaftlichen Nutzpflanzen und ihrer bedarfsgerechten Düngung von Bedeutung. Daher muss also bei der Bestimmung des potentiell bio- oder pflanzenverfügbaren P nicht nur die aktuelle P-Konzentration in der Bodenlösung, sondern auch die P-Löslichkeit oder P-Nachlieferung aus der Bodenfestphase berücksichtigt werden (z. B. Abdu 2006, Zheng und Zhang 2012). Um den Düngebedarf für die wichtigsten Nährelemente wie P, K und Mg einzuschätzen, wurden seit der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts unterschiedliche Extraktionsmethoden entwickelt; später sind dann sogenannte Ion-sink-Methoden dazugekommen. Die Methoden zur Bewertung des bio- oder pflanzenverfügbaren P versuchen die Bedingungen um die Pflanzenwurzeln nachzubilden (z. B. die Abgabe von niedermolekularen organischen Säuren durch die Pflanzenwurzel). Generell wird zwischen den chemischen Extraktionen und den Ion-sink-Methoden unterschieden. Alle diese Methoden haben ihre speziellen Vor- und Nachteile. Insbesondere die chemischen Extrakte wurden oft für spezielle Böden mit speziellen Eigenschaften entwickelt, auf denen sie auch sehr effektiv nutzbar sind; aber für andere Böden können sie dann nur eingeschränkt genutzt werden (Abdu 2006). Hier spielen insbesondere der pH-Wert und

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

die Konzentration von Carbonat eine Rolle (z. B. Schüller 1969, Zheng und Zhang 2012). Der Vorteil der Ion-sink Methoden liegt in ihrer universellen Einsetzbarkeit, da sie weitestgehend unabhängig von den Bodeneigenschaften sind und, ähnlich den Pflanzenwurzeln, den P-Entzug nachahmen. Außerdem werden die chemischen Eigenschaften des Bodens nicht verändert und insbesondere die Anionen-Austauscherharze können wiederverwendet werden, ohne ihre Extraktionsfähigkeit zu verlieren (Abdu 2006, Zheng und Zhang 2012).

Im Folgenden werden einige Methoden zur Abschätzung des pflanzenverfügbaren Phosphors vorgestellt.

#### 4.5.2.1 DL und CAL-Extrakt

##### **Prinzip und Eignung der Extrakte**

In Deutschland werden in der Landwirtschaft der Doppellactat- (DL) und der Calciumlactat- (CAL) Extrakt durchgeführt, um abzuschätzen, welcher Anteil des Phosphors, Kaliums und Magnesiums potenziell pflanzenverfügbar ist. Somit kann die zu düngende Aufwandmenge abgeschätzt werden. Im Folgenden wird nur auf P eingegangen. In anderen Ländern werden andere Extrakte genutzt (z. B. mit  $\text{NaHCO}_3$ ), um den potenziell pflanzenverfügbaren und daraus zu düngenden Phosphor abzuschätzen.

**Der CAL-Extrakt nach Schüller (1969) wird in Deutschland für kalkhaltige Bodenproben und der DL-Extrakt nach Riehm (1948) für kalkfreie Bodenproben genutzt.** Die Vorgaben der Landesuntersuchungs- und Forschungsanstalten (LUFen), ob ein DL- oder CAL-Extrakt in der Landwirtschaft zu verwenden ist, sind abhängig vom Bundesland. Der DL-Extrakt besteht aus einer Calciumlactatlösung mit einem pH-Wert von 3,8. Beim CAL-Extrakt handelt es sich um eine gepufferte Lösung aus Calciumacetat, Calciumlactat und Essigsäure mit einem pH-Wert von 4,1 (VDLUFA 2015).

Der folgende Abschnitt wurde Schüller (1969), van Laak et al. (2018) und VDLUFA (2012) entnommen: Da sich apatitische Phosphate in neutralen bis alkalischen Böden, im Gegensatz zu sauren Böden, nicht oder kaum lösen und so auch kaum eine P-Düngewirkung haben, sollten durch das Extraktionsmittel die Apatite in neutralen bis alkalischen Böden nicht oder nur geringfügig gelöst werden. Sowohl DL als auch CAL lösen Monocalcium- und Dicalciumphosphate. Aufgrund der höheren Ca-Aktivität des CAL-Extrakts, im Gegensatz zum DL-Extrakt, werden aber die schwerlöslichen Ca-Phosphate wie Apatite mit dem CAL-Extrakt nicht

gelöst. Daher kann mit dem CAL-Extrakt, im Gegensatz zum DL-Extrakt, auf neutralen und alkalischen Boden eine Überbewertung der P-Verfügbarkeit vermieden werden. Auf sauren Böden kann der CAL-Extrakt bei Vorliegen von apatitischen Phosphaten allerdings zu Unterbefunden führen. Aufgrund der höheren Pufferkapazität des CAL-Extrakts im Vergleich zum DL-Extrakt (Anstieg des pH-Werts der Extraktionslösung bei Carbonat-haltigen Bodenproben) kann der CAL-Extrakt für  $\text{CaCO}_3$ -Konzentration von bis zu 8 bzw. bis 15 % genutzt werden. Um DL- und CAL-Extrakte besser vergleichbar zu machen, entwickelten van Laak et al. (2018) pH-abhängige Gleichungen zur Umrechnung der P-Konzentrationen zwischen DL- und CAL-Extrakten.

### **Interpretation der Ergebnisse**

Sowohl für den DL-Extrakt als auch für den CAL-Extrakt sind für die P-Konzentrationen (ebenso Mg und K) sogenannte Gehaltsklassen A (sehr niedriger Gehalt) bis E (sehr hoher Gehalt) definiert (VDLUFA 2015, Tab. 4.5.2-1). Die Richtwerte für die P-Konzentrationen für die Gehaltsklassen können ebenfalls der Tabelle 4.5.2-1 entnommen werden (VDLUFA 2015). Aus diesen Gehaltsklassen werden die Düngeempfehlung abgeleitet. Die konkrete Düngeempfehlung richtet sich nach der Kulturart und dem auf dem jeweiligen Boden möglichen und angestrebten Ertrag. In der VDLUFA-Vorschrift wird die P-Konzentration traditionell mittels Molybdänblau am Photometer bestimmt. Es ist aber, auch laut VDLUFA (2015), ebenso die P-Bestimmung am ICP-OES möglich (dabei parallel Mg und K), wie sie in der AG Bodenkunde durchgeführt wird. Sie liefert generell vergleichbare Ergebnisse. Es wird vermutet, dass die Bestimmung mittel MB und ICP-OES annähernd gleiche Ergebnisse liefern, weil mit DL bzw. CAL vorwiegend tatsächlich anorganisches Phosphat und kein organisch gebundenes extrahiert wird. Dies sollte aber spezifisch für den zu extrahierenden Boden abgeglichen werden.

Hinweis: Im ökologischen Landbau wird oft die Gehaltsklasse B angestrebt, sodass die Düngeempfehlungen entsprechend niedriger ausfallen.

**Tab. 4.5.2-1** Definition der Gehaltsklassen, P-Konzentrationen und Düngeempfehlung nach VDLUFA (2015)

| Gehalts-<br>klasse | Kurzdefinition<br>für P im<br>Boden | mg P pro<br>kg Boden | Düngeempfehlung  |
|--------------------|-------------------------------------|----------------------|--|
| A                  | sehr niedriger<br>Gehalt            | bis 20               | stark erhöhte Düngung gegenüber<br>der Empfehlung in Gehaltsklasse C |
| B                  | niedriger<br>Gehalt                 | 21 bis 44            | erhöhte Düngung gegenüber der<br>Empfehlung in Gehaltsklasse C       |
| C                  | anzustrebender<br>Gehalt            | 45 bis 90            | Erhaltungsdüngung in der Regel nach<br>Abfuhr                        |
| D                  | hoher Gehalt                        | 91 bis 150           | verminderte Düngung gegenüber der<br>Empfehlung in Gehaltsklasse C   |
| E                  | sehr hoher<br>Gehalt                | >150                 | keine Düngung  |

**Hinweis** aus VDLUA (2015): Im Routinebetrieb haben sich vertikal rotierende Schüttelmaschinen weitgehend durchgesetzt. Die optimale Drehgeschwindigkeit hängt vom Durchmesser des Rotors ab. Boden und Extraktionslösung müssen zuverlässig gemischt, Zentrifugaleffekte durch zu hohe Drehgeschwindigkeiten aber vermieden werden.

Probenvorbereitung für DL- und CAL-Extrakt:

- ▶ Bodenproben trocknen (siehe Kapitel 2.4 und 3.1)
- ▶ Bodenproben <2 mm sieben und diese <2 mm Fraktion (Feinboden) verwenden
- ▶ In einer Teilprobe Gesamtelementkonzentrationen bestimmen (z. B. mittels Königswasserextrakt, siehe Kapitel 4.1.2)

## **Protokoll für die DL-Extraktion**

### benötigtes Material und Chemikalien für den DL-Extrakt

#### DL-Vorratslösung

- ▶ 120 g Calciumlactat ( $C_6H_{10}CaO_6 \cdot 5H_2O$ ) in einen 1-Liter Maßkolben geben und mit ca. 0,8 L kochendem Reinstwasser (RW) übergießen und umrühren, bis alles gelöst ist.
- ▶ Zur noch warmen Lösung 40 ml 10 M HCl geben und nach dem Erkalten mit RW auf 1 L auffüllen.

#### DL-Gebrauchslösung (täglich frisch herstellen)

- ▶ 500 ml der DL-Vorratslösung mit RW auf 10 L auffüllen oder 50 ml auf 1 Liter auffüllen
- ▶ Wichtig: pH-Kontrolle 3,6

### Durchführung DL-Extraktion:

- ▶ Pro Bodenprobe mindesten 3 Replikate und pro 10 Extraktionsproben mindestens 1 Blindwert ansetzen.
- ▶ Normalerweise werden 4 g Boden in 250 ml Schüttelflaschen eingewogen und mit 200 ml DL-Gebrauchslösung versetzt; es können aber auch 0,6 g Boden in 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 30 ml Gebrauchslösung versetzt werden; dabei verstärkt auf die Homogenität der Probe zu achten
- ▶ 90 min über Kopf schütteln bei ca. 20 Umdrehungen pro Minute
- ▶ DL-Extrakt durch P-freie Filter in Erlenmeyerkolben filtrieren
- ▶ Werden keine P-freien Filter genutzt, dann die ersten 10 bis 30 ml des Filtrats verwerfen (Spülen der Filter), dazu die Erlenmeyerkolben, die das Filtrat aufgefangen haben, austauschen bzw. die Trichter mit den Filtern nach den ersten ml Filtrat auf neue Erlenmeyerkolben setzen und den Rest filtrieren
- ▶ Aliquot in ICP-Gefäße überführen und bis zur Messung im Kühlschrank lagern oder einfrieren (wenn die Extrakte >1 Tag gelagert werden müssen)
- ▶ Bestimmung der Elemente K (766,490 nm), Mg (285,213 nm) und P (213,617 und/oder 214,914 nm) am ICP-OES und/oder P photometrisch mit Molybdänblau, siehe unten

## **Protokoll für die CAL-Extraktion**

### benötigtes Material und Chemikalien für den CAL-Extrakt

#### CAL-Vorratslösung

- ▶ 77 g Ca-Lactat-Pentahydrat ( $C_6H_{10}CaO_6 \cdot 5H_2O$ ) in ca. 300 ml kochendem RW und 39,5 g Ca-Acetat ( $Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ ) (bzw. 35,5 g  $Ca(CH_3COO)_2$  wasserfrei) in ca. 300 ml RW lösen (ggf. erwärmen)
- ▶ Beide Lösungen im 1-Liter Maßkolben vereinigen und mit 89,5 ml Eisessig (konz. Essigsäure) p.a. versetzen
- ▶ Mischung mit RW im Maßkolben auf 1 L auffüllen.

#### CAL-Gebrauchslösung:

- ▶ 1 L der Vorratslösung mit RW im Maßkolben auf 5 L auffüllen (= 0,1 M Ca-Lactat; 0,1 M Ca-Acetat; 0,3 M Essigsäure; pH 4,1)

### Durchführung der CAL-Extraktion:

- ▶ Pro Probe mindesten 3 Replikate und pro 10 Proben mindestens 1 Blindwert ansetzen.
- ▶ Normalerweise werden 5 g Boden in 300 ml Schüttelflaschen eingewogen und mit 100 ml CAL-Gebrauchslösung versetzt; es können aber auch 1,5 g Boden in 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 30 ml Gebrauchslösung versetzt werden; dabei verstärkt auf die Homogenität der Probe achten
- ▶ 90 min über Kopf schütteln bei ca. 20 Umdrehungen pro Minute
- ▶ CAL-Extrakt durch P-freie Filter in Erlmeyerkolben filtrieren
- ▶ Werden keine P-freien Filter genutzt, dann die ersten 10 bis 30 ml des Filtrats verwerfen (Spülen der Filter), dazu die Erlmeyerkolben, die das Filtrat aufgefangen haben, austauschen bzw. die Trichter mit den Filtern nach den ersten ml Filtrat auf neue Erlmeyerkolben setzen und den Rest filtrieren
- ▶ Aliquot in ICP-Gefäße o.ä. überführen und bis zur Messung im Kühlschrank lagern oder einfrieren (wenn >1 Tag gelagert werden muss)
- ▶ Bestimmung der Elemente K (766,490 nm), Mg (285,213 nm) und P (213,617 und/oder 214,914 nm) am ICP-OES und/oder photometrisch mit Molybdänblau, siehe unten

## **P-Bestimmung im DL- und CAL-Extrakt mit Molybdänblau (nach Murphy und Riley, 1962)**

Die photometrische P-Bestimmung ist nur an farblosen, ungetrübten Extrakten möglich!

### **Reagenzien:**

#### Für 1 Liter Nachweisreagenz A

- ▶ In einen 1-Liter-Maßkolben ca. 500 ml RW geben
- ▶ 6 g Ammoniumheptamolybdat  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$  darin lösen
- ▶ 74 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugeben, etwas abkühlen lassen
- ▶ 0,149 g Kaliumantimonoxidtartrat  $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 0,5 \text{ H}_2\text{O}$  (KAT) darin lösen
- ▶ Da sich das KAT schlecht löst, das KAT zugeben, wenn die Lösung noch warm ist und ggf. ins Ultraschallbad stellen und zwischendurch immer wieder schwenken bis zur vollständigen Lösung.
- ▶ Weiteres RW bis etwas unterhalb der Marke zugeben, auf Raumtemperatur abkühlen lassen und auf 1 Liter mit RW auffüllen.

#### Für 2 Liter Nachweisreagenz A:

Es werden 12 g Ammoniumheptamolybdat, 148 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 0,298 g KAT benötigt.

#### Für 250 ml Nachweisreagenz B:

- ▶ 1,32 g Ascorbinsäure in einen 200 ml Maßkolben geben
- ▶ Reagenz A zugeben und schwenken, bis sich die Ascorbinsäure gelöst hat
- ▶ Auf 200 ml mit Reagenz A auffüllen

#### Für 500 ml Nachweisreagenz B:

- ▶ 2,64 g Ascorbinsäure in einen 500 ml Maßkolben geben
- ▶ Reagenz A zugeben und schwenken, bis sich die Ascorbinsäure gelöst hat
- ▶ Auf 500 ml mit Reagenz A auffüllen

### Hinweis:

Das **Reagenz B** muss **täglich frisch hergestellt** werden, da es **nicht länger als 24 h haltbar** ist. Pro Probe/Standard werden bei einem 25-ml-Maßkolben 4 ml vom Nachweisreagenz B benötigt. Je nach benötigter Menge Nachweisreagenz B müssen die Einwaage der Ascorbinsäure und das Volumen angepasst werden.

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

Ansatz der Standardreihe für die photometrische P-Bestimmung:

Zielkonzentration für die P-Stammlösung: 10 mg P pro Liter in einen 100-ml-Kolben ansetzen

- ▶ Für die Herstellung der Kalibrierstandards (Tab. 4.5.2-2) das entsprechend nötige Volumen der Stammlösung in einen 25 ml oder 50 ml Kolben geben und mit RW maximal bis zur Hälfte auffüllen. (Es werden unterschiedliche Pipettengrößen benötigt!)
- ▶ 4 ml (im 25-ml-Kolben) bzw. 8 ml (50-ml-Kolben) vom Nachweisreagenz dazugeben
- ▶ Auf 25 bzw. 50 ml mit RW auffüllen
- ▶ 30 min warten und Extinktionen bei 882 nm messen
- ▶ den Standard S0 im Photometer auf „Null“ setzen, Herstellerangaben für das Photometer beachten
- ▶ Kalibriergerade berechnen

**Tab. 4.5.2-2** Zielkonzentrationen für die P-Standards für die Kalibrationsgerade

| Standard | Zielkonzentration P in mg l <sup>-1</sup> für die Kalibriergerade |
|----------|---|
| S0       | 0   |
| S1       | 0,025   |
| S2       | 0,05  |
| S3       | 0,1   |
| S4       | 0,2   |
| S5       | 0,3   |
| S6       | 0,4   |
| S7       | 0,5   |
| S8       | 0,6   |
| S9       | 0,7   |
| S10      | 0,8   |

Hinweis:

Liegen die Extinktionen der meisten Proben unterhalb des Standards S2, so sind zusätzliche Standards zwischen S0 und S2 einzufügen (Tab. 4.5.2-3). Dafür werden entsprechende µl-Pipetten benötigt.

**Tab. 4.5.2-3** Zusätzliche Standards A, B und C für die Kalibrationsgerade, wenn die Extinktionen der meisten Proben unterhalb des Standards S2 sind

| Standard | Zielkonzentration P in mg l <sup>-1</sup> für die Kalibriergerade |
|----------|---|
| S0       | 0   |
| A        | 0,01  |
| B        | 0,02  |
| S1       | 0,025   |
| C        | 0,04  |
| S2       | 0,05  |

### Photometrische Bestimmung der P-Konzentration in den Proben mit Molybdänblau

- ▶ Je 1 bis max. 10 ml (bzw. 0,5 bis max. 5 ml) des Filtrats in 25 ml (bzw. 50 ml) Messkolben pipettieren und anschließend max. bis zur Hälfte mit RW auffüllen
- ▶ 4 ml (bzw. 8 ml) Nachweisereagenz zugeben und auf 25 (bzw. 50 ml) mit RW auffüllen
- ▶ Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 882 nm messen, dafür Standard S0 auf Platz „Null“ belassen. Angaben des Herstellers des Photometers beachten
- ▶ Die Blindwerte werden ebenso wie die Proben gemessen und der Mittelwert der Extinktionswerte der Blindwerte von denen der Proben subtrahiert
- ▶ Berechnung der P-Konzentration in den Proben mittels Kalibriergerade

### Hinweis:

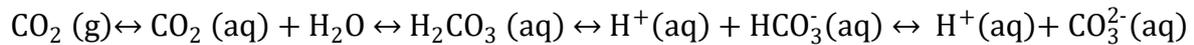
Die benötigte Probenmenge für das Molybdätreagenz hängt von der DL- bzw. CAL- extrahierbaren P-Konzentration im Boden ab. Für Bodenproben aus Ap-Horizonten mit 2,5 ml Probe aufgefüllt auf 25 ml ausprobieren!

Die DL- und CAL-Extrakte können in den AGs Bodenkunde und Pflanzenbau (beide AUF, Uni Rostock) durchgeführt werden.

#### 4.5.2.2 NaHCO<sub>3</sub>-Extrakt

##### **Prinzip und Eignung des Extrakts**

Generell besteht im Wasser ein Gleichgewicht zwischen folgenden Spezies:



Wird NaHCO<sub>3</sub> zur Bodenlösung gegeben, so zerfällt es im Wasser zu Na<sup>+</sup> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Im alkalischen Boden reagiert HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> mit dem Ca<sup>2+</sup> der Bodenlösung und fällt als CaCO<sub>3</sub> aus (Olsen et al. 1954, Soenne 2009). Das Gleichgewicht wird auf die rechte Seite der Gleichung verschoben. Dadurch kann das vorher an Ca gebundene P extrahiert werden. In sauren Böden, in denen P vor allem an Al- und Fe-(hydroxide) gebunden ist, reagiert HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> mit den H<sup>+</sup> zu H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und immer weiter zur linken Seite bis zum CO<sub>2</sub>, welches auch ausperlen kann (CO<sub>2</sub>(g)) und damit dem Gleichgewicht entzogen wird. Alle Ionen aus der obigen Gleichgewichtsreaktion konkurrieren mit dem P um die Bindungsplätze an den pedogenen Oxiden (Hartikainen, 1981), sodass auch P von diesen in Lösung geht. Aufgrund des Ausperlens des CO<sub>2</sub> kann sich kein konstantes Gleichgewicht zwischen den Spezies einstellen. Da sich somit bei der Extraktion kein Gleichgewicht einstellt und die extrahierten P-Konzentrationen dadurch schwanken können, ist für die Vergleichbarkeit auf die exakte Einhaltung von Schütteldauer, -temperatur usw. zu achten (Miller et al. 2002). Der Extrakt nach Olsen et al. (1954) wird beispielsweise in einigen Staaten der USA genutzt, um den pflanzenverfügbaren P-Anteil abzuschätzen (Wuenscher et al. 2015). Er wird bevorzugt für kalkhaltige Böden genutzt, kann aber auch für kalkfreie verwendet werden (Wuenscher et al. 2015).

##### **Protokoll**

###### Probenvorbereitung:

- ▶ Bodenproben trocknen (siehe Kapitel 2.4 und 3.1)
- ▶ Bodenproben <2 mm sieben und diese <2 mm Fraktion (Feinboden) verwenden
- ▶ In einer Teilprobe Gesamtelementkonzentrationen (z. B. mittels Königswasserextrakt, siehe Kapitel 4.1.2) bestimmen

## Ansatz der Chemikalien

### **1 Liter 0,5 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,5)**

- ▶ 42 g NaHCO<sub>3</sub> in 1-L-Kolben geben und mit RW auf ca. 800 ml auffüllen
- ▶ pH-Wert mit 1 M NaOH einstellen (ungefähr 10 bis 20 ml nötig)
- ▶ mit RW auf 1 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
- ▶ Nach vollständiger Auflösung der Pellets und Abkühlung auf Raumtemperatur, auf 1 Liter mit RW auffüllen

## Durchführung:

- ▶ 1,00 g lufttrockenen Boden in 50 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen
- ▶ 20 ml 0,5 M NaHCO<sub>3</sub> Lösung zugeben
- ▶ 30 min schütteln
- ▶ 10 min bei 3500 x g zentrifugieren
- ▶ in Erlenmeyerkolben filtrieren
- ▶ evtl. 20 ml abfüllen für photometrische Molybdänblau-Messung (siehe Kapitel zur sequentiellen P-Fraktionierung F2, keine Zerstörung HCO<sup>-</sup> mit HCl)
- ▶ 10 ml Probe für ICP-Messung mit HCl ansäuern (Zerstörung HCO<sup>-</sup>):
  - ▶ 10 ml Probe + 1 ml konz. HCl in Erlenmeyerkolben geben, über Nacht stehen lassen (Ausgasen CO<sub>2</sub>)
  - ▶ Am nächsten Tag 9 ml RW zugeben (Verdünnungsfaktor: 2)
- ▶ Abfüllen für P-Bestimmung am ICP-OES, Wellenlänge: 213,617 nm und/oder 214,914 nm

Diese Extraktion kann in den AGs Bodenkunde und Pflanzenbau (beide AUF, Uni Rostock) durchgeführt werden.

### **4.5.2.3 Wasser-Extrakte**

#### **Prinzip und Eignung der Extrakte**

Wasserextrakte simulieren den durch Regenereignisse potenziell mobilisierbaren P-Pool im Boden. Dieser P-Pool kann gleichzeitig auch als direkt pflanzenverfügbar angesehen werden. Wasserextrakte lassen allerdings weitestgehend die Nachlieferung des labil gebundenen P außer Acht, welches in Lösung geht, sobald das gelöste P durch Pflanzen aufge-

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

nommen wurde. Es kann zwischen Kalt- und Heißwasserextrakten unterschieden werden. Mit dem Heißwasserextrakt kann insbesondere neben den interessierenden mineralischen Elementen gleichzeitig auch die leicht mobilisierbare bzw. umsetzbare organische Bodensubstanz (OBS), also auch C und N extrahiert werden (Leinweber et al. 1995).

#### Probenvorbereitung für die Wasserextrakte:

- ▶ Bodenproben trocknen (siehe Kapitel 2.4 und 3.1) und
- ▶ Bodenproben <2 mm sieben und diese <2 mm Fraktion (Feinboden) verwenden
- ▶ Soll naturfeuchter Boden (z. B. Rhizosphärenboden) verwendet werden, sollte zumindest <5 mm gesiebt und Steinchen, Wurzel u. Ä. entfernt werden
- ▶ In einer Teilprobe Gesamtelementkonzentrationen bestimmen (z. B. mittels Königswasserextrakt, siehe Kapitel 4.1.2)

#### **Protokoll Kaltwasserextraktion** (Boden + Wasserverhältnis: 1 + 10)

##### Durchführung:

- ▶ 2,00 g lufttrockenen Feinboden (<2 mm) in 50 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen
- ▶ 20 ml Reinstwasser zugeben
- ▶ Für 60 min über Kopf schütteln
- ▶ Bei 3000 x g für 10 min zentrifugieren
- ▶ Überstand durch P-freie Filter in 100 ml Erlenmeyerkolben filtrieren
- ▶ Mit 20 µl konz. HCl auf pH 2-3 ansäuern, um eine Elementausfällung und mögliche mikrobielle Veränderungen („verschleimen“) zu verhindern
- ▶ Bei Ansäuerung sollten die Proben mehrere Tage gut im Kühlschrank lagerbar sein. Da bisher die Elemente aber immer zeitnah bestimmt wurden, liegen keine Erfahrungen zur Lagerfähigkeit vor. Bei längerer Lagerung sollten die Extrakte eingefroren werden.
- ▶ Elementbestimmung am ICP-OES (auswählen z. B. Al, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Zn)

## **Protokoll Heißwasserextrakt zur gleichzeitigen Bestimmung der leicht umsetzbaren OBS**

### Durchführung:

- ▶ (10) oder 25 bis 30 g luftgetrockneten Feinboden (<2 mm gesiebt) in einen 250 ml Glaskolben einwiegen (der Heizblock bietet 12 Plätze, mind. einen davon als Blindwert ansetzen)
- ▶ einige Siedesteinchen zugeben und 50 bis 60 ml Wasser zugeben
- ▶ exakte Einwaage und Wasservolumen notieren
- ▶ Glaskolben in den Heizblock setzen
- ▶ Rückflusskühler aufsetzen, die Suspension im Heizblock erhitzen und 60 min kräftig kochen, sodass Boden und Wasser intensiv durchwirbelt werden
- ▶ Probe schnell abkühlen (Gefäße in kaltes Wasser stellen)
- ▶ 3 Tropfen 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung als Filtrierhilfe zugeben und über P-freie Faltenfilter in 100 ml Erlenmeyerkolben filtrieren
- ▶ Bestimmung von C- und N-Konzentrationen in flüssigen Extrakt wie bei C<sub>mic</sub>
- ▶ Bestimmung P (und ggf. weitere Elemente) am ICP-OES
- ▶ Wenn zur Bestimmung organischer C-Verbindungen mittels MS ein Feststoff nötig ist, sollte der Extrakt gefriergetrocknet werden.

Beide Wasserextrakte können in der AG Bodenkunde (AUF, Uni Rostock) durchgeführt werden.

### **4.5.2.4 Extraktion mit niedermolekularen organischen Säuren**

#### **Prinzip und Eignung der Extrakte**

Im Boden liegen nur geringe Anteile von P als gelöstes Phosphat in der Bodenlösung vor; die größten Anteile sind stärker oder schwächer an die Bodenteilchen gebunden. Die Extraktion mit niedermolekularen organischen Säuren (low molecular weight organic acids = LMWOA) simuliert die Ausscheidung von Wurzelexudaten der Pflanzen und damit die Lösung von potenziell verfügbaren Nährstoffen in der Rhizosphäre. Feng et al. (2005) beschreiben die Extraktion mit LMWOA für pflanzenverfügbare Schwermetalle, während Wei et al. (2010) Zitronensäurelösung ähnlicher Molarität zur Extraktion von pflanzenverfügbaren P verwendeten.

Werden mit diesen Extrakten kleinräumige hot spots im Boden, wie z. B. Rhizosphäreboden, untersucht, empfiehlt sich die Nutzung naturfeuchter Proben, um mikrobielle Umsetzungen und oxidative Veränderungen



- ▶ Ameisensäure                      1,11 mM                      51,09 mg

#### Durchführung der Extraktion

- ▶ 2,00 g feuchten Rhizosphärenboden oder lutro Boden <2mm in 50 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen
- ▶ 20 ml LMWOA-Lösung zugeben plus 2 Tropfen Chloroform (Wei et al. 2010) als Biozid
- ▶ 16 h über Kopf schütteln bei ca.20 Umdrehungen pro Minute
- ▶ Bei 3000 x g für 30 min zentrifugieren
- ▶ 5 ml des Überstandes in 10 ml graduierte Reagenzgläser abpipettieren, diese mit 2 %-iger HNO<sub>3</sub> auffüllen

#### Zitronensäure-, Oxalsäure- oder Maleinsäureextrakt nach Wei et al. (2010)

Nach Wei et al. 2010 war die Extraktion mit Zitronensäure für tropische und subtropische Böden am effektivsten.

#### Ansatz der Lösungen

##### 1 mM Zitronensäurelösung

- ▶ molare Masse: 192,124 g mol<sup>-1</sup>
- ▶ Einwaage für 1 Liter 1mM Zitronensäure: 192 mg

##### 1 mM Oxalsäurelösung

- ▶ molare Masse: 90,04 g·mol<sup>-1</sup> (wasserfrei) 126,07 g·mol<sup>-1</sup> (Dihydrat)
- ▶ Einwaage für 1 Liter 1 mM Oxalsäure: 90 mg (wasserfrei) oder 126 mg (Dihydrat)

##### 1 mM Maleinsäurelösung

- ▶ Molare Masse: 116,072 g mol<sup>-1</sup>
- ▶ Einwaage für 1 Liter 1 mM Maleinsäure: 116 mg

#### Durchführung der Extraktion mit LMWOAs

- ▶ 4,00 g lutro Boden <2mm in 50 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen
- ▶ 40 ml Zitronensäure-, oder Oxalsäure- oder Maleinsäure-Lösung zugeben plus 2 Tropfen Chloroform als Biozid (unter dem Abzug arbeiten)
- ▶ 24 h über Kopf schütteln
- ▶ Bei 3000 x g für 30 min zentrifugieren
- ▶ Durch P-freie Filter filtrieren

### Bestimmung der Elementkonzentrationen

- ▶ Messung der interessierenden Elemente am ICP-OES
- ▶ Ggf. Messung  $P_i$  mittels Molybdänblau

#### 4.5.2.5 Ion-sink-Methoden - Anionenaustauscherharz

Zu den Ion-Sink-Methoden zählen Extrakte mit Anionenaustauscherharz und Fe-beschichtet Streifen oder Filterpapieren (Myers et al. 2005). Diese Methoden simulieren die Verhältnisse in der Rhizosphäre, d. h. die Pflanzenwurzel (oder in dem Fall die Austauscher) nehmen das in der Bodenlösung vorhandene P auf. Daraufhin wird, dem Löslichkeitsgleichgewicht folgend, P von den Bodenpartikeln desorbiert und das gelöste P wieder von den Wurzeln bzw. dem Austauscher aufgenommen. Diese Methoden haben den Vorteil, dass sie, im Gegensatz zu chemischen Extraktionsmitteln, unabhängig von den Bodeneigenschaften genutzt werden können, den Boden nicht chemisch verändern und im Fall von Anionenaustauscherharz mehrfach (50 bis 500 Mal) wiederverwendet werden können (Saggar et al. 1990, Schoenau und Huang 1991).

#### **Hinweise zu den Extrakten mit Anionenaustauscherharz**

Extraktionen mit Anionenaustauscherharzen können entweder als sogenannte (1) Batch-Extrakte (mit Harzmembranen (anion exchange membran = AEM) oder Harzkügelchen), mit der (2) miscible displacement technique (Abdu 2006) oder (3) mit der Platzierung der Austauscherharze direkt in den ungestörten Boden durchgeführt werden (e.g. Quian and Schoenau 2002). Bei den Batch-Extrakten werden Boden und Reinstwasser in einem weiten Verhältnis gemischt und das Austauscherharz zum Schütteln zugegeben. Die Austauscherharze können entweder mit HCl oder mit Bicarbonat vorbehandelt werden (Abdu 2006, Sibbesen 1978, Quian and Schoenau 2002). Es werden dann Phosphate gegen Anionen der Membran ausgetauscht. Sibbesen (1978) wies nach, dass  $HCO_3^-$ -Harze geeigneter sind als  $Cl^-$ -Harze, da die Pflanzen  $HCO_3^-$  in der Rhizosphäre anreichern, was in sauren bis neutralen Böden zu einer Erhöhung des pH-Wertes in der Rhizosphäre und in alkalischen Böden zu einer pH-Verringerung führt. Wird  $Cl^-$ -Harz genutzt, kann sich das  $Cl^-$  in der Lösung anreichern und die Austauschreaktion hemmen (Myers et al. 2005). Diese Methode kann daher auch nicht bei salzhaltigen Böden eingesetzt werden.

Im Folgenden wird, ausgehend von der sequentiellen P-Fraktionierung, das Vorgehen zur P-Extraktion mit Anionenaustauscherharz als Membran

in der  $\text{HCO}_3^-$ -Form beschrieben. Da sonst keine Erfahrungen mit diesen Extraktionsmethoden in den AGs vorliegen, wird auf die Literatur verwiesen.

### **Protokoll zur Extraktion mit Streifen von Anionenaustauscherharz**

Präparation der Harzstreifen (siehe auch Myers et al. 2005, Saggart et al. 1990)

- ▶ Anionen-Austauscher-Membrane BDH #55164 2S (siehe auch sequentielle P-Fraktionierung, in 12 Streifen von je 6 x 2 cm schneiden)
- ▶ 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 in zweites Becherglas überführen und erneut 1 h inkubieren
- ▶ Harzstreifen 3 Mal waschen, indem sie in Bechergläser mit RW gelegt werden (mit Pinzette bewegen, Pinzette vor Benutzung in RW einlegen)
- ▶ Lagerung in RW im Kühlschrank (24 h vor Nutzung, nach Vorbereitung mit  $\text{HCO}_3^-$ )

Probenvorbereitung:

- ▶ Bodenproben trocknen (siehe Kapitel 2.4 und 3.1)
- ▶ Bodenproben <2 mm sieben und diese <2 mm Fraktion (Feinboden) verwenden
- ▶ In einer Teilprobe Gesamtelementkonzentrationen (z. B. mittels Königswasserextrakt, siehe Kapitel 4.1.2) bestimmen

Durchführung:

- ▶ Einwaage 0,5 g Boden, 30 ml Reinstwasser und einen Streifen Anionenaustauscherharz zugeben, 18 Stunden über Kopf schütteln
- ▶ Harzstreifen mit einer Pinzette entfernen, anhaftende Bodenpartikel mit Reinstwasser (RW; Spritzflasche) zurück in Zentrifugenröhrchen spülen
- ▶ Harzstreifen mit max. 45 ml 1 M HCl über Trichter mit P-freiem Filter in 50 ml Maßkolben waschen
- ▶ Harzstreifen wieder in Bechergläser mit RW legen, später erneute Vorbehandlung für Bicarbonatform durchführen, bevor wieder die Lagerung im Kühlschrank erfolgt
- ▶ Maßkolben mit 1 M HCl auf 50 ml auffüllen

- ▶ Aliquote (10 bis 20 ml) für P-Bestimmung abfüllen, Bestimmung Harz- $P_t$  am ICP, ggf.  $P_i$  mittels MB (siehe Kapitel 4.5.1 sequentielle P-Fraktionierung)

### Herstellen 0,5 M $\text{NaHCO}_3$

Molare Masse  $\text{NaHCO}_3$ :  $84,007 \text{ g mol}^{-1}$

42 g  $\text{NaHCO}_3$  in einen 1-Liter Maßkolben geben und mit RW auffüllen

Da es sich um eine Fraktion der sequentiellen P-Fraktionierung handelt, kann die Extraktion mit Anionenaustauscherharz in den AGs Bodenkunde und Pflanzenbau an der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock durchgeführt werden.

Myers et al. (1999) und (2005) weichen vom obigen Vorgehen wie folgt ab:

Nach der Bodenextraktion und dem Abspülen der Bodenpartikel mit Reinstwasser werden:

- ▶ Die Harzmembranen in eine 125 ml Weithalsflasche gegeben und es werden 50 ml von 0,5 M HCl zugegeben, um P von den Harzstreifen zu entfernen
- ▶ Die verschlossenen Flaschen werden auf einem Horizontalschüttler (horizontally and end-to-end on a reciprocating shaker) bei 125 bis 130 rpm für 90 min geschüttelt
- ▶ Die Harzstreifen werden entfernt und die P-Konzentration in der HCl-Lösung bestimmt

Schoenau und Huang (1991) weichen wie folgt ab:

Ist der Boden von den Harzmembranen abgewaschen, werden sie in 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 30 ml 0,5 M HCl werden zugegeben.

Die Harzmembranen werden 1 h auf dem Horizontalschüttler geschüttelt.

Vorbehandlung Anionenaustauscherharz, wenn die Cl-Form genutzt werden soll, nach Myers et al. (2005):

- ▶ Harzmembranen 24 h vor Benutzung in Reinstwasser lagern
- ▶ 250 ml 1.0 M KCl herstellen, in ein Becherglas geben und für 30 min die Harzmembranen einlegen
- ▶ Den Vorgang in einem zweiten Becherglas wiederholen,

- ▶ danach Harzstreifen mit Reinstwasser spülen, bevor sie in Reinstwasser gelagert werden

## Referenzen

- Abdu, N. 2006. Soil-phosphorus extraction methodologies: A review. *Afr. J. Agric. Res.* 1, 159-161
- 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)
- 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)
- 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)
- Feng, M-H, Shan, X-Q, Zhang, S, Wen, B (2005) A comparison of the rhizosphere-based method with DTPA, EDTA, CaCl<sub>2</sub>, and NaNO<sub>3</sub> extraction methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley. *Environmental Pollution* 137, 231-240
- Hartikainen, H. 1981. Effect of decreasing acidity on the extractability of inorganic soil phosphorus. *Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland* 53, 16–26.
- 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)
- Leinweber, P., Schulten, H.-R., Körschens, M. (1995) Hot water extracted organic matter: chemical composition and temporal variations in a long-term field experiment. *Biol Fertil Soils* 20, 17-23
- Murphy J. and Riley, J. P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27: 31-36
- Miller, R.O. and Horneck, D. (2002) Bicarbonate (Olsen) Phosphorus troubleshooting. <http://www.naptprogram.org/files/napt/publications/method-papers/2002-bicarbonate-phosphorus-p-troubleshooting.pdf>
- Myers RG, Sharpley AN, Thien SJ, Pierzynski GM (2005). Ion-Sink phosphorus extraction methods applied on 24 soils from the continental USA. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69, 511- 521
- Myers, R.G., Thien, S.J., Pierzynski, G.M. (1999) Using an ion sink to extract microbial phosphorus from soil. *Soil Sci. Soc. Am J.* 63:1229–1237, DOI: [10.2136/sssaj1999.6351229x](https://doi.org/10.2136/sssaj1999.6351229x)
- Ogwada RA, Sparks DL (1986). Kinetics of ion exchange on clay minerals and soils: 1. Evaluation of methods. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50, 1158-1162.

- Olsen, SR, Cole, CV, Watanave, FS, Dean, LA (1954) Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate; USDA Circ. 939, USDA, Government Printing Office: Washington, DC
- Qian, P. and Schoenau, J. J. 2002. Practical applications of ion exchange resins in agricultural and environmental soil research. *Can. J. Soil Sci.* 82, 9–21.
- Rennert, T. (2019) Wet-chemical extractions to characterise pedogenic Al and Fe species – a critical review. *Soil Res* 57, 1–16, DOI: [10.1071/SR18299](https://doi.org/10.1071/SR18299)
- Riehm, H. (1948) Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der Phosphorsäure und des Kaliums nach Lactatverfahren. *Z. Pflanzenernährung. Düng. Bodenk.* 40, 152-156, DOI: [10.1002/jpln.19480400206](https://doi.org/10.1002/jpln.19480400206)
- Saggar, S., M.J. Hedley, and R.E. White. (1990) A simplified resin membrane technique for extracting phosphorus from soils. *Fert. Res.* 24, 173–180.
- Schoenau, J.J., W.Z. Huang. (1991) Anion-exchange membrane, water, and sodium bicarbonate extractions as soil tests for phosphorus. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 22,465–492, DOI: [10.1080/00103629109368432](https://doi.org/10.1080/00103629109368432)
- Schüller, H. (1969) Die CAL-Methode, eine neue Methode zur Bestimmung des pflanzenverfügbaren Phosphates in Boden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 123, 48-63, DOI: [10.1002/jpln.19691230106](https://doi.org/10.1002/jpln.19691230106)
- Soinne, H (2009) Extraction methods in soil phosphorus characterisation - Limitations and applications. Diss. Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki
- Saggar, S, Hedley, M.J., White, R.E. (1990) A simplified resin membrane technique for extracting phosphorus from soils. *Fertilizer Research* 24: 173-180, DOI: [10.1007/BF01073586](https://doi.org/10.1007/BF01073586)
- Sparling G.P., Whale K.N., Ramsay A.J. (1985): Quantifying the contribution from the soil microbial biomass to the extractable P levels of fresh and air-dried soils. *Austral J Soil Res* 23, 613–621, DOI: [10.1071/SR9850613](https://doi.org/10.1071/SR9850613)
- Srivastava, S.C. (1998) Microbial contribution to extractable N and P after air-drying of dry tropical soils. *Biol Fertil Soils* 26, 31–34
- 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)
- Turner B.L., Haygarth P.M. (2003) Changes in bicarbonate-extractable inorganic and organic phosphorus by drying pasture soils. *Soil Science Society of America Journal*, 67, 344–350
- van Laak, M., Klingenberg, U., Peiter, E., Reitz, T., Zimmer, D., Buczko, U. (2018) The equivalence of the Calcium-Acetate-Lactate and Double-Lactate extraction methods to assess soil phosphorus fertility. *J Plant Nutr Soil Sci* 181 (5), 795-801, DOI: [10.1002/jpln.201700366](https://doi.org/10.1002/jpln.201700366)

- VDLUFA (2015) A 6.2.1.1 Bestimmung von Phosphor und Kalium im Calcium-Acetat-Lactat-Auszug.
- Wei, L, Chen, C, Xu, Z (2010) Citric acid enhances the mobilization of organic phosphorus in subtropical and tropical forest soils. *Biol Fertil Soils* 46, 765–769
- Zheng, ZM, Zhang, TQ (2011) Soil phosphorus tests and transformation analysis to quantify plant availability: A review. In Whalen, JK (Ed.) (2012) *Soil fertility improvement and integrated nutrient management – A global perspective*. InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, ISBN 978-953-307-945-5, pp. 19-36

**For citation:** Zimmer D, Baumann K (*year of download*) Kapitel 4.5.2 Abschätzung von pflanzenverfügbarem P in 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*