

Inhaltsverzeichnis

1	Umweltprobenbank des Bundes	2
2	Zielsetzung dieser Richtlinie	2
3	Allgemeine Festlegungen	2
4	Geräte und Materialien	2
5	Vorbereitung des Materials	3
	5.1 Lagerung	3
	5.2 Manuelle Zerkleinerung.....	3
6	Durchführung der Cryomahlung	3
	6.1 Cryomühle KHD Palla VM-KT	3
	6.2 Planetenmühle	4
	6.3 Partikelgrößenanalyse	4
7	Reinigung der Geräte	4
8	Dokumentation	5
9	Literatur	5
	Anhang A: Formular Mahlprotokoll	6
	Anhang B: Partikelgrößenanalyse eines Buchenblätter-Homogenats	7
	Anhang C: Betriebsanweisung Flüssigstickstoff	8

**Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung von
Umwelt- und Humanproben**

Dezember 2008, V 2.0.0

1 Umweltprobenbank des Bundes

Die Umweltprobenbank des Bundes (UPB) ist ein Instrument der Umweltbeobachtung des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) unter fachlicher und administrativer Koordinierung des Umweltbundesamtes (UBA). Die UPB sammelt ökologisch repräsentative Umweltproben sowie Humanproben, lagert sie ein und untersucht sie auf umweltrelevante Stoffe.

Die Langzeitlagerung erfolgt unter Bedingungen, die eine Zustandsveränderung oder einen Verlust chemischer Eigenschaften über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten weitestgehend ausschließen. Damit stellt das Archiv Proben für die retrospektive Untersuchung solcher Stoffe bereit, deren Gefährdungspotential für die Umwelt oder die menschliche Gesundheit heute noch nicht bekannt ist.

Umfassende Informationen zur UPB sind unter www.umweltprobenbank.de verfügbar.

2 Zielsetzung dieser Richtlinie

Diese Vorschrift gilt für biologische Umweltproben wie z.B. Blasentang, Brassenmuskulatur, Regenwurm, Fichtentriebe sowie abiotische Proben wie Boden und Schwebstoff.

Für die Lagerung in der UPB werden sämtliche Proben zum Zeitpunkt der Probenahme eingefroren, wobei anschließend die Kühlkette nicht mehr unterbrochen wird. Transport, Lagerung sowie Zerkleinerung und Homogenisierung des Probenmaterials findet deshalb unter Cryobedingungen (Temperatur unterhalb von ca. -130°C) unter Beachtung spezieller Sicherheitsbestimmungen statt.

Der besonders hohe Anspruch an Qualitätssicherung ergibt sich aus der außergewöhnlichen Bedeutung der Proben als Archivmaterial. Repräsentativität und Reproduzierbarkeit der Proben sind Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse in Zeit und Raum.

Beschrieben wird die Zerkleinerung und Homogenisierung des tiefgekühlten Materials durch Vermahlung unter Kühlung mit Flüssigstick-

stoff. Durch die tiefen Temperaturen versprödet das wasserhaltige biologische Material, so dass eine schonende Vermahlung zu Korngrößen kleiner $200\ \mu\text{m}$ möglich wird.

3 Allgemeine Festlegungen

Die Zerkleinerung und Homogenisierung des Materials erfolgt bei Probenmengen ab ca. 1 kg durch Mahlen des Materials in einer Schwingmühle. Zum Homogenisieren kleinerer Mengen von Umweltproben wird eine Planetenmühle eingesetzt.

Um Verunreinigungen des Probenmaterials durch Staubpartikel und gasförmige Stoffe zu vermeiden, darf die Aufarbeitung nur in sauberen, mit gereinigter Luft belüfteten Räumen stattfinden. Dies erfordert den Betrieb der Cryomühle z.B. in einem Laminar-Flow-Feld mit gefilterter Luft sowie das Abfüllen von Proben in einer Reinluftwerkbank.

Während aller Bearbeitungsschritte ist sicherzustellen, dass das Probenmaterial sich nicht erwärmt. Alle Geräte und Gefäße sind vor Gebrauch mit Flüssig-Stickstoff auf Temperaturen von mindestens -150°C abzukühlen. Falls erforderlich, ist während der Bearbeitung weiter mit Flüssig-Stickstoff zu kühlen, wobei aber möglichst wenig Flüssig-Stickstoff direkt mit der Probe in Berührung kommen darf.

4 Geräte und Materialien

- Cryo-Schwingmühle KHD Humboldt Wedag Palla VM-KT mit Titanmahlzylinder und Titanmahlstäben (Fa. KHD, Köln).
- Planetenkugelmühle (z.B. Pulverisette 5, Fa. Fritsch, Idar-Oberstein mit 500 mL-Mahlbechern und 3 cm-Mahlkugeln jeweils aus Zirkonoxid).
- Mörser und Pistill aus Teflon, Titan oder Keramik.
- Partikelgrößenanalysator (z.B. Mastersizer 2000, Fa. Malvern, Herrenberg).
- Reinluftwerkbank (handelsübliches Modell).
- Messgerät zur Überwachung des Sauerstoffgehalts der Raumluft (z.B. Gaswarngerät Micro III der Fa. GfG, Dortmund).

- Glasfläschchen (z.B. 20 mL-Szintillations-Vials der Fa. PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim); gefertigt aus hochwertigem Glas mit folgenden Standardmaßen: Höhe ca. 60 mm, Durchmesser ca. 25 mm; die Schraubdeckel bestehen aus Kunststoff und sind an der Innenseite mit einer Metallfolie beschichtet.
- Kältefeste Kunststoff-Klebeetiketten (z.B. glänzend weiße Etiketten aus Polyester; Größe ca. 2 * 4 cm, ESTO GmbH), bedruckbar mittels Thermodrucker (z.B. Eltron TLP 3642, mit Thermotransferfolien auf Kunstharzbasis; ESTO GmbH, Potsdam).
- Flüssigstickstoff (99,999 %).

5 Vorbereitung des Materials

5.1 Lagerung

Das Probenmaterial wird direkt nach der Probenahme bis zur Aufbereitung bei Temperaturen unter -150°C gelagert. Für die Aufbewahrung werden Edelstahlbehälter verwendet (z.B. im Gastronomiebereich übliche, rechteckige Metallbehälter mit 1,5 L, 3,5 L oder 5,5 L Volumen und Deckeln, die mittels einer Spange befestigt sind). Jeder Behälter sollte eindeutig zu identifizieren sein (z.B. durch eine eingestanzte oder eingeätzte Ordnungsnummer). Außerdem muss die Probenbezeichnung auf dem Metallbehälter angegeben sein.

5.2 Manuelle Zerkleinerung

Die hier beschriebene Cryomahlung kann mit biologischem Material durchgeführt werden, das eine Korngröße von < 1 cm Kantenlänge besitzt. Gegebenenfalls ist eine Vorzerkleinerung erforderlich.

In den meisten Fällen kann eine manuelle Zerkleinerung mit einem vorgekühlten Stößel aus Porzellan, Teflon oder Titan durchgeführt werden. Die Bearbeitung erfolgt z.B. in einem ebenfalls vorgekühlten Porzellanmörser passender Größe. Unter Umständen kann es notwendig sein, die Aufarbeitung in einer größeren Edelstahlwanne durchzuführen (z.B. wenn eine größere Menge Probenmaterial verarbeitet wird) oder in einem Metallbehälter, in dem das Material gelagert wird.

6 Durchführung der Cryomahlung

6.1 Cryomühle KHD Palla VM-KT

Bei der Bedienung der Cryomühle KHD Palla VM-KT ist die Bedienungsanleitung zu beachten.

Die Cryomühle KHD Palla VM-KT besteht aus der eigentlichen Mühle mit einem Mahlzyylinder und Mahlstäben. Alle Proben-berührenden Teile, die mechanischer Beanspruchung ausgesetzt sind, sind aus Titan gefertigt (bzw. Teflon für die Faltenbälge, die den schwingenden Mahlzyylinder mit der Probenaufgabevorrichtung und dem Probenauffangbehälter verbinden). Außerdem verfügt die Cryomühle über einen Dosierrinnenaufsatz, der für einen gleichmäßigen Probeneintrag in die Mühle sorgt.

SICHERHEITSHINWEIS: Beim Kühlen der Cryomühle KHD Palla VM-KT werden größere Mengen an Flüssig-Stickstoff benötigt. Dies kann im Raum zu einem Sauerstoffmangel führen. Es ist für ausreichende Lüftung zu sorgen. Der Sauerstoffgehalt der Raumluft muss durch einen Sauerstoffsensord überwacht werden, der bei unter 19 % Sauerstoffgehalt akustische Warnsignale ausgibt. Da Flüssig-Stickstoff tiefkalt ist, besteht bei Kontakt die Gefahr von Verletzungen. Es ist Schutzkleidung zu tragen (kältefeste Handschuhe, Schutzbrille, Kittel, feste Schuhe). Eine Betriebsanweisung für den Umgang mit Flüssigstickstoff befindet sich im Anhang C.

Der Mahlzyylinder der Cryomühle KHD Palla VM-KT ist zu ca. 2/3 mit den Mahlstäben zu befüllen. Danach wird das Gerät zusammengebaut und alle Befestigungsschrauben fest angezogen. Vor Beginn der Cryomahlung sind die Mühle und die Dosierrinne über mindestens zwei Stunden mit Flüssigstickstoff zu kühlen. Die Temperatur bei Beginn der Mahlung sollte unter -170°C liegen (Messpunkte: Dosierrinne und Mahlzyylinder).

Nach dem Abkühlen der Cryomühle erfolgt die Mahlung des Probenmaterials. Das zerkleinerte Material wird in einem mit Flüssigstickstoff gekühlten Edelstahlbehälter aufgefangen. Bei Leerläufen der Mühle können durch die mechanische Belastung Titanpartikel abgelöst werden. Um den Eintrag in das Probenmaterial zu minimieren, wird zunächst die Dosierrinne und erst nach ca. einer Minute die Mühle eingeschaltet. Bei ausreichender Probenmenge kann

auch der erste Teil des Mahlguts verworfen werden, um eine Kontamination zu vermeiden.

Die Cryomahlung ist so lange zu wiederholen, bis das Probenmaterial die gewünschte Korngröße besitzt. Angestrebt wird ein Homogenat mit einer Korngröße von $< 200 \mu\text{m}$ (für $> 90\%$ der Partikel). Dies wird für die meisten Probenarten durch ca. fünfmaliges Mahlen erreicht.

Zwischen den einzelnen Mahlgängen ist das Probenmaterial zu kühlen: Auffangen in einem mit Flüssigstickstoff gekühltem Edelstahlbehälter; Zwischenlagerung in einem mit Flüssigstickstoff gekühltem Cryolagerbehälter.

Falls die Temperatur am Ende eines Mahlvorgangs über -130°C angestiegen ist, sind die Mühle und die Dosierrinne erneut mit Flüssigstickstoff bis unter -170°C zu kühlen.

6.2 Planetenmühle

Zum Homogenisieren kleinerer Mengen von Umweltproben (bis ca. 1 kg) wird eine Planetenmühle eingesetzt.

Bei der Bedienung der Planetenmühle ist die entsprechende Bedienungsanleitung zu beachten.

SICHERHEITSHINWEIS: Durch die tiefkalten Mahlbecher sowie durch ihr hohes Gewicht entstehen besondere Gefahren durch Erfrierungen an den Händen. Bei der Cryomahlung ist unbedingt Schutzkleidung zu tragen (Cryohandschuhe, Schutzbrille, Kittel).

Für den Betrieb werden die Mahlbecher und die Mahlkugeln über Nacht in Flüssigstickstoff-Atmosphäre gekühlt. Die Mahlbecher werden jeweils mit mehreren Mahlkugeln gefüllt und anschließend wird das Probenmaterial auf die Kugeln gegeben. Der Becher wird geschlossen und in der Mühle eingespannt. Die Mahlung erfolgt für 1 - 2 min. Nach jeweiliger Zwischenkühlung der Mahlbecher für mindestens 2 h in der Gasphase über Flüssigstickstoff kann der Mahlgang 2- bis 4mal wiederholt werden, bis die nötige Feinkörnigkeit erreicht ist.

Derzeit wird die Planetenmühle Pulverisette 5 (Fa. Fritsch, Idar-Oberstein) oder ein äquivalentes Gerät eingesetzt. Mahlbecher und Mahlkugeln bestehen aus Zirkonoxid (500 mL-Becher, Kugeln

mit 3 cm Durchmesser). Routinemäßig werden die Mahlbecher mit 10 Mahlkugeln und 250 g Probenmaterial gefüllt. Die Mahlung erfolgt für 1 - 2 min bei ca. 400 Upm. Wird mehr oder weniger Probenmaterial verwendet, so wird die Anzahl der Mahlkugeln verringert bzw. erhöht. Die Güte des Mahlergebnisses wird für jede Probe überprüft.

6.3 Partikelgrößenanalyse

Bei jeder Mahlung ist die Qualität des Mahlergebnisses routinemäßig zu überprüfen. Hierzu werden Partikelgrößenanalysen z.B. mittels Laserbeugungs- oder Lichtstreuungstechnik durchgeführt. Alle zerkleinerten und homogenisierten Proben werden mit einem Partikelgrößenanalysator (z.B. des Typs Mastersizer 2000 mit Hydro MU Probendispergiereinheit; Fa. Malvern, Herrenberg) untersucht. Die Partikelgrößenanalyse eines typischen UPB-Buchenblätter-homogenats ist in Anhang B dargestellt.

Das kalte Material wird routinemäßig direkt nach der Mahlung untersucht (z.B. nach dem vierten Mahlgang). Die Messungen erfolgen mit Wasser als Dispersionsmedium (für nicht-pflanzliche Probenarten unter Zusatz von ca. 30 % Isopropanol). Falls die erforderliche Partikelgröße nicht erreicht ist, werden weitere Mahlgänge durchgeführt.

Die Ergebnisse werden mit unter gleichen Bedingungen gemessenen Proben aus früheren Jahren verglichen.

7 Reinigung der Geräte

Da in den zu homogenisierenden Proben organische Spurenstoffe und Spurenelemente bestimmt werden sollen, ist jede Verunreinigung der Proben zu vermeiden. Alle verwendeten Geräte und Aufbewahrungsgefäße sind vor Gebrauch mit hochreinen Lösungsmitteln (z.B. Ethanol) und/oder Reinstwasser zu reinigen. Zur Reinigung sind die Geräte nach Gebrauch zunächst auf Raumtemperatur zu erwärmen. Demontierbare Teile der Cryomühle können in einer Spülmaschine gereinigt werden (Temperatur: ca. 90°C).

Falls eine Reihe gleichartiger Materialien mit ähnlichen Stoffgehalten (z.B. Einzelproben einer Probenart aus einem Gebiet) aufgearbeitet werden

soll,, reicht es aus, die Cryomühle KHD Palla VM-KT nur mechanisch zu reinigen bzw. vor Einbringen der nächsten Probe leer laufen zu lassen.

8 Dokumentation

Alle relevanten Angaben zum Mahlgut bzw. der Cryomahlung sind zu dokumentieren (Formular Anhang A). Die Probenidentifizierung erfolgt über den UPB-Code mit Angaben zu Probenart, Probennahmeort und Jahr und entspricht den Vorgaben des Schlüsselsystems der Umweltprobenbank. Für jede zu bearbeitende Probe ist das Probengewicht vor und nach der Bearbeitung auf 0,1 g genau zu notieren.

Die ausgefüllten Formulare werden als Rohdaten abgelegt und mindestens 5 Jahre archiviert.

9 Literatur

BMU (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Hrsg.) (2008): Umweltprobenbank des Bundes – Konzeption (Stand: Oktober 2008); www.umweltprobenbank.de

Umweltbundesamt (1996): Umweltprobenbank des Bundes – Verfahrensrichtlinien. Herausgeber: Umweltbundesamt, Berlin. Erich Schmidt Verlag, Berlin.

Anhang A: Formular Mahlprotokoll

Umweltprobenbank

Formular Cryomahlung

Probenidentifizierung

UPB-Code der Probe: /

Kommentarzeile:.....

Identifizierung der Edelstahlgefäße, aus denen die Proben entnommen wurden:

1	2	3	4
5	6	7	8

Gesamtgewicht vor der Cryomahlung: g

Cryomahlung

Bearbeiter: _____

Datum: _____

Mahlbedingungen KHD Palla VM-KT:

Temperatur Cryomühle	vor der Mahlung	nach der Mahlung
Dosierrinne	°C	°C
Mahlzylinder	°C	°C
Probenmaterial	°C	°C

Einstellung Dosierrinne	mm
Vorschub Dosierrinne	Skalenteile

Mahlbedingungen Planetenmühle Pulverisette 5:

Anzahl Kugeln: _____ Stück

Anzahl Becher: _____ Stück

Dauer je Mahlung: _____ Sekunden

Anzahl Mahlvorgänge:

(jeweils abhaken): 1 2 3 4 5 6 7 8

Zwischenkühlung der Cryomühle: ja / nein

Gesamte Dauer der Cryomahlung: _____ min

Gesamtgewicht nach der Cryomahlung: g

Identifizierung der Edelstahlgefäße, in denen das Mahlgut zwischengelagert wird:

1	2	3	4
5	6	7	8

Zwischenlagerung bis zum nächsten Verarbeitungsschritt: in Cryolagerbehälter

Bestimmung der Korngröße nach der Mahlung:

Bearbeiter: _____

Datum: _____

Prozentanteil kleiner 200 µm: %

Anhang B: Partikelgrößenanalyse eines Buchenblätter-Homogenats

Mastersizer 2000

Fraunhofer IME / Umweltprobenbank

P2 B 328

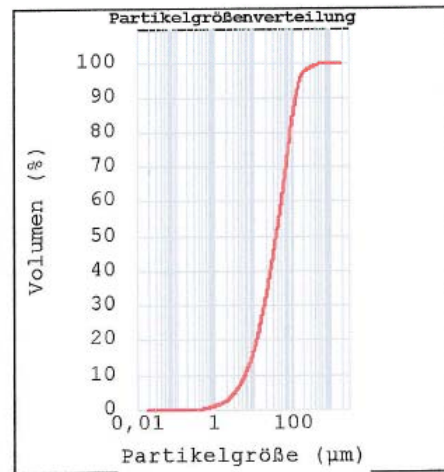
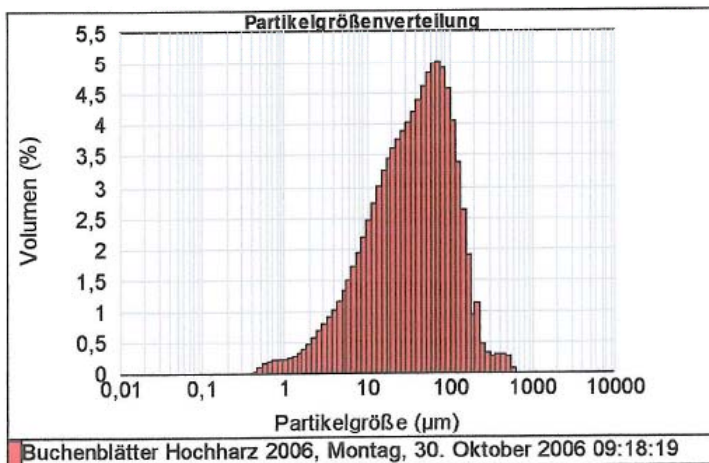
K-UBA-011/7-30

Result Analysis Report

Sample Name: Buchenblätter Hochharz 2006 **SOP Name:**
Measured by: Unbekannt
Sample Source & type: **Result Source:** Messung *Wc 30.10.06*
Sample bulk lot ref:
Particle Name: Default **Accessory Name:** Hydro 2000MU (A) **Obscuration:** 20,11 %
Particle RI: 1,520 **Absorption:** 0,1 **Analysis model:** Universal
Dispersant Name: Water **Size range:** 0,020 to 2000,0... um **Weighted Residual:** 0,695 %
Dispersant RI: 1,330 **Result Emulation:** Aus

Concentration: 0,0495 %Vol **Vol. Weighted Mean D[4,3]:** 58,655 um **Specific Surface Area:** 0,451 m²/g
Span: 3,169 **Uniformity:** 1,08 **Surface Weighted Mean D[3,2]:** 13,294 um

Result units: Volumen
D(0,10): 6,27 um **D(0,25):** 15,43 um **D(0,50):** 38,89 um **D(0,75):** 80,40 um **D(0,95):** 168,18 um



Größen-	Durchgang (%)	Größen-	Durchgang (%)	Größen-	Durchgang (%)	Größen-	Durchgang (%)	Größen-	Durchgang (%)	Größen-	Durchgang (%)
0,010	0,00	0,105	0,00	1,096	1,05	11,482	18,84	120,226	88,09	1258,925	100,00
0,011	0,00	0,120	0,00	1,259	1,28	13,183	21,57	138,038	91,47	1445,440	100,00
0,013	0,00	0,138	0,00	1,445	1,54	15,136	24,57	158,489	94,10	1659,587	100,00
0,015	0,00	0,158	0,00	1,660	1,84	17,378	27,80	181,970	96,00	1905,461	100,00
0,017	0,00	0,182	0,00	1,905	2,22	19,953	31,25	200,000	96,91	2187,782	100,00
0,020	0,00	0,209	0,00	2,188	2,69	22,909	34,85	239,883	98,02	2511,886	100,00
0,023	0,00	0,240	0,00	2,512	3,25	26,303	38,62	275,423	98,48	2884,032	100,00
0,026	0,00	0,275	0,00	2,884	3,92	30,200	42,51	316,228	98,79	3311,311	100,00
0,030	0,00	0,316	0,00	3,311	4,70	34,674	46,54	363,078	99,06	3801,894	100,00
0,035	0,00	0,363	0,00	3,802	5,60	39,811	50,72	416,869	99,35	4365,158	100,00
0,040	0,00	0,417	0,00	4,365	6,62	45,709	55,11	478,630	99,65	5011,872	100,00
0,046	0,00	0,479	0,00	5,012	7,78	52,481	59,72	549,541	99,92	5754,399	100,00
0,052	0,00	0,550	0,10	5,754	9,09	60,256	64,55	630,957	100,00	6605,934	100,00
0,060	0,00	0,631	0,26	6,607	10,58	69,183	69,53	724,436	100,00	7585,776	100,00
0,069	0,00	0,724	0,44	7,596	12,26	79,433	74,56	831,764	100,00	8709,636	100,00
0,079	0,00	0,832	0,64	8,710	14,20	91,201	79,46	954,993	100,00	10000,000	100,00
0,091	0,00	0,955	0,85	10,000	16,38	104,713	84,04	1095,478	100,00		

Operator notes: *dest. Wasser*

Anhang C: Betriebsanweisung Flüssigstickstoff

GEFAHREN FÜR MENSCH UND UMWELT

Flüssiger, tiefkalter Stickstoff verursacht bei Kontakt mit Augen oder Haut schwerste Erfrierungen mit verbrennungsartigen Schäden (Rötung, Schwellung, Blasenbildung), bis hin zu tiefen Gewebeerstörungen. Das kalte Gas ist schwerer als Luft, kriecht am Boden entlang und kann den Sauerstoff in tieferen Räumen verdrängen. 1 Liter flüssiger Stickstoff entwickelt ca. 650 Liter Gas! Bei Konzentrationen über 85 % in der Atemluft tritt Sauerstoffmangel ein (Symptome: Schläfrigkeit, Unwohlsein, Blutdruckanstieg, Atemnot), ab 88% sofortige Bewusstlosigkeit und Erstickungsgefahr!

SCHUTZMAßNAHMEN UND VERHALTENSREGELN

Der Transport und Umgang mit flüssigem Stickstoff darf nur in geeigneten Cryogefäßen oder kältebeständigen Geräten erfolgen. Niemals große Mengen in kleinen, schlecht belüfteten Räumen handhaben. Kontakt der tiefkalten Flüssigkeit/Gas mit Haut und Augen unbedingt vermeiden. Kältebeständige Schutzkleidung, gegen "Hineinlaufen" geschützte Schuhe, Schutzhandschuhe aus Leder und Vollschutzbrille benutzen. Bei unvermeidbarer oder zu erwartender hoher Gasfreisetzung Isoliergerät verwenden. Bei Arbeiten in engen oder nicht ausreichend belüftbaren Räumen ist eine weitere Person außerhalb des Gefahrenbereiches erforderlich, die ggf. Rettungsalarm auslöst.

VERHALTEN IM GEFAHRFALL

Brand: Stickstoff brennt nicht. Löschmaßnahmen auf die Umgebung abstimmen. Kann ein Umgebungsbrand nicht unmittelbar gelöscht werden, Gefahrenbereich sofort verlassen. Niemals flüssigen Stickstoff zum Löschen in die Flammen gießen! Bei Freisetzung größerer Mengen Stickstoff sofort KollegInnen warnen, Gefahrenbereich verlassen und nur wieder mit Isoliergerät betreten. Falls möglich Leck abdichten. Der Gefahrenbereich darf ohne Isoliergerät erst nach gründlicher Be- und Entlüftung wieder betreten werden (falls erforderlich, Sauerstoff-Konzentration messen).

ERSTE HILFE

Einatmen: Sofort an die frische Luft bringen, falls erforderlich Atemspende mit Maske und Beatmungsbeutel. Arzt hinzuziehen! Augenkontakt: Sofort Augenarzt hinzuziehen! Hautkontakt : Steifgefrorene Körperteile nicht reiben oder bewegen, vorsichtig mit (kaltem) Wasser auftauen, Kleidung entfernen und Haut mit sterilem Verbandmaterial lose abdecken. Arzt hinzuziehen!

SACHGERECHTE ENTSORGUNG

Im Freien langsam verdampfen lassen. Dabei Gefäßöffnung lose abdecken um die Kondensation und Anreicherung von Sauerstoff aus der Luft im Flüssigkeitsrest zu vermeiden.