

## N-PHONE

# Nutzung von Smartphones zur spektralphotometrischen Vor-Ort-Bestimmung des Mineralstickstoffs im Boden als Basis einer bedarfsgerechten Stickstoffdüngung im Feldgemüsebau

Aktenzeichen 34515/01

## Abschlussbericht

(Berichtszeitraum 17.06.2019 bis 31.10.2023)

Projektleitung:

Hochschule Weihenstephan-Triesdorf  
Zentrum für Forschung und Wissenstransfer  
Institut für Gartenbau  
Prof. Dr. Elke Meinken/Dr. Dieter Lohr  
Am Staudengarten 14

85354 Freising

Kooperationspartner:

STEP Systems GmbH  
Harald Braungardt (CEO)  
Duisburger Straße 44

90451 Nürnberg

Laufzeit: 17.06.2019 – 30.10.2023

Projektbearbeitung:

Hochschule Weihenstephan-Triesdorf:  
STEP Systems GmbH:

Lukas Czech, Jan Glaubke  
Dieter Rusche, Marjan Karlovic

Freising, März 2024

# Projektkennblatt

der

## Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	<b>34515</b>	Referat	<b>34</b>	Fördersumme	<b>321.652 €</b>
----	--------------	---------	-----------	-------------	------------------

**Antragstitel** **N-PHONE – Nutzung von Smartphones zur spektralphotometrischen Vor-Ort-Bestimmung des Mineralstickstoffs im Boden als Basis einer bedarfsgerechten Stickstoffdüngung im Feldgemüsebau**

**Stichworte** Nmin, Nitratauswaschung, Analytik, Kulturbegleitendes Nmin-Sollwertsystem

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
<b>36/51 Monate</b>	<b>17.06.2019</b>	<b>16.06.2022/30.09.2023</b>	<b>1</b>

Zwischenberichte	16.06.2020 16.06.2021
------------------	--------------------------

<b>Bewilligungsempfänger</b>	Hochschule Weihenstephan-Triesdorf (HSWT) Zentrum für Forschung und Wissenstransfer Institut für Gartenbau Am Staudengarten 14 85354 Freising	Tel	+49 8161 71-3347
		Projektleitung	Prof. Dr. Elke Meinken /Dr. Dieter Lohr
		Bearbeiter	Jan Glaubke/Lukas Czech

**Kooperationspartner** STEP Systems GmbH  
Harald Braungardt  
Duisburger Str. 44  
90451 Nürnberg

### **Zielsetzung und Anlass des Vorhabens**

Wie der aktuelle Nitratbericht der Bundesregierung zeigt, ist unter anderem in Gebieten mit intensivem Feldgemüseanbau weiterhin eine hohe Nitratbelastung des Grundwassers zu verzeichnen. Dieser Sachverhalt beruht darauf, dass viele Gemüsekulturen zur Erzielung hoher Erträge in den vom Markt geforderten guten Qualitäten intensiv mit Stickstoff gedüngt werden müssen, was eine erhebliche Gefahr übermäßiger Nitratreinträge ins Grundwasser nach sich zieht. Um dies zu vermeiden, sollte der im Boden vorhandene Mineralstickstoff regelmäßig gemessen und dann bei der Düngebedarfsberechnung berücksichtigt werden. Dieses, dem kulturbegleitenden  $N_{min}$ -Sollwert (KNS)-System zu Grunde liegende Prinzip wird allerdings kaum in der Praxis umgesetzt, da die notwendigen  $N_{min}$ -Analysen einen erheblichen finanziellen und logistischen Aufwand bedeuten. Schnelltest-Verfahren zur  $N_{min}$ -Bestimmung vor Ort sind wegen der mangelnden Genauigkeit bzw. der z. T. sehr hohen Anforderungen an den Anwender keine Alternative.

### **Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden**

Alle Arbeiten im Rahmen des Projektes erfolgten schrittweise. Den Anfang machte jeweils eine intensive Literatur- und Marktrecherche, um potentiell geeignete Konzepte, Verfahren und Geräte zu identifizieren. Die potentiell geeigneten Ansätze wurden im nächsten Schritt auf ihre grundlegende Eignung geprüft. Basierend auf dieser Eignungsprüfung wurde ein möglicher Lösungsweg skizziert und die einzelnen Komponenten – egal ob Software, Hardware oder Methodenvorschriften – in mehreren Feedback-Schleifen auf einen Praxiseinsatz hin optimiert. Als Referenz für die analytische Leistungsfähigkeit diente dabei immer die etablierte VDLUFA-Methode zur  $N_{min}$ -Bestimmung.

## **Ergebnisse und Diskussion**

Im Grundsatz konnten alle gesteckten Ziele erreicht werden. Für die volumendefinierte Probenahme wurde ein spezielles Probenahmewerkzeug entwickelt. Es handelt sich um ein sich nach unten verjüngendes Rohr mit einem sich außen befindlichen Bohrgewinde. Das Rohr wird mithilfe eines Akkuschlagschraubers in den Boden ein- und wieder herausgedreht. Aus der Anzahl der Einstiche und dem Gesamtgewicht des entnommenen Bodens kann die aktuelle Lagerungsdichte des Bodens berechnet werden. Die Messungen zeigen, dass unabhängig von der Bodenart bzw. dem Gehalt an organischer Bodensubstanz eine sehr gute Übereinstimmung zur mittels Stechzylindern ermittelten Lagerungsdichte besteht. Die Modellierung ergab eine Abweichung von im Mittel 0,12 kg/l. Einschränkend ist allerdings zu sagen, dass bei bindigen Böden für das Eindrehen des Bohrers sehr viel Kraft benötigt wird, was einen erheblichen Materialverschleiß zur Folge hat. Gut geeignet ist das Verfahren für sandige sowie vor allem sehr humusreiche Böden, bei denen das Fehlerrisiko bei der Umrechnung über Faustzahlen besonders groß ist. Ein Problem bleibt allerdings der Wassergehalt der Proben und die damit einhergehende Verdünnung des Extrakts. Dieses Problem ließ sich nicht abschließend lösen.

Neben dem Werkzeug zur volumendefinierten Probenahme wurde ein Schnelltest zur Bestimmung des Mineralstickstoffs in der entnommenen Bodenprobe entwickelt. Das Verfahren basiert auf der etablierten VDLUFA-N<sub>min</sub>-Methode. Im ersten Schritt wird die Probe mit CaCl<sub>2</sub> extrahiert, wobei das Extraktionsverhältnis aus Gründen der Praktikabilität auf 1:1 eingengt und die Suspension mit einem Pürierstab homogenisiert wird. Vom Filtrat werden zwei Aliquote entnommen und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 angesäuert. Anschließend wird einem der beiden Aliquote Zinkpulver zugegeben, wodurch das enthaltene Nitrat zu Ammonium reduziert wird (Ausbeute 75 %). Im nächsten Schritt werden die beiden Aliquote mit NaOH wieder alkalisiert und das enthaltene Ammonium durch die Zugabe von Trinatriumcitrat, Dichlorisocyanursäure, Natriumnitroprussid und Salicylat (Berthelot-Reaktion) angefärbt. Die Zudosierung aller Reagenzien erfolgt entweder über Glasspritzen oder über einen Mikrolöffel.

Für die eigentliche Endbestimmung wurde ein einfaches LED-Photometer im 3D-Druck gefertigt, das mit dem Smartphone als Detektor gekoppelt wird. Die Ermittlung des Ammonium-N-Gehaltes erfolgt über die Auswertung des R-Farbwertes. Die Messungen bei Standardlösungen und Bodenextrakten zeigen eine sehr hohe Übereinstimmung zur Bestimmung mittels Continuous-Flow-Analyzer im Labor. Mit einer Abweichung von weniger als 10 kg N/ha ist das Verfahren durchaus für einen Praxiseinsatz geeignet. Für die Nutzerführung bei der Messung (inklusive Anfärbung, Kalibration und Auswertung) wurde eine Smartphone-App entwickelt.

## **Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation**

Czech, L., Glaubke, J., Lohr., D., Meinken, E. (2023): NPhone – Spektralphotometrische N<sub>min</sub>-Bestimmung mit dem Smartphone. Posterbeitrag auf der 55. Jahrestagung der Deutschen Gartenbauwissenschaftlichen Gesellschaft in Osnabrück (03/23).

Czech, L., Glaubke, J., Lohr., D., Meinken, E. (2023): Volumendefinierte Entnahme von Bodenproben für die N<sub>min</sub>-Bestimmung. Posterbeitrag auf dem 134. VDLUFA-Kongress in Freising (09/23).

## **Fazit**

Im Rahmen des Forschungsprojektes konnte gezeigt werden, dass das gesetzte Ziel einer Vor-Ort-Bestimmung des N<sub>min</sub>-Gehaltes im Boden mittels Smartphone möglich ist und das Fehlerrisiko bei der Umrechnung der Messwerte auf den Flächenbezug mit Faustzahlen bei humusreichen bzw. anmoorigen und moorigen Böden durch eine volumenbasierte Probenahme deutlich reduziert werden kann. Allerdings wurde bei keiner der Komponenten das angestrebte TRL von 7 bis 8 erreicht. Bis zu einem Praxiseinsatz sind noch umfangreiche Feldtests und darauf aufbauend Optimierungsmaßnahmen im Hinblick auf das Handling notwendig.

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	6
2	Anlass und Zielsetzung des Projekts .....	7
3	Arbeitsschritte und Methode.....	9
4	Ergebnisse .....	9
4.1	Probennahme und Extraktion .....	10
4.1.1	Entwicklung des Probenahmewerkzeugs.....	10
4.1.2	Evaluierung der volumenbasierten Probenahme .....	12
4.2	Reaktionschemie.....	14
4.2.1	Vorauswahl geeigneter Verfahren .....	14
4.2.2	Grundlegende Erprobung der ausgewählten Verfahren .....	16
4.2.3	Optimierung der Reaktionschemie für den Feldeinsatz.....	18
4.3	Endbestimmung mittels Smartphone .....	22
4.3.1	Grundkonzeption der Hard- und Softwarekomponenten.....	22
4.3.2	Design der Messküvette .....	23
4.3.3	Funktionsmuster und Entwicklung des Auswertalgorithmus.....	24
4.3.4	Erprobungsträger der Messküvette .....	25
4.3.5	Entwicklung der Smartphone-App .....	26
5	Diskussion .....	30
6	Öffentlichkeitsarbeit .....	31
7	Fazit.....	31
8	Literaturverzeichnis.....	32
9	Anhang.....	A-1
9.1	Poster auf der 55. Jahrestagung der Deutschen Gartenbauwissenschaftlichen Gesellschaft (DGG) in Osnabrück (03/23) .....	A-1
9.2	Poster auf dem 134. VDLUFA-Kongress in Freising (09/23) .....	A-2
9.3	Literaturrecherche zur spektralphotometrischen Bestimmung von Ammonium- und Nitratstickstoff .....	A-3

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Ablauf der spektralphotometrischen $N_{\min}$ -Bestimmung (links) sowie die zu entwickelnden Hard- und Softwarekomponenten (rechts) .....	9
Abb. 2:	Erstes Konzept eines Werkzeuges für die volumendefinierte Probenahme ([a] Querholm mit aufgesetzten Vierkantrohren und [b] Satz der sich verjüngenden Vierkantprofile).....	11
Abb. 3:	Zweites Konzept eines Werkzeuges für die volumendefinierte Probennahme ([a-c] Hohlbohrer mit unterschiedlich ausgestalteten Hohlkörpern und Bohrköpfen und [d] Bohrkopf mit Verlängerung an Akkuschlagschrauber).....	11

Abb. 4:	Drittes und viertes Konzept eines Werkzeuges für die volumendefinierte Probennahme ([a] mittels eines Erdbohrers in den Boden eingezogener Bohrstock und [b] konisches Hohlrohr mit Außengewinde und Adapter zum Anschluss an den Schlagschrauber) ....	12
Abb. 5:	Gewichte (frisch) der mittels Bohrstockprototyp auf den 15 Schlägen entnommenen Einzelproben (Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (n = 9); Zahlen oberhalb der Säulen = C <sub>org</sub> -Gehalt in %) .....	13
Abb. 6:	Gegenüberstellung der mittels Stechzylinder bestimmten Lagerungsdichten und der über die mit dem Bohrstock entnommenen Frischmassen modellierten .....	14
Abb. 7:	[a] Relative Wiederfindung von Nitrat bei Standardlösungen (n = 25) sowie [b] Vergleich der in Bodenextrakten (n = 50) bei händischer Reduktion mittels Zink in salzsaurer Lösung und mittels Cd bei Einsatz eines Continuous Flow Analyzers gefundenen Nitratmengen (die gestrichelte Linie kennzeichnet die erste Winkelhalbierende) .....	17
Abb. 8:	Einfluss der Temperatur auf die Farbentwicklung bei der Ammoniumbestimmung (Probe mit 2,5 mg NH <sub>4</sub> -N/l, Temperierung der Probe im Wasserbad und minütliche Messung aus demselben Ansatz) .....	18
Abb. 9:	Relative Abweichung zwischen der Bestimmung von Ammonium- und Nitratstickstoff in Bodenextrakten mittels des erarbeiteten Schnelltestverfahrens und der Bestimmung mittels Continuous Flow Analyzer (CFA) .....	20
Abb. 10:	Vergleich der mittels Continuous Flow Analyzer (CFA) ermittelten N <sub>min</sub> -Gehalte und denen gemäß Schnelltestverfahren bei der Reagenzienzugabe als Pulver mit dem Mikrolöffel .....	21
Abb. 11:	Konzept der nach dem Prinzip eines LED-Photometers arbeitenden Messküvette für die smartphonebasierte N <sub>min</sub> -Bestimmung .....	22
Abb. 12:	Gesamtansicht des Designprototyps von oben bzw. der Seite sowie der einzelnen Komponenten der Messküvette .....	23
Abb. 13:	Wiederholte Messung von NH <sub>4</sub> Cl-Lösungen mit unabhängigen Kalibrationen mit zwei überlappenden 2-Punkt-Kalibrationen (n = 5; Fehlerbalken = Standardfehler); die Bilder zeigen die Farbintensität der Proben bzw. Standards in den beiden Arbeitsbereichen	25
Abb. 14:	Screenshots der Smartphone-App für den automatisierten Kalibrierprozess .....	27
Abb. 15:	Screenshots der Benutzerführung während des Anfärbeprozesses .....	28
Abb. 16:	Screenshots der Smartphone-App von der Anlage von Schlägen, der Zuordnung von Proben zu einem Schlag sowie der Zuordnung von Analysen und Einstichen zu einer Probe (von links nach rechts) .....	29

# 1 Zusammenfassung

Regionen mit intensivem Feldgemüseanbau gehören neben Regionen mit einem hohen Tierbestand zu den Hot-Spots im Hinblick auf die Nitratbelastung des Grundwassers. Hintergrund ist der hohe Stickstoffbedarf vieler gemüsebaulicher Kulturen. Mit dem Kulturbegleitenden  $N_{\min}$ -Sollwert (KNS)-System steht zwar seit vielen Jahren ein Werkzeug zur bedarfsgerechten N-Düngung zur Verfügung, das aber in der Praxis nur wenig genutzt wird. Das wesentliche Hemmnis ist der Aufwand für die Entnahme der notwendigen  $N_{\min}$ -Proben. Zwar sind bereits verschiedene Schnelltestsysteme zur  $N_{\min}$ -Bestimmung verfügbar. Diese haben aber alle Schwächen bei der analytischen Genauigkeit. Zudem schrecken viele Praktiker vor den notwendigen Handphotometern etwas zurück. Genau an diesem Punkt setzt das Forschungsprojekt an: Es soll ein einfaches, aber genaues Verfahren zur  $N_{\min}$ -Bestimmung entwickelt werden, wobei das Smartphone als Detektor verwendet wird. Dies hat zwei wesentliche Vorteile. Zum einen werden Kosten gespart, da kein zusätzliches Gerät benötigt wird. Zum Zweiten gibt es keine Berührungängste seitens der Praktiker. Neben der Messung an sich hat die  $N_{\min}$ -Methode, egal ob vor Ort oder im Labor gemessen wird, eine weitere Schwäche. Das ist die Umrechnung des gewichtsbezogenen Messwertes auf den Flächenbezug. In der Regel werden hierfür Faustzahlen verwendet, was auf humusreichen Böden mit einem erheblichen Fehlerrisiko behaftet ist. Daher sollte ein Werkzeug für die Entnahme volumendefinierter Proben entwickelt werden, so dass parallel zur Entnahme der Proben ohne Mehraufwand die Lagerungsdichte bestimmt werden kann.

Für beide Aspekte konnten im Rahmen des Projektes grundsätzlich praxistaugliche Lösungen gefunden werden. Für die volumendefinierte Probenahme wurde ein spezieller Bohrer konzipiert. Dieser besteht aus einem konisch zulaufendem Rohr mit einem Bohrgewinde an der Außenseite. Dieser Bohrer kann zumindest auf sandigen bzw. humusreichen Böden einfach mit einem akkubetriebenen Schlagschrauber in den Boden ein- und wieder herausgedreht werden. Aus der Anzahl der Einstiche und dem Gesamtgewicht der entnommenen Bodenmenge kann die Lagerungsdichte des Bodens berechnet werden. Die Untersuchungen zeigen eine – bodenunabhängig – sehr gute Übereinstimmung zur Bestimmung mittels Stechzylindern bei nur unwesentlich mehr Aufwand als bei der üblichen Probenahme mit Einschlagbohrstöcken.

Auch die smartphonebasierte  $N_{\min}$ -Bestimmung konnte erfolgreich umgesetzt werden. Dazu wurde im 3D-Druck ein einfaches LED-Photometer gefertigt, in das die angefärbte Probe gestellt wird. Anschließend wird mit dem Smartphone ein Foto aufgenommen und über die Analyse des R-Farbwertes die Ammonium-N-Konzentration ermittelt. Für die Nutzerführung sowie die gesamte Durchführung der Messung (inklusive Kalibration) wurde eine App entwickelt. Zudem wurde die Reaktionschemie (Nitratreduktion

und Anfärbung) stark vereinfacht, in dem die Zugabe verschiedener Reagenzien kombiniert und die Zugabe so gestaltet wurde, dass sie mit einfachen Glasspritzen und einem Mikrolöffel erfolgen kann.

Grundsätzlich sind alle im Projekt entwickelten Komponenten für die Vor-Ort-Bestimmung des Mineralstickstoffs im Boden geeignet und könnten dazu beitragen das KNS-System breiter in der gemüsebaulichen Praxis zu verankern. Allerdings sind bis dahin noch intensive Tests unter echten Praxisbedingungen und einige Entwicklungsschritte notwendig.

## **2 Anlass und Zielsetzung des Projekts**

Viele Gemüsekulturen haben einen hohen Stickstoffbedarf, eine kurze Kulturzeit und werden während ihrer Hauptwachstumsphase geerntet. Das bedeutet: Es muss viel Stickstoff in sehr kurzer Zeit zur Verfügung gestellt werden und auch zum Erntezeitpunkt muss eine ausreichende Stickstoffversorgung gewährleistet sein, um hohe Erträge und eine gute Qualität zu erzielen. Aus diesem Grund enthalten die von der Praxis für die Düngbedarfsermittlung zu Grunde gelegten Stickstoffbedarfswerte relativ hohe Sicherheitszuschläge. Die Folge davon sind häufig sehr hohe Restmengen an mineralischem Stickstoff ( $N_{\min}$ ), die hochgradig auswaschungsgefährdet sind. Dementsprechend gehören Gemüseanbaubereiche, neben Gebieten mit hohen Viehbesatzdichten, zu den Hot-Spots bei der Nitratbelastung des Grundwassers.

Mit dem Kulturbegleitenden  $N_{\min}$ -Sollwert(KNS)-System steht zwar ein Werkzeug zur Verfügung mit dem die Nitratauswaschung im Feldgemüsebau nachweislich um bis zu 50 % reduziert werden kann, allerdings wird das KNS-System bisher in der Praxis kaum umgesetzt. Das Haupthemmnis sind dabei die zu jedem Düngungstermin notwendigen  $N_{\min}$ -Analysen. Auf Grund der Vielzahl von Kulturen und dem satzweisen Anbau bedeuten die Analysen einen erheblichen finanziellen und logistischen Aufwand. Hinzu kommt, dass die Ergebnisse frühestens einige Tage nach der Probenahme vorliegen. Dieser Zeitverzug ist bei vielen Gemüsekulturen bereits zu groß. Zwar gibt es Schnelltest-Verfahren zur Vor-Ort-Bestimmung der  $N_{\min}$ -Gehalte, wodurch eine aufwendige Kühlung der Proben entfällt und die Ergebnisse unverzüglich vorliegen, diese sind aber nicht ausreichend genau bzw. stellen so hohe Anforderungen an den Anwender, dass viele Gemüseanbauer vor deren Nutzung zurückschrecken.

Hinzu kommt die fehlerträchtige Umrechnung der gewichtsbasierten Messwerte – unabhängig davon ob im Labor oder auf dem Feld ermittelt – auf den flächenbezogenen Stickstoffvorrat im Boden. Diese Umrechnung erfolgt in der Regel nicht mit der tatsächli-

chen Lagerungsdichte des Bodens, deren Bestimmung einen erheblichen Aufwand bedeutet sowie dem aktuellen Bodenwassergehalt, sondern es werden Faustzahlen herangezogen, die die Realität auf dem Feld mehr oder weniger gut widerspiegeln.

An diesen zentralen Schwachpunkten setzt das Forschungsvorhaben an: Ziel ist die Entwicklung eines spektralphotometrischen Verfahrens zur Bestimmung des  $N_{\min}$ -Gehaltes Vor-Ort, bei dem das Smartphone als Detektor dient sowie von Werkzeugen zur volumendefinierten Entnahme und Extraktion feldfeuchter Bodenproben. Die Nutzung des Smartphones als analytisches Werkzeug bietet dabei zwei wesentliche Vorteile: Zum Ersten ist der Anwender mit dem Gerät vertraut, wodurch keine grundsätzlichen Berührungängste bestehen. Zum Zweiten können alle für eine valide Analytik notwendigen Arbeitsschritte (u.a. Kalibration, analytische Qualitätssicherung) so in die App integriert werden, dass auch analytisch wenig geschulte Anwender sie einfach und fehlerfrei ausführen können. Durch die direkte Extraktion auf dem Feld ist keine Kühlung der Bodenproben notwendig und durch die volumenbasierte Probenahme wird das Fehlerrisiko bei der Umrechnung auf den flächenbezogenen Stickstoffvorrat eliminiert. Hinzu kommt, dass der Praktiker mit der App einfach durch die Düngebedarfsermittlung geführt und die Düngungsmaßnahme, gemäß den Vorgaben der Düngeverordnung, direkt dokumentiert werden kann.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens sollen die wesentlichen Hemmnisse für einen breiten Einsatz des KNS-Systems in der gärtnerischen Praxis gezielt beseitigt werden. Das Kernstück des Vorhabens ist die Entwicklung eines spektralphotometrischen Bestimmungsverfahrens für Ammonium- und Nitratstickstoff, bei dem ein Smartphone als Detektor genutzt wird. Hardwareseitig soll eine Messküvette gebaut werden, die über einen flexibel konstruierten Adapter auf verschiedene Smartphone-Modelle aufgesetzt werden kann. Softwareseitig wird eine App programmiert, die das aufgenommene Bild auswertet, den Ammonium- und Nitratgehalt in der Probe ermittelt sowie die Analysenergebnisse, basierend auf den Daten des KNS-Systems und einigen weiteren Eingaben des Anwenders direkt in eine Düngeempfehlung umsetzt. Zusätzlich sollen in die App weitere Funktionen, unter anderem zur analytischen Qualitätssicherung und zur Dokumentation von Düngungsmaßnahmen entsprechend der Anforderungen der Düngeverordnung, integriert werden. Um das Problem der Lagerungsdichte sowie des Bodenwassergehaltes zu lösen, soll zudem ein volumenbasiertes Verfahren zur Probenahme und Extraktion (inklusive Homogenisierung und Filtration) für die spektralphotometrische Bestimmung erarbeitet werden; dies erfordert den Bau spezieller Werkzeuge. Abb. 1 zeigt, wie die Umsetzung in der Praxis später erfolgen soll sowie welche Hard- und Softwarekomponenten dafür entwickelt werden müssen.



Abb. 1: Ablauf der spektralphotometrischen  $N_{\min}$ -Bestimmung (links) sowie die zu entwickelnden Hard- und Softwarekomponenten (rechts)

### 3 Arbeitsschritte und Methode

Alle Arbeiten im Rahmen des Projektes erfolgten schrittweise. Den Anfang machte jeweils eine intensive Literatur- und Marktrecherche, um potentiell geeignete Konzepte, Verfahren und Geräte zu identifizieren. Die potentiell geeigneten Ansätze wurden im nächsten Schritt auf ihre grundlegende Eignung geprüft. Basierend auf dieser Eignungsprüfung wurde ein möglicher Lösungsweg skizziert und die einzelnen Komponenten – egal ob Software, Hardware oder Methodenvorschriften – in mehreren Feedback-Schleifen auf einen Praxiseinsatz hin optimiert. Als Referenz für die analytische Leistungsfähigkeit diente dabei immer die etablierte VDLUFA-Methode zur  $N_{\min}$ -Bestimmung.

### 4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die wesentlichen Arbeitsschritte bei der Entwicklung der Soft- und Hardwarekomponenten für die spektralphotometrische  $N_{\min}$ -Bestimmung mit dem Smartphone sowie die erreichten Ergebnisse dargestellt. Anders als in der Gliederung des Antrags, die sich an den Entwicklungsschritten von der Entwicklung der grundlegenden Konzepte und Funktionsmuster bis hin zum Praxistest von Prototypen orientierte, gliedert sich das folgende Kapitel in die einzelnen Komponenten des Gesamtsystems. Dementsprechend werden in den einzelnen Abschnitten immer Ergebnisse aus

mehreren Arbeitspaketen gemeinsam vorgestellt. Im ersten Abschnitt wird die Entwicklung der Protokolle und Werkzeuge für die volumenbasierte Entnahme von Bodenproben sowie die nachfolgende Extraktion genauer beschrieben. Es folgt die Reaktionschemie (Reduktion, Anfärbung) der Proben. Der dritte Teil behandelt die Entwicklung der Messküvette inklusive des Algorithmus zur Auswertung der Bilder und die Ermittlung der  $\text{NH}_4$ - und  $\text{NO}_3\text{-N}$ -Konzentration. Im letzten Teil wird auf die App zur Durchführung der Messung eingegangen.

## 4.1 Probennahme und Extraktion

Für die Probenahme wurden folgende Anforderungen an die Werkzeuge formuliert: Es sollen volumendefinierte, in drei Schichten geteilte (0-30 cm, 30-60 cm und 60-90 cm) Bodenproben entnommen werden. Für einen aussagekräftigen  $N_{\min}$ -Wert sind mindestens 8 bis 10 Einstiche je Hektar notwendig. Gleichzeitig muss der Bohrstock ein bestimmtes Volumen aufweisen, um eine repräsentative Probenahme zu gewährleisten. Aus der Anzahl und dem Gewicht aller Teilproben wird die Lagerungsdichte bei aktueller Feuchte berechnet. Anschließend wird die Probe durch ein 5 mm Sieb homogenisiert und es erfolgt eine gewichtsbasierte Extraktion, wie sie auch bei der Labormethode üblich ist.

Für die eigentliche Extraktion und Filtration sind keine speziellen Entwicklungsarbeiten notwendig. Die Extraktion erfolgt mittels eines akkubetriebenen Pürierstabs und die Filtration mit üblichen Papierfaltensfiltern, wie sie auch bei der Labormethode angewendet werden.

### 4.1.1 Entwicklung des Probenahmewerkzeugs

Als Grundlage für die Entwicklung eines ersten Funktionsmusters für die volumenbasierte Entnahme der Bodenprobe wurden potentiell geeignete Werkzeuge aus anderen Anwendungsbereichen beschafft, deren Aufbau und Funktionsprinzip analysiert und Funktionsmuster angefertigt. Der erste Probennehmer (Abb. 2) basierte auf einem Profilstecher aus dem Forstbereich. Es handelt sich um ein dreiteiliges Set sich verjüngender, zweigeteilter Vierkantrohre, bei dem ähnlich wie bei den etablierten Göttinger Bohrstöcken die Entnahme der Proben aus den drei Tiefen sequentiell aus dem gleichen Loch erfolgt. Die beiden halbierten Vierkantrohre wurden beweglich in einen Querholm eingehängt und sollten mit Wippbewegungen in den Boden eingedrückt werden. Beim Herausziehen sollten sich die beiden Rohre ineinanderschieben und so die Probe einklemmen, um ein Herausrieseln der Probe zu verhindern. Die ersten Tests zeigten sehr schnell, dass die Konstruktion nicht robust genug war und sich die Aufhängung der Vierkantrohre beim Eindrücken in den Boden sehr schnell verbogen.

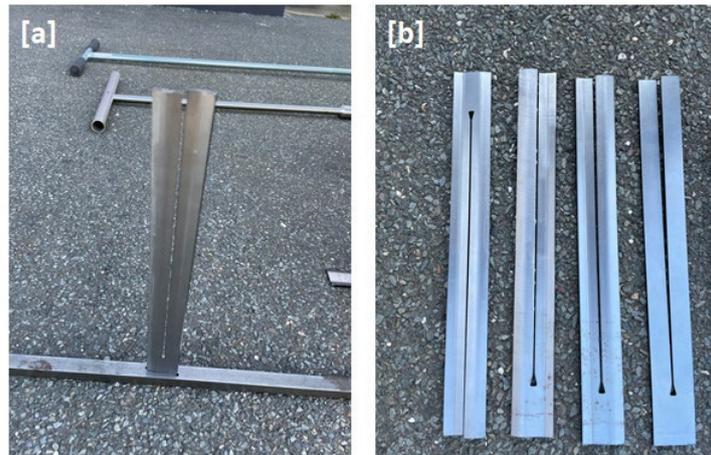


Abb. 2: Erstes Konzept eines Werkzeuges für die volumendefinierte Probenahme ([a] Querholm mit aufgesetzten Vierkantrohren und [b] Satz der sich verjüngenden Vierkantprofile)

Als zweiter Ansatz wurde ein Hohlbohrer (Abb. 3) erprobt, der mittels eines akkubetriebenen Schlagschraubers in den Boden eingedreht wurde. Bei den ersten Tests zeigte sich, dass das Design grundsätzlich funktioniert. Das entnommene Probenvolumen schwankte nur in sehr geringen Grenzen. Allerdings gab es Handling-Probleme. Durch die sehr geschlossene Bauform des Bohrkopfes gestaltete sich auf bindigen Böden die Entleerung sehr zeitaufwendig und mühsam. Daher wurde bei der zweiten Funktionsmustergeneration eine offenere Bauform mit mehr und breiteren Schlitzzen zur Entleerung gewählt. Zwar funktionierte dadurch das Entleeren auch bei sehr bindigen Böden sehr gut, allerdings war der Bohrkopf nicht stabil genug. Bei einer dritten Funktionsmustergeneration wurde der Durchmesser des Bohrkopfes sowie dessen Wandstärke vergrößert. Dadurch war zwar die Stabilität ausreichend hoch und das Entleeren auch bei bindigen Böden sehr einfach. Allerdings erforderte das Eindrehen sehr viel Kraft und die entnommene Probenmenge war sehr hoch.

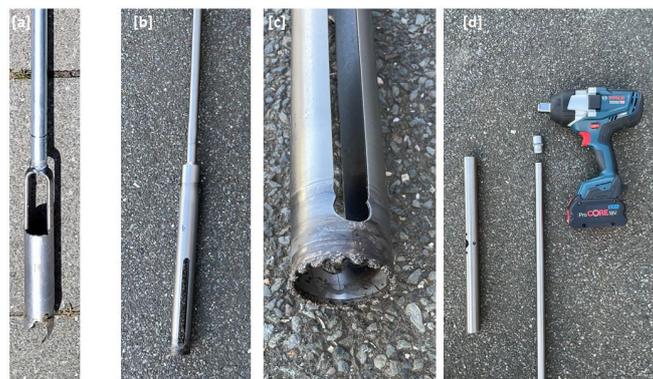


Abb. 3: Zweites Konzept eines Werkzeuges für die volumendefinierte Probenahme ([a-c] Hohlbohrer mit unterschiedlich ausgestatteten Hohlkörpern und Bohrköpfen und [d] Bohrkopf mit Verlängerung an Akkuschlagschrauber)

Daher wurde parallel noch ein weiteres Konzept (Abb. 4a) erprobt. Dabei wurde ein Metallrohr durch einen spindelförmigen Bohrer in den Boden eingezogen. Dieses Verfahren war sehr vielversprechend im Hinblick auf die Entnahme, allerdings gestaltete sich auch hier die Entleerung als relativ aufwendig. Weswegen das Konzept der sich „eindrehenden Bohrschreibe“ nochmals etwas anders gestaltet wurde. Es wurde ein leicht konisches Stahlrohr mit einem außenliegenden Schraubengewinde verwendet (Abb. 4b). Dieses Rohr wird über einen aufgesetzten Kopf mit dem Schlagschrauber verbunden und in den Boden eingedreht. Das Handling des Systems ist sowohl im Hinblick auf das Ein- und Ausdrehen als auch die Entleerung also recht einfach. Lediglich auf sehr bindigen Böden mit einem geringen Anteil organischer Substanz erforderte das Eindrehen einen sehr hohen Kraftaufwand, der zu einem erheblichen Materialverschleiß führte. Allerdings ist auch fraglich, ob auf solchen Standorten die volumenbasierte Probenahme überhaupt notwendig ist, da die Lagerungsdichten trocken und die Wassergehalte solcher Böden nur in sehr engen Grenzen schwanken, so dass eine Umrechnung mit den üblichen Faustzahlen nur ein geringes Fehlerrisiko birgt.



Abb. 4: Drittes und viertes Konzept eines Werkzeuges für die volumenbasierte Probenahme ([a] mittels eines Erdbohrers in den Boden eingezogener Bohrstock und [b] konisches Hohlrohr mit Außengewinde und Adapter zum Anschluss an den Schlagschrauber)

#### 4.1.2 Evaluierung der volumenbasierten Probenahme

Für die Evaluierung unter AP 3.3 wurden insgesamt 22 Schläge an neun Standorten beprobt. Es handelt sich bei den Flächen um acker- bzw. gemüsebaulich genutzte Flächen in Bayern mit einer sehr weiten Spreizung der  $C_{org}$ -Gehalte von etwa 1 % bis über 20 %. Die Proben wurden aus der Schicht 0 bis 30 cm entnommen. Auf jedem Schlag wurden drei Beprobungen in einem räumlich eng begrenzten Bereich durchgeführt. Bei jeder Beprobung wurden jeweils drei Einstiche (Dreiecksverbund) mit dem neu entwickelten Bohrstock gemacht und mittig zwischen den drei Einstichen eine Stechzylinderprobe (VDLUFÄ-Methodenbuch Band I; Methode A 1.2.5) zur Bestimmung der Lagerungsdichte feucht und trocken entnommen. Die mit dem Bohrstock entnommenen Probenmengen

wurden gewogen und deren Trockensubstanzgehalt im Labor (VDLUFAMethodenbuch Band I; Methode A 2.1.1) analysiert.

In Abb. 5 ist die mittels dem Bohrstock entnommene Frischmasse für die insgesamt 22 Standorte dargestellt. Wie an den kleinen Fehlerbalken zu erkennen ist, waren die Schwankungen des Frischgewichts zwischen den jeweils neun Einstichen sehr gering. Der Variationskoeffizient für alle Schläge lag bei 1,6 %. Des Weiteren zeigt die Abbildung, dass zwar ein grober, negativer Trend zwischen dem Gehalt an organischem Kohlenstoff und dem Gewicht der entnommenen Probe vorliegt. Allerdings ist vor allem bei den sehr stark humosen bzw. den anmoorigen und moorigen Böden mit  $C_{org}$ -Gehalten 5 % (Schläge 6 bis 9) kein eindeutiger Zusammenhang zu erkennen. Ursächlich hierfür sind die großen Schwankungen des Bodenwassergehaltes bei der Beprobung.

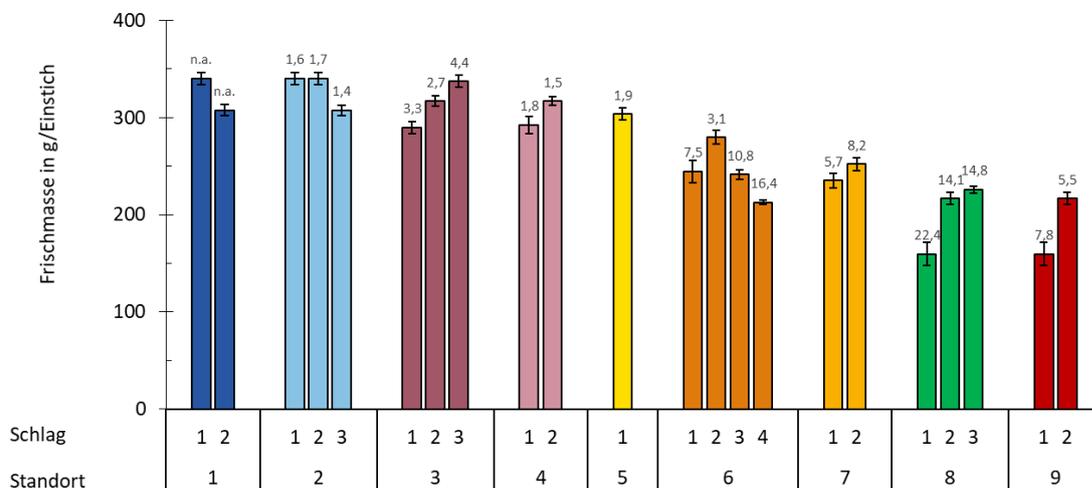


Abb. 5: Gewichte (frisch) der mittels Bohrstockprototyp auf den 15 Schlägen entnommenen Einzelproben (Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler ( $n = 9$ ); Zahlen oberhalb der Säulen =  $C_{org}$ -Gehalt in %)

In einem zweiten Schritt wurde an Hand der mittels des Bohrstocks entnommenen Probenmenge die mit dem Stechzylinder ermittelte Lagerungsdichte feucht modelliert. Dazu wurde ein einfaches lineares Regressionsmodell an die Daten angepasst:

$$LD_{\hat{f}} = a \cdot FM + b$$

mit  $LD_{\hat{f}}$  = modellierte Lagerungsdichte feucht in kg/l

$FM$  = Frischmasse der entnommenene Probe in kg/Einstich

Wie aus Abb. 6 zu entnehmen ist besteht ein hochsignifikanter linearer Zusammenhang zwischen der modellierten und der tatsächlich gemessenen Lagerungsdichte feucht. Der mittlere Fehler des Modells beträgt 0,12 kg/l (entspricht einem Variationskoeffizienten von 7 %). Lediglich bei einer Probe ist eine etwas größere Abweichung von 0,35 kg/l

zu beobachten. Bei einem Boden mit einer Lagerungsdichte trocken von 1,0 kg/l und einem Wassergehalt von 45 Gew.-% ergäbe sich bei einem  $N_{\min}$ -Wert von 150 kg/ha eine Abweichung von 13 kg N/ha.

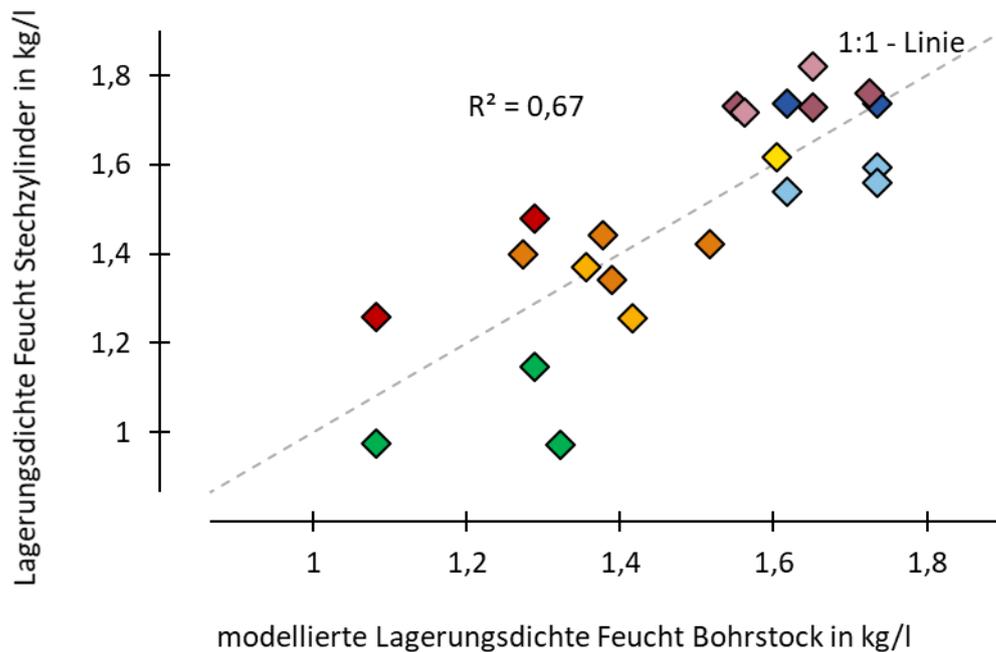


Abb. 6: Gegenüberstellung der mittels Stechzylinder bestimmten Lagerungsdichten und der über die mit dem Bohrstock entnommenen Frischmassen modellierten

In einem zweiten Schritt wurde aus der modellierten Lagerungsdichte und dem Probenfrischgewicht das theoretische Volumen der entnommenen Probe bei ungestörter Lagerung berechnet. Dies betrug im Mittel 180 ml und entsprach damit ziemlich genau dem, aus der geometrischen Form (Rohrdurchmesser und Einstichtiefe) errechneten, Volumen des Bohrers von 188 ml. Dies ist ein weiterer Indikator dafür, dass mit dem gewählten Ansatz eine reproduzierbare, volumendefinierte Probennahme möglich ist.

## 4.2 Reaktionschemie

### 4.2.1 Vorauswahl geeigneter Verfahren

#### Ammoniumbestimmung

Bereits im Antrag waren die wesentlichen Kriterien für die Auswahl potentiell geeigneter Verfahren festgelegt. Diese lassen sich in die drei Aspekte analytische Leistungsfähigkeit, Umweltverträglichkeit und Praktikabilität untergliedern. Bei der analytischen Leistungsfähigkeit sind der Messbereich, die Präzision und die Wiederholbarkeit sowie die Matrixanfälligkeit entscheidend. Zudem muss eine Messung mit dem Smartphone möglich sein. Auf Grund der in den Kameras verbauten UV- und IR-Sperrfiltern kommen daher nur Methoden in Frage, die im VIS-Bereich arbeiten. Bei der Umweltverträglichkeit steht die Giftigkeit (kanzerogen, mutagen, umweltgefährlich) bzw.

Gefährlichkeit (z. B. Reaktivität, Brennbarkeit, starke Säuren/Laugen) und die Menge der eingesetzten Chemikalien im Vordergrund. Für die Praktikabilität sind die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Dauer) sowie die Anzahl und Haltbarkeit sowie die Dosierung der eingesetzten Reagenzien entscheidend.

Eine umfangreiche Literaturrecherche (Literatur ist als Anlage beigefügt) ergab, dass für die Bestimmung von Ammonium nur die Berthelot-Reaktion (bzw. die Indophenolblau-Methode) in Frage kommt, die in vielen Bereichen – u.a. der Bodenuntersuchung (VDLUFA, 2016) sowie der Wasseranalytik (DIN 38406-5:1983-10, DIN EN ISO 11732:2005-05) – das Standardverfahren ist. Bei allen anderen gefundenen Verfahren sind entweder die Reaktionszeiten zu lang, das Handling zu aufwendig oder es werden hoch giftige Reagenzien (z. B. Quecksilber-(II)-Iodid und Kaliumcyanid) verwendet. Allerdings gibt es zusätzlich zur Originalvorschrift, in der eine alkalische Lösung mit Phenol und Hypochlorit verwendet wurde (KITAOKA und NAKANO, 1969; GRESSNER und ARNDT, 2013), inzwischen eine Vielzahl von Modifikationen sowohl bezüglich der eingesetzten Reagenzien als auch der Durchführung. Der nächste Schritt der Literaturrecherche fokussierte sich daher auf einen Vergleich der verschiedenen Vorgehensweisen im Hinblick auf die anfangs genannten Kriterien. Basierend darauf wurde festgelegt, dass die Ammoniumbestimmung mittels der Berthelot-Reaktion mit Trinatriumcitrat als Komplexbildner, Dichlorisocyanursäure als Chlorlieferant und Natriumnitroprussid als Katalysator erfolgen soll. Als Farbreagenz wurden sowohl Salicylat als auch Thymol evaluiert.

#### Nitratbestimmung

Die Verfahren zur Nitratbestimmung lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe umfasst Verfahren, bei denen eine direkte Nitratmessung ohne vorherige Anfärbung mittels UV-Spektroskopie erfolgt. Auf Grund der in Smartphones verbauten UV-Filter kamen diese Verfahren nicht in Frage. Die zweite Gruppe bilden Verfahren, bei denen das Nitration in einer stark schwefelsauren Lösung direkt angefärbt wird. Diese Verfahren wurden vor allem auf Grund des hohen Gefährdungspotentials für den Anwender (Umgang mit konzentrierter Schwefelsäure und starke Erhitzung der Reaktionsgefäße) ausgeschlossen. Die dritte Gruppe bilden Verfahren, bei denen das Nitrat reduziert wird, wobei diese sich in solche unterteilen lassen, bei denen die Reduktion nur bis zum Nitrit reicht und das Nitrit angefärbt wird und solche, bei denen eine vollständige Reduktion bis zum Ammonium erfolgt. Das erste Verfahren ist das Standardverfahren in der Bodenanalytik (VDLUFA-Methodenbuch Band I; A 6.1.4.1). Die Anfärbung erfolgt über die Kopplung des gebildeten Nitrits mit einem Azofarbstoff (Griess-Ilosvay-Reaktion). Das Verfahren ist relativ einfach und robust und damit grundsätzlich für einen Vor-Ort-Einsatz geeignet. Allerdings erfolgt die Reduktion im Labor entweder mittels verkupfertem Cadmium oder mittels Hydrazin. Beide

Reagenzien sind kanzerogen und kommen daher für eine Vor-Ort-Methode nicht in Frage. Eine Alternative ist die Nitratreduktion in einer salzsauren Lösung mittels elementarem Zinkpulver. Das größte Problem ist die Ausbeute der Reduktion. Während bei der Labormethode eine Ausbeute von in der Regel über 95 % erreicht wird, kann laut Angaben in der Literatur die Ausbeute bei der Zinkreduktion sowohl bei der Reduktion bis zum Nitrit (MURRAY et al., 2017) als auch bis zum Ammonium (FANNING, 2000; HU et al., 2001; LIMOUSY et al., 2010; LOPES et al. 2016) erheblich schwanken. Bekannt ist, dass die Ausbeute bei beiden Verfahren vom pH-Wert, der Zinkmenge sowie der Zinkkörnung abhängt, wobei einzelne Autoren z. T. auch widersprüchliche Effekte berichten (LOPES et al. 2016). Ein Problem dabei dürfte sein, dass der genaue Reaktionsverlauf bisher nicht bekannt ist (YANG und LEE, 2005). Im Rahmen des Projektes wurden daher beide Wege erprobt.

#### 4.2.2 Grundlegende Erprobung der ausgewählten Verfahren

##### Nitratreduktion

Die Untersuchungen zeigten sehr bald, dass die Reduktion des Nitrats nur bis zum Nitrit nicht zielführend ist. Zum einen waren die Ausbeuten mit um die 10 % nur sehr gering, zum Zweiten war die Reaktion nicht stabil. Daher wurde dieses Verfahren zu Gunsten der vollständigen Reduktion bis zum Ammonium recht bald aufgegeben. Bei der Reduktion zum Ammonium zeigten sich die aus der Literatur bekannten Einflüsse des pH-Wertes, der Zinkmenge und der Zinkkörnung. Durch die Verwendung einer größeren Menge eines sehr feinkörnigen Zinkpulvers und einer starken Ansäuerung der Probe (pH 2) konnte eine stabile und annähernd quantitative Reduktion (ca. 90 %) erzielt werden. Allerdings ergaben sich in der nachfolgenden Anfärbung Probleme durch die Ausfällung von Zinkhydroxid nach der Alkalisierung der Probe. Die dadurch verursachte Trübung der Probe machte eine spektralphotometrische Messung unmöglich.

Zur Lösung des Problems wurde im ersten Schritt die Zinkmenge für die Reduktion verringert. So konnten die Ausfällungen zwar vermieden werden, gleichzeitig nahm aber auch die Reduktionsleistung ab. Im nächsten Ansatz wurde die Trinitriumcitratmenge erhöht, um das Zink – ähnlich wie Ca und Mg – durch Komplexierung vor Ausfällung zu schützen. Zur kompletten Vermeidung der Ausfällungen waren allerdings erhebliche Citratmengen notwendig, wodurch der Blindwert sehr stark anstieg und damit der Linearitätsbereich erheblich verkleinert wurde. Der dritte Lösungsansatz war eine nochmalige stärkere Alkalisierung (> pH 13) der angefärbten Probe, wodurch sich, aufgrund der amphoteren Eigenschaft des Zinkhydroxids, der Niederschlag beseitigen lässt. Mit diesem Verfahren wurden umfangreichere Messserien durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Wiederfindung bei der Reduktion nicht ausreichend stabil war, weswegen die Vorgehensweise nochmals etwas modifiziert werden musste.

Dadurch sank die Ausbeute zwar leicht auf 75 %, die Reproduzierbarkeit war aber wesentlich besser. Abb. 7 [a und b] zeigt die relative Nitratwiederfindung von Standardlösungen und Bodenextrakten bei der Reduktion zu Ammonium mittels Zink im Vergleich zur Reduktion mittels Cadmium, die auf dem im Labor genutzten Autoanalyser (SEAL AA 3 HR) durchgeführt wird und bei der die Ausbeute  $\geq 97\%$  war. Die Analyse der Proben fand unter Wiederholbedingungen statt, wobei der Ammoniumgehalt in der nicht mit Zink behandelten Probe vom Ammonium-Messwert der behandelten Probe abgezogen wurde. Nicht reduziertes Nitrat konnte in den mit Zink behandelten Proben nicht mehr gefunden werden. Dies wurde auch durch eine Stickstoffbestimmung mittels Wasserdampfdestillation (sequentielle Zugabe von  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  und Devarda-Legierung) bestätigt, sodass davon auszugehen ist, dass es sich bei den fehlenden 25 % Wiederfindung um gasförmige Verluste und nicht um eine unvollständige Reduktion handelt.

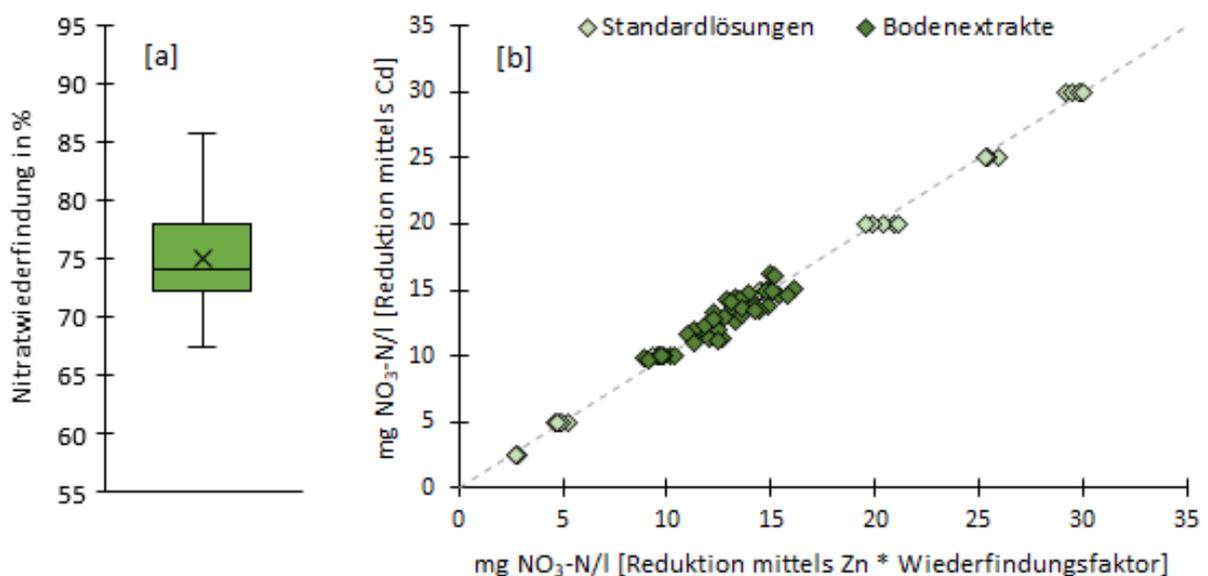


Abb. 7: [a] Relative Wiederfindung von Nitrat bei Standardlösungen ( $n = 25$ ) sowie [b] Vergleich der in Bodenextrakten ( $n = 50$ ) bei händischer Reduktion mittels Zink in salzsaurer Lösung und mittels Cd bei Einsatz eines Continuous Flow Analyzers gefundenen Nitratmengen (die gestrichelte Linie kennzeichnet die erste Winkelhalbierende)

### Ammoniumbestimmung mittels der Berthelot-Reaktion

Ausgehend von den, in der Literatur (Details sie AP 1.1) beschriebenen, Vorgehensweisen wurde im ersten Schritt ein Protokoll (Menge und Konzentration der Reagenzien) für einen linearen Messbereich von 0 bis 5 mg  $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$  erarbeitet. Da die Methode in vergleichbarer Form im Labor der HSWT zur Analyse von Bodenextrakten mittels Autoanalyser verwendet wird, sind Probleme durch Interferenzen oder andere Störeinflüsse sehr unwahrscheinlich. Allerdings ist die Farbentwicklung stark temperaturabhängig, weswegen die Reaktion in der Laborroutine in einem auf  $37\text{ }^\circ\text{C}$  temperierten Wasserbad durchgeführt wird. Um den Temperatureinfluss auf die

Farbentwicklung zu quantifizieren und die notwendigen Wartezeiten festzulegen, wurden Reaktionskinetiken bei Temperaturen zwischen 5 und 30 °C erstellt (Abb. 8). Während bei 30 °C die Farbentwicklung bereits nach ca. 4 Minuten abgeschlossen war, dauerte es bei 20 °C bereits knapp doppelt so lange. Bei 5 bzw. 10 °C war das Absorptionsmaximum auch nach 14 Minuten noch nicht erreicht. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Extinktion bei 10 °C etwa 90 % und bei 5 °C weniger als 50 % des Endwerts. Dieser war erst nach 22 bzw. 40 Minuten zu verzeichnen. Die beschriebenen Temperatureffekte gelten unabhängig davon, ob Salicylat oder Thymol als Farbreagenz verwendet wird und auch die Ammoniumkonzentration hatte keinen signifikanten Einfluss. Nach Eintreten der maximalen Farbtintensität bleibt diese für mindestens 60 Minuten erhalten, ein Einfluss der Temperatur war nicht zu beobachten.

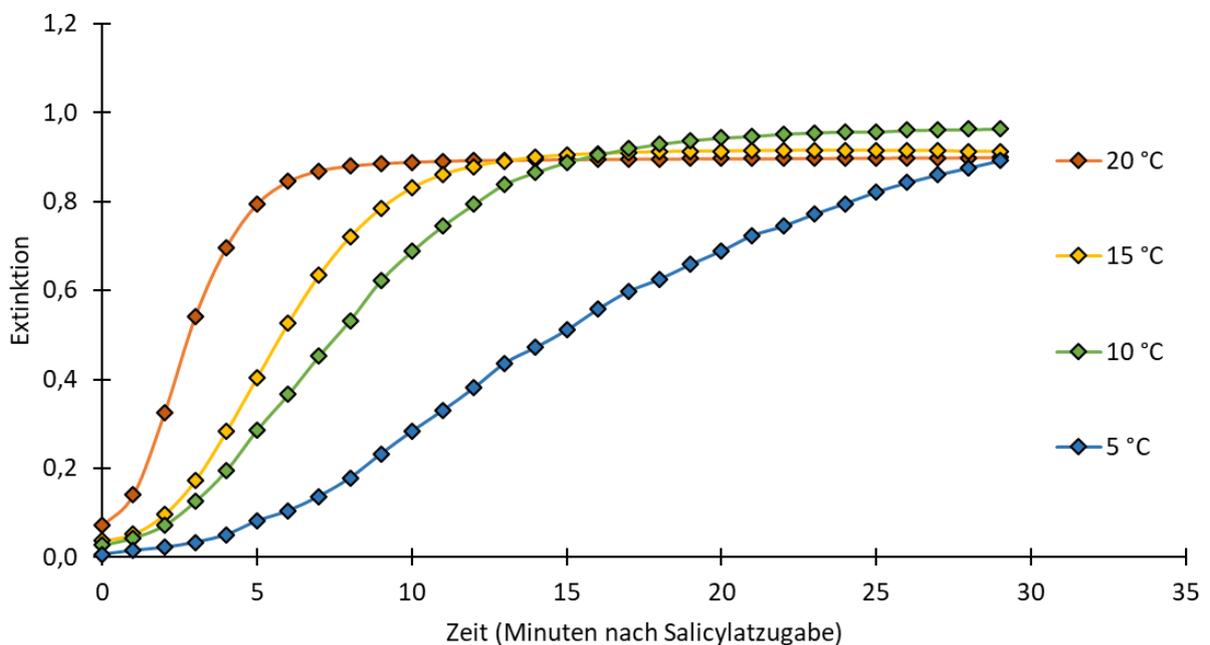


Abb. 8: Einfluss der Temperatur auf die Farbentwicklung bei der Ammoniumbestimmung (Probe mit 2,5 mg NH<sub>4</sub>-N/l, Temperierung der Probe im Wasserbad und minütliche Messung aus demselben Ansatz)

#### 4.2.3 Optimierung der Reaktionschemie für den Feldeinsatz

Nachdem die grundlegende Eignung der beiden Teilschritte (Reduktion von Nitrat zu Ammonium und Endbestimmung von Ammonium mittels der Berthelot-Reaktion) gezeigt werden konnte, erfolgte eine schrittweise Optimierung der gesamten Reaktionschemie im Hinblick auf den Feldeinsatz. Der wesentliche Punkt dabei war die Zugabe der Reagenzien: Zum einen sollten die notwendigen Arbeitsschritte auf ein Minimum reduziert und zum Zweiten die Zugabe der Chemikalien möglichst einfach gestaltet werden (z. B. Verzicht auf Pipetten oder gewichtsbasierte Zugabe).

Auf Grund der Voruntersuchungen zur Nitratreduktion (Wiederfindung ca. 75 %) stand fest, dass eine gemeinsame Bestimmung von Ammonium und (reduziertem) Nitrat nicht möglich ist. Zwar sind die Ammoniumgehalte in vielen Böden sehr niedrig, weswegen eine pauschale Korrektur des Messwertes mit dem Faktor 1,33 (entspricht der Division durch die Wiederfindung) oftmals möglich wäre, aber gerade im Feldgemüsebau werden zunehmend ammoniumstabilisierte Dünger eingesetzt. In solchen Fällen hätte das Vorgehen eine signifikante Überschätzung des  $N_{\min}$ -Vorrats im Boden zur Folge. Daher wurde das folgende Vorgehen festgelegt: Vom Bodenextrakt werden zwei Aliquote (A und B) abgenommen und mit einer schwach konzentrierten Salzsäure auf einen pH-Wert von etwa 2 angesäuert. In die Teilprobe B wird für die Reduktion von Nitrat zu Ammonium mit einem Mikrolöffel Zinkpulver zugegeben. Während der notwendigen Wartezeit von 5 Minuten kann bereits die Anfärbung der Teilprobe A zur Bestimmung des originär vorhandenen Ammoniums erfolgen. Dazu wird in schneller Folge Natronlauge, Trinatriumcitrat, Dichlorisocyanursäure, Natriumnitroprussid und Natriumsalicylat zugegeben. Nach Abschluss der Reduktion wird mit Teilprobe B exakt gleich verfahren. Die Messung des Ammoniumgehalts erfolgt jeweils 12 Minuten nach der Zugabe der Reagenzien. Der Messwert für die Teilprobe A entspricht der Ammonium-N-Konzentration im Bodenextrakt. Die Nitrat-N-Konzentration errechnet sich aus der Differenz der Messwerte der Teilproben B und A multipliziert mit dem Faktor 1,33. Die Ansäuerung bei der Teilprobe A wäre aus fachlicher Sicht nicht notwendig, dadurch ist aber die gesamte Vorgehensweise bei beiden Aliquoten mit Ausnahme der Zinkzugabe identisch und damit weniger fehleranfällig.

In der Folge wurde die beschriebene Vorgehensweise in mehreren Messserien mit Bodenextrakten ohne und mit Dotierung in Form von Ammonium und/oder Nitrat validiert, wobei die Endbestimmung mittels eines Zweistrahl-Photometers mit einer 10 mm Durchflussküvette (Specord 200 Plus, Analytik Jena) erfolgte. Bei  $N_{\min}$ -Gehalten von weniger als 20 kg N/ha (Umrechnung der Messwerte basierend auf einem Extraktionsverhältnis von 1+1, einer Probenahmetiefe von 30 cm, einer Lagerungsdichte trocken von 1,4 kg/l und einem Trockensubstanzgehalt von 75 %) ist ein deutlicher Anstieg der relativen Abweichung zwischen den Ergebnissen der Laboranalyse und des Schnelltestverfahrens zu erkennen (Abb. 9). Absolut gesehen sind die Unterschiede aber zu vernachlässigen. Für die 42 Bodenextrakte mit  $N_{\min}$ -Gehalten zwischen 10 und 248 kg N/ha betrug die mittlere Abweichung lediglich  $7(\pm 6)$  kg N/ha.

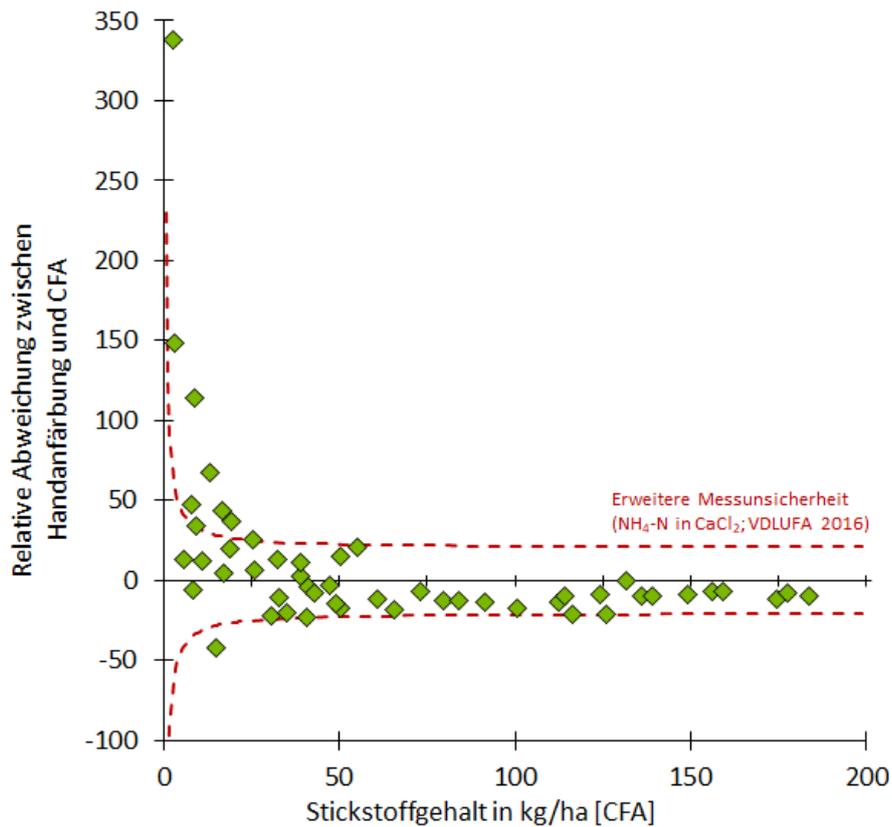


Abb. 9: Relative Abweichung zwischen der Bestimmung von Ammonium- und Nitratstickstoff in Bodenextrakten mittels des erarbeiteten Schnelltestverfahrens und der Bestimmung mittels Continuous Flow Analyzer (CFA)

Nachdem eine gute analytische Leistungsfähigkeit des Schnelltestverfahrens im Hinblick auf Vergleichbarkeit, Richtigkeit und Stabilität über den angestrebten Arbeitsbereich bis ca. 300 kg N<sub>min</sub>/ha nachgewiesen war, konzentrierten sich die Arbeiten auf eine möglichst einfache Handhabung auf dem Feld. In den bisher geschilderten Arbeiten wurden die Reagenzien in Meßkolben im Labor angesetzt und mit Präzisionspipetten zudosiert. Dies musste für einen Feldeinsatz durch analytische Laien deutlich vereinfacht werden. Ziel war eine möglichst einfache Zugabe der Reagenzien ohne aufwendige Hilfsmittel und die Minimierung der notwendigen Arbeitsschritte. Basierend auf einer Marktrecherche zu nach der Berthelot-Reaktion arbeitenden Schnelltests, wurde ein Verfahren etabliert, für das neben der schwachkonzentrierten Salzsäure (3,7 %) für die Ansäuerung der Probe vor der Reduktion lediglich eine Natronlaugelösung (14 %) sowie zwei Reagenziengemische benötigt werden. Das erste Gemisch besteht aus Trinatriumcitrat und Dichlorisocyanursäure und das zweite aus Natriumsalicylat und Natriumnitroprussid, wobei letzterem zur Verbesserung der Dosierbarkeit Natriumchlorid als Füllstoff zugesetzt wird. Um eine homogene Vermischung der einzelnen Chemikalien zu gewährleisten, werden diese nach dem Einwiegen in einer Scheibenschwingmühle vermahlen. Bei der Anfärbung können beide Reagenziengemische mit dem gleichen Mikrolöffel zudosiert werden.

Die Abnahme der Probenaliquote sowie der Salzsäure und der Natronlauge erfolgt volumetrisch, wobei sich die abgenommenen Volumina zwischen einem und zehn Milliliter bewegen. Wie Abb. 10 zu entnehmen ist, wird für die 51 dargestellten Extrakte mit diesem vereinfachten Verfahren eine vergleichbare Leistungsfähigkeit (mittleren Abweichung =  $8(\pm 6)$  kg N/ha) erreicht wie für die in der vorangegangenen Abbildung gezeigte flüssige Zugabe der Reagenzien mittels einer Präzisionspipette.

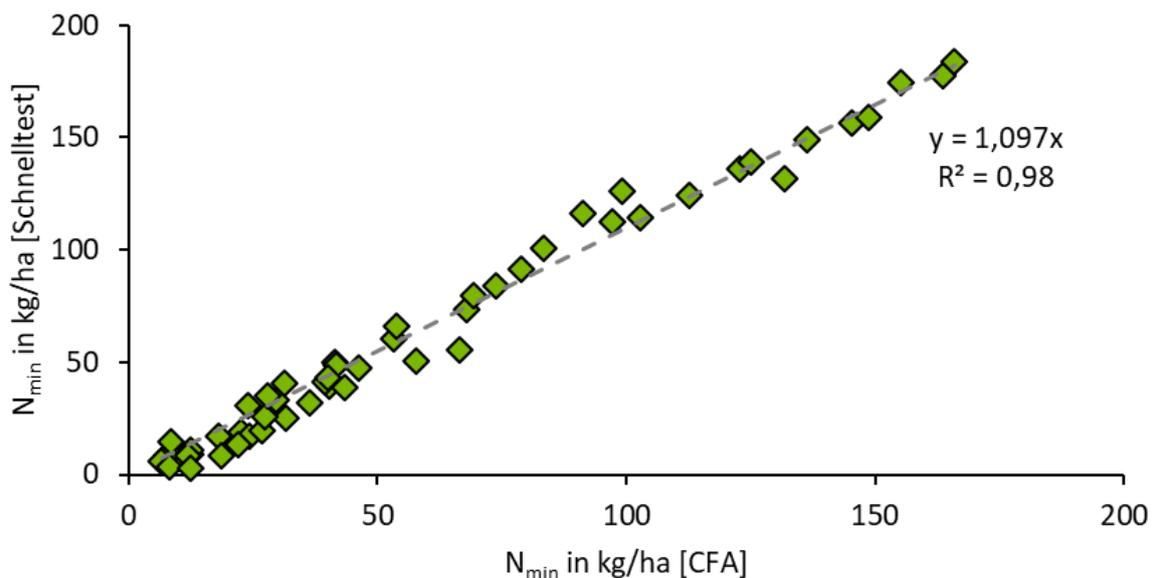


Abb. 10: Vergleich der mittels Continuous Flow Analyzer (CFA) ermittelten  $N_{\min}$ -Gehalte und denen gemäß Schnelltestverfahren bei der Reagenzienzugabe als Pulver mit dem Mikrolöffel

Eine weitere Vereinfachung für die Feldmethode betrifft die Zudosierung der flüssigen Reagenzien. Dafür wird die Präzisionspipette durch Glasspritzen mit 1 ml bzw. 10 ml Füllmenge ersetzt. Mit diesen können gleichmäßige Volumina abgemessen werden und diese können bei Beschädigungen leicht ersetzt werden. Versuche zeigten, dass mit den Glasspritzen eine sehr gut reproduzierbare Zudosierung der Proben bzw. der flüssigen Reagenzien (Natronlauge, Salzsäure) möglich ist.

## 4.3 Endbestimmung mittels Smartphone

### 4.3.1 Grundkonzeption der Hard- und Softwarekomponenten

#### Messküvette für die Kopplung mit dem Smartphone

Die Grundlage für die Hardwareentwicklung der Messküvette diente das bereits im Rahmen der Antragstellung eingereichte Konzept eines sehr einfach aufgebauten LED-Photometers (Abb. 11). Da die Endbestimmung sowohl des Ammonium- als auch des Nitratstickstoffs als Ammonium erfolgte, würde als Lichtquelle nur eine Hochleistungs-Dunkelrot-LED (Emissionspeak bei etwa 650 nm) benötigt. Im Rahmen der Funktionsträgerentwicklung wurde die Frage der Universalität des Konzepts für verschiedene Smartphones (unterschiedliche Abmessungen und Position der Rückkameras) intensiv diskutiert. Das in Abb. 11 gezeigte Design mit einem Schiebedeckel, der modellspezifisch angepasst wird, wurde zwar für grundlegend geeignet, aber auch sehr aufwendig befunden.

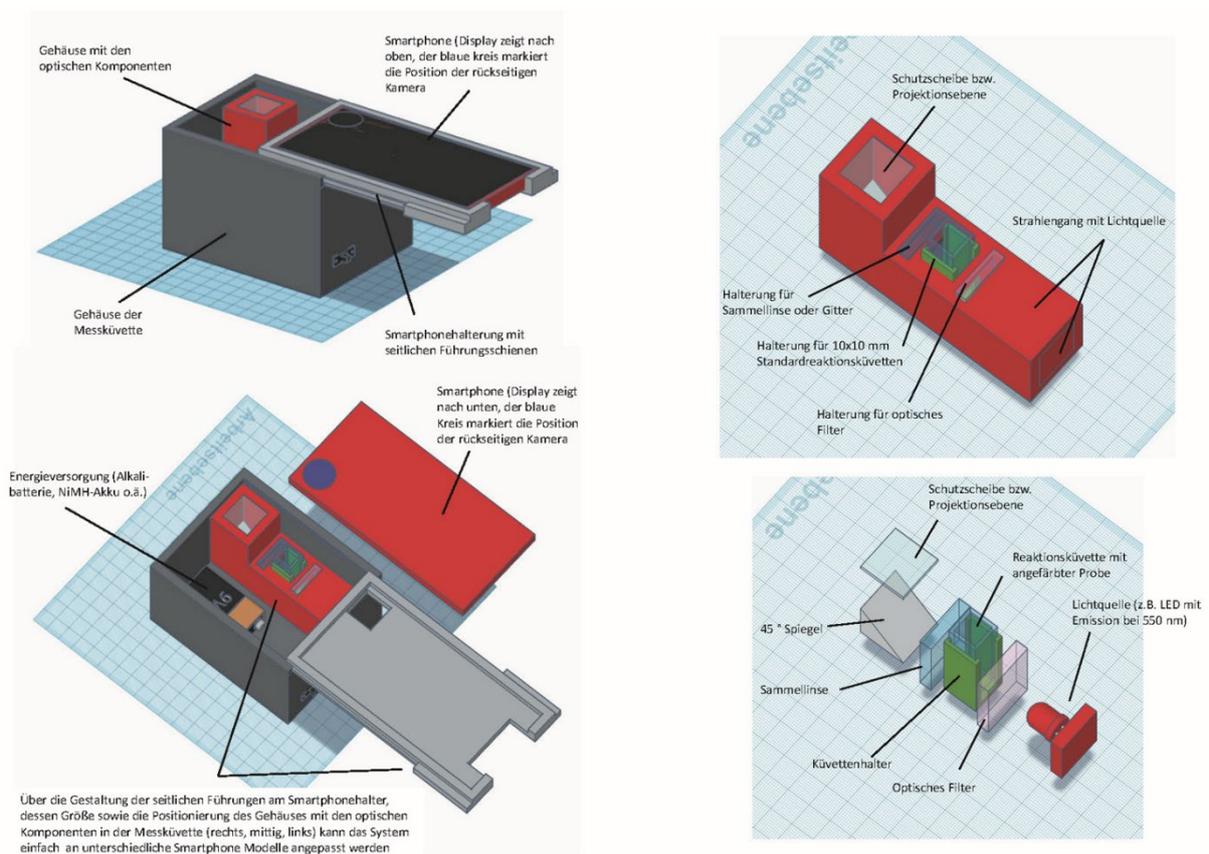


Abb. 11: Konzept der nach dem Prinzip eines LED-Photometers arbeitenden Messküvette für die smartphonebasierte  $N_{\min}$ -Bestimmung

#### Smartphone App

Ursprünglich war die Programmierung einer Cross-Platform App (iOS und Android) in der Entwicklungsumgebung Visual Studio mit Xamarin geplant. Da allerdings kein Projektbearbeiter mit den entsprechenden Programmierfähigkeiten gefunden werden

konnte, wurde entschieden die App-Entwicklung anders als ursprünglich vorgesehen nicht projektbegleitend selbst zu machen, sondern in der zweiten Projekthälfte einen Entwicklungsauftrag an einen externen Softwareentwickler zu vergeben. Vor Beginn der Softwareentwicklung wurde ein Pflichtenheft mit den notwendigen Funktionen aufgesetzt, dass im Folgenden schrittweise umgesetzt wurde. Die wichtigsten Funktionen sind im Folgenden aufgeführt:

- Implementierung eines Auswertalgorithmus für die Ermittlung der  $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration basierend auf der Färbung der Probe
- Automatisierte Kalibrierfunktion mit Nutzerführung
- Umrechnung der gemessenen  $N_{\text{min}}$ -Werte auf den Flächenbezug
- Maßnahmen der analytischen Qualitätssicherung
- Nutzerführung durch den gesamten Analysenprozeß (Anfärbung, Messung, Auswertung)
- Probenerfassung und -dokumentation

#### 4.3.2 Design der Messküvette

Für den ersten Designprototyp der Messküvette wurde von der STEP Systems GmbH ein Gehäuse sowie der Strahlengang mittels CAD entworfen und im 3D-Druck-Verfahren gefertigt (Abb. 12). In das Gehäuse bzw. den Strahlengang wurde eine 9-V-Batterie als Stromquelle, eine Platine zur Steuerung der LED und ein 45 Grad Spiegel zur Umlenkung des Lichtstrahls eingebaut.

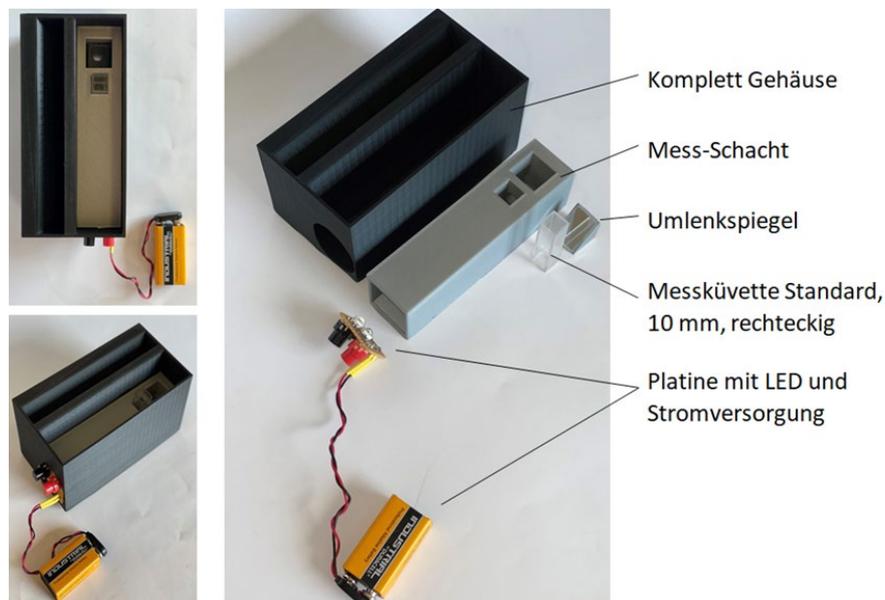


Abb. 12: Gesamtansicht des Designprototyps von oben bzw. der Seite sowie der einzelnen Komponenten der Messküvette

### 4.3.3 Funktionsmuster und Entwicklung des Auswertalgorithmus

Basierend auf dem Designprototyp wurde ein erstes Funktionsmuster gefertigt. Da bei der Reaktionschemie inzwischen die Festlegung auf die Reduktion des Nitrats zum Ammonium und die Endbestimmung mittels der Berthelot-Reaktion gefallen war, wurde als Lichtquelle eine Hochleistungs-LED mit einem scharfen Emissionspeak bei 660 nm – der üblicherweise bei der Berthelot-Reaktion für die Messung verwendeten Wellenlänge – verbaut. Für die Methodenentwicklung wurde zusätzlich ein Potentiometer eingebaut, um die Helligkeit der LED stufenlos regulieren zu können. Später wurde anstelle des Potentiometers ein entsprechender Festwiderstand verbaut. Die Positionierung der Kamera erfolgte händisch und das Eindringen von seitlichem Störlicht wurde durch eine Moosgummidichtung verhindert. In ersten Versuchen wurden die grundlegenden Kameraeinstellungen festgelegt. Hierfür wurde eine allgemeine Foto-App verwendet. Die Messungen zeigten sehr schnell, dass die Aufnahme der Bilder mit maximalem Zoom am zielführendsten war, wobei die Schärfereinstellung keine Rolle spielte. Bei diesem Vorgehen hatte eine Verschiebung der Kameraposition oberhalb der Messöffnung keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Dies bedeutet, dass auf die Fixierung/Positionierung der Kamera im Gehäuse verzichtet werden kann, also keine Anpassung der Messküvette an unterschiedliche Smartphone-Modelle notwendig ist. Gleichzeitig zeigten die Messungen, dass über die Analyse der R-Werte aus dem RGB-Farbraum bzw. dem H-Wert aus dem HSL-Farbraum die besten Ergebnisse erzielt wurden. Die Unterschiede zwischen den beiden Werten waren zu vernachlässigen. Letztendlich wurden die R-Werte verwendet.

Im nächsten Schritt wurden die Belichtungseinstellung der Kamera und die Helligkeit der LED angepasst. Dabei zeigte sich, dass der bei den Messungen mit dem Laborspektrometer erreichte Arbeitsbereich von 0 bis 30 mg N/l mit einer einzigen Einstellung nicht abgedeckt werden kann. Entweder waren die Bilder bei geringen Konzentrationen zu hell oder bei hohen zu dunkel. Im Folgenden wurde versucht, den Arbeitsbereich entweder durch eine Variation der Belichtung über den EV-Wert in der Smartphone-App bei gleicher Potentiometerstellung (also gleicher Helligkeit der LED) oder umgekehrt durch eine Veränderung der Potentiometerstellung bei gleicher Belichtungseinstellung zu vergrößern. Beide Ansätze brachten eine Verbesserung, wobei die Effekte durch die Veränderung der LED-Helligkeit mittels des Potentiometers deutlich größer waren. In beiden Fällen konnte aber nicht der gesamte Arbeitsbereich erfasst werden. Es wurde daher ein Konzept mit zwei virtuellen Arbeitsbereichen mit jeweils anderen Kameraeinstellungen (Kombination aus Belichtungszeit und ISO-Wert) erarbeitet. Ein Arbeitsbereich reicht von 0 bis etwa 15 mg N/l und der zweite von etwa 10 bis 25 mg N/l. Die Kalibration erfolgt über zwei 2-Punkt-Kalibrationen mit drei Standards (0, 12,5 und 25 mg N/l), wobei der 12,5er-Standard bei der Kalibration für den niedrigen Messbereich als höchster und bei der Kalibration für den hohen Messbereich als niedrigster Standard genutzt wird. Bei der

Analyse von Proben werden dann immer zwei Messungen durchgeführt. Eine mit den Kameraeinstellungen für den oberen Messbereich und eine mit denen für den unteren. Welcher der beiden Messungen ausgewertet wird, wurde anhand der R-Werte definiert. Bei R-Werten  $< 50$  für den unteren Messwert (Bild sehr dunkel) bzw.  $> 200$  für den hohen Messbereich (Bild sehr hell) wird die jeweilige Messungen nicht ausgewertet und die im anderen Bereich ermittelte  $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration ausgegeben. Werden für beide Arbeitsbereiche gültige Messwerte gefunden (im Konzentrationsbereich von etwa 11 bis 14 mg  $\text{NH}_4\text{-N/l}$ ), werden beide Messungen ausgewertet und als Ergebnis der Mittelwert ausgegeben. Abb. 13 zeigt die Präzision und Wiederholbarkeit der Messung. Die relative Standardabweichung lag für beide Werte bei etwa 10 %.

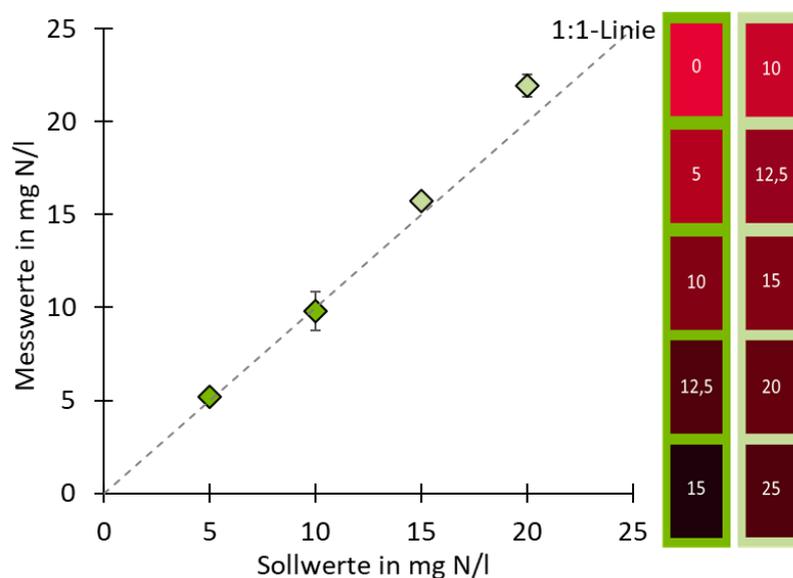


Abb. 13: Wiederholte Messung von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösungen mit unabhängigen Kalibrationen mit zwei überlappenden 2-Punkt-Kalibrationen ( $n = 5$ ; Fehlerbalken = Standardfehler); die Bilder zeigen die Farbintensität der Proben bzw. Standards in den beiden Arbeitsbereichen

#### 4.3.4 Erprobungsträger der Messküvette

Auf Grundlage der in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Arbeiten wurde von der STEP System GmbH ein Erprobungsträger der Messküvette gefertigt. Die wesentlichen Unterschiede zum ersten Funktionsmuster waren eine veränderte Positionierung der Öffnung für die Auflage des Kameraobjektivs, der Ersatz des Potentiometers durch einen passenden Festwiderstand sowie der Einbau einer Streuscheibe als Projektionsebene am Ausgang des Strahlengangs. Die Streuscheibe erfüllt dabei zwei Aufgaben: Zum einen sorgt die Streuung des Lichts für eine gleichmäßigere Ausleuchtung, wodurch der Einfluss der Kameraposition komplett eliminiert werden kann. Zum Zweiten schützt sie den Umlenkspiegel im Strahlengang vor Verschmutzungen. Zudem wurde eine Halterung für 10er-

Rechteckküvetten integriert. Mit diesem Erprobungsträger wurden die Messungen im Rahmen der App-Entwicklung durchgeführt.

#### 4.3.5 Entwicklung der Smartphone-App

##### Implementierung des Auswertungsalgorithmus und Automatisierung der Kalibration

Die Implementierung des Auswertalgorithmus an sich stellte keine größere technische Herausforderung dar, da das Auslesen des RGB-Wertes eines Pixels eine Standardfunktion darstellt, eine lineare Kalibrierfunktion verwendet wird und die Entscheidung, welche Kalibration (niedrige, hohe, beide) für die Auswertung genutzt wird, in einer einfachen If-else-Schleife getroffen werden kann. Wesentlich aufwendiger war die Automatisierung der Kalibration. Diese beginnt mit dem 12,5 mg N/l-Standard. Zuerst werden die Belichtungszeit und der ISO-Wert auf die Minimalwerte gesetzt. In einer rekursiven Schleife werden die Belichtungszeit und der ISO-Wert dann schrittweise immer weiter vergrößert, ein Bild aufgenommen und ausgewertet. Die wird solange gemacht, bis der R-Wert in einem vorgegebenen Fenster liegt. Die Belichtungszeit und der ISO-Wert werden als Einstellung für den niedrigen Messbereich verwendet. Es folgt eine zweite rekursive Schleife, in der mit Maximalwerten begonnen wird, die in der Folge immer weiter verkleinert werden bis wieder ein vordefinierter Zielbereich erreicht wird. Das sind die Einstellungen für den hohen Messbereich.

Im Anschluss wird der Standard mit 0 mg N/l mit den Einstellungen für den niedrigen Messbereich und der Standard mit 25 mg N/l mit denen für den hohen gemessen und die beiden Kalibriergleichungen berechnet. Zur Qualitätssicherung werden die aktuellen Kameraeinstellungen sowie Steigung und Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion mit den Werten der vorangegangenen Kalibrierungen verglichen. Liegen die Werte zu weit auseinander, wird das Prozedere wiederholt. Im Rahmen der Softwareentwicklung wurde die automatisierte Kalibration in mehreren Feedback-Schleifen immer weiter verbessert. So wurden z. B. die Schrittgrößen für die Annäherung an den Zielwert adaptiv gestaltet: Erst erfolgt die Annäherung in großen und bei zunehmender Annäherung an den Zielbereich in immer kleineren Schritten. Das reduziert den Zeitbedarf. Ähnliches gilt für die Startwerte, für die Belichtungszeit und den ISO-Wert. Zudem wurde ein Abbruchkriterium integriert, um zu verhindern, dass der Anpassungsalgorithmus in der Endphase der Annäherung in eine Endlosschleife läuft: Wird der R-Wert nicht mit einer bestimmten Anzahl Annäherungsschritte erreicht, springt der Algorithmus einige Suchschritte (zurück?) und die detaillierte Suche wird neu gestartet. Die intensiven Tests der automatisierten Kalibration zeigten eine sehr gute Reproduzierbarkeit und einen Zeitbedarf von nur wenigen Sekunden für die Festlegung der Kameraeinstellungen. Abb. 14 zeigt die Umsetzung der automatisierten Kalibrierung in der Smartphone-App.

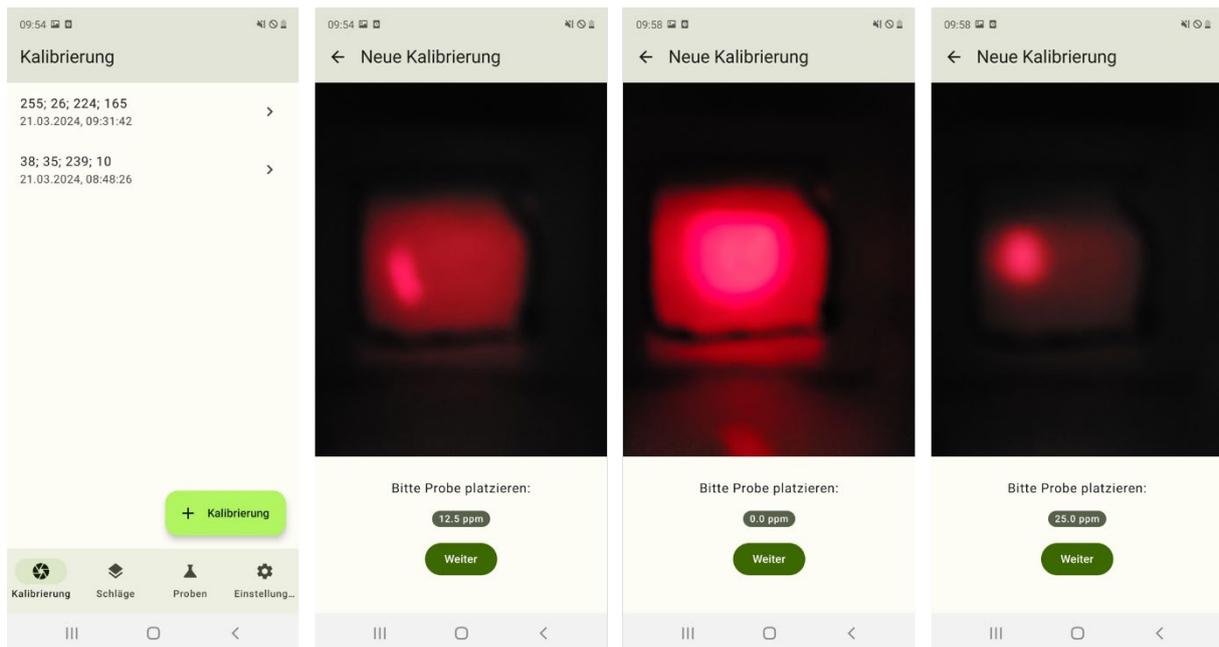


Abb. 14: Screenshots der Smartphone-App für den automatisierten Kalibrierprozess

### Nutzerführung während der Analyse

Zur Unterstützung der richtigen Positionierung der Smartphonekamera über dem Ausgang des Strahlengangs wurde eine Echtzeitkamerabild in die App integriert (Abb. 15). Des Weiteren wurde versucht den Nutzer möglichst intuitiv durch den gesamten Analysenprozeß beginnend von der Abnahme der beiden Filtrataliquote, deren Ansäuerung und die Reduktion mit Zink im Aliquot für die Nitratbestimmung und die nachfolgende Anfärbung bis hin zur Messung zu führen. Dazu wurde der gesamte Prozess in kleine Teilschritte zerlegt und zu jedem Teilschritt ein Erklärbildschirm erstellt. Die Erklärung bestehen aus kurzen Texten, die zukünftig mit einer detaillierten (multimedialen) Anleitung hinterlegt werden können. Zudem wurden bei den beiden Teilschritten mit vorgegebenen Wartezeiten (Reduktion und Anfärbung) automatische Timer eingebaut. Der Nutzer wischt sich einfach von einem Schritt zum nächsten, wobei für erfahrene Nutzer auch die Möglichkeit besteht den Prozess komplett zu überspringen und direkt zum eigentlichen Messfenster zu gehen.

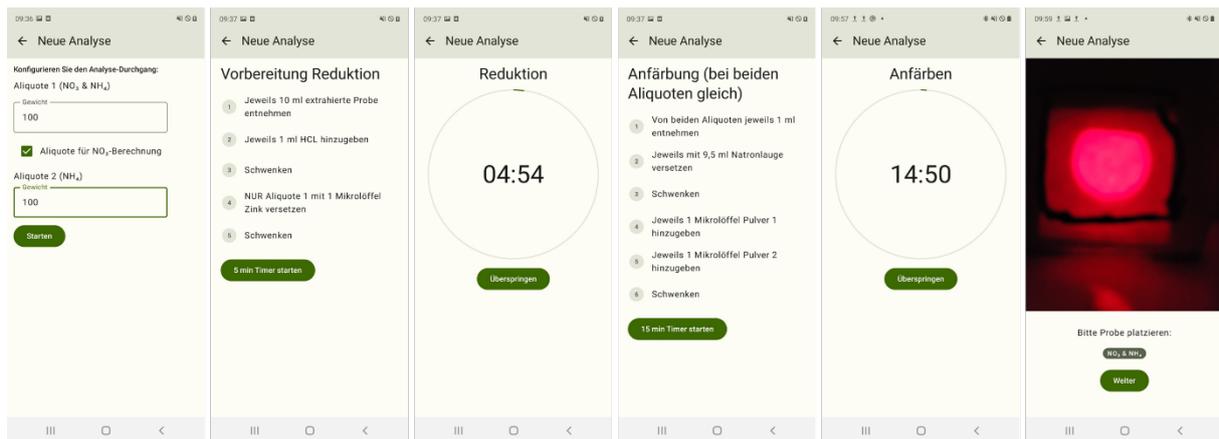


Abb. 15: Screenshots der Benutzerführung während des Anfärbeprozesses

### Umrechnung der Messwerte auf kg N/ha

Die Umrechnung der Messwerte erfolgt mittels der über die volumendefinierte Probennahme ermittelte Lagerungsdichte feucht des Bodens. Dazu trägt der Nutzer die Anzahl der Einstiche sowie das Gesamtgewicht des entnommenen Bodens in zwei Eingabefenster ein. Bei der Erprobung der App zeigte sich allerdings, dass die Nutzung der Lagerungsdichte feucht zu besseren Ergebnissen führt als die Verwendung von Faustzahlen. Allerdings kann damit der Verdünnungseffekt der Extrakte durch das Bodenwasser nur zum Teil kompensiert werden. Gerade auf sehr humusreichen (moorigen) Böden kann dies zu erheblichen Abweichungen führen, da der gewichtsmäßige Anteil des Bodenwassers an der Einwaage im Vergleich zu Mineralböden sehr hoch ist. Zudem ist das Extraktionsverhältnis mit 1:1 deutlich geringer als beim Laborverfahren, bei dem im Verhältnis von einem Teil Boden zu vier Teilen  $\text{CaCl}_2$ -Lösung extrahiert wird. Eine Vergrößerung des Extraktionsverhältnisses ist aus rein praktischen Gründen nicht möglich: Eine Verkleinerung der Einwaage würde bedeuten, dass die Probe sehr gut homogenisiert werden müsste, was sehr zeitaufwendig und mühsam sein kann. Gleichzeitig würde eine Erhöhung der Menge an Extraktionsmittel bedeuten, dass sehr große Flüssigkeitsmengen transportiert werden müssten. Auch die Einbeziehung von Standardwerten für den Bodenwassergehalt, wie sie bei Mineralböden üblich ist, bringt nur eine relativ geringfügige Verbesserung, da die Wassergehalte in sehr humosen Böden wesentlich stärker schwanken können. Die einzige zuverlässige Lösung wäre die Einbeziehung des tatsächlichen Bodenwassergehaltes. Technisch könnte dies über einen kapazitiven Bodenfeuchtefühler, der eventuell sogar direkt über Bluetooth mit der Smartphone-App gekoppelt wird und parallel zu jeder Teilprobenentnahme in den Boden eingestochen wird, gelöst werden. Nachteil ist allerdings, dass diese Fühler zum Teil bodenspezifisch kalibriert werden müssen. Im Rahmen des Projektes konnte dieser Ansatz zwar aus Zeitgründen nicht mehr praktisch erprobt werden, allerdings wurde er bei der Dokumentation der Probennahme rudimentär über eine Handeingabe implementiert (s. nächster Abschnitt).

## Dokumentation der Probennahme und Ergebnisverwaltung

Als oberste Hierarchieebene kann der Anwender Schläge anlegen und diesen dann Proben zu ordnen (Abb. 16). Zu jeder Probe werden das Probenahmedatum, die Anzahl der Einstiche und das Gesamtgewicht der Probe sowie die Messwerte (inklusive der Kameraeinstellung, der Rohdaten und der Kalibrierungen) für die beiden Aliquote abgespeichert. Jeder Probe können zudem die einzelnen Einstiche zugeordnet werden, die über die GPS-Funktion des Smartphones bei der Entnahme zusätzlich georeferenziert werden können. Zusätzlich zu den Positionsdaten kann optional der Bodenwassergehalt abgespeichert werden. Dieser wird später für die Umrechnung einfach gemittelt. Zudem wurde eine Exportfunktion integriert, mit der die Daten einfach in eine Excel-Datei übertragen und vom Nutzer weiterverarbeitet werden können.

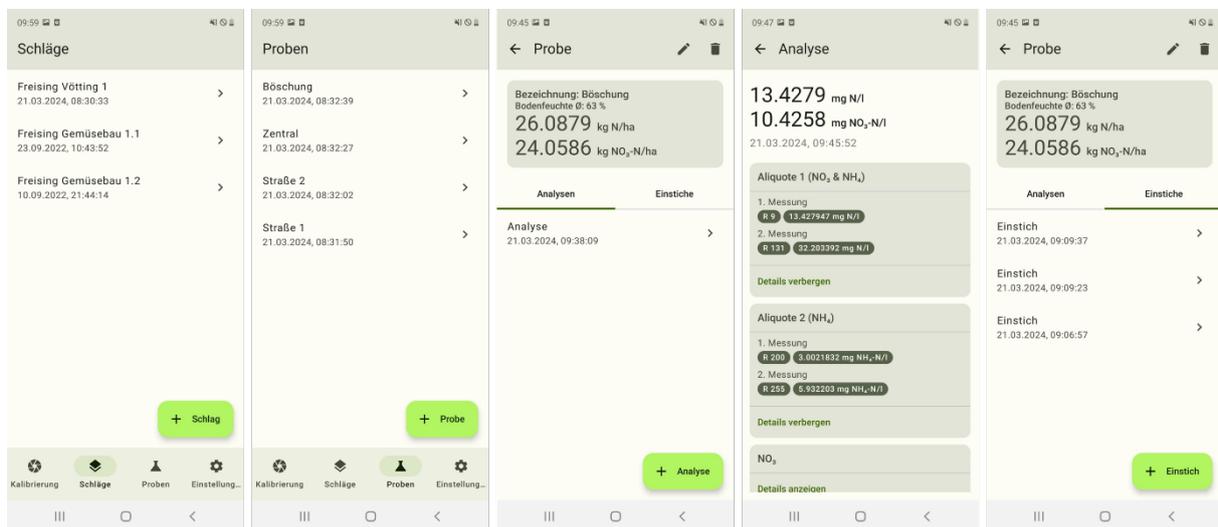


Abb. 16: Screenshots der Smartphone-App von der Anlage von Schlägen, der Zuordnung von Proben zu einem Schlag sowie der Zuordnung von Analysen und Einstichen zu einer Probe (von links nach rechts)

## 5 Diskussion

Ziel des Projektes war die Entwicklung von Werkzeugen für die volumendefinierte Entnahme von Bodenproben und die nachfolgende photometrische Bestimmung des enthaltenen Mineralstickstoffs, wobei das Smartphone als Detektor genutzt werden sollte. Angepeilt war, dass am Ende des Projektes alle Komponenten (Probenahmewerkzeug, Messküvette zur Kopplung mit dem Smartphone, Smartphone App zur Durchführung der Messung) den Entwicklungsstand eines technischen Prototyps, der unter Praxisbedingungen umfangreich getestet wurde, erreicht haben (TRL 7 bis 8). Dieses Ziel wurde nicht ganz erreicht. Zwar konnten alle technischen Herausforderungen schlussendlich gelöst werden, allerdings dauerten die Arbeiten z. T. erheblich länger als geplant bzw. es ergaben sich immer wieder technische Rückschläge, die einen Rücksprung auf einen früheren Entwicklungsschritt notwendig machten. Hinzu kamen in der ersten Projekthälfte Einschränkungen durch die Coronapandemie, die dazu führten, dass sich einzelne Arbeitsschritte immer wieder verzögerten. Am weitesten fortgeschritten ist die Messküvette für die spektralphotometrische N-Bestimmung sowie das Prozedere zur Anfärbung der Proben (Reaktionschemie). Der Prototyp der Messküvette und die eigentliche Anfärbung wurden unter quasi Feldbedingungen erfolgreich erprobt (TRL 5 bis 6), wobei einschränkend hinzuzufügen ist, dass die Messungen immer von sehr gut geschultem Personal durchgeführt wurden. Die wirkliche Validierung durch Praktiker steht noch aus. Die Smartphone App ist ebenfalls recht weit gediehen (TRL 5). Der Großteil der geplanten Features konnte integriert werden. Leidglich auf die Implementierung der Düngeberechnung wurde verzichtet. Dies hängt damit zusammen, dass dies keine technische Herausforderung darstellt und schlicht nicht ausreichend Mittel zur Verfügung standen, um die Umsetzung durch den externen Softwareentwickler zu finanzieren. Die größten Schwierigkeiten bereitete das Werkzeug zur volumendefinierten Probenahme. Hier wurde bisher nur der Nachweis der Funktionstüchtigkeit des Konzepts erbracht und ein für Testzwecke geeigneter Erprobungsträger gebaut (TRL 3 bis 4). Auf Grund der an sich einfachen technischen Konstruktion, sollte die Weiterentwicklung bis zu einem technischen Prototyp deutlich weniger Zeit in Anspruch nehmen als bei der wesentlich komplexeren  $N_{\min}$ -Messung (Küvette und Reaktionschemie).

Trotz der bereits erwähnten Pandemieprobleme und das für die STEP Systems GmbH insgesamt schwierige wirtschaftliche Umfeld gestaltete sich die Zusammenarbeit der beiden Projektpartner als sehr reibungslos. Es bestand bei allen Entwicklungsschritten ein enger und vertrauensvoller Austausch. Anders als ursprünglich geplant, erfolgte allerdings keine Einbindung von Praktikern und Beratern in das Projekt. Dies war insbesondere auf die Verzögerungen bei den technischen Entwicklungen zurückzuführen, weswegen erst in den letzten Projektmonaten ein System zur Verfügung stand, das überhaupt in der Praxis testbar gewesen wäre.

Für die Stickstoffbestimmung existieren bereits Ideen einer Weiterentwicklung, wobei es dabei nicht um die Untersuchung von Mineralböden, sondern um Messungen bei Kultursubstraten geht. Seitens der HSWT wurde ein entsprechender Antrag beim BMEL eingereicht über den derzeit aber noch nicht entschieden ist.

## 6 Öffentlichkeitsarbeit

Der breiten Öffentlichkeit wurde das Forschungsprojekt zusätzlich zur Pressemitteilung der DBU im Internetangebot der HSWT vorgestellt (Meldung in den Forschungsnews und Einrichtung einer Projektseite). Basierend auf diesen Bekanntmachungen haben zudem verschiedene Webportale (z.B. das Online-Portal der Zeitschrift Fruchthandel) über das angelaufene Projekt berichtet.

Zudem wurde das Projekt Fachleuten aus unterschiedlichen Bereichen (Universitäten und Hochschulen, Forschungseinrichtungen, Behörden, Ministerien) im Zuge von Führungen am Institut für Gartenbau, z. B. im Rahmen einer vom BMEL organisierten und der HSWT durchgeführten Fachveranstaltung im Jahr 2022, vorgestellt. Hinzu kamen zwei Posterbeiträge bzw. Kurzvorträge auf der 55. Jahrestagung der Deutschen Gartenbauwissenschaftlichen Gesellschaft in Osnabrück (03/23) und auf dem 134. VDLUFA-Kongress in Weihenstephan (09/23). Die beiden Poster sind dem Bericht im Anhang beigefügt.

## 7 Fazit

Das Projekt hat gezeigt, dass die Grundidee des Projekts zielführend und technisch umsetzbar ist. Durch die volumendefinierte Probenahme kann, vor allem bei sehr humosen Böden, der Fehler bei der Umrechnung des gewichtsbezogenen Stickstoffmesswerts in mg/l auf den flächenbezogenen  $N_{\min}$ -Gehalt in kg/ha im Vergleich zur Nutzung von Faustzahlen deutlich verringert werden. Ein Problem bleibt allerdings der Wassergehalt der Probe und die damit verbundene Verdünnung des Extraktes. Auf Grund des engen Extraktionsverhältnisses, dass aus Gründen der Praktikabilität auch nicht wesentlich erweitert werden kann, könnte hier nur die direkte Bodenfeuchtemessung (schaffen)helfen. Ein möglicher Ansatz wäre die Messung mit kapazitiven Fühlern, die im Rahmen des Projektes aber nicht genauer evaluiert werden konnte.

Zusätzlich zur volumendefinierten Probenahme wurde im Rahmen des Forschungsprojektes ein einfaches Vor-Ort-Verfahren zur spektralphotometrischen  $N_{\min}$ -Bestimmung mit dem Smartphone entwickelt. Technologisch basiert das Verfahren auf dem etablierten Laborverfahren: Extraktion mit  $CaCl_2$ , Anfärbung des im Extrakt enthaltenen Ammoniums mittels der Berthelotreaktion und spektralphotometrische Messung. Ergänzt wurde das Verfahren um die Reduktion des im Extrakt enthaltenen Nitrats zu Ammonium durch die Zugabe von Zink. Zudem wurde das Prozedere der Anfärbung sehr

stark vereinfacht, so dass zum einen nur sehr wenige Arbeitsschritte notwendig sind und zum Zweiten alle Reagenzien mittels einfacher Spritzen oder Mikrolöffel zudosiert werden können. Die Endbestimmung erfolgt mittels eines sehr einfachen, im 3D-Druck gefertigten LED-Photometer. Als Detektor dient die Kamera des Smartphones. Für die Durchführung der Messung (inklusive der Nutzerführung während Anfärbung und Messung, der Kalibration und der Umrechnung des Messwertes in kg/ha) wurde eine Smartphone App entwickelt. In praxisnahen Tests ergab sich eine Abweichung zwischen dem Schnelltest und der Labormethode von weniger als 10 kg N/ha.

Grundsätzlich sind alle im Projekt entwickelten Komponenten für die Vor-Ort-Bestimmung des Mineralstickstoffs im Boden geeignet und könnten dazu beitragen das KNS-System breiter in der gemüsebaulichen Praxis zu verankern. Allerdings sind bis dahin noch intensive Tests unter echten Praxisbedingungen und einige Entwicklungsschritte notwendig.

## 8 Literaturverzeichnis

- DIN EN ISO 11732:2005-05, Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von Ammoniumstickstoff - Verfahren mittels Fließanalytik (CFA und FIA) und spektrometrischer Detektion (ISO 11732:2005)
- DIN 38406-5:1983-10, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Kationen (Gruppe E); Bestimmung des Ammonium-Stickstoffs (E 5)
- FANNING, J. C. (2000): The chemical reduction of nitrate in aqueous solution. *Coordination Chemistry Reviews*, Volume 199, Issue 1, April 2000, Pages 159-179.
- GRESSNER, A. M. und ARNDT, T. (2013): *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik Laboratoriumsdiagnostik*. 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- HU, H.-Y.; GOTO N. und FUJIE, K. (2001): Effect of pH on the reduction of nitrite in water by metallic iron. *Water Research*, Volume 35, Issue 11, August 2001, Pages 2789-2793.
- KITAOKA, S. und NAKANO, Y. (1969): Colorimetric Determination of  $\omega$ -Amino Acids. *The Journal of Biochemistry*, Volume 66, Issue 1, July 1969, Pages 87-94.
- KROM, M. D. (1980): Spectrophotometric Determination of Ammonia: A Study of Modified Berthelot Reaction Using Salicylate and Dichloroisocyanurate. *The Analyst*, Vol. 105 No. 1249.
- LIMOUSY, L.; DUTOURNIE P. und HADJIEV, D. (2010): Kinetics of Nitrite Reduction by Zinc Metal: Influence of Metal Shape on the Determination of Kinetic Parameters. *Water Environment Research*, Volume 82, Number 7.
- LOPES, D. V.; SILLIANPÄÄ, M. und WOLKERSDORFER, C. (2016): Nitrate reduction in real mine water using zero-valent iron (ZVI) and iron waste. *Proceedings IMWA 2016, Freiberg/Germany*. Drebenstedt, Carsten, Paul, Michael (eds.). *Mining Meets Water – Conflicts and Solutions*.
- MURRAY, E., NESTERENKO, E. P., MCCAUL, M., MORRIN, A., DIAMOND, D. und MOORE, B. (2017). A colorimetric method for use within portable test kits for nitrate determination in various water matrices. *Analytical methods*, 9(4), 680-687.
- VDLUFA (2016): *VDLUFA-Methodenbuch*. Band 1 Die Untersuchung von Böden. VDLUFA-Verlag Darmstadt.
- YANG, G. C. C. und LEE H.-L. (2005): Chemical reduction of nitrate by nanosized iron: kinetics and pathways. *Water Research* 39 (2005) 884-894.

# 9 Anhang

## 9.1 Poster auf der 55. Jahrestagung der Deutschen Gartenbauwissenschaftlichen Gesellschaft (DGG) in Osnabrück (03/23)

**WEIHENSTEPHAN - TRIESDORF**  
University of Applied Sciences

Hochschule Weihenstephan-Triesdorf  
Am Staudengarten 14 | 85354 Freising

### NPhone - Spektralphotometrische $N_{min}$ -Bestimmung mit dem Smartphone

Lukas Czech, Jan Glaubke, Dieter Lohr, Elke Meinken  
lukas.czech@hswt.de

#### Hintergrund

- Regionen mit intensivem Gemüsebau sind Hotspots bezüglich der Nitratbelastung des Grundwassers
- Reduktion der Nitratauswaschung durch konsequente Anwendung des kulturbegleitenden  $N_{min}$ -Sollwert-Systems
- ABER:** Notwendigkeit regelmäßiger  $N_{min}$ -Analysen
  - Laboranalysen sind sehr zeit- und arbeitsaufwendig
  - Schnelltests sind nur bedingt als Alternative geeignet, da
    - > die Genauigkeit z. T. nicht ausreichend ist
    - > nur der Nitrat-N-Anteil erfasst wird
    - > ein Handphotometer zur Auswertung notwendig ist

→ **Bedarf für ein einfaches, genaues und zuverlässiges Vor-Ort-Verfahren**

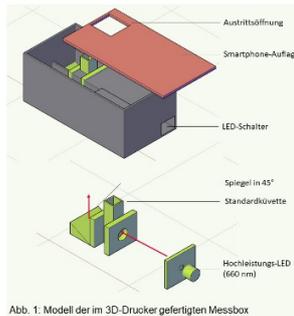


Abb. 1: Modell der im 3D-Drucker gefertigten Messbox

#### Fazit

- Smartphone-basierte  $N_{min}$ -Bestimmung ist ein vielversprechendes Verfahren für den intensiven Gemüsebau**
- Erfassung von Nitrat- und Ammonium-N
- Bestimmung ist einfach, robust und genau
  - Anwender sind den Umgang mit dem Smartphone gewohnt
  - detaillierte Nutzerführung über eine App
  - keine Verwendung giftiger oder gefährlicher Reagenzien und einfache Dosierung
- App bietet Vielzahl von Erweiterungsmöglichkeiten (z. B. Dokumentation von Düngemaßnahmen, Georeferenzierung)



Abb. 2: Schematischer Ablauf des Smartphone-basierten Vor-Ort-Verfahrens zur  $N_{min}$ -Bestimmung

Material und Methoden	Ergebnisse	Diskussion
<p><b>1. Reduktion von <math>NO_3</math> zu <math>NH_4</math> mittels Zn-Pulver</b></p> <p><b>Arbeitsschritte</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Entnahme eines Aliquotes des filtrierten Extrakts mittels Spritze</li> <li>Ansäuerung des Aliquotes mit verdünnter HCl mittels Spritze</li> <li>Zugabe von Zink-Pulver (&lt; 10 <math>\mu m</math>) mittels Mikrolöffel</li> <li>Wartezeit 5 Minuten</li> </ul> <p><b>Auswertung</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Neutralisation der Aliquote mit NaOH</li> <li><math>NH_4</math>- und <math>NO_3</math>-N-Bestimmung mit Continuous-Flow-Analyzer</li> </ul>	<p>Abb. 3: Reduktionsleistung bei Bodenextrakten und Standards (n = 50)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Durchführung der Reaktion ohne besondere Schutzmaßnahmen im Reagenzglas (kein Aufschäumen oder Erhitzen)</li> <li>Reduktionsleistung stabil bei etwa 75 %</li> <li>nicht wiedergefundenes Nitrat entweicht gasförmig</li> </ul> <p>→ <b>Ausbeute und Wiederholbarkeit der <math>NO_3</math>-Reduktion mit Zn ausreichend</b></p> <p>→ <b>ABER:</b> Bestimmung von <math>NH_4</math>- und <math>NO_3</math>-N mit getrennten Aliquoten notwendig</p>
<p><b>1. Reduktion von <math>NO_3</math> zu <math>NH_4</math> mittels Zn-Pulver</b></p> <p><b>2. Anfärbung (Berthelot-Reaktion)</b></p> <p><b>Arbeitsschritte</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Entnahme von Teilmengen der angesäuerten Aliquote (mit bzw. ohne Zn-Zugabe), Alkalisierung mit verdünnter NaOH</li> <li>Zugabe von Isocyanursäure als <math>Cl_2</math>-Quelle und Citratpuffer</li> <li>Zugabe von Na-Nitroprussid (Katalysator) und Na-Salicylat (Farbreagenz) mit NaCl als Füllstoff</li> <li>Wartezeit 15 Minuten</li> <li>Dosierung von Lösungen und Reagenzien mittels Glas-spritze (10 ml) und Mikrolöffel</li> </ul> <p><b>Auswertung</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><math>NH_4</math>-N-Bestimmung am Laborspektralphotometer</li> <li>Referenzmessung mittels Continuous-Flow-Analyzer</li> </ul>	<p>Abb. 4: Relative Abweichung zwischen Labormethode und Handanfärbung (n = 50)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>gute Übereinstimmung zwischen der Handanfärbung und der Labormethode (CFA)                     <ul style="list-style-type: none"> <li>bei höheren <math>N_{min}</math>-Gehalten (&gt; 50 kg/ha) bei der Handanfärbung systematisch etwas geringere Werte als bei der Labormethode</li> <li>mittlere relative Abweichung bei Werten über 15 kg N/ha bei &lt; 20 % (<math>\approx</math> untere Grenze der Vergleichbarkeit nach VDLUFA)</li> <li>Arbeitsbereich der Methode ab 30 kg N/ha</li> <li>mittlere Abweichung über alle Proben circa 8,5 kg N/ha</li> </ul> </li> </ul> <p>→ <b>Handanfärbung bietet eine für die Praxis ausreichende Genauigkeit</b></p>
<p><b>1. Reduktion von <math>NO_3</math> zu <math>NH_4</math> mittels Zn-Pulver</b></p> <p><b>2. Anfärbung (Berthelot-Reaktion)</b></p> <p><b>3. Auswertung mittels Smartphone</b></p> <p><b>Arbeitsschritte</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Einstellen der 10 mm Standardküvette mit der angefärbten Probe in den Strahlengang der 660 nm Hochleistungs-LED</li> <li>Verschließen der Messbox und Auflegen des Smartphones (Objektiv der Rückkamera über der Austrittsöffnung)</li> <li>iterativer Algorithmus zur Einstellung der Belichtung</li> <li>Aufnahme eines Bildes mit der gewählten Belichtungseinstellung und Erfassung des R-Wertes</li> </ul> <p><b>Auswertung</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>wiederholte Messung von <math>NH_4</math>-Standardlösungen (Handanfärbung plus Ansäuerung)</li> </ul>	<p>Abb. 5: Wiederholte Messung von <math>NH_4</math>-Standardlösungen mit unabhängigen Kalibrationen (Standards: 0, 12,5, 25 mg N/l) und Farbspektrum der zwei Arbeitsbereiche (n = 5; Fehlerbalken = Standardfehler)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>enger linearer Zusammenhang zwischen R-Wert und <math>NH_4</math>-N-Konzentration                     <ul style="list-style-type: none"> <li>zwei überlappende 2-Punkt-Kalibrationen: 0 bis 15 bzw. 10 bis 25 mg <math>NH_4</math>-N/l mit drei Standards (0, 12,5 und 25 mg N/l)</li> <li>Kombination mit iterativem Algorithmus zur Einstellung der Belichtung</li> <li>Arbeitsbereich bei Standardbedingungen bis knapp 300 kg N/ha</li> </ul> </li> <li>hohe Wiederholbarkeit und Präzision</li> </ul> <p>→ <b>Smartphone-basierte Auswertung ist ein praxistauglicher Ansatz</b></p>

Diese Arbeit erfolgte im Rahmen des von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) geförderten Projekts „NPhone: Nutzung von Smartphones zur spektralphotometrischen Vor-Ort-Bestimmung des Mineralstickstoffs im Boden ( $N_{min}$ ) als Basis einer optimierten Stickstoffdüngung im intensiven Feldgemüsebau“ in Zusammenarbeit mit der Step Systems GmbH



## 9.2 Poster auf dem 134. VDLUFA-Kongress in Freising (09/23)

### Volumendefinierte Entnahme von Bodenproben für die $N_{min}$ -Bestimmung

Lukas Czech, Dieter Lohr, Elke Meinken  
lukas.czech@hswt.de

#### Hintergrund

Ein wesentlicher Teilaspekt bei der  $N_{min}$ -Bestimmung ist die Umrechnung des gewichtsbezogenen Messwertes mittels der Lagerungsdichte des Bodens auf den flächenbezogenen  $N_{min}$ -Gehalt. In der Praxis wird hierbei in der Regel mit Schätzwerten gearbeitet, da die Bestimmung der Lagerungsdichte mittels Stechzylindern sehr arbeitsaufwendig ist (VDLUFA-Methodenbuch Band I; Methode A 1.2.5). Für landwirtschaftliche Böden mit einem geringen Anteil an organischer Substanz (< 4 %) werden mit diesen Schätzwerten zuverlässige flächenbezogene  $N_{min}$ -Gehalte errechnet. Schwierig wird es bei Böden mit höheren Gehalten an organischer Substanz, z. B. auf Niedermoorstandorten oder auch im intensiven Feldgemüseanbau. Solche Böden haben eine deutlich geringere Lagerungsdichte, wodurch es bei der Anwendung von Schätzwerten zu einer Überschätzung der  $N_{min}$ -Gehalte um bis zum Fünffachen kommt.

#### Zielsetzung

Entwicklung eines Probenahmewerkzeuges, das insbesondere auf Böden mit einer geringen Lagerungsdichte die Entnahme volumendefinierter Bodenproben für die  $N_{min}$ -Bestimmung ermöglicht, um den Fehler bei der Umrechnung auf den Flächenbezug zu reduzieren.

#### Material und Methoden

- **Referenzverfahren:** Entnahme ungestörter Bodenproben mit dem Stechzylinder (VDLUFA-Methodenbuch Band I; Methode A 1.2.5)
- **Bohrstockprototyp für volumendefinierte Probenahme:** Nach unten verjüngtes Rohr mit Außengewinde und aufsteckbarem Adapterkopf; Antrieb mittels eines Akkuschlagschraubers (Abb. 1)
- **Testflächen:** 15 Schläge an 7 Standorten in Südbayern (Abb. 2)
- **Vorgehen:** Parallele Beprobung der Bodenschicht 0-30 cm mit Stechzylinder (n = 3) und Bohrstock (n = 9);
- **Auswertung:** Lagerungsdichte frisch und trocken mittels Stechzylinder; Regression zwischen dem Gewicht der mit dem Bohrstockprototyp entnommenen Proben und der Lagerungsdichte frisch



Abb. 1: Bohrstockprototyp mit dem aufsteckbaren Adapterkopf für Schlagschrauber



Abb. 2: Probenahmestandorte (1 bis 3 Schläge je Standort) (Quelle d-maps)

#### Ergebnisse und Diskussion

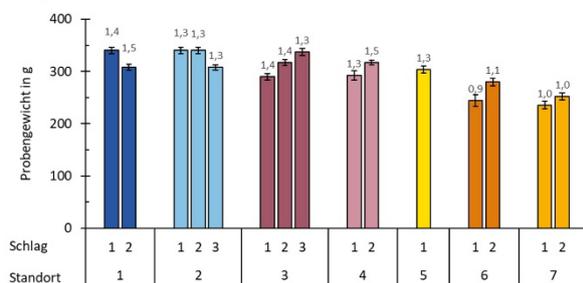


Abb. 3: Gewichte (frisch) der mittels Bohrstockprototyp auf den 15 Schlägen entnommenen Einzelproben (Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (n = 9); Zahlen oberhalb der Säulen = Lagerungsdichte trocken mittels Stechzylinder in kg/l)

- Nur sehr geringe Schwankungen beim Gewicht der entnommenen Einzelproben (mittlere relative Standardabweichung 2,2 %) unabhängig vom Standort bzw. Schlag (Abb. 3)
- Einfache und schnelle Entleerung des Bohrstockprototyps durch die konische Form auch bei bindigen bzw. nassen Böden
- Ein- und Ausdrehen des Bohrstocks bei sandigen oder humosen Böden einfach, bei lehmig-tonigen Böden allerdings sehr zeit- und kraftaufwendig und mit hoher Materialbeanspruchung verbunden  
→ Eignung des Bohrstockprototyps vor allem für Böden mit einer Lagerungsdichte trocken < 1.000 g/l

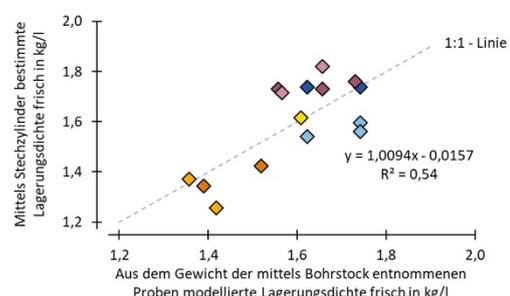


Abb. 4: Gegenüberstellung der Lagerungsdichten frisch; bestimmt mittels Stechzylinder und modelliert aus den Gewichten der mittels des Bohrstockprototyps entnommenen Proben

- Lagerungsdichte frisch lässt sich aus dem Gewicht der mittels Bohrstockprototyp entnommenen Probe mit einer mittleren Abweichung von 0,18 kg/l gut modellieren (Abb. 4)
- theoretisches ( $\emptyset$ -Bohrstocköffnung  $\times$  Beprobungtiefe) und ermitteltes (Probengewicht  $\div$  Stechzylinder-Lagerungsdichte frisch) Probenvolumen stimmen überein: 183 ml zu 188 ml  
→ Überschätzung bei Umrechnung auf flächenbezogenen  $N_{min}$ -Gehalt bei Böden mit einer Lagerungsdichte trocken < 1.000 g/l durch volumendefinierte Probenahme im Vergleich zu geschätzten Lagerungsdichten deutlich reduziert

#### Fazit

Der neu entwickelte Bohrstock ist auf Böden mit hohen Gehalten an organischer Substanz eine vielversprechende Alternative gegenüber der fehleranfälligen Verwendung von geschätzten Lagerungsdichten bzw. dem hohen Zeitaufwand für die Entnahme von Stechzylinderproben. Zudem wird bei Stechzylindern in der Regel nur eine 5 cm hohe Teilschicht beprobt, während der Bohrstock die gesamte Bodenschicht erfasst. So können vertikale Inhomogenitäten innerhalb der Bodenschicht besser abgebildet werden. Eine Schwierigkeit bei humusreichen Böden bleibt allerdings die Berücksichtigung des aktuellen Wassergehalts bei der Umrechnung auf den flächenbezogenen  $N_{min}$ -Gehalt.



Diese Arbeit erfolgte im Rahmen des von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) geförderten Projekts „NPhone: Nutzung von Smartphones zur spektralphotometrischen Vor-Ort-Bestimmung des Mineralstickstoffs im Boden ( $N_{min}$ ) als Basis einer optimierten Stickstoffdüngung im intensiven Feldgemüseanbau“ in Zusammenarbeit mit der Step Systems GmbH



### 9.3 Literaturrecherche zur spektralphotometrischen Bestimmung von Ammonium- und Nitratstickstoff

- BACHHAUSEN, P.; BUCHHOLZ, N. und HARTKAMP, H. (1985): Bestimmung von Nitrat in Gewässern mit Hilfe von Chromotropsäure. Springer-Verlag, Fresenius Z Anal Chem (1985) 320: 490-493.
- BARTZATT, R. und DONIGAN, L. (2004): The colorimetric determination of nitrate anion in aqueous and solid samples utilizing an aromatic derivative in acidic solvent. Toxicological and Environmental Chemistry 86 (1 - 4): 73 - 83.
- BENESCH, R. und MANGELSDORF, P. (1972): Eine Methode zur colorimetrischen Bestimmung von Ammoniak in Meerwasser. Helgoländer wiss. Meeresunters. 23, 365-375 (1972).
- BLINN, R. C. und GUNTHER, F. A. (1957): Determination of Ammonia with Cupric Carbonate. Analytical Chemistry, Vol. 29, No. 12, Dember 1957, S. 1882-1883.
- BOWER, C. E. und HOLM-HANSEN, T. (1980): A Salicylate-Hypochlorite Method for Determining Ammonia in Seawater. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1980, 37(5): 794-798, <https://doi.org/10.1139/f80-106>
- CHAMOT, E. M.; PRATT, D. S. und REDFIELD, H. W. (1910): A Study of the Phenolsulphonic Acid Method for the Determination of Nitrates in Water. [Second Paper.] The Composition of the Yellow Compound. Journal of the American Chemical Society 1911 33 (3), 381-384.
- CHENG, I. F.; MUFTIKIAN, R.; FERNANDO, Q. und KORTE, N. (1997): Reduction of nitrate to ammonia by zero-valent iron. Chemosphere Volume 35, Issue 11, December 1997, Pages 2689-2695.
- DAVÍDEK, J.; KLEIN, S. und ŽÁČKOVÁ, A. (1963): Colorimetrische Bestimmung von Nitrat und Nitrit in biologischem Material. Z Lebensm Unters Forch 119, 342-346.
- EPA (1971): Method 352.1: Nitrogen, Nitrate (Colorimetric, Brucine) by Spectrophotometer. United States Environmental Protection Agency.
- FADRUS, H. und MALÝ, J. (1969): Photometrische Bestimmung von Nitrat und Nitrit in Schwefelsäure mit Brucin. Z. Anal. Chem. 246, 239--241 (1969).
- FANNING, J. C. (2000): The chemical reduction of nitrate in aqueous solution. Coordination Chemistry Reviews, Volume 199, Issue 1, April 2000, Pages 159-179.
- FØYN, E. (1951): Nitrogen determinations in sea-water. Fiskeridir. Skr. Havundersøk., Vol. 9 (14).
- GEHRKE, C. W.; KILLINGLEY, J. S. und WALL, L. L. (1972): Missouri Automated Nitrogen Method (MANM) for Fertilizers. Journal of Association of Official Analytical Chemists, Volume 55, Issue 3, 1 May 1972, Pages 467-480.
- GEISLER, C.; STEINHÖFEL, O. und ULBRICH, M. (1991): Zum Nitratgehalt in der Milch, Archiv für Tierernährung, 41:6, 649-656.
- GHARINI, P. P. R. (2004): Etablierung einer sensitiven Nitratanalyse zur vollständigen Charakterisierung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels in vitro und in vivo. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Medizinischen Fakultät.
- GRIEB, P. (1879): Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt "Über einige Azoverbindungen". S. 426-428.
- HAHN, F. L. und JAEGER, G. (1925): Eine höchst empfindliche und durchaus spezifische Reaktion auf Nitrat. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A und B Series), Volume 58, Issue 10, S. 2335-2340.
- HASHMI, M. H.; AJMAL, A. I. und RASHID, A. (1968): Spectrophotometric Determination of Nitrogen in Small Quantities of Biological Materials. Mikrochimica Acta [Wien] 1968, S. 860-865.
- Howell, J. H. und Boltz, D. F. (1964): Indirect Spectrophotometric Determination of Ammonia. Analytical Chemistry, Vol. 36, No. 9, August 1964, S. 1799-1802.
- HU, H.-Y.; GOTO N. und FUJIE, K. (2001): Effect of ph on the reduction of nitrite in water by metallic iron. Water Research, Volume 35, Issue 11, August 2001, Pages 2789-2793.

- HUBBLE, D. S. und HARPER, D. M. (2000): A revised method for nitrate analysis at low concentrations. *Water Research* 34 (9): 2598 – 2600.
- IRANDOUST, M.; SHARIATI-RAD, M. und HAGHIGHI, M. (2013): Nitrite determination in water samples based on a modified Griess reaction and central composite design. *Anal. Methods*, 2013, 5, 5977–5982.
- JUILFS, G. (1997): Spektralphotometrische Nitratbestimmung in natürlichen Gewässern. Diplomarbeit, 1997 Diplomica Verlag GmbH.
- KEMPERS, A.J. und KOK C.J. (1989): Re-examination of the determination of ammonium as the indophenol blue complex using salicylate. *Analytica Chimica Acta*, Volume 221, 1989, Pages 147-155.
- KEMPERS, A.J. und ZWEERS, A. (1986): Ammonium determination in soil extracts by the salicylate method. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 17:7, 715-723.
- KITAOKA, S. und NAKANO, Y. (1969): Colorimetric Determination of  $\omega$ -Amino Acids. *The Journal of Biochemistry*, Volume 66, Issue 1, July 1969, Pages 87–94.
- KOLTHOFF, I. M. und NOPONEN, G. E. (1933): Diphenylamine sulfonic acid as a reagent for the colorimetric determination of nitrates. *Journal of the American Chemical Society* 55 (4): 1448 – 1453.
- KROM, M. D. (1980): Spectrophotometric Determination of Ammonia: A Study of Modified Berthelot Reaction Using Salicylate and Dichloroisocyanurate. *The Analyst*, Vol. 105 No. 1249.
- LABY, R. H. und MORTON, T. C. (1966): Estimation of Nitrate by Nitration of 7-Hydroxy-4,8-dimethyl Coumarin. *Nature* April 16, 1966 Vol. 210, S. 298-299.
- LANGE, R.; FRIEBE, R. und LINOW, F. (1979): Zur Anwendung der Methodenkombination Kjeldahl-Aufschluß/Berthelot-Reaktion bei der Stickstoffbestimmung in biologischen Materialien. 1. Mitt. Stand der Kenntnisse - Teil II. *Die Nahrung* 23, 4, 1979, 431-439.
- LIMOUSY, L.; DUTOURNIE P. und HADJIEV, D. (2010): Kinetics of Nitrite Reduction by Zinc Metal: Influence of Metal Shape on the Determination of Kinetic Parameters. *Water Environment Research*, Volume 82, Number 7.
- LOPES, D. V.; SILLIANPÄÄ, M. und WOLKERSDORFER, C. (2016): Nitrate reduction in real mine water using zero-valent iron (ZVI) and iron waste. *Proceedings IMWA 2016, Freiberg/Germany*. Drebenstedt, Carsten, Paul, Michael (eds.). *Mining Meets Water – Conflicts and Solutions*.
- LÜHR, W. (1933): Über die colorimetrischen Verfahren zur Nitratbestimmung im Wasser. *Zeitschr. f. Untersuchung der Lebensmittel* 66, 544–556 (1933).
- MADSEN, B. C. (1981): Utilization of flow injection with hydrazine reduction and photometric detection for the determination of nitrate in rain-water. *Analytica Chimica Acta* 124 (2): 437 – 441.
- MARGESON, J. H.; SUGGS, J. C. und MIDGETT, M. R. (1980): Reduction of nitrate to nitrite with cadmium. *American Chemical Society, Anal. Chem.* 1980, 52, 1955-1957.
- MIR, S. A. (2007): An Improved Zinc Reduction Method for Direct Determination of Nitrate in Presence of Nitrite. *Asian Journal of Chemistry*, Vol. 19, No. 7 (2007), 5703-5710.
- MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G. und WINK, D. A. (2001): A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 2001;5(1):62-71.
- MOLINER-MARTINEZ Y.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R. und CAMPÍNS-FALCÓ P. (2005): Improved detection limit for ammonium/ammonia achieved by Berthelot's reaction by use of solid-phase extraction coupled to diffuse reflectance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 534 (2005) 327–334.
- MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J. und COMPTON, R. G. (2001): Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta* 54 (2001) 785–803.
- MORRIS, M. P. und GONZALES-MAS, A. (1958): Simple Colorimetric Method for the Determination of Nitrates in Forage Crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1958 6 (6), 456-457.

- MURRAY, E.; NESTERENKO, E. P.; MCCAUL, M.; MORRIN, A.; DIAMOND, D. und MOORE, B. (2017): A colorimetric method for use within portable test kits for nitrate determination in various water matrices. *Analytical methods*, 9, 680-687. doi: 10.1039/c6ay03190k
- NEßLER, J. (1856): Über das Verhalten des Jodquecksilbers und der Quecksilberverbindungen überhaupt zu Ammoniak und über eine neue Reaction auf Ammoniak. Inauguraldissertation. Universitätsbuchdruckerei von Hermann Meinhard Poppen, Freiburg i. Br. 1856.
- NYDAHL, F. (1976): On the optimum conditions for the reduction of nitrate to nitrite by cadmium. *Talanta*, 23(5), 349-357.
- PAPPENHAGEN, J. M. (1958): Colorimetric Determination of Nitrates. *Analytical Chemistry*, Vol. 30, No. 2, February 1958, S. 282-284.
- PASQUALI, C. E. L.; GALLEGRO-PICÓ, A.; HERNANDO, P. F.; VELASCO, M. und DURAND ALEGRÍA, J.S. (2009): Two rapid and sensitive automated methods for the determination of nitrite and nitrate in soil samples." *Microchemical Journal* 94 (1): 79 – 82.
- PASQUALI, C. E. L.; HERNANDO, P. F. und DURAND ALEGRÍA, J.S. (2007): Spectrophotometric simultaneous determination of nitrite, nitrate and ammonium in soils by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta* 600 (1 – 2 SPEC. ISS.): 177 – 182.
- PATTON, C. J., und KRYSKALLA, J. R. (2011): Colorimetric determination of nitrate plus nitrite in water by enzymatic reduction, automated discrete analyzer methods. *US Geological Survey Techniques and Methods*, 34.
- PFEILSTICKER, K. (1932): Die colorimetrische Nitratbestimmung mit Diphenylamin oder Diphenylbenzidin. *Zeitschrift für Analytische Chemie* 89 (1 – 2): 1 – 8.
- PINTO, P. C., LIMA, J. L., und MFS SARAIVA, M. L. (2005): An enzymatic flow analysis methodology for the determination of nitrates and nitrites in waters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 85(1), 29-40.
- PONS, C.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; FORTEZA, R. und CERDÀ, V. (2008): Multi-pumping flow system for the determination of nitrite and nitrate in water samples. *Microchimica Acta* 161 (1 – 2): 73 – 79.
- PROCHÁZKOVÁ, L. (1959): Bestimmung der Nitrate im Wasser. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* Volume 167, S. 254–260.
- PROCHÁZKOVÁ, L. (1964): Spectrophotometric Determination of Ammonia as Rubazoic Acid with Bispyrazolone Reagent. *Analytical Chemistry*, Vol. 36, No. 4, April 1964, S. 865-871.
- RELIMPIO, A. M., GUERRERO, M. G., PANEQUE, A., und LOSADA, M. (1972): Determination of nitrate with nitrate reductase from spinach leaves. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 66(3), 290-293.
- RIDNOUR, L. A.; SIM, J. E.; HAYWARD, M. A.; WINK, D. A.; MARTIN, S. M.; BUETTNER, G. R. und SPITZ, D. R. (2000): A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media. *Analytical Biochemistry* 281 (2): 223 – 229.
- RIEHM, H. (1930): Systematische Untersuchung der Reaktion von Diphenylamin-Schwefelsäure mit Nitraten in Gegenwart von Chloriden unter besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendung zur Bestimmung der Nitrate im Ackerboden. *Fresenius, Zeitschrift f. anal. Chemie* 81, 353–377.
- RÖHL, K.; SCHÖNHERR, S. und SCHRADER, R. (1978): Bestimmung kleiner Nitrit- und Nitratkonzentrationen in wässrigen Ammoniaklösungen. *Pergamon Press Ltd. Talanta*, Vol. 25, pp. 535-538.
- SAWICKI, C. R. (1971): Fluorimetric Determination of Nitrate, *Analytical Letters*, 4:11, 761-775.
- SAWICKI, E.; JOHNSON, H. und STANLEY, T. W. (1963): Determination of Nitrate or Nitrate Plus Nitrite with 1-Aminopyrene. Application to Air Pollution. *Analytical Chemistry*, Vol. 35, No. 12, November 1963, S. 1934-1936.
- SCHEINER, D. (1976): Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method. *Water Research* Volume 10, Issue 1, 1976, Pages 31-36.

- SEARLE, P. L. (1984): The Berthelot or Indophenol Reaction and Its Use in the Analytical Chemistry of Nitrogen. *Analyst*, May 1984, Vol. 109.
- SIMS, G. K. ELLSWORTH, T. R. und MULVANEY, R. L. (1995): Microscale determination of inorganic nitrogen in water and soil extracts. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 26:1-2, 303-316, DOI: 10.1080/00103629509369298.
- SKUJINS, J. J. (1964): Spectrophotometric Determination of Nitrate with 4-Methylumbelliferone. *Analytical Chemistry*, Vol. 36, No. 1, January 1964, S. 240-241.
- SNELL, F. D. (1981): *Photometric and Fluorometric Methods of Analysis: Nonmetals*. Wiley-Blackwell; 2 Part Set edition.
- THOMAS, O. und GALLOT, S. (1990): Ultraviolet multiwavelength absorptiometry (UVMA) for the examination of natural waters and wastewaters. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* volume 338, pages 234–237.
- THOMAS, O.; GALLOT, S. und MAZAS, N. (1990): Ultraviolet multiwavelength absorptiometry (UVMA) for the examination of natural waters and wastewaters. Part II. Determination of nitrate. *Fresenius J Anal Chem* (1990) 338: 238-240.
- TU, X.; XIAO, B.; XIONG, J. und CHEN, X. (2010): A simple miniaturised photometrical method for rapid determination of nitrate and nitrite in freshwater. *Talanta* 82 (3): 976 – 983.
- VERDOUW, H.; VAN ECHTELD, C. J. A. und DEKKERS, E. M. J. (1977): Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, Volume 12, Issue 6, 1978, Pages 399-402.
- WERR, F. (1937): Eine Xylenolmethode zum qualitativen Nitratsnachweis. *Mitteilungen aus dem Forschungsinstitut Klein-Wanzleben, Zuckerfabrik Klein-Wanzleben, vorm. Rabbethge & Giesecke A. G.*
- WESTLAND, A. D. und LANGFORD, R. R. (1956): Determination of Nitrate in Fresh Water Concentration of Samples by an Ion Exchange Procedure. *Analytical Chemistry*, Vol. 28, No. 12, December 1956, S. 1996-1998.
- WILLIS, R. B.; MONTGOMERY, M. E. und ALLEN, P. R. (1996): Improved Method for Manual, Colorimetric Determination of Total Kjeldahl Nitrogen Using Salicylate. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 7, 1804-1807.
- WILLIS, R. B.; SCHWAB, G. J. und GENTRY, C. E. (1993): Elimination of interferences in the colorimetric analysis of ammonium in water and soil extracts. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 24:9-10, 1009-1019, DOI: 10.1080/00103629309368857.
- YAMAMOTO, Y.; UCHIKAWA, S. und AKABORI, K. (1964): A New Colorimetric Determination of Nitrate Ions by Solvent Extraction with Crystal Violet. *Short Communications*, 1964, Vol.37, No.11, S. 1718-1719.
- YANG, G. C. C. und LEE H.-L. (2005): Chemical reduction of nitrate by nanosized iron: kinetics and pathways. *Water Research* 39 (2005) 884–894.
- ZIMMERMANN, K. und LENGERKEN, J. v. (1979): Zur Nitrat- und Nitritanalytik in Futtermitteln 3. Mitt. Spektrophotometrische Bestimmung von Nitrat und Nitrit mit Sulfanilsäure/1-Naphthylamin sowie Nitrit mit Resorcin/Zirkonium(IV)-oxidchlorid. *Die Nahrung* 23, 9/10, 1979. 929-934.
- ZITOMER, F. und LAMBERT, J. L. (1962): Spectrophotometric Determination of Ammonia as Trichloramine. *Analytical Chemistry*, Vol. 34, No. 13, December 1962, S. 1738-1740.