

3. Probenvorbereitung

3.5 Homogenisierung

Dana Zimmer, Rhena Schumann, Sebastian Marcus Strauch, Theresa Zicker, Maximilian Berthold, Michael Oster

Umweltproben sind oftmals in sich sehr heterogen, sodass ohne Homogenisierung insbesondere bei kleinen Einwaagen die Wiederholungen für die P-Bestimmung eine sehr hohe relative Standardabweichung hätten. Dies gilt insbesondere für **Suspension, feste pflanzliche** oder **mineralische Proben** sowie **tierische Gewebeproben**. In vielen Fällen ist eine mehrstufige Homogenisierung notwendig.

3.5.1 Homogenisierung von Suspensionen

Da **Suspensionen** keine echten Lösungen sind, kommt es in Abhängigkeit von der Standzeit zum Absetzen der festen Partikel, also zu einer gewissen Trennung von Fest- und Flüssigphase. Beispiele für Suspensionen sind Güllen, Gärreste, Jauchen und Klärschlämme. Sollen der Aufschluss und die P-Bestimmung an der Frischmasse erfolgen (nicht empfehlenswert), muss die Probe entsprechend durch starkes Rühren gut durchmischt werden; dies sollte vor der Entnahme jeder Teilprobe erfolgen. Parallel, neben den Proben für die P-Bestimmung, müssen Teilproben zur Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes (TS-%) entnommen werden. Ist die Heterogenität einer Probe zu hoch, z. B. durch das Vorliegen von unzersetzten, sperrigen Pflanzenresten, kann die Probe auf keinen Fall als Frischmasse aufgeschlossen werden. Die Probe muss getrocknet und weiter aufbereitet werden. Es sind unterschiedliche Möglichkeiten der Aufbereitung/Homogenisierung denkbar. Die Auswahl erfolgt nach der Fragestellung und den Eigenschaften der Suspension (z. B. TS-%). Nach der Trocknung der Suspensionen kann die Probe, wenn nötig, wie ein Feststoff (3.5.2 Homogenisierung von Feststoffen) weiterbehandelt werden. Hat die Probe einen hohen Anteil an organischer Substanz, kann zur Homogenisierung auch eine Veraschung der Probe in Erwägung gezogen werden (Kapitel 3.3).

(a) Weitestgehende Trennung der Fest- und Flüssigphase der Suspension

Insbesondere bei Suspensionen wie Gällen und Gärresten, die zur Düngung eingesetzt werden sollen, kann es sein, dass sich die Frage nach der Verteilung der Nährstoffe zwischen der Fest- und der Flüssigphase stellt. Dann muss vor der Trocknung zwingend eine Trennung der Fest- und der Flüssigphase erfolgen.

Diese Trennung kann **(a.1)** durch Stehenlassen und **schwerkraftbedingte Sedimentation** der Feststoffe erfolgen. Hier ist aber mit langen Wartezeiten und einer nur sehr unvollständigen Trennung zu rechnen. Außerdem kommt es aufgrund der langen Wartezeit zu evtl. unerwünschten mikrobiellen Umsetzungen. Nach der Trennung sind die Fest- und die Flüssigphase getrennt weiter zu behandeln. Diese Methode ist aufgrund der nur unvollständigen Trennung und des Zeitaufwandes aber nicht empfehlenswert.

Die zweite Möglichkeit der Trennung besteht in **(a.2)** der Trennung mittels z. B. **Pressschneckenseparator** (Mönicke et al. 1978). Diese Trennung wird vor allem im professionellen landwirtschaftlichen Bereich für entsprechend große Probenmengen angewendet. Die Fest- und die Flüssigphase können anschließend getrennt landwirtschaftlich verwertet werden. Die Festphase hat nach Separation mittels Pressschneckenseparator einen TS-% von 18 bis 25 % und die Flüssigphase von 3 bis 7 % (Burgstaler et al. 2017). Bei Gärresten erfolgt in der Festphase eine „Anreicherung“ des P gegenüber der Flüssigphase (Bachmann et al. 2015). Die Festphase hat eine Konsistenz in etwa der von gekaufter Blumenerde oder Torf und muss „nur noch“ getrocknet und ggf. gemahlen oder verascht werden. Die Flüssigphase ist noch eine Suspension, in der sich Feststoffe absetzen können. Sie wird für die Analyse entsprechend gut durchmischt als feuchte Suspension, also Frischmasse, aufgeschlossen (entsprechende parallele Bestimmung des TS-%) oder es muss im Vorfeld eine Trocknung erfolgen (Punkte b und c).

Die Trennung der Fest- und Flüssigphase kann auch **(a.3)** durch **Zentrifugation** erfolgen. Für eine repräsentative Probe sollten größere Probenmengen zentrifugiert werden. Dies geht wesentlich schneller als die schwerkraftbedingte Sedimentation und die Trennung ist auch vollständiger als mit einem Pressschneckenseparator. In den Laboren der Bodenkunde (AUF) können mit der vorhandenen Zentrifuge (Heraeus Multifuge 3 SR+ Centrifuge, Thermo Scientific) pro Gefäß bis zu 750 ml Probenmaterial zentrifugiert werden. Von diesen 750 ml-Zentrifugenbechern fasst die Zentrifuge pro Durchgang vier Gefäße. Alternativ stehen Adapter (4 pro Rotor) für die Befüllung mit 12 x 15 ml Zentrifugenröhrchen (48 pro Rotor), 5 x 50 ml Zentrifugenröhrchen (20 pro Rotor),

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

und 2 x 100 ml Zentrifugenröhrchen (8 pro Rotor) zur Verfügung. Weitere Adapter für Mikrotiterplatten o. ä. stehen nicht zur Verfügung. Es handelt sich um eine Zentrifuge mit Ausschwingrotor mit einer maximalen Zentrifugalbeschleunigung von 4500 x g; außerdem kann für die Zentrifuge eine Kühlung ($\leq -9\text{ °C}$) eingestellt werden. Im Fall einer ungleichmäßigen Beladung stoppt die Zentrifuge durch die Unwuchterkennung automatisch. Die Beschleunigung und das Abbremsen können separat eingestellt werden. Nach der Zentrifugation muss der Überstand vorsichtig dekantiert oder mit einer Spritze abgesaugt werden. Liegen die Fest- und Flüssigphase nach der Zentrifugation entsprechend getrennt vor, wird die Festphase vollständig getrocknet (siehe unter Punkt b und c). Für die Flüssigphase muss individuell entschieden werden, ob eine Trocknung erfolgen oder ob sie als Frischmasse aufgeschlossen werden soll.

Eine Trennung der Phasen kann auch **(a.4)** durch **Filtration** erfolgen. Durch die Filtration kann nach entsprechender Auswahl der Filter die vollständigste Trennung zwischen Fest- und Flüssigphase erreicht werden. Eine direkte Filtration der Suspension ist nur bei sehr hohen Flüssigkeitsanteilen empfehlenswert, da ansonsten durch den Aufbau eines Filterkuchens die Filter entsprechend schnell verstopfen. Eine vorgeschaltete Zentrifugation ist daher empfehlenswert. Es ist darauf zu achten, dass solche Filter ausgewählt werden, von denen der Filterkuchen entsprechend gut abgetrennt werden kann. Vor der Filtration ist die Masse des Filters zu bestimmen. Dann kann nach der Filtration der Filter inklusive Filterkuchen getrocknet und ausgewogen werden. Der getrocknete Filterkuchen wird dann vorsichtig abgebürstet.

(b) Trocknung der Probe im Trockenschrank

Erfolgte keine Trennung der Suspension in Fest- und Flüssigphase, wird empfohlen, die Suspension idealerweise vollständig oder evtl. eine größere Teilprobe (dann so gut wie möglich durchgerührt) zu trocknen. Erfolgte im Vorfeld eine Abtrennung der Festphase, sollte diese vollständig getrocknet werden. Für die Flüssigphase muss individuell entschieden werden, ob eine Trocknung vor dem Aufschluss erfolgt oder ob die Flüssigphase im feuchten Zustand aufgeschlossen wird. Es wird für alle Proben die Einwaage und die Auswaage nach Trocknung notiert (Leergewicht des Gefäßes beachten), um so den TS-% zu bestimmen. Die Trocknung erfolgt idealerweise in flachen Schalen im (nach Möglichkeit umluftbetriebenen) Trockenschrank. Mit Umluft erfolgt die Trocknung schneller als ohne. Die Temperatur wird in Abhängigkeit von der Fragestellung und den nachfolgenden Analysen ausgewählt. Soll nur eine Analyse der Gesamtelementkonzentrationen erfolgen, ist eine Temperatur von 60 °C zu empfehlen. Um ein Verkleben/„Verbacken“ der Probe zu verhindern, sollte während der Trocknung die Probe von Zeit zu Zeit umgerührt oder ggf. anderweitig per Hand zerbröseln werden. Werden Güllen, Gärreste

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

o. ä. getrocknet, kann es während der Trocknung zu entsprechender Geruchsbelästigung kommen. Bei derartig geruchsintensiven Proben ist eine Gefriertrocknung (c) zu empfehlen oder der Trockenschrank ist alternativ entsprechend separiert aufgestellt. Nach der Trocknung wird die Probe entweder gemörsert oder gemahlen (sh. dazu in Kapitel 3.5.2 Homogenisierung von Festproben). In den Professuren Bodenkunde, Bodenphysik und Pflanzenbau stehen mehrere Trockenschränke, z. T. mit Umluft zur Verfügung. Einer der Trockenschränke (mit Umluft) steht separiert im Keller.

(c) Gefriertrocknung

Ist eine Gefriertrocknungsanlage verfügbar, sollte bei sehr geruchsintensiven Proben oder bei anschließend sehr temperaturempfindlichen Analysen (z. B. wegen Probenveränderung durch mikrobielle Umsetzung) eine Gefriertrocknung statt einer Trocknung im Trockenschrank durchgeführt werden. Je nach Probenmenge und Gefriertrocknungsanlage werden die Proben beispielsweise in Zentrifugenröhrchen (z. B. 50, 100 oder 500 ml) gefüllt. Es wird für alle Proben die Einwaage (bzw. Probenvolumen) und die Auswaage nach Trocknung notiert (Leergewicht des Gefäßes beachten), um so den TS-% zu bestimmen. Die Gefäße werden mit einem mit Gummi befestigten Papier-Labortuch abgedeckt, ggf. in einen Halter gestellt und in der Gefriertruhe aufrecht eingefroren (-20 °C). Durch das Einfrieren nimmt das Volumen des Wassers zu, es ist daher ausreichend Platz im Gefäß einzuplanen. Sind die Proben vollständig durchgefroren, wird die Papierabdeckung der Gefäße entfernt und die Gefäße werden in die Gefriertrocknung gestellt. Die Gefriertrocknungsanlage darf nicht allein bedient werden. Vor der Bedienung ist eine detaillierte Einweisung durch einen erfahrenen Laboranten notwendig oder die Anlage wird durch den Laboranten bedient. In Abhängigkeit vom Probenvolumen kann die vollständige Trocknung allerdings bis zu einer Woche oder länger dauern. Nach vollständiger Trocknung liegt der Feststoff oft bereits als pulvrige Substanz vor. Je nach Zustand des Feststoffes kann dieser direkt für den Aufschluss verwendet werden oder wird weiter wie Torf (Kapitel 3.5.2) homogenisiert. Allerdings entfällt die Siebung auf < 2 mm. In der Professur Bodenkunde (AUF, Universität Rostock) befindet sich die Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 von Christ Gefriertrocknungsanlagen (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, <https://www.martinchrist.de/de/>). Der Eiskondensator hat eine maximale Kapazität von 4 kg und eine Temperatur von -85 °C; es können so auch lösungsmittelhaltige oder niedrig gefrierende Proben getrocknet werden.

3.5.2 Homogenisierung von Feststoffen

Feststoffe wie pflanzliches Material, Torfe, auf < 2 mm gesiebter Mineralboden und Sedimente sowie Biokohlen können ebenfalls sehr heterogen sein. Bei Pflanzen und Torfen entsteht die Heterogenität vor allem durch ihre Sperrigkeit und/oder das Vorliegen unterschiedlicher Gewebeteile, während bei Böden und Sedimenten die Heterogenität vor allem durch die Aggregatbildung und/oder dem Vorliegen unterschiedlich großer Einzelpartikel (v. a. Sande) entsteht.

Pflanzliches Material und Torfe

Pflanzliches Material wird nach der Trocknung in Mühlen gemahlen, evtl. ist ein schrittweises Vermahlen mit Grob- und Feinmühlen notwendig.

Krautige Pflanzen (oberirdische Biomasse und Wurzeln) und evtl. auch **Tang** u. ä. werden nach der Trocknung, wenn nötig und möglich, per Hand leicht zerbröseln und mit Feinmühlen vermahlen (z. B. Ultra-Zentrifugalmühle ZM1000 von Retsch, Pulverisette 23 und 6 von Fritsch) oder direkt verascht (sh. Kapitel 3.3). In der Professur Bodenkunde (AUF, Universität Rostock) wird für die Feinvermahlung die Ultra-Zentrifugalmühle ZM1000 von Retsch verwendet. Die ZM1000 schafft maximal 15000 Umdrehungen pro Minute und hat ein Sieb von 0,25 mm. Die zugeführte Körnung muss etwa < 5/10 mm sein. Dies hängt von der Struktur und Festigkeit des Materials ab. In der Professur Pflanzenbau (AUF, Universität Rostock) wird für Probenmengen bis zu einem Volumen von 5 ml (Korngröße < 6 mm) die Kugelmühle Pulverisette 23 (von Fritsch) verwendet (Endfeinheit: 5 µm). Die Mühle ist generell zur Kryovermahlung geeignet. Dies wurde bisher aber noch nicht getestet. Für größere Probenmenge wird in der Professur Pflanzenbau die Planeten-Kugelmühle Pulverisette 6 (von Fritsch) verwendet. Die Mühle fasst ein Probenvolumen zwischen 10 und 225 ml, die zugeführte Körnung darf maximal 10 mm sein. Es wird eine Mahlfeinheit von < 1 µm erreicht. Generell kann das Feinvermahlen evtl. unterbleiben, wenn größere Probenmengen verascht werden sollen (siehe Kapitel 3.3).

Getreideganzpflanzen u. ä. werden vor der Trocknung durch Dreschen in Stroh und Korn getrennt. Das Stroh wird vor dem Mahlen mit einer Schere in kurze Stücke zerschnitten. Alternativ kann das Stroh u. ä. grobes Material mit einer Grobmühle vorzerkleinert werden. In der Professur Bodenkunde (AUF, Universität Rostock) kann dafür die Schneidmühle SM200 von Retsch genutzt werden. Die Endfeinheit liegt je nach Lochweite der Siebe zwischen 0,25 und 20 mm. Es wurden damit auch bereits Maiskolben gemahlen. Das gut zerkleinerte Stroh o. ä. kann mit den Feinmühlen (wie oben angegeben) vermahlen werden. Für eine repräsentative gemahlene Strohprobe müssen aus einer Probe evtl.

mehrere Teilproben vermahlen und wieder zusammengeführt werden. Die Körner können mit entsprechenden Mühlen (z. B. Messermühlen wie für tierisches Weichgewebe s. u., auch Küchenmühlen, die für Nüsse u. ä. geeignet sind) direkt vermahlen oder auch ohne Vermahlen verascht werden. Problematisch kann evtl. das Vermahlen von ölhaltigen Samen (z. B. Raps) werden, wenn sich die Proben beim Mahlen stark erwärmen. Dies muss bei der Mahlzeit u. ä. Einstellungen berücksichtigt werden. In der Professur Pflanzenbau (AUF, Universität Rostock) wird die Kugelmühle Pulverisette 23 für das Vermahlen von Rapssamen verwendet. Dafür werden 35 Umdrehungen/min und eine Zeit von 20 sec eingestellt. Die Mahlkammer wird maximal bis zu $\frac{3}{4}$ gefüllt, sodass die Mahlkugel noch gut zu sehen ist. Außerdem steht in der Versuchstation in der Satower Straße eine Schneidmühlenkombination, die Pulverisette 25/19 von der Firma Fritsch, zur Verfügung. Mit dieser Mühle können beispielsweise auch Maiskolben gemahlen werden. Es handelt sich um eine Kombinationsmühle zur Vor- und Feinzerkleinerung in einem Schritt. Es können Teile mit maximal 120 x 85 mm verarbeitet werden. Nach der vollautomatischen zweistufigen Zerkleinerung wird eine Endfeinheit von 0,2 bis 6 mm erreicht. Die Probe wird während der Zerkleinerung gekühlt. Die Zerkleinerung läuft wie folgt ab: In der Pulverisette 25 wird die gesamte Probe vorzerkleinert, fällt dann automatisch über einen Trichter auf einen Probenteiler, der die Probe standardmäßig im Verhältnis 1:13 teilt. Das Teilungsverhältnis ist variabel. Diese mengenreduzierte Probe wird anschließend automatisch in der Pulverisette 19 auf eine Endfeinheit von bis zu 0,2 mm feinstzerkleinert und durch den angeschlossenen Fritsch Zyklon in das Probenglas gesaugt. Es muss dann entschieden werden, ob das ausreichend fein ist oder aber das Material beispielsweise mit einer der obigen Feinmühlen erneut gemahlen wird. Bei Nachfragen zu dieser Mühle kann man sich entweder an die Professur Pflanzenbau oder den Leiter der Versuchstation wenden (Kapitel 10).

Holziges Pflanzenmaterial mit Blattanteilen (z. B. Äste/Zweige von Weiden) wird bereits vor der Trocknung per Hand in Holzanteile und Blattanteile getrennt und im Folgenden separat gemahlen. Das Holz wird erst in einer Grobmühle und dann in einer Feinmühle (s. o.) vermahlen. Laut Herstellerangaben ist dafür auch die SM200 von Retsch geeignet (s. o.). Eventuell ist die Kombinationsmühle Pulverisette 25/19 geeignet. Das muss mit den Laboranten der Professur Pflanzenbau besprochen werden. Das Holz muss für das Vermahlen in der Feinmühle ausreichend fein sein ($< 5/10$ mm). Es sollten nur jeweils kleine Probenmengen vermahlen werden, da sich die Feinmühlen dabei sonst schnell erhitzen können. Die Blätter an den Ästen werden wie krautiges Pflanzenmaterial behandelt, d. h. es ist normalerweise keine Grobvermahlung, sondern nur eine Feinvermahlung notwendig oder es wird direkt verascht.

Knollen, wie z. B. Kartoffeln, werden vor der Trocknung oftmals, in Abhängigkeit von der Fragestellung, geschält und Schale und zerkleinertes Kartoffelfleisch werden getrennt getrocknet. Ein Vermahlen beider Materialien oder auch der grob zerkleinerten Kartoffelganzknolle in herkömmlichen Pflanzenmühlen, wie der Ultra-Zentrifugalmühle, ist nicht möglich. In der Professur Pflanzenbau wird für Kartoffeln die Schneidmühlenskombination Pulverisette 25/19 von der Firma Fritsch genutzt (s. o.). Es kann auch versucht werden, Kartoffeln mit Messermühlen (sh. Kapitel 3.5.3) zu zerkleinern. Wenn dies nicht möglich ist, muss das Material verascht werden (sh. Kapitel 3.3). **Torfe** müssen je nach Fasrigkeit nach der Trocknung evtl. unterschiedlich behandelt werden. Idealerweise werden sie nach der Trocknung, wie Boden, < 2 mm gesiebt und anschließend in einer Mörsermühle (s. u.) gemahlen. Ist dies aufgrund grober Fasern nicht möglich, kann versucht werden, den Torf in Messermühlen zu vermahlen. Ist dies auch nicht möglich, wird die Torfprobe verascht (Kapitel 3.3).

Mineralboden, Sedimente, Biokohlen (auch Knochenkohle)

Mineralboden wird nach der Trocknung < 2 mm gesiebt. Bei sehr großen und festen Aggregaten (z. B. bei tonigen Proben) ist evtl. ein vorheriges Zerstoßen der Aggregate mittels Mörser und Stößel per Hand notwendig. Das Zerstoßen der großen Aggregate darf auf keinen Fall auf dem < 2 mm-Sieb erfolgen, da dabei das Sieb zerstört werden kann. Boden und Sedimente können nicht in Mühlen für pflanzliches Material gemahlen werden. Nach der Siebung < 2 mm wird eine Teilprobe des Bodens in einer Mörsermühle (z. B. in der Bodenkunde 2 Mörsermühlen: die RM100 von Retsch und die Pulverisette 2 von Fritsch) gemahlen, um die kleinen Aggregate zu zerstören und so die Probe zu homogenisieren. Die Pulverisette 2 erreicht beispielsweise eine Mahlfeinheit von 10 bis 20 µm. Es können laut Herstellerangaben Probenvolumina von maximal 190 ml mit einer Teilchengröße von maximal 6 bis 8 mm vermahlen werden. Für die RM100 konnten keine näheren Angaben mehr gefunden werden, da nun das Nachfolgemodell RM200 auf dem Markt ist. Die maximal zuzuführende Probenmenge und Teilchengröße sowie die Mahlfeinheit entspricht nach eigenen Erfahrungen aber dem der Pulverisette 2. In der Bodenkunde werden in beiden Mühlen pro Portion Bodenvolumina von etwa 1 bis 2 Esslöffeln gemörsert.

Mineralische **Sedimente** werden wie Mineralboden behandelt. Haben die Sedimente einen zu hohen Anteil an organischer Substanz und können Teilproben nicht gemörsert werden, werden sie verascht. **Knochenkohlen** und wahrscheinlich auch andere **Biokohlen** können nach Versuchen in der Professur Bodenkunde nicht in den Mörsermühlen für Boden gemahlen werden. Sie werden mit Mörser und Stößel per Hand möglichst staubfein zerkleinert. Diese Zerkleinerung ist evtl. nicht notwendig, wenn

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

unterschiedliche Siebfraktionen der Kohlen hergestellt wurden und ein Aufschluss von Einzelpartikeln durchgeführt werden soll.

3.5.3 Homogenisierung von tierischem Gewebe

Bei tierischem Gewebe ist zwischen wasserreichem Weichgewebe (z. B. Muskelfleisch), der (Fisch)haut und festem Gewebe wie Knochen, Knorpel, Horn oder Muschelschalen zu unterscheiden. Es liegen nur sehr wenige Erfahrungen zum Umgang mit diesen Materialien vor. Es muss darauf geachtet werden, dass für alle Teile das Frischgewicht und das Trockengewicht bzw. das Aschengewicht bestimmt werden. So nicht bereits separat vorliegend, werden in einem ersten Schritt Vögel gerupft und andere Tiere gehäutet. Muskelfleisch muss von den Knochen und Eingeweiden separiert werden. Zuerst wird das Tier dafür geöffnet und die Eingeweide werden separat entfernt. Die Eingeweide (insbesondere Magen und Darmtrakt) müssen ggf. separat gewaschen werden, um Verdauungsreste zu entfernen. Anschließend wird mit einem scharfen Messer das Muskelfleisch von den Knochen entfernt. Die Knochen werden separat verarbeitet. Fische werden je nach Fragestellung entweder als Ganzfische oder in Teilen separiert verarbeitet. Werden sie separiert verarbeitet, wird zuerst der Kopf abgetrennt und die Eingeweide werden entnommen. Dann wird filetiert, sodass sie in Fischfleisch (Filet) und Knochen (Karkasse) getrennt sind. Die Fischhaut verbleibt entweder am Filet oder muss vor dem Filetieren entfernt werden.

Weichgewebe, z. B. Fischfleisch sowie Fischhaut

Das **wasserreiche Weichgewebe** muss vor der Trocknung jeweils separat (Muskelfleisch, Haut, Eingeweide) möglichst gut zerkleinert werden. Eine erste Vorzerkleinerung kann per Hand mittels Schere oder Messer erfolgen. Fischmuskelfleisch könnte generell auch im frischen Zustand in der Mikrowelle mit HNO_3 aufgeschlossen werden. Dies sollte aber nur gemacht werden, wenn sichergestellt ist, dass das Material relativ homogen ist. Parallel muss der TS-% bestimmt werden. In der Professur Aquakultur & Sea-Ranching (AUF, Universität Rostock) wurden Fische sowohl als Ganzfische als auch zerteilt verarbeitet. Ganzfische wurden bei -20 °C tiefgefroren, dann grob kleingesägt und anschließend 3 Mal durch den Fleischwolf gedreht. Bei zerteilten Fischen wurden sowohl das gefrorene Filet (wegen der ledrigen Haut) als auch die Karkasse getrennt mit einem Fleischwolf zerkleinert. Nach den Erfahrungen der Professur Aquakultur muss Fischfleisch im gefrorenen Zustand zerkleinert werden, da es im frischen Zustand zu viel Wasser verliert! Eine Zerkleinerung mit Messermühlen war nicht möglich, da die Fischteile nur

in der Mühle herumgewirbelt, aber nicht zerkleinert wurden. Nach der Zerkleinerung wurde das Material wieder bei -20 °C tiefgefroren und anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage 3 Tage getrocknet. Das gefriergetrocknete Material wurde mit einer Achatkugelmühle (bei 200 Umdrehungen/Minute für 20 min) zerstoßen und anschließend in einer Keramikmühle (IKEA 365+ IHÄRDIG) feinvermahlen.

Barrento et al. (2009) haben frisches Fischfleisch mit einer Messermühle (Grindomix GM200 von Retsch; 5000 Umdrehungen/Minute) bis zur vollständigen sichtbaren Materialzerstörung gemahlen. Es wurden Polypropylenbecher und Edelmessmesser benutzt. Anschließend wurde das Material bei -20 °C eingefroren. Eine Teilprobe wurde jeweils für 48 h bei -50 °C und niedrigem Druck (10^{-1} atm) gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Proben verascht und in HNO_3 aufgeschlossen. Ersoy und Çelik (2009) haben die Frischfischproben ebenfalls mittels stahlfreier Messer in einer Mühle zerkleinert, das homogenisierte Material aber dann direkt ohne Trocknung aufgeschlossen.

Es kann generell im Trockenschrank oder durch Gefriertrocknung getrocknet werden (siehe Kapitel 3.5.1 Punkte b und c). In beiden Fällen ist die Ein- und Auswaage zu notieren, um den TS-% zu bestimmen. Bei der Trocknung im Trockenschrank ist mit einer starken Geruchsbelästigung zu rechnen. Es wird daher, wie bei Barrento et al. (2009) und in der Professur Aquakultur durchgeführt, eine Gefriertrocknung empfohlen (Kapitel 3.5.1 Punkt c). Nach Schoo (2010) können zumindest Hummerlarven vollständig nach der „Ernte“ direkt eingefroren und gefriergetrocknet, anschließend pulverisiert und aufgeschlossen werden. Es werden bei Schoo (2010) keine näheren Angaben zur Pulverisierung gegeben.

Prinzipiell kann (Fisch)Fleisch auch als Frischmasse im Muffelofen bei 450 bis 550 °C zur Homogenisierung verascht werden (z. B. Engmann und Jorhem 1998, Jorhem et al. 1996). Dabei kommt es nach eigenen Versuchen in der Biologischen Station Zingst aber zu einer starken Geruchsbelästigung und Verrußung des Muffelofens (siehe Kapitel 3.3).

Hartgewebe, z. B. Knochen, Knorpel und Horn

Knochen, Knorpel und **Horn** lassen sich nicht mit herkömmlichen Mühlen oder per Hand mit Mörser und Stößel zur Homogenisierung zermahlen. Es werden spezielle Knochenmühlen benötigt. Die Karkasse von Fischen kann nach Erfahrungen der Professur Aquakultur mittels Fleischwolf zerkleinert werden. Möglicherweise sind die sogenannten Backenbrecher der Firma Retsch für das Vermahlen von Knochen geeignet (<https://www.retsch.de/de/produkte/zerkleinern/backenbrecher/>), da mit diesen auch Erze, Keramik u. ä. zerkleinert werden kann. Die BB50 von Retsch verarbeitet Material < 40 mm und vermahlt auf < 0,5 mm,

während die BB200 von Retsch Korngrößen $< 90 \text{ mm}$ auf $< 2 \text{ mm}$ vermahlen kann.

Knochenmaterial $< 10 \text{ mm}$ kann teilweise mit Kugelmøhlen zerkleinert werden. Liegen Knochen, Knorpel und Horn bereits als Chips $< 5 \text{ mm}$ vor, können sie auch direkt mit $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ in der Mikrowelle aufgeschlossen werden. Liegt eine optisch sichtbare Heterogenität dieses Materials vor, muss das Material entweder, wie grobes Material, in einer Knochenmøhle zerkleinert werden oder es wird im Muffelofen verascht, um homogenes Material zu erhalten. Die Veraschung von Knochen u. ä. wurde bisher in den Laboren nicht getestet. Da sich bei der Pyrolyse (O_2 -frei) von Knochenchips auch bereits bei etwa $500 \text{ }^\circ\text{C}$ eine relativ bröselige Knochenkohle bildet, wird aber davon ausgegangen, dass durch Veraschung bei $550 \text{ }^\circ\text{C}$ im Muffelofen (siehe Kapitel 3.3) zumindest ein Material gebildet wird, welches mit Mørser und Støbel per Hand zerkleinert werden und somit homogenisiert werden kann.

Carbonathaltige biogene Materialien, z. B. Muschelschalen, Chitinpanzer von Gliederfüßer (Arthropoda)

Muschelschalen bestehen vorwiegend aus Calciumcarbonat (in der Form von Aragonit), welches durch die organische Substanz Conchyn (auch Conchiolin) verkittet ist (Wikipedia Muschelschalen). Als erste Quelle für Conchyn wird dort Frémy (1855) angegeben. Es ist darauf zu achten, dass die Schalen vor der Zerkleinerung ausreichend gereinigt werden, um anhaftenden Schmutz oder ggf. je nach Fragestellung anhaftende organische Substanz zu entfernen. Muschelschalen können generell per Hand mit Mørser und Støbel zur Homogenisierung ausreichend zerkleinert werden (Pilkey & Goodell 1963, Ragland et al. 1979). Als Alternative wäre eine Veraschung im Muffelofen bei $550 \text{ }^\circ\text{C}$ denkbar, da durch die Oxidation der organischen Substanz nur ein brüchiges Calciumcarbonat übrig bleiben sollte, welches leicht weiter zerkleinert werden kann ($400 \text{ }^\circ\text{C}$, bei Elsaesser 2014). Analysen von Muschelschalen wurden bisher in den Laboren noch nicht durchgeführt. Kost (1853) gibt allerdings an, dass es bei der Verbrennung von Muschelschalen zu einer starken Ammoniakbildung gekommen wäre.

Die **chitinhaltigen Exoskelette** (z. B. von Krebstieren) könnten mit der Hand grob zerkleinert werden, dann wie bei Cárdenas et al (2004) in Porzellanschalen bei $105 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend zur Homogenisierung in einem Muffelofen bei $900 \text{ }^\circ\text{C}$ verascht werden. Boßelmann et al. (2007) haben Exoskelette von Hummern zum einen in einer Kugelmøhle mit 500 Umdrehungen/Minute für 3 h bei Raumtemperatur und zum anderen mit flüssigem Stickstoff in einem Mørser gemahlen. Sie fanden keine chemischen Unterschiede durch die unterschiedliche Homogenisierung.

Eine weitere Möglichkeit für schwierig zu vermahlende oder wärmeempfindliche Proben ist das Vermahlen in **Kryomühlen**. Dabei werden beim Vermahlen die Proben durch Eintauchen des Mahlgefäßes in flüssigen Stickstoff gekühlt. Durch die Stickstoffkühlung wird die Probe zusätzlich versprödet und außerdem bleiben leichtflüchtige Bestandteile erhalten.

Für diese Mühlen sind spezielle Sicherheitsbestimmungen zum Betrieb der Geräte zu beachten und das Personal ist entsprechend im Umgang mit flüssigem Stickstoff zu schulen. Derartige Mühlen sind z. B. die Kryogenschwingmühle CryoMill von Retsch oder die Kryomühlen von C3 Prozess- und Analysetechnik GmbH. Die Kryomühle von Retsch hat ein geschlossenes LN₂-System (Autofill), welches einen direkten Kontakt des Anwenders mit Flüssigstickstoff verhindert und so die Sicherheit erhöht. Bisher liegen in den Laboren keine Erfahrungen mit Kryomühlen vor.

Vergleich der P-Konzentrationen zwischen Bodenproben < 2 mm und ungemörsert und zusätzlich gemörserten (homogenisierten) Bodenproben

Es wurde ein Versuch mit 4 Böden (BS1 bis BS4) jeweils < 2 mm gesiebt, einmal ungemörsert und einmal zusätzlich zur Homogenisierung gemörsert, durchgeführt (n = 5). Es wurden jeweils 0,50 g der Bodenproben mit Königswasser in der Mikrowelle aufgeschlossen und die P-Konzentration am ICP-OES bei 214,914 nm bestimmt.

Für alle 4 Böden wurden keine signifikanten Unterschiede in den P-Konzentrationen zwischen den nur < 2 mm gesiebt Bodenproben und den zusätzlich gemörserten Bodenproben nachgewiesen (Tab. 3.5-1). Allerdings war die relative Standardabweichung der zusätzlich gemörserten Proben geringer als bei den Proben, die nur < 2 mm gesiebt worden waren. Dies lässt sich auch an der geringeren Spanne zwischen Minimum und Maximum bei den gemörserten Proben ablesen. Die kleinste Spanne zwischen Minimum und Maximum bei den nur < 2 mm gesiebt Proben lag bei 32 mg P kg⁻¹ (BS1) und die größte bei 1214 mg P kg⁻¹ (BS2), während für die gemörserten Proben die kleinste Spanne 16 mg P kg⁻¹ (BS2) und die größte 43 mg P kg⁻¹ (BS3) betrug. Bei den gemörserten Proben konnten auch keine Ausreißer nachgewiesen werden. Durch das Mörsern der Bodenproben kam es also zu einer Homogenisierung der Proben, da die ungleich großen Bodenaggregate zerstört wurden. Dieser Effekt wurde auch für die anderen in diesem Versuch bestimmten Elemente (Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Zn) nachgewiesen (nicht gezeigt).

Tabelle 3.5-1 Minimum, Maximum, Mittelwert und relative Standardabweichung (S %) der P-Konzentrationen in mg kg⁻¹ für die Böden BS1 bis BS 4 jeweils < 2 mm gesiebt und zusätzlich gemörsert

Boden	vorbehandelt	Minimum	Maximum	Mittelwert	S %
BS1	< 2 mm	598	630	615	2.1
	gemörsert	602	620	612	1.2
BS2	< 2 mm	792	2006	1051	51
	gemörsert	797	813	803	0.8
BS3	< 2 mm	938	1004	975	2.7
	gemörsert	936	979	962	2.2
BS4	< 2 mm	655	719	681	4.3
	gemörsert	672	691	678	1.1

Literatur

- Bachmann, S, Uptmoor, R, Eichler-Löbermann, B (2016) Phosphorus distribution and availability in untreated and mechanically separated biogas digestates. *Sci. Agric.* 73 (1), 9-17, DOI: [10.1590/0103-9016-2015-0069](https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0069)
- Barrento, S, Marques, A, Teixeira, B, Carvalho, ML, Vaz-Pires, P, Nunes, ML (2009) Accumulation of elements (S, As, Br, Sr, Cd, Hg, Pb) in two populations of *Cancer pagurus*: Ecological implications to human consumption. *Food and Chemical Toxicology* 47, 150–156, DOI: [10.1016/j.fct.2008.10.021](https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.10.021)
- Boßelmann, F, Romano, P, Fabritius, H, Raabe, D, Epple, M (2007) The composition of the exoskeleton of two crustacea: The American lobster *Homarus americanus* and the edible crab *Cancer pagurus*. *Thermochimica Acta* 463, 65–68, DOI: [10.1016/j.tca.2007.07.018](https://doi.org/10.1016/j.tca.2007.07.018)
- Burgstaler, J, Wiedow, D, Kahnswohl, N (2017) Präsentation „Gärresteaufbereitung – Restgaspotentiale und Erfahrungswerte aus der Praxis“, letzter Zugriff 09.05.2018
- Cárdenas, G, Cabrera, G, Taboada, E, Miranda, SP (2004) Chitin Characterization by SEM, FTIR, XRD, and ¹³C Cross Polarization/Mass Angle Spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science* 93, 1876–1885, DOI: [10.1002/app.20647](https://doi.org/10.1002/app.20647)
- Edmond Frémy: Recherches chimiques sur les os. In: *Annales de chimie et de physique*. Serie 3, Bd. 43, 1855, S. 47–107 (Gallica), S. 96
- Elsaesser, WN (2014) [Influence of diet on element incorporation in the shells of two bivalve molluscs: *Argopecten irradians concentricus* and *Mercenaria mercenaria*](#). Dissertation der University of South Florida

- Engman, J & Jorhem, L (1998) Toxic and essential elements in fish from Nordic waters, with the results seen from the perspective of analytical quality assurance. *Food Additives & Contaminants* 15, 884-892, DOI: [10.1080/02652039809374725](https://doi.org/10.1080/02652039809374725)
- Ersoy, B & Çelik, M (2009) Essential elements and contaminants in tissues of commercial pelagic fish from the Eastern Mediterranean Sea. *J Sci Food Agric* 89, 1615–1621, DOI: [10.1002/jsfa.3646](https://doi.org/10.1002/jsfa.3646)
- Jorhem, L, Sundström, B, Engman, J, Åstrand-Yates, C, Olsson, I (1996) Levels of certain trace elements in beef and pork imported to Sweden. *Food Additives & Contaminants* 13, 737-745, DOI: [10.1080/02652039609374462](https://doi.org/10.1080/02652039609374462)
- Kost, H (1853) Über die Struktur und chemische Zusammensetzung einiger Muschelschalen. Dissertation Universität Würzburg
- Mönicke, R Köditz, K, Döhler, K (1978) [Fest-Flüssig-Trennung von Gülle mit einer Schneckenpresse](#). *Agrartechnik* 28, 69-70
- Pilkey, OH & Goodell, HG (1963) Trace elements in recent mollusk shells. *Limnology and Oceanography* 8, 137-148, DOI: [10.4319/lo.1963.8.2.0137](https://doi.org/10.4319/lo.1963.8.2.0137)
- Ragland, PC, Pilkey, OH, Blackwelder, BW (1979) Diagenetic changes in the elemental composition of unrecrystallized mollusk shells. *Chemical Geology* 25, 123-134, DOI: [10.1016/0009-2541\(79\)90088-3](https://doi.org/10.1016/0009-2541(79)90088-3)
- Schoo, KL (2010) [Stoichiometric constraints in primary producers affect secondary consumers](#). Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

For citation: Zimmer D, Schumann R, Strauch SM, Zicker T, Berthold M, Oster M (*year of download*) Kapitel 3.5 Homogenisierung (Version 1.0) in Zimmer D, Baumann K, Berthold M, Schumann R: Handbuch zur Auswahl der Aufschluss- und Bestimmungsverfahren für Gesamtphosphor in Umweltproben. DOI: 10.12754/misc-2018-0001