

## Kurzmitteilung – Nachweis von Knochenpartikeln in gedüngten Ackerböden

Note – Detection of bone particles in fertilized soils

W. BRANSCHIED

### Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit der mutmaßlichen Verunreinigung von Zuckerrübenschnitzeln mit Tierknochen wurde nach einer Methode zum mikroskopischen Nachweis von Knochenpartikeln in Bodenproben gesucht. Mit der Siriusrot-Färbung lassen sich an einem Boden, der im selben Jahr mit Tiermehl (2 t/ha) gedüngt wurde, zahlreiche Knochenpartikel (20 bis > 100 µm Durchmesser) sicher nachweisen. Morphologisch gleichen die Partikel den Knochenpartikeln, die in präpariertem Tiermehl gefunden wurden. Für die Methode ist die Verwendung nativer, ungesiebter Bodenproben erforderlich. Es wird angeraten, das Vorkommen dieser Knochenpartikel weiter zu untersuchen, da sie die bisherige Hypothese nicht unterstützen, dass Knochenfragmente in gedüngten Böden grundsätzlich von Feldnagern stammen.

### Summary

In the context of a suspected pollution of sugar beet pulp with animal bones, a method for the microscopic detection of bone particles in soil samples was developed. With Sirius-red staining, numerous bone particles (20 to > 100 µm in diameter) could be identified in a soil which had been fertilized the same year with meat bone meal (2 t/ha). Morphologically, the particles resembled the bone particles which were found in samples of prepared fresh meat bone meal. It is recommended to further examine the occurrence of these bone particles because they contrast with a present hypothesis that ascribes bone fragments in fertilized soils to wild rodents only.

---

**Schlüsselwörter** Bodenproben – Knochenpartikel – Dünger – Tiermehl

**Key Words** soil samples – bone particles – fertilizer – meat bone meal

---

### Einleitung

Nachdem an einer größeren Charge von Rübenschnitzeln aus Deutschland Knochenpartikel nachgewiesen worden waren, bestand der Verdacht, dass diese aus Tiermehlen stammen könnten, da Tiermehle nach der vorgeschriebenen Hitzebehandlung zur Düngung eingesetzt werden dürfen, sofern das Tiermehl kein Risikomaterial von Wiederkäuern enthält. Auf der anderen Seite wurde allerdings davon ausgegangen, dass die Knochenpartikel autochthon aus Nagetierknochen entstanden sein könnten (BfR, 2005; HAHN, 2005). Hieraus ergab sich als Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung die Suche nach einer Methode, mit der Knochenpartikel in Bodenproben mikro-

skopisch besser dargestellt und leichter aufgefunden werden können. Bei der Planung der Untersuchung wurde davon ausgegangen, dass für die Darstellung von Knochenpartikeln vor allem ihre organische Matrix (Kollagen) als morphologische Zielgröße geeignet sein könnte. Der mineralische Anteil des Knochengewebes (Ca-Apatit) ist im Gegensatz zur Futtermitteluntersuchung für eine selektive färberische Hervorhebung in Bodenproben problematisch, da seine Darstellung in Konkurrenz zu ebenfalls kalziumhaltigen Mineralien des Bodens selbst steht. Das gilt besonders dann, wenn native, ungesiebte Bodenproben untersucht werden. Als Darstellungsmethode wurde daher die Siriusrot-Färbung gewählt, die in histologischen Schnitten zum selektiven polarisations-

optischen Nachweis von Kollagenfasern genutzt wird (WURMBACH und POHLAND, 1964). Entsprechend setzt die Methode das Vorhandensein von histochemisch zugänglichem, also nicht fortgeschritten korrodiertem Kollagen voraus. Da die Fragestellung im eigenen Labor nicht weitergehend bearbeitet werden kann, werden die bisher erzielten Ergebnisse mitgeteilt, ohne dass sie den Anspruch einer abgeschlossenen Untersuchung erheben.

## Material und Methode

Es wurden Bodenproben eines im Frühjahr 2004 mit 2 t/ha Tiermehl gedüngten und landwirtschaftlich genutzten Bodens untersucht. Die Proben wurden im November 2004 gezogen und teils frisch, teils getrocknet (40 °C) und teils verascht (> 500 °C) angeliefert. Ergänzend wurde eine Probe frischen Tiermehls untersucht (Organischer Dünger der TBA Hardheim).

Jeweils ein Aliquot des Substrats wurde entnommen und in Schnappdeckelgefäßen (Eppendorf) mit den Reaktionsflüssigkeiten aufgeschwemmt. Der Wechsel der Flüssigkeiten erfolgt jeweils nach 30 Sekunden Zentrifugation. Nach vorausgegangenen Probefärbungen wurde die Siriusrot-Färbung (Details der Farbstofflösungen bei WURMBACH und POHLAND, 1964) nach folgendem modifiziertem Färbeschema durchgeführt:

- 3 % Essigsäure 2x spülen,
- 1 % Phosphormolybdänsäure 30 Min.,
- Siriusrot/Orange G 30 Min.,
- 3 % Essigsäure spülen
- 100 % Alkohol 2x wechseln, Xylol 2x wechseln
- Aufschlännen und Eindecken des Materials mit DePeX

Ergänzend wurden ungefärbte Proben, ebenfalls nach Entwässerung und Eindecken in DePeX untersucht.

## Ergebnisse

An den veraschten und den getrockneten Bodenproben erwies sich der Nachweis

von Knochengewebe als erschwert bzw. als nicht möglich. Hierauf wird daher nicht weiter eingegangen. An den ungefärbten frischen Bodenproben konnten nur sehr vereinzelt Knochenpartikel erkannt werden, allerdings waren an diesen die morphologischen Details des Knochengewebes besonders gut darstellbar (Abb. 1).

Die polarisationsoptische Untersuchung der gefärbten Bodenproben erwies sich insgesamt als wenig erfolgreich (ohne Abb.): Die Auswertung der Polarisationsfarben der Siriusrot-Färbung setzt voraus, dass die Schichtdicke standardisiert ist. Anders als in histologischen Schnitten war dies bei den Bodenproben naturgemäß nicht gegeben, so dass unterschiedliche Polarisationsfarben eher auf Schichtdickenunterschiede als auf Substrateigenschaften zurückzuführen waren.

Die überwiegend kräftige Rotfärbung führte auch bei der Untersuchung im einfachen Durchlicht zu einer raschen und sicheren Identifizierung der Knochenpartikel. Die Färbung erhöhte die Zahl erkannter Knochenpartikel im Vergleich zu den ungefärbten Präparaten erheblich (Abb. 2, 3). Allerdings fiel die Stärke der Färbung variabel aus. Sicher als Knochen erkannte Partikel hatten eine Größe von 20 bis mehr als 100 µm. Nachteil der Färbung war allerdings, dass sie die morphologischen Details und hier speziell die Canaliculi der Osteozyten teilweise verdeckte, weshalb Zweifelsfälle einer genauen morphologischen Abklärung bedurften und im Einzelfall trotzdem nicht sicher zuzuordnen waren (vergl. Abb. 2, Pfeil).

In den Präparaten des Tiermehls erfolgte die Färbung der Knochenpartikel zwar einigermaßen selektiv, aber nicht spezifisch (Abb. 4). Selbst Muskelgewebe zeigte eine lebhafte Rotfärbung. Die Prüfung im polarisierten Licht ließ allerdings eine eindeutige Differenzierung zu, da die Polarisation des Farbstoffes an der Muskelfaser nur gering war (nicht dargestellt). Pflanzliches Material nahm den Farbstoff praktisch nicht auf (Abb. 4). Die Partikel in Abbildung 5 haben große Ähnlichkeit zu den in Abbildung 3 dargestellten Verhältnissen.

## Diskussion

Der Nachweis von Knochenpartikeln in nativen Bodenproben mit der hier vorgestellten Siriusrot-Färbung ist prinzipiell möglich. Getrocknete oder veraschte Proben sind dagegen für die Methode schlecht bzw. gar nicht geeignet. Die Auswertung der gefärbten Präparate im einfachen Durchlicht reicht aus: Die gesuchten Partikel heben sich überwiegend durch eine deutliche Rotfärbung gegenüber dem ungefärbten mineralischen Hintergrund ab. Die polarisationsoptische Auswertung bringt keinen zusätzlichen Informationsgewinn, da die Schichtdicke der Präparate der Bodenproben nicht soweit standardisiert werden kann, dass eine differenzierte Auswertung der Polarisationsfarben möglich wäre.

Der direkte mikroskopisch-morphologische Nachweis der Knochenpartikel an ungetrockneten Bodenproben stellt also eine gangbare und methodisch wenig aufwändige Alternative zu den in der Futtermittelanalyse bzw. in der Bodenkunde bisher verwendeten Methoden des Knochenachweises dar. So ist in der EU-Methode zum Nachweis von Bestandteilen tierischen Ursprungs in Futtermitteln (KOMMISSION 2003) ein trockenes Substrat erforderlich, das durch Sedimentieren und Sieben (Maschenweite höchstens 0,50 mm) fraktioniert wird. Die optional mögliche Färbung mit Jod-/Jodkalium bezieht sich nur auf Muskelfasern, die Färbung mit Alizarinrot auf den hier zur Differenzierung weniger geeigneten Kalzium-Anteil des Knochens. In einer Untersuchung anderer Arbeitsgruppen an Bodenproben zu der hier behandelten Thematik wurde die mikroskopische Auswertung offenbar ebenfalls erst nach einer Fraktionierung des getrockneten Probenmaterials (Sieben mit Siebgrößen von 63-200 µm) vorgenommen; sie führte dementsprechend zu anderen Schlussfolgerungen als die eigene Untersuchung (HORN, 2004; BfR, 2005; HAHN, 2005). Der Nachweis an fraktionierten Proben hat gegenüber der eigenen Methode den entscheidenden Nachteil, dass nicht die Gesamtheit der Knochenpartikel, sondern nur die der ge-

wählten Siebgröße entsprechenden Partikel gefunden werden. Mit der eigenen Methode wurde ein bedeutender Anteil von Partikeln mit einem Durchmesser von <60 µm nachgewiesen, wie er auch für Tiermehle charakteristisch ist.

Da der untersuchte Boden im Jahr der Probenahme mit Tiermehl gedüngt worden war, liegt es nahe, die Knochenpartikel auf das Tiermehl und nicht auf autochthon entstandene Knochen zurückzuführen. Insbesondere die Ähnlichkeit mit Knochenpartikeln, die parallel mit derselben Methode in frischem Tiermehl dargestellt wurden, stützt diese Vermutung. Wollte man die Knochenpartikel der gefundenen Größenordnung (20 bis >100 µm) auf autochthone Nager zurückführen (vergl. BfR, 2005; HAHN, 2005), so müsste geklärt werden, wie es zu einer derart feinen und offenbar relativ gleichmäßigen Disseminierung von Nagerknochen kommt und wie sich nach Ablauf eines weitgehenden Korrosionsprozesses, der für die erhebliche Abnahme der Partikelgröße voraussetzen wäre, die kräftige Anfärbbarkeit der Partikel für Siriusrot erhalten kann. Die Siriusrot-Färbung erfordert die Anwesenheit von vergleichsweise frischem Kollagen. Sollte es sich bei den dargestellten Partikeln tatsächlich um Reste von Tiermehl handeln, so wäre zu klären, ob diese fein verteilten Partikel aus regulär erhitzten Tiermehlen (133 °C, 3 Bar Druck, 20 Minuten), die über eine Sommerperiode hinweg im Boden gelagert waren, noch den Tierartnachweis mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion zulassen. Dieser Nachweis wurde methodenkritisch seitens des BfR (2005) offenbar nicht geführt, so dass ohne weiteres die Nichtnachweisbarkeit mit dem Nichtvorhandensein von Material landwirtschaftlicher Nutztiere gleichgesetzt wurde.

Die hier vorgelegten Befunde sprechen gegen die autochthone Entstehung der dargestellten Knochen und eher dafür, dass Tiermehle durchaus in Ackerböden nachweisbar sein können. Daher sind weitere Arbeiten zu diesem Thema unter Anwendung der hier dargestellten Methode anzuraten.

## Danksagung

Herrn Dr. Dietmar Horn, BGD-Bodengesundheitsdienst GmbH, 97199 Ochsenfurt, danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung der Boden- und Düngerproben.

## Literatur

BfR (2005): Knochenfragmente in Zuckerrübenschnitzeln. Aktualisierte Stellungnahme Nr. 005/2005 des BfR vom 27. Januar 2005. 8 Seiten

HAHN, H. (2005): Rückverfolgbarkeit bei Futtermitteln - Beitrag der Futtermittelmikroskopie.

Mitteilungsbl. Fleischforschung Kulmbach 169, 185-193

HORN, D. (2004): Schriftl. Mitteilung vom 23.12.04 (Dr. D. Horn, BGD, 97199 Ochsenfurt)

KOMMISSION (2003): Richtlinie 2003/126/EG der Kommission vom 23. Dezember 2003 über die Analysenmethode zur Bestimmung der Bestandteile tierischen Ursprungs bei der amtlichen Untersuchung von Futtermitteln. ABl. L 339 vom 24.12.2003, p.78-84

WURMBACH, H., und H.-L. POHLAND (1964): Der gleichzeitige histologische Nachweis saurer Mukopolysaccharide und von Kollagen in einer neuen Übersichtsfärbung. *Z. wiss. Mikroskopie* 66, 171-179

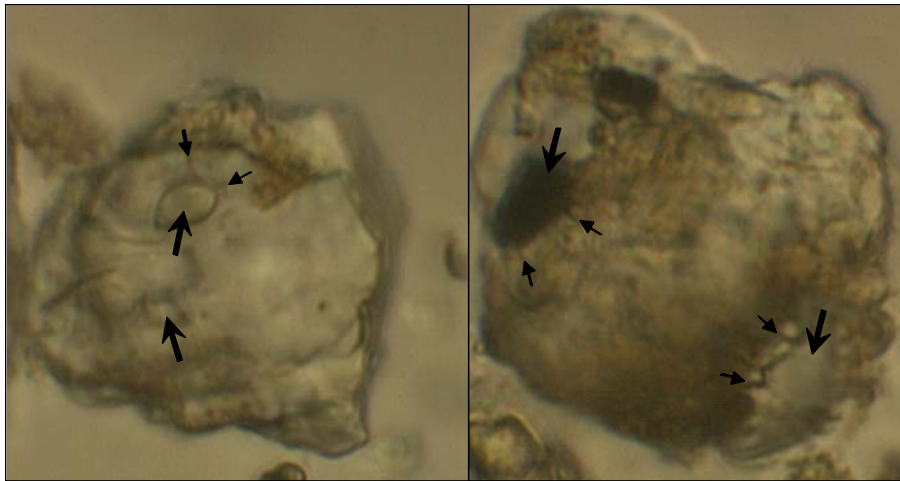


Abb. 1: Zwei Knochenpartikel (ungefärbt) aus einem mit 2 t Tiermehl/ha gedüngten Ackerboden: Die Canaliculi (kleine Pfeile) der Osteocyten als das entscheidende diagnostische Merkmal sind gut erkennbar. Osteocytenlakunen sind durch große Pfeile markiert. Das Auffinden der Partikel ist am ungefärbten Präparat erschwert. (Obj. 40x)

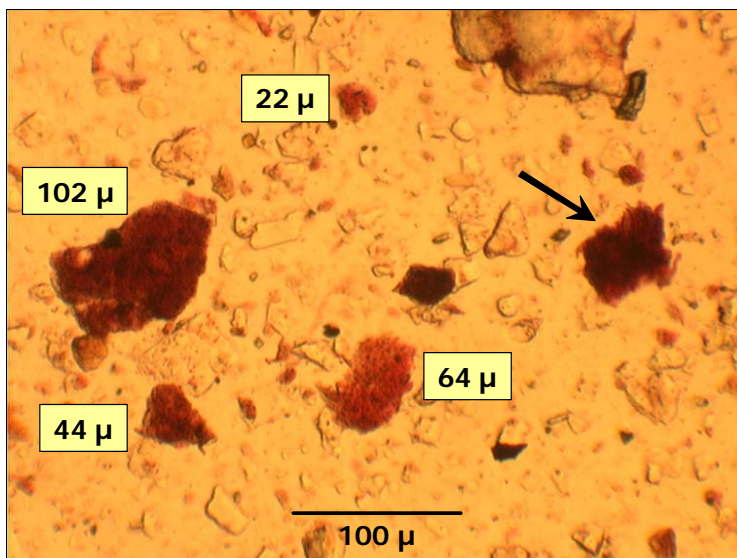


Abb. 2: Mehrere rot gefärbte Partikel sind gut erkennbar, von denen die vier durch Größenanzeige markierten zweifelsfrei als Knochen identifizierbar sind (vgl. Abb. 3). Auch die kräftig gefärbte Partikel (Pfeil rechts) dürfte Knochen sein. Inwieweit die gefärbten Partikel <20 μm Knochen darstellen, ist morphologisch nicht sicher auszumachen. Der Anteil der Bodenminerale bleibt offensichtlich ungefärbt. (Siriusrot; Obj. 16x)

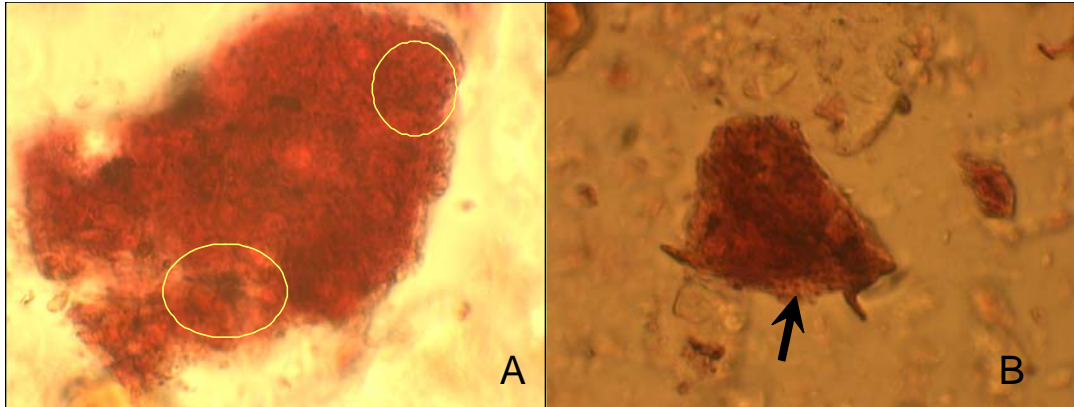


Abb. 3: Zwei Partikel aus Abb. 2 (Siriusrot; Obj. 40x)  
 - A (102 µm): Osteozytenlakunen (Ellipsen) mit gut identifizierbaren Canaliculi  
 - B (44 µm): vor allem ersichtliche „Punktierung“ aufgrund zahlreicher, senkrecht zur Bildebene getroffener Canaliculi (besonders an der durch Pfeil markierten Stelle)

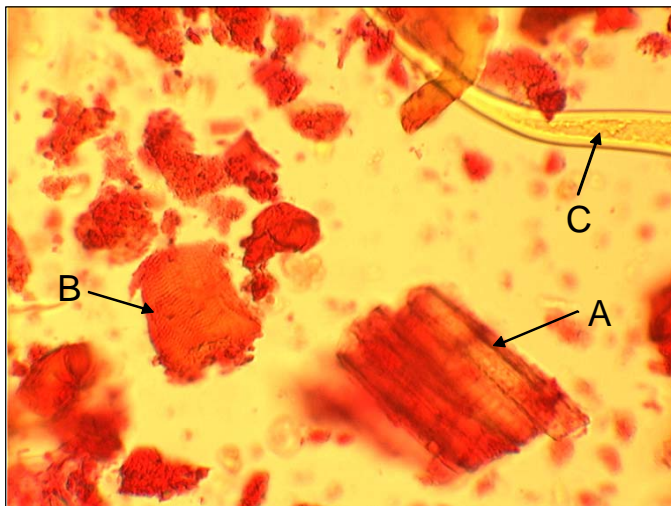


Abb. 4: Das Färbungsbild von Tiermehl ist frischer und brillanter als das der Bodenproben. Allerdings wird deutlich, dass die Färbung nicht spezifisch, sondern nur selektiv für Kollagen ist. Von drei identifizierten Partikeln ist nur **A** tatsächlich Knochen, bei **B** liegt ein Stück Muskelgewebe (Querstreifung im Original gut sichtbar), bei **C** pflanzliches Gewebe. **A** und **B** sind im Durchlicht farblich kaum differenziert, wären im polarisationsoptischen Bild aber gut zu unterscheiden. Lediglich **C** ist völlig ungefärbt. (Siriusrot; Obj. 16x)

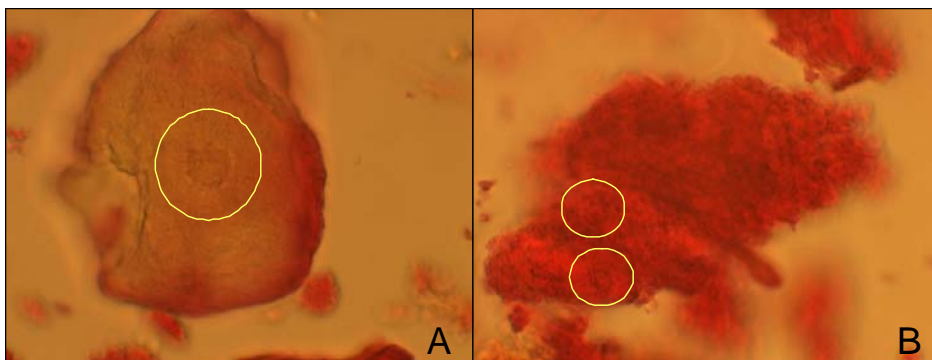


Abb. 5: Details von Knochenpartikeln aus Tiermehl (Siriusrot; Obj. 40x)  
 - A: Osteozytenlakune (Ellipse) mit gut sichtbaren Canaliculi, in  
 - B: kleiner erscheinende Osteocytenlakunen (Ellipsen). Die Größenunterschiede könnten durch unterschiedliche Aufsicht auf die spindelförmigen Lakunen bedingt sein. Wie auch in den Bodenproben ist die Anfärbbarkeit variabel. Die Ähnlichkeit hinsichtlich der Größe und Form mit den im Boden gefundenen Partikeln ist beeindruckend

