

**Biom mineralisation: Struktur und Wirkung von  
SiO<sub>2</sub>-Silica in Poaceae und ihr Vorbild für die  
Werkstofftechnik**

**Dissertation zur Erlangung des  
akademischen Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)**

vorgelegt von

Siroky, Stephan

an der

Universität  
Konstanz



Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion

Fachbereich Chemie

Konstanz, 2020

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2020

1. Prof. Dr. Sebastian Polarz

2. Prof. Dr. Helmut Cölfen

Eine Eiche und ein Schilfrohr stritten über ihre Stärke und Festigkeit.

„Jeder Windhauch bewegt dich hin und her“, sagte wegwerfend die Eiche zum Rohr.

Dieses entgegnete kein Wort.

Als ein heftiger Sturm aufkam, stemmte die Eiche sich ihm entgegen und wurde geknickt.

Das Schilfrohr aber beugte und wiegte sich im Wind und blieb unbeschädigt stehen.

Nach Äsop, 6. Jahrhundert v. Chr.



## *Danksagung*

An erster Stelle gilt mein Dank **Sebastian Polarz**, der mit der Übernahme der Betreuung die Möglichkeit eröffnet hat, die Dissertation zu Ende zu führen. Damit danke ich auch für die freundliche und gute Zusammenarbeit bei unterschiedlichsten Aufgaben in den letzten Jahren.

Ebenso gilt mein Dank **Helmut Cölfen**, sowohl für die Übernahme des Zweitgutachtens als auch für die freundliche und produktive Zusammenarbeit im SFB1214.

Nicht weniger gilt mein Dank **Jürgen Felsche**, der durch die ursprüngliche Ausgabe des Themas und die anfängliche Betreuung entscheidenden Einfluss auf diese Arbeit hatte. Durch seine guten Kontakte zu den Arbeitsgruppen **Samoson, Fratzl, Reusser** und **Günther** hat er den Zugang zu Methoden eröffnet hat, die für diese Arbeit essentiell waren.

Auch Herrn **Gerhard Müller** danke ich für die Bereitschaft der Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ganz herzlich möchte ich **Ulrich Haunz** danken, der mir bei den Einstellungen des MAS-NMR für die Messungen in Konstanz immer hilfreich zur Seite stand. Die gemeinsame Anspannung beim Anspinnen der Rotoren wird mir im Gedächtnis bleiben.

In der Arbeitsgruppe Felsche danke ich **Gerhard Wildermuth**, der durch seine Erkrankung plötzlich und viel zu früh ausschied, Alfred Straub für die Hilfe bei Problemen rund um die Röntgendiffraktometer sowie meinen Kollegen **Mathias Katchebesibo, Seung Kwon Lee** und **Ulrich Wachter**. Mit euch allen war die Zusammenarbeit immer angenehm.

Auch allen aktuellen und vergangenen **Mitgliedern der Arbeitsgruppe Polarz** danke ich sehr herzlich, dass ihr mich so freundlich in euren Kreis aufgenommen habt.

Im SFB1214 danke ich dem gesamten Vorstand für eine gute Zusammenarbeit und insbesondere meinen Kolleginnen **Susanne Spaeter** und **Desiree Bruttel**, sowie im PAC **Brigitte Bössenecker** und **Elana Harbalik** für eine sehr gute Zeit.

Ganz großer Dank gilt meinen Eltern **Karl und Ingrid Siroky**, die mich beide immer und bei allem unterstützt und gefördert haben.

Da zu einem Leben ja auch das private Umfeld gehört, möchte ich mich ebenso und nicht zuletzt bei meinen Freunden für eine wirklich gute Zeit bedanken. Dies gilt für alle Segler, insbesondere die des Ausbildungsteams des Hochschulsports, für alle Taucher, auch hier

besonders die Tauchlehrer Kollegen und Vereinsaktiven, sowie das Kanupoloteam des Hochschulsports. Ihr habt mir den sportlichen Ausgleich sehr angenehm gestaltet.

Auch wenn die folgenden Personen oft Bestandteil der oben genannten Gruppen sind, so möchte ich ihnen hier auch noch einmal Explizit für ihre Freundschaft, ihre Unterstützung und für eine sehr gute Zeit während der Doktorarbeit danken: **Till und Sandra Vogel, Daniel und Ildico Guhr, Thorben und Johanna Schütz, Peter Keim, Oliver Ristow, Sören Kumkar, Jochen Kerbusch, Matthias Eisenmann und Notker Dannenmayer.** Einen ganz herzlichen Dank an Euch!

## *Inhaltsverzeichnis*

1. Einleitung und Allgemeines .....	1
1.1 Allgemeine Definitionen .....	3
1.2 Anatomie des Bambus .....	6
1.3 Verwendete Methoden .....	8
2. Stand der Forschung .....	12
2.1 Silica in höheren Pflanzen .....	15
2.2 Anwendungen von Biomineralisationsverfahren .....	19
3. Vorarbeiten .....	21
4. Lücke in bisherigen Arbeiten und Aufgabenstellung .....	23
5. Ergebnisse und Diskussion .....	28
5.1 Vergleiche zwischen Pflanzenspezies .....	31
5.2 Verteilung der chemischen Elemente im Gewebe .....	36
5.3 Strukturanalyse I: Röntgendiffraktometrie und Röntgenbeugung .....	43
5.4 LA-ICP-MS Experimente .....	47
5.5 Strukturanalyse II: MAS-NMR-Untersuchungen .....	65
5.6 Si-Anreicherungs-Experimente .....	83
5.7 Mechanische Experimente zur Zugfestigkeit .....	86
6. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick .....	95
7. Literatur .....	103
8. Experimentelles .....	114

## *1. Einleitung und Allgemeines*

Die oxydischen Verbindungen des Siliciums werden schon seit Jahrtausenden von Menschen in den verschiedensten Erscheinungsformen im Alltag genutzt. Kulturhistorisch begann es mit dem Anfertigen von Werkzeugen durch die Verarbeitung von Feuersteinen (Flint, Silex, SiO<sub>2</sub>-Silica Verbindungen mit Strukturen zwischen Opal CT und amorphen SiO<sub>2</sub>) für Pfeilspitzen, Klingen und Faustkeile im Mesolithikum, über den Gebrauch von Keramiken (zum Beispiel die Hallstein Kultur oder die Schnurkeramiker) im Neolithikum am Übergang zur Bronzezeit, zur Herstellung von Gläsern bis hin zu modernen Hochleistungskeramiken zum Beispiel im Bereich von Isolatoren, Elektronikbausteinen oder der Hitze- und Kältetechnik.

Die Biomineralisation kann zusätzliche Synthesestrategien und –produkte vorweisen, die über ihre Verwendung in hierarchischen Strukturen Eigenschaften aufweisen, die mit den klassischen synthetischen Methoden nicht zugänglich sind. Mit dem System Graspflanze (Poaceae) steht ein Biokomposit zur Verfügung, das bereits in nativem Zustand als Material genutzt wird (zum Beispiel Reed-Deckung von Dächern, Bambus für Gerüste oder als Stahlersatz in Betonbauten [Ghavami 2005] und Inspiration für neue Materialien bietet. Neue Materialien nach dem Vorbild der Poaceae synthetisch verfügbar zu machen ist der Grund für die analytischen Untersuchungen in dieser Arbeit.

### *Motivation Biomineralisation*

Die Biomineralisation ist ein inspirierendes und herausforderndes Themenfeld, mit dem sich viele wissenschaftliche Fachbereiche, vor allem die Chemie, Materialwissenschaften, Biologie und die Ingenieurwissenschaften, intensiv beschäftigen [Mann 2001, Baeuerlein 2000, Baeuerlein 2007, Behrens/Baeuerlein 2007, Müller 2003, Epple/Baeuerlein 2007]. Grund dafür ist, dass die lebende Natur lange vor der technologischen Entwicklung bereits Strategien entwickelt hat, die mit beschränkten Ressourcen und geringem Energieaufwand zu erstaunlichen Lösungen für Materialien mit speziellen Eigenschaften geführt haben. Ziel ist es, diese Strategien und Synthesewege zu verstehen, damit die zugrundeliegenden Prinzipien auf neue künstliche Materialien übertragen werden können.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Biomineralisation von  $\text{SiO}_2$  Silica in Pflanzen. Im Fokus der Untersuchungen steht dabei nicht die Bildung großer mineralischer Ablagerung in Form von Phytolithen (Pflanzensteine, Mineralische Ausscheidungen in und neben Pflanzenzellen) [Klinowski 1998], sondern der funktionale Zellschutz. Hier schaffen Pflanzen, insbesondere Pflanzen der Familie der Poaceae (Graspflanzen, Süßgräser, ehem. Gramineae), die Einbettung von flexiblen aber mechanisch stabilen Schutzschichten in ihren Zellwänden. Allein die passgenaue Ausbildung solcher  $\text{SiO}_2$  Silica-Schichten stellt eine synthetische Herausforderung dar, die zu erforschen einen besonderen Erkenntnisgewinn verspricht. Die Synthese zudem unter den energetischen Rahmenbedingungen eines lebenden Pflanzensystems zu lösen, ist eine weitere Fragestellung, die bisher nicht geklärt werden konnte. Eine Aufnahme gelöster Kieselsäure rund um pH 7 mit maximal 10ppm Löslichkeit scheint im Rahmen des Wasserumsatzes nicht allein ausreichend zu sein, um die Aufnahme und Anreicherung von  $\text{SiO}_2$ -Silica in Poaceae zu erklären [Gruher 2002, Iler 1979].

Die drei Fragekomplexe, die sich um die Aufklärung dieser Form der Biomineralisation von  $\text{SiO}_2$ -Silica in Poaceae entspannen, nämlich

- 1) Verfügbarkeit und Aufnahme von  $\text{SiO}_2$  in geeigneter Struktur und Menge,
- 2) Analyse der Verteilung und Struktur der inkorporierten  $\text{SiO}_2$  Silica Verbindungen im Hinblick auf ihre Struktur-Wirkungsbeziehungen und
- 3) die synthetischen und strukturdirigierenden Faktoren bei der Bildung funktionalen  $\text{SiO}_2$ -Silicas und nutzbarer  $\text{SiO}_2$ -Biokomposite,

wurden dabei mit Schwerpunkt auf Punkt 2) bearbeitet, der Verteilung und Struktur von  $\text{SiO}_2$ -Silica in den Zellwänden von Poaceae, die eine funktionierende Zellaktivität und gleichzeitig einen mechanischen Schutz erlauben. Im Mittelpunkt steht die Aufklärung der Struktur der  $\text{SiO}_2$ -Silica Materialien in den funktionalen Pflanzenteilen Halm und Blatt von Poaceae. Ziel ist, durch das Verständnis des Aufbaus von gering konzentriertem Silica in Silica-Biomasse-Systemen Wege zu neuen Materialien zu eröffnen, die eine Kombination von geringer Dichte bei hoher Zugfestigkeit erlauben. Diese Arbeit stellt einen ersten Vorstoß in Bereiche bisher nicht erforschter Silica-Biopolymere dar, die den Auftakt zur Erforschung und Entwicklung neuer Werkstoffe im natürlichen Kreislauf bilden soll.

Dabei spielt vor allem ein relativ geringer Anteil an 3<sup>dim</sup> vernetztem SiO<sub>2</sub>-Silica eine Rolle, um flexible Strukturen zu bewahren und Versprödung zu vermeiden.

Unter anderem im Rahmen des DFG Schwerpunktprogramms SPP1117 wurde die Biomineralisation von SiO<sub>2</sub>, insbesondere im Bambus, in dieser Arbeit untersucht. Durch die Konzeption des SPP1117 wurden auch die Rahmenbedingungen für den Untersuchungskomplex gegeben. Die Wahl fiel, untermauert durch Vorarbeiten in der Gruppe durch Gruler, Schuffenhauer und Riemann, auf das System SiO<sub>2</sub> in der Unterfamilie der Bambusoideae, insbesondere an Bambuspflanzen der Art *Phyllostachys viridiglaucescens* (*Phyll.v.g.*) und *Phyllostachys edulis* (*Phyll.ed.*). Zu den Rahmenbedingungen gehörte der Ausschluss von Anreicherungsexperimenten und Isotopenmarkierungen an lebenden Systemen, so dass für die Analytik nur natürlich verfügbare Pflanzen zur Verfügung standen.

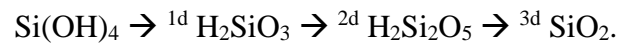
### ***1.1 Allgemeine Definitionen:***

#### *Silicium und Silikate:*

Silicium ist neben Sauerstoff und Wasserstoff eines der häufigsten Elemente der Erdkruste. Es liegt natürlich jedoch ausschließlich in oxydischen Formen vor. Silicium ist in allen diesen Verbindungen ein Tetraeder Zentrum, das von vier Sauerstoffatomen umgeben ist. Der Bindungswinkel der Si-O-Si kann dabei auf Grund eines sehr flachen Potentialtopfes äußerst geringem Energieaufwand im Bereich von 120° bis 170° variieren [O'Keefe/Hyde 1977, Iler 1979, Devine/Arndt 1987]. Die daraus resultierende Bindungswinkellabilität führt sowohl zu der Neigung aus der Schmelze bevorzugt Gläser zu bilden, als auch zu einer Anpassungsfähigkeit an vorgegebene Strukturen, die zur Bildung von Gast Wirt Strukturen genutzt werden können.

#### *Silica:*

Unter dem Begriff Silica werden die Polykondensationsprodukte der Kieselsäure zusammengefasst, die je nach Polymerisierungsgrad auch endständige OH-Gruppen enthalten können. Formal beginnt die Reihe mit der Kieselsäure, diese ist jedoch praktisch nicht existent, sondern es bilden sich im Gleichgewicht sofort Di- und Trimere [Iler 1979]. Hauptbestandteile dieser Kondensationsreihe sind die folgenden Produkte:



Die Zwischenstufen können dabei als Ketten-, Band- und Gerüststrukturen vorliegen [Iler 1979]. Viele dieser Zwischenstufen finden sich in Mineralien auch als polyanionische Strukturen in Silikaten wieder. Hier ergibt sich eine salzähnliche Gesamtstruktur aus Si-O Polyanionen und (Poly-) Kationen meist in Form von Alkali- und Erdalkalimetallen.

Die thermodynamische stabilste Form besteht bei kristallinen Gitterstrukturen vierfach kondensierter sauerstoffverbrückter Silicium Zentren, jedoch sind im Bereich der Zwischenschritte eine Vielzahl von unterschiedlichen Kombinationen aus Ringweiten denkbar. Die bevorzugte Ringgröße liegt im Bereich von Ringen aus 4 bis 8 Silicium Atomen. Über die Kombination aus Fünfringen mit Sechsringen sind kugelförmige Strukturen zugänglich. Die kleinste Kugelgröße ergibt sich aus einem  $5^{12}$  Pentagondodekaeder, also einem isometrischen Körper, der aus zwölf Fünfecken besteht. Schichtweiser Aufbau, ausgehend von den  $5^{12}$  Partikeln, kann so zu den Grundbausteinen für globulare Partikel wie Silica Kugeln aus dem Stöber-Prozess [Stöber 1968, v.Blaaderen 1992] führen. Im Bereich der Biomineralisation bieten flexible Nanopartikel, welche die Pflanze über den Wasserkreislauf aufnimmt, die Möglichkeit sich an vorhandene biologische Strukturen anzupassen. Kieselalgengehäuse weisen dazu vielfältige Strukturen auf.

Die Flexibilität der Bindungswinkel ermöglicht darüber hinaus bei Verkieselungsprozessen einen sukzessiven Austausch von Biomaterial durch Silica. Dies ist inzwischen im Bereich der Diatomeen inklusive der zugehörigen Proteinsysteme für die Synthese aus (Poly-) Kieselsäure geklärt. [Sumper/Kröger 1999, 2002, 2004, Tacke 1990]

### *Hierarchische Strukturen*

Hierarchische Strukturen zeichnen sich durch ein Ordnungssystem unterschiedlicher Strukturen aus, die sich gegenseitig beeinflussen. Der Aufbau der Strukturen erfolgt stufenförmig, wobei der Einfluss auf die benachbarten Stufen stärker ist, als auf entferntere Stufen. In biologischen Systemen lassen sich die folgenden Stufen steigenden Größe und Komplexität aufzeigen.

- Atomare- und molekulare Stufe

Auf dieser kleinsten funktionalen Stufe biologischer Systeme finden die chemischen Reaktionen statt. Hier erfolgt die Synthese und Abbau der Stoffwechselprodukte sowie der Energiehaushalt. Die Größenskala der Strukturen liegt im Bereich von  $10^{-10}$  –  $10^{-9}$  m und ist damit optischen Verfahren nicht zugänglich. Diese Hierarchiestufe ist das klassische Arbeitsfeld der Biochemie und für viele Prozesse gut untersucht.

- Oligomere und polymere Stufe

Die zweitiefste Stufe ist die der Oligomere und Polymere. Es handelt sich bereits um Verbindungen, die aus einer Vielzahl von Einzelbausteinen aufgebaut sind und in den biologischen Organismen konstruktive und steuernde Funktionen ausüben. Beispiele auf dieser Ebene sind die DNA, Proteine und Strukturbausteine wie Cellulose, Lignin oder Collagen. Diese liegen in Größenbereichen von  $10^{-9}$  –  $10^{-7}$  m und sind zum Teil gut erforscht. Analytisch ist dieser Bereich entweder biochemisch über den Abbau in die Einzelbestandteile oder über strukturanalytische Methoden wie die Einkristall-Röntgenstrukturanalyse und NMR-Methoden zugänglich. Dies betrifft vor allem die aktiven Verbindungen wie Proteine und DNA. Bildgebende Verfahren sind nur äußerst begrenzt einsetzbar.

- Überstrukturen polymerer Baueinheiten

Quartäre Strukturen verschiedener Wicklungen und Faltungen sowie Kombinationen verschiedener Polymere bauen einzelne funktionelle Bestandteile der Zellen und Organe auf. Da es sich zum Teil um Komposite handelt, ist die Analytik erschwert. Einkristall-Röntgenstrukturanalyse ist nicht mehr möglich. Informationen können zum Teil noch über Röntgen-Streuexperimente, zum Beispiel bei Cellulose [Fratzl 1998], und über NMR-Verfahren [Graetsch 1994] erhalten werden. Heterogen aufgebaute Strukturen wie die Zellwände bereiten hier bereits größere Schwierigkeiten und liefern keine scharfen Signale. Die Strukturen liegen im Größenbereich von  $10^{-8}$  –  $10^{-6}$  m und fallen in die Größenordnung der mesoskopischen Strukturen. Bildgebende Verfahren sind begrenzt einsetzbar, wurden in den letzten Jahren jedoch deutlich verbessert, so dass sie in diesem Größenbereich inzwischen auch analytisch zur Verfügung stehen.

- Organellen und Zellen

Aufgebaut aus den zuvor genannten Stufen finden sich nun die mikroskopischen Strukturen. Diese bilden häufig eigenständige Funktionseinheiten, die sich bereits von ihrer Umgebung abgrenzen. Im Falle von Einzellern handelt es sich bereits auf dieser Stufe um vollständige Lebewesen. Die Größenordnung liegt im Bereich von  $10^{-6}$  bis  $10^{-3}$  m und ist damit bereits lichtoptischen Methoden zugänglich. Bei dieser Größenordnung beginnt das Feld der klassischen Biologie.

- Organe

Zellen bestimmter Typen verbinden sich zu Organen mit bestimmten physiologischen Aufgaben. Hier entsteht eine übergeordnete Gesamtfunktion aus den einzelnen, spezialisierten Zellfunktionen. Die Größenordnung beläuft sich auf einen Bereich von  $10^{-3}$  –  $10^0$  m.

- Organismus

In höheren Lebewesen erfolgt schließlich der Aufbau eines gesamten Organismus aus dem Zusammenspiel der einzelnen Organe. Dieser makroskopische Bereich wird durch seine Morphologie beschrieben und stellt die oberste Stufe der biologischen Analyse dar. Der Gesamtorganismus liegt im Bereich von  $10^{-3}$ - $10^2$  m.

## ***1.2 Anatomie des Bambus [Liese 1998]***

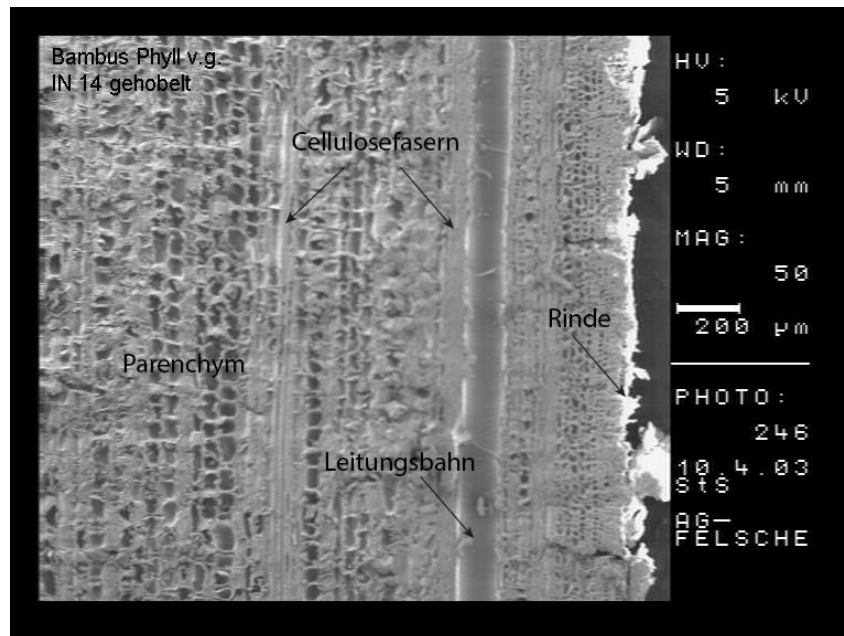
Rhizom:

Das Wurzelgeflecht des Bambus, aus dem die einzelnen Halme sprießen, wird Rhizom genannt. Es verbindet unterirdisch und teilweise an der Erdoberfläche alle zu einem Organismus gehörenden Pflanzenhalme.

Halm:

Da Bambus zu den Graspflanzen (Poaceae) zählt, besitzt er keinen Stamm, sondern einen innen hohlen Halm. Dieser Halm wächst bereits in seinem finalen Durchmesser aus dem Spross, ein sekundäres Dickenwachstum wie bei Bäumen findet nicht statt. In regelmäßigen Abschnitten wird der Halm durch Noden (Knoten) eingeschnürt, die den Hohlraum des Halmes unterbrechen. An den Noden beginnen auch abzweigende Äste.

Der Halm besteht an der Außenseite aus einer Rinde mit Wachsschicht. Innerhalb der Rinde beginnt das Parenchym, ein Gewebe aus Pflanzenzellen mit hohem Lignin Anteil, das den Halm aufbaut. Durchzogen ist das Parenchym von Cellulose Fasern, die in Wachstumsrichtung der Pflanze ausgerichtet sind und rund um die Leitungsbahnen für Flüssigkeiten besonders konzentriert auftreten. Die Leitungsbahnen (vaskuläre Bündel) finden sich in Gruppen von 3-4 parallel verlaufenden, durch Cellulose Fasern getrennte Leitungen. In den Leitungsbahnen findet getrennt voneinander sowohl der Transport von Wasser und löslicher Komponenten vom Rhizom in und durch die Pflanze statt (Phloem), als auch der Transport von in der Pflanze produzierten organischen Komponenten (z.B. Zucker, Proteine), dem Pflanzensaft, statt (Xylem). Ein Austausch zwischen den Leitungsbahnen ist im Bereich der Noden möglich.



**Abb. 1.1:** Längsschnitt durch einen Halm von *Phyll.v.g.*. Sichtbar sind die verschiedenen Komponenten des Halmes, Parenchymgewebe, Cellulose Fasern, eine angeschnittene Leitungsbahn sowie rechts außen die Rinde.

#### Blatt:

Die Blätter, die Orte der Photosynthese des Bambus, sind mit dem Halm beziehungsweise den Ästen über den Stiel verbunden, der hauptsächlich aus vaskulären Bündeln und Cellulose besteht. Diese Leitungsbündel verteilen sich über das Blatt. An den Außenseiten bildet eine obere und untere Epidermis Zellschicht mit einer Wachsschicht die Haut des Blattes. Auf der Unterseite befinden sich in der Epidermis Schicht die Spaltöffnungen des Blattes. In der Mitte

besteht das Blatt aus einem lockeren Gewebe von Zellen, in denen die Photosynthese abläuft, dem Schwammgewebe.

### ***1.3 Verwendete Methoden***

#### *MAS-NMR (Magic Angle Spinning – Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)*

Neben der seit langem bekannten Flüssig-NMR hat sich in den letzten 30 Jahren auch die Messung an Festkörperstrukturen etabliert. Damit steht eine weitere Methode zur Strukturermittlung zur Verfügung, die neben Informationen zu kristallinen Proben auch Ergebnisse zu (röntgen-) amorphen Strukturen liefert und so eine gute Ergänzung zu den röntgenografischen Methoden darstellt.

Möglich wurde die Kernspinnmagnetresonanz an Festkörpern dadurch, dass die Probe im Magnetfeld um einen so genannten „magischen Winkel“ gedreht wird (Magic Angle Spinning = MAS). Beim magischen Winkel handelt es sich um einen Winkel von  $\approx 54,7^\circ$  zur Richtung des Magnetfeldes. Bei Flüssigkeiten ist dies nicht notwendig, da hier die Konzentrationen geringer sind und die Mittelung durch die Molekularbewegung im Lösungsmittel erreicht wird. Bei Festkörpern ist die Rotation um diesen Winkel notwendig um über die Kern Dipol-Dipol Wechselwirkungen und Anisotropien in der elektronischen Abschirmung zu mitteln. Ohne MAS-Rotation erhält man in Festkörperspektren ein breites Pake-Signal. Dieses Signal wird schmaler, je höher die Rotationsgeschwindigkeit wird. Ist die Rotationsfrequenz höher als die Dipol-Dipol-Wechselwirkung erhält man nur noch ein scharfes Signal. Ist sie noch unterhalb der Wechselwirkungsfrequenz so erhält man Rotationsseitenbanden mit einem der Rotationsfrequenz entsprechenden Abstand zum Hauptsignal.

Die hohe Rotationsfrequenz im Bereich von 4 kHz bis zu über 100 kHz erfordert entsprechend stabile Rotoren, die den Kräften standhalten, und nicht mit den zu untersuchenden Isotopen wechselwirken. Häufig eingesetzte  $\text{SiN}_4$ -Rotoren können für Silicium- und Aluminiummessungen nicht verwendet werden, da sie zum einen selbst Silicium enthalten und zum anderen Spuren von Aluminium ebenfalls enthalten sein können. Daher kommen für diese beiden Kerne nur  $\text{ZrO}_2$ -Rotoren in Frage. Da die Empfindlichkeit im Festkörper-NMR geringer als im flüssig-NMR ist, werden deutlich größere Stoffmengen

gebraucht. Daher haben Rotoren größere Durchmesser als NMR-Röhrchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Rotoren mit 4 mm, 7 mm und 10 mm Durchmesser verwendet.

-  $^{29}\text{Si}$ -MAS-NMR

Für die Silicium-NMR wird der  $^{29}\text{Si}$ -Kern verwendet. Dieser hat mit 4,67% Isotopenanteil ein vergleichsweise gutes Verhältnis zu den nicht NMR-aktive Si-Kernen und mit einem Wert von 0,49 eine akzeptable relative Rezeptivität ( $^1\text{H}=62,9$ ;  $^{13}\text{C}=1$ ;  $^{27}\text{Al}=1220$ ) und damit Messempfindlichkeit.

Diese vorteilhaften Eigenschaften des  $^{29}\text{Si}$ -Kernes werden durch eine recht langsame Relaxationszeit, die bei Messungen zu langen Wartezeiten führen kann, geschmälert. So sind bei Messungen Relaxationszeiten von 300s – 500s zwischen den Pulsen einzuhalten um nicht zu einer Anreicherung oder Sättigung des angeregten Zustandes zu gelangen und damit die Empfindlichkeit der Messung zu reduzieren.

-  $^{27}\text{Al}$ -MAS-NMR

Der NMR-aktive Aluminium Kern ist das Isotop  $^{27}\text{Al}$ , das mit einer natürlichen Häufigkeit von 100% vorkommt und so ein sehr geeignetes Element für NMR-Experimente ist. Außerdem hat  $^{27}\text{Al}$  eine schnelle Relaxation, so dass schnelle Pulsfolgen möglich sind und eine relative Rezeptivität im Vergleich zu  $^{13}\text{C}$  von 1220. Da der Kern jedoch einen Kernspin von  $5/2$  aufweist, ist eine vollständige Mittelung der Wechselwirkungen durch die Rotation um den magischen Winkel nicht möglich. Festkörper NMR Messungen von  $^{27}\text{Al}$  weisen daher eine hohe Zahl von Rotationsseitenbanden auf.

In Silica-Festkörperverbindungen kommt Aluminium in zwei verschiedenen Koordinationen vor. Ersetzt es in der Tetraeder-Netzwerkstruktur Positionen von Silicium, so befindet es sich ebenfalls in einer tetraedischen Koordinationsumgebung und zeigt im NMR-Signal eine chemische Verschiebung von 80 ppm, die durch die lokale Geometrie, Bindungsumgebung sowie durch Gegenionen beeinflusst wird. Das Signal der oktaedrisch koordinierten Al-Atome in Alumosilikaten wie zum Beispiel Glimmern und Tonen hat eine chemische Grundverschiebung von 0 ppm.

- Kreuzpolarisierung

Kreuzpolarisierung (engl. cross polarisation) ist eine NMR-Technik, bei der nicht nur der zu untersuchende Kern angeregt wird, sondern auch die in der Probe vorhandenen  $^1\text{H}$ -Protonen.

Anschließend werden die Anregungen der Protonen mit einem Kontaktpuls auf den zu untersuchenden Kern übertragen. Dies führt zu einer verbesserten Messempfindlichkeit des untersuchten Kernes. Die Empfindlichkeit ist damit abhängig von der Zahl der benachbarten Protonen wodurch es bei der  $^{29}\text{Si}$  Messung an Silica Proben zu Intensitätsverschiebungen zwischen den Q1 - Q4 Signalen kommt. Daher empfiehlt sich diese Methode nicht für die Ermittlung von Strukturinformationen bei Silica Proben.

#### *Anreicherungsexperimente*

Da die nativen Proben, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, nur einen sehr geringen Anteil an Silicium enthielten (ca. 0,01 – 5 Gew. %), mussten Wege zur Anreicherung des Si-Anteils gefunden werden. Dazu bot sich die thermische Entfernung der organischen Bestandteile an. Ein mögliches Problem dieser Methode konnte die strukturelle Veränderung der Si-O-Verbindungen bei Temperaturen oberhalb von 400-500°C in Anwesenheit von Alkali- und Erdalkaliverbindungen sein. Um strukturelle Veränderungen auszuschließen wurde an einem Silicium reicheren Referenzsystem (Dinkel) eine Messreihe von Raumtemperatur bis 475°C durchgeführt. (siehe Ergebnisse MAS-NMR). Hier zeigten sich nur geringe Veränderungen, so dass diese Methode der Anreicherung auch für alle weiteren Proben verwendet wurde und Messungen an den entsprechenden Proben erst praktikabel wurden.

#### *Röntgenbeugung und Röntgenstreuung*

Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen mit einer Wellenlänge von  $10^{-9}$  bis  $10^{-11}$  m. Diese Wellenlänge liegt im Bereich der Atom-Atom Abstände in Festkörpern und Molekülen. Damit erfüllen sie eine grundsätzliche Voraussetzung, um für Beugungs- und Streuexperimente genutzt werden zu können. Technische Voraussetzung ist eine Röntgenlichtquelle, die möglichst monochromatische Strahlung mit einer ausreichenden Intensität zur Verfügung stellt. Dies können sowohl über Röntgenröhren erzeugte Strahlen als auch Synchrotronstrahlen sein.

##### *- Pulver-Röntgenbeugung*

Ein Standardverfahren bei der Strukturermittlung von Festkörpern ist die Pulver-Röntgenbeugung. Bei diesem Verfahren wird ein kristallines Pulver so in einen Röntgenstrahl gebracht, dass die Kristallite alle möglichen Winkel zum Strahl einnehmen und so die Lagenstatistik

ausreichend gegeben ist. Dabei gibt es unter allen Beugungswinkeln, für die die Bragg-Gleichung  $n\lambda = 2d \sin\Theta$  ( $n$ =Beugungsordnung,  $\lambda$ =Wellenlänge,  $d$ =Abstand der Beugungsebenen,  $\Theta$ =Beugungswinkel) erfüllt ist, eine konstruktive Interferenz und damit ein Signal. Die Schärfe des Signals hängt dabei von der Größe der kristallinen Bereiche ab. Üblicherweise werden in diesem Verfahren Winkelbereiche von  $4-100^\circ$   $2\Theta$  betrachtet. Anschließend kann aus den erhaltenen Reflexen eine Substanzermittlung über Datenbanken erfolgen (Fingerprint Vergleich) oder aus den Reflexen das Achssystem und eventuell die Raumgruppe ermittelt und daraus die Gitterparameter der kristallinen Substanz errechnet werden.

- *Kleinwinkelstreuung SAXS (Small Angle X-Ray Scattering)*

Die Kleinwinkelstreuung bietet die Möglichkeit auch Beugungswinkel unterhalb von  $4^\circ$   $2\Theta$  zu vermessen. Sie ist daher für Strukturen geeignet, die große Abstände zwischen den Streuebenen  $d$  aufweisen. Sie ist in dieser Funktionsweise eine Ergänzung zur Röntgenbeugung. Darüber hinaus können bei weniger kristallinen Proben aus den erhaltenen Streukurven ohne signifikante Reflexe auch Informationen über den Ordnungsgrad durch die Berechnung der fraktalen Dimension von röntgenamorpher Materie erhalten werden.

- *Röntgenbeugung bei SiO<sub>2</sub>-Verbindungen*

Da die Si-O-Si Bindung im Bereich von  $120^\circ - 170^\circ$  eine sehr flache Potentialmulde besitzt sind in diesem Bereich eine Vielzahl von unterschiedlichen Bindungswinkeln möglich. Dies begünstigt in Kombination mit der tetraedrischen Symmetrie die Bildung von Gläsern und Gelen, erschwert aber die Bildung von kristallinen Strukturen. Daher verfügen gerade Silica-Feststoffe häufig nur über eine Nahordnung, nicht aber über eine entsprechende Fernordnung in der Struktur. Die fehlende Fernordnung verhindert im Röntgenexperiment die konstruktive Interferenz der gebeugten Strahlen und damit die Ausbildung von scharfen Beugungsreflexen. Ein solcher Stoff wird als röntgenamorph bezeichnet.

## ***2. Stand der Forschung:***

Die Bedeutung von SiO<sub>2</sub>-Silica in Pflanzen fand in der Frühphase der Naturwissenschaften nur wenig Beachtung. Der Gehalt von Siliciumoxiden in Veraschungsexperimenten wurde zwar schon im 19. Jahrhundert mit untersucht, ihm wurde jedoch allgemein recht geringe Bedeutung beigemessen. Allerdings finden sich laut Joyce Lewin [Lewin 1969] bereits in einer Publikation aus dem Jahr 1862 von J. Sachs über „Ergebnisse einiger neuerer Untersuchungen über die in Pflanzen enthaltene Kieselsäure“ Fragen zur Bedeutung der Kieselsäure für den Pflanzenorganismus. Kieselalgen waren ebenfalls seit langem bekannt (bereits 1702 fanden sie wissenschaftliche Erwähnung (Two letters from a Gentleman in the Country, relating to Mr. Leeuwenhoek's Letter in Transaction no. 283, Philos. Trans. R.Soc.Lond.B.23, 1494-1501 zitiert in [Hildebrand 2018]), fanden jedoch vor allem ästhetische Beachtung.

Intensivere Beachtung fand die Kieselsäure in Pflanzen Mitte des 20. Jahrhunderts durch ihre Bedeutung in der Holzwirtschaft. So zeigte sich, dass der Kieselsäuregehalt insbesondere tropischer Hölzer Einfluss auf die Bearbeitung, Lagerung und Nutzung in der holzverarbeitenden Industrie hatte [Fengel 1984, Liese 1998].

In den Fokus der chemischen Forschung geriet die Biomineralisation von SiO<sub>2</sub>-Silica dann mit Untersuchungen an unterschiedlichen Vertretern aus dem Pflanzenreich durch die Arbeiten von Steven Mann und Carol C. Perry zur Biomineralisation von SiO<sub>2</sub> in Diatomeen, Schachtelhalm und Gräsern. [Mann, Perry 1983, 1984, 1991]. Im Zentrum standen vor allem elektronenmikroskopische Methoden (SEM, TEM, EDX) sowie Kernspinspektroskopie (engl. Magic Angle Spinning – Nuclear Magnetic Resonance: MAS-NMR) zur Analyse der Verteilung und der Zusammensetzung von Silica in Pflanzen. Die Untersuchungen an mineralischen Ausscheidungen von Pflanzen und Diatomeen zeigte eine dem Silica-Gel vergleichbare amorphe Struktur und führte zu den ersten Schlussfolgerungen, dass die SiO<sub>2</sub>-Silica Ausscheidungen in Pflanzen einer amorphen Opal-ähnlichen Struktur, aufgebaut aus amorphen kleineren Kugeln auf Basis kondensierter Kieselsäure, bestehen. Die Strukturen waren nicht vollständig durchkondensiert, enthielten aber zu über 2/3 vierfach vernetzte Si-O-Si Bindungen [Mann, Perry 1983]. Auf Grund dieses Aufbaus wurde eine Anpassungsfähigkeit an alle strukturellen Erfordernisse in den lebenden Systemen postuliert. Ergänzt werden

diese Befunde durch die Röntgenbeugungsexperimente von van Santen, Gieskes et al. über den gesamten Beugungswinkelbereich (Weitwinkel Röntgenbeugung WAXS, Kleinwinkel Röntgendiffraktion SAXS und Ultrakleinwinkel Röntgenstreuung USAXS), die zeigen können, dass es keine kurzreichweitige Ordnung gibt, es sich folglich um amorphes Silica handelt, jedoch die Signale im SAXS und USAXS Bereich einen Aufbau aus silicagelartigen Kugeln zeigt [van Santen/Gieskes 2004].

Zur Anpassung an spezielle Formen, insbesondere an die filigranen Schalen der Diatomeen, wurde nach strukturdirigierenden Substanzen gesucht. Zur Wechselwirkung mit der Kieselsäure standen Substanzklassen im Fokus, die mit den Hydroxyl-Gruppen der Kieselsäure wechselwirken können oder über eine Kondensation direkt an die Kieselsäure binden. Dazu kamen prinzipiell (Poly-)Saccharide wie Zucker oder Cellulose, (Poly-)Peptide, (Poly-)Amine oder Carbonsäuren in Frage.

Um eine möglichst hohe Konzentration an Silica, gut verfügbare Mengen an Probenmaterial und ein reaktionsschnelles Biomineralisationssystem zu haben sind Diatomeen die beste Wahl, da sie innerhalb weniger Tage bis Wochen beobachtbare Mineralisation zeigen. Zudem zeigen Diatomeen mit ihren verschiedenen Gehäusen eine große Vielfalt an Strukturen, so dass auch der Einfluss von Strukturdirigenten gut zu beobachten ist.

Diatomeen, die sowohl in Salz- als auch in Süßwasser vorkommen, stellen für den globalen Stoffkreislauf einen wichtigen Faktor dar. Diese Algen, mit einer Größe von rund 10 µm Durchmesser, binden bis zu 25% des in die Ozeane aufgenommenen CO<sub>2</sub> und bilden bis zu 20% der globalen Primärproduktion von Biomasse. Damit sind sie nicht nur aus Sicht der Biomineralisation wichtige Lebewesen, die den Planeten stark beeinflussen [Gautam 2019]. Diatomeen bilden ein Gehäuse aus SiO<sub>2</sub>-Silica, das aus 2 ineinandersteckenden Hälften besteht. Zur Zellteilung der Einzeller bildet sich ein Einschnürungs-Bereich an der Schnittstelle der Hälften. Dort entwickelt sich das Silica-Depositing-Vesikel, in dem die jeweils nach der Zellteilung benötigten neuen Hälften aufgebaut werden. [Gautam 2019, Sumper/Kröger 2002, Hildebrand 2018].

Beim Aufbau der Silica-Schalen werden rund 2 Gew. % an organischer Masse mit eingebaut. Die Aufklärung dieser organischen Masse führte zur Identifikation der wichtigsten

strukturdirigierenden Substanzen bei der Biomineralisation von  $\text{SiO}_2$  in Diatomeen. Durch Auflösen der  $\text{SiO}_2$ -Struktur in Flusssäure HF konnten die organischen Komponenten freigesetzt und analysiert werden. [Sumper/Kröger 2004]. Es handelte sich um 3 Polypeptide mit 4 bis 17 kDa Masse, die Silaffin-Proteine, die durch weitere Polyamine (< 3.5 kDa) ergänzt wurden.

Synthese Experimente zeigten, dass sowohl die Proteine als auch die Polyamine zu einer deutlichen Beschleunigung der Kondensationsreaktion führten. Besonders Lysin-Modifikationen der Proteine und Polyamine zeigten diesen Effekt. Eine gezielte Strukturdirigierung kommt durch das Zusammenspiel von 2 Silaffin-Proteinen zustande. Sumper und Kröger [Sumper/Kröger 2002, 2004] zeigten, dass zur Bildung der Silica-Kondensation polykationische Verbindungen und zur Kontrolle polyanionische Komponenten zusammenkommen. Diese experimentellen Befunde wurden durch Lenoci und Camp auch theoretisch nachvollzogen, die in ihren Simulationen über einen großen Konzentrationsbereich die Bildung von Silica-Strukturen zeigen konnten [Lenoci/Camp 2006].

Seit diesen ersten Durchbrüchen zur strukturdirigierten Biomineralisation von  $\text{SiO}_2$  in lebenden Zellen wurden weitere Proteine und Polyamine gefunden, die alle auf vergleichbaren Bauprinzipien beruhen (Cingulin, Silicanin, Silacidin, SiMat Protein, Chitin). Die Frage, an welchen Stellen der Proteine genau der Aufbau der Biominerale synthetisiert wird, konnte erst mit Einführung der single-molecule location microscopy (SMLM) in Kombination mit dem Green-Flourescent Protein (GFP) in Photo-activatable localisation microscopy (PALM) und stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) in lebenden Zellen die genauen Reaktionszentren sichtbar gemacht werden [Kröger/Schlierf 2016]. Weitere Details konnten durch Fixierung der Proteine in der gebildeten Silicawand erreicht werden. So konnten Kröger und Kumari in der Kombination von Licht- und Lokalisierungsmikroskopie die Auflösung weiter verbessern und weitere Erkenntnisse zum Zellwandaufbau erhalten [Kumari/Kröger 2020]. Neben den optischen Experimenten fanden auch Untersuchungen mit einer Kombination von  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  MAS-NMR, Elektronenmikroskopie und Massenspektroskopie statt, um die Struktur und Funktionsweise der Proteine in und auf der Silica-Zellwand aufzuklären [Brunner/Baldus 2015]. Diese analytischen Methoden werden zudem durch gentechnische Ansätze unterstützt. Görlich und Kröger zeigen durch knock-out von Silicanin-1 im Silica deposition vesicle (SDV), dass es zu

Veränderungen im Silica-Aufbau kommt, die Rückschlüsse auf die Funktionsweisen der Proteine zulassen [Görlich/Kröger 2019].

Auch wenn mit den Proteinen und Polyaminen die Hauptakteure für die Biomineralisation von Silica in Diatomeen gefunden sind, so zeigt sich weiterhin, dass auch Kohlenhydrat-Polymere bei der Strukturbildung beteiligt sind [Hildebrand 2018]. Für biomimetische und bioinspirierte Synthesen steht damit ein großes Reservoir an Verbindungen zur Verfügung um unterschiedlichste Eigenschaften des resultierenden Festkörpers zu erreichen.

Diese Synthesen starten sehr nah bei den am biologischen Vorbild aufgebauten Varianten, wie der *in vivo* Einbau von funktionalisierten Triethoxysilyl-Bausteinen in die Zellwand der Diatomeen. So gelang Presti et. al der Einbau von Fluorophoren in die Zellwand. Das so modifizierte Biosilica konnte anschließend für Anwendungen isoliert werden [Presti 2018]. Unter Einsatz der Proteine und Polyamide konnten Kröger und Sandhage *in vitro* auch zeigen, dass es möglich ist, Silicium teilweise oder ganz durch Einsatz geeigneter Vorstufen durch Titan zu ersetzen und somit den Experimentalraum deutlich zu erweitern [Kröger/Sandhage 2010].

Anwendungen basierend auf Diatomeen liegen außerdem im Bereich des Drug-Delivery, dem Transport von Wirkstoffen in Verkapselungen zu den Wirkstellen im Körper, an denen die Wirkstoffe freigesetzt werden sollen. Terracciano et al. berichten dazu von in Diatomeen-Schalen gekapselten Wirkstoffen [Terracciano 2018].

## ***2.1 Silica in höheren Pflanzen***

Der mehrzellige Aufbau höherer Pflanzen mit differenzierten Strukturen und Funktionen bietet im Vergleich zu den einzelligen Diatomeen auch eine größere Vielfalt von möglichen Strukturen und Funktionen für Silica. Jedoch ist auch der Gehalt an Silica in höheren Pflanzen deutlich niedriger als in Diatomeen, was sowohl die Strukturaufklärung als auch die Erforschung von strukturdirektierenden Mechanismen erschwert.

Die höchsten Anteile an Biomineralen und somit auch an Silica findet sich in höheren Pflanzen als Phytolithe, also Zellsteine in typischen Größen von 10 – 50 µm, in verschiedenen

Formen in den Zellen. Manche Zellen bilden so charakteristische Phytolithe, dass darüber die Pflanzenspezies identifiziert werden kann. Dies kann sowohl in den Holzzellen von Bäumen als auch in den Blättern sein [Rudall 2014].

Dass Bambus und viele Graspflanzen zu den Si-anreichernden Pflanzen zählen, ist schon lange publiziert [Liese 1998, Takahashi 1977]. International setzen sich jedoch nur wenige Gruppen mit der Biomineralisation von  $\text{SiO}_2$ -Silica in Pflanzen auseinander. Untersuchungen zur Biomineralisation von  $\text{SiO}_2$  in Pflanzen [Perry 2000, Mann 2001, Lux 2003] kommen zu dem Schluss, dass es sich um typische amorphe gelartige Strukturen handelt und somit vergleichbare Prozesse zu Biomineralisierung von  $\text{SiO}_2$ -Silica in Diatomeen vorliegt.

Im Fall von Bambus können sogar makroskopische Mengen von Silica-Biomineralen erhalten [Liese 1998]. Diese finden sich in den Hohlräumen des Halmes zwischen den Knoten. Ihre Funktion ist nicht geklärt, es gibt Vermutungen, dass es sich um Ausscheidungen zur Reduktion der Aluminiumkonzentration in der Pflanze handeln könnte [Wang 2005, Klinowski 1998]. Die von Klinowski et al. gezeigten  $^{27}\text{Al}$  MAS-NMR-Daten zeigen einen Anteil von tetraedrisch koordiniertem Al in dem Silica-Biomineral. Eine solche Co-Mineralisation ist bei Diatomeen unbekannt, zeigt sich aber bei Nadelbäumen [Sangster 1999].

Arbeiten von Lux, Luxová, Abe, Morita und Inanaga [Lux 2003] zeigen ebenfalls anhand von EDX-Daten (Energiedispersive Röntgenspektroskopie) die Verteilung von  $\text{SiO}_2$ -Silica in Bambus Blättern und Wurzeln, weisen auf Silicium Zellen in den Blättern hin, beschränken sich jedoch auf die biologische Beschreibung der Zellen.

Untersuchungen zur Struktur und Verteilung von Silica in höheren Pflanzen sind immer noch recht selten. In den letzten Jahren hat es einige wenige Untersuchungen zur Verteilung von Silica im Bereich unterschiedlicher Nutzpflanzen gegeben.

Für Blätter des Mate-Strauchs, untersucht im Hinblick auf den Elementgehalt mit Blick auf lösliche Elemente beim Trinken des Heißwasser-Extrakts, fanden Barbosa et al. an der oberen Blattseite eine leichte Erhöhung der Silicium-Konzentration mit sehr schwachem Signal zu

Rausch Verhältnis in EDX-Messungen. Diese Verteilung fand sich im Raum zwischen der oberen Wachsschicht und der obersten Zellwände [Barbosa 2019].

Untersuchungen an Schachtelhalm durch García-Gaytán et al. zeigen ebenfalls eine Silicium-Anreicherung oberhalb der oberen Blatt-Epidermis Zelle. Darüber hinaus berichten sie über eine Erhöhung des Silicium Gehalts im Bereich der Spaltöffnungen, allerdings ohne Mapping-Daten zu zeigen [García-Gaytán 2019].

Sheue et al. haben in 2020 über die Untersuchungen an Silica-Partikeln zur Verteilung in Bärlapppflanzen berichtet. Sie zeigten mit EDX-Untersuchungen eine Verteilung von Silicium in den untersuchten jungen Blättern entlang der Leitungs-bündel.

Intensive Arbeiten zum Einfluss von Silicium und Silica auf das Wachstum von Reispflanzen haben Ma et al durchgeführt. Sie konnten für Reis, und damit wahrscheinlich für einen Großteil von Graspflanzen, einen Silica-Transportmechanismus in den Knoten des Halmes identifizieren. Es handelt sich um ein Proteinsystem, das 3 verschiedene Proteine [Ma 2006] für den Transport von Silica aus dem über die Wurzel aufgenommenen Wasser im Bereich der Knoten im Halm vom wässrigen Phloemleitungssystem in das organische Xylemleitungssystem überführt [Ma 2007b, 2008, 2008b, 2009, 2014, 2015]. Ma et al zeigten in ihren Arbeiten somit nicht nur die Bedeutung des Silica in Graspflanzen, sondern auch die Bedeutung der Knoten für die Versorgung der Pflanze. Das Transportprotein gehört zur Untergruppe der Aquaporine. Die Proteine befinden sich neben den oben beschriebenen Funktionen in den Knoten des Halmes auch hoch konzentriert im Bereich der Blätter, um einen Transport aus dem Xylem in die angrenzenden Gewebebereiche zu gewähren. Identifiziert werden konnte die zugehörige RNA, die über Polymerase Chain Reaction- (PCR) Verfahren zur Entschlüsselung der Proteinsequenz führte. Mittels knock-out Experimenten wurde ebenfalls der Nachweis geführt, dass ein Fehlen des Transporters zu einer deutlich verringerten Versorgung der Pflanze mit Silica führte [Ma 2019]. Die lokale Verteilung von Silica im Halm wurde mit Laser Ablation – Induced Coupled Plasma – Mass Spectroscopy (LA-ICP-MS) mit einer lateralen Auflösung 20 µm nachgewiesen. Neben den Effekten durch die Ausschaltung der verschiedenen Transportsysteme zeigen die Daten bei den Wildtypen auch sehr eindrücklich die Verteilung von Silica im Halm von Reis. Wie zu erwarten gibt es eine erhöhte Konzentration in den Leitungs-bündeln, insbesondere im Xylem (Leitungs-bündel

der Pflanze für organische Pflanzensäfte). Die maximale Konzentration findet sich jedoch im Bereich der äußersten 10 µm des Halmes, also im Bereich der Epidermis (Außenhaut).

Ein deutlich größerer Anteil an Arbeiten als bei den Silica Verteilungen untersucht die biologischen und agrikulturnen Auswirkungen von Silicium-Mangel bei Pflanzen [Ma 2007, Takahashi 1977]. Während die früheren Arbeiten insbesondere auf pathologische Erscheinungen wie hängende und blasse Blätter, ein geringerer Wasserumsatz und ein geringerer Ertrag durch einen Mangel von Silica hinweisen, beschäftigen sich die neueren Arbeiten auch mit dem Einfluss des verfügbaren Silica auf die Aufnahme von toxischen Mineralien in die Reispflanze. So können Majumdar et al. zeigen, dass über die Bewässerungstechnik die Aufnahme von Silica gesteigert werden kann und dies zu kräftigeren Pflanzen führt, die wiederum weniger Arsen akkumulieren als Vergleichspflanzen [Majumdar 2019]. Rao et al. fassen in einem Review [Rao 2017] die Auswirkungen von Silica auf die Ernährung von Reispflanzen wie folgt zusammen: stabilere Halme und weniger Halmbruch, größere und mehr Körner, aufrechtere Blätter, die somit besser Photosynthese betreiben können und folglich eine höhere Toleranz gegenüber Stickstoffdüngern aufweisen. Die Toxizität von Aluminium und Eisenionen auf die Pflanze wird darüber hinaus verringert, überschüssiges Aluminium kann in Phytolithen (Zellsteinen – Mineralische Ablagerungen innerhalb oder außerhalb von Pflanzenzellen) abgelagert werden. Außerdem berichten sie über eine bessere Verträglichkeit von Trockenstress, Salzstress, eine höhere Toleranz gegenüber Schädlingen und Krankheiten.

Für Gerste berichten Vega et al. ebenso über eine höhere Toleranz gegenüber Aluminiumionen bei ausreichender Verfügbarkeit von Silica [Vega 2019].

Sowohl Leroy et al. und Moise et al. zeigen positive Abwehrkräfte für Mais gegenüber Schädigung durch Insekten und Insektenlarven bei einer ausreichenden Versorgung der Pflanzen mit Silica. Neben einer direkten Abwehrfunktion zeigen beide Arbeiten, dass bedingt über den Silica-Stoffwechsel auch die antioxidisch wirkenden Substanzen der Pflanze erhöht werden, was ebenfalls zu einem besseren Schutz führt. [Leroy 2019, Moise 2019]

## **2.2 Anwendungen von Biomineralisationsverfahren**

Aus den oben aufgeführten Ergebnissen und Erkenntnissen wurden auch Synthesestrategien für die Darstellung von neuen Silica Strukturen und Verbindungen veröffentlicht.

Ein großes Anwendungsgebiet ist dabei die gute Biokompatibilität von Silica-Strukturen zu Knochenstrukturen. So zeigen Perry et al. einen Weg, um aus Spinnenseide und dem in Diatomeen gefundenen Silica-Abscheidungsprotein Silaffin verschiedene Strukturen von Fasern über Netze bis hin zu schwammartigen Strukturen zu verknüpfen und anschließend *in vitro* durch Einsatz von Silica-Precursoren mit SiO<sub>2</sub> zu überziehen. Es konnte anschließend mit humanen Knochenzellen gezeigt werden, dass eine Biokompatibilität zu den Zellen besteht und diese Knochenzellen über das bestehende Gerüst wachsen [Perry 2016]. Vergleichbare Ziele verfolgen auch Alizadeh et al. [Alizadeh 2017] und Lei et al. [Lei 2018] unter dem Stichwort Bioglass für Implantate in Knochen. Diese Ansätze synthetisieren ein Silica-Gerüst auf Basis verschiedener Silica-Abscheidungsproteine und Polyaminen, auf dem anschließend schnell Knochenzellen oder andere Zellen anwachsen können.

Rickus et al. überziehen direkt Collagenfasern für ein Silicagerüst mit Silicavorstufen. Sie untersuchten dazu die Kinetik und Konzentrationen von Silica für eine erfolgreiche Polykondensation auf den Kollagenfasern. Sie schlagen ein zweistufiges rheologisch kontrolliertes Verfahren vor [Rickus 2016]

Aus den Erkenntnissen resultieren auch Synthesewege, die keine Gerüste für ein Zellwachstum aufbauen, sondern die durch schichtweise Ablagerung entweder größere Strukturen bilden oder Beschichtungen auf anderen Materialien aufbringen, um auf diese Weise eine bessere Biokompatibilität zu erhalten. Beispiele für solche Strategien sind die von Kröger et al. [Kröger 2011] gezeigten Wege, die einen schichtweisen Aufbau vorschlagen oder jene von Cölfen/Garcia-Ruiz et al. [Cölfen/Garcia-Ruiz 2019] mit einer biokompatiblen Schutzschicht, die über Poly-PCDA und Polypyrrole zum Untergrund vermittelt wird.

Auch für die Biomaterial-Silica Komposite aus der Natur gibt es entsprechende Verwendungsvorschläge. So schlagen Luque et al. [Luque 2018] vor, die stark silicahaltigen Reisspelzen in einem fünfstufigen Aufschluss von der Organik zu trennen, mit Eisen zu

dotieren und anschließend als günstigen Katalysator für die Oxidationen von Aldehyden einzusetzen.

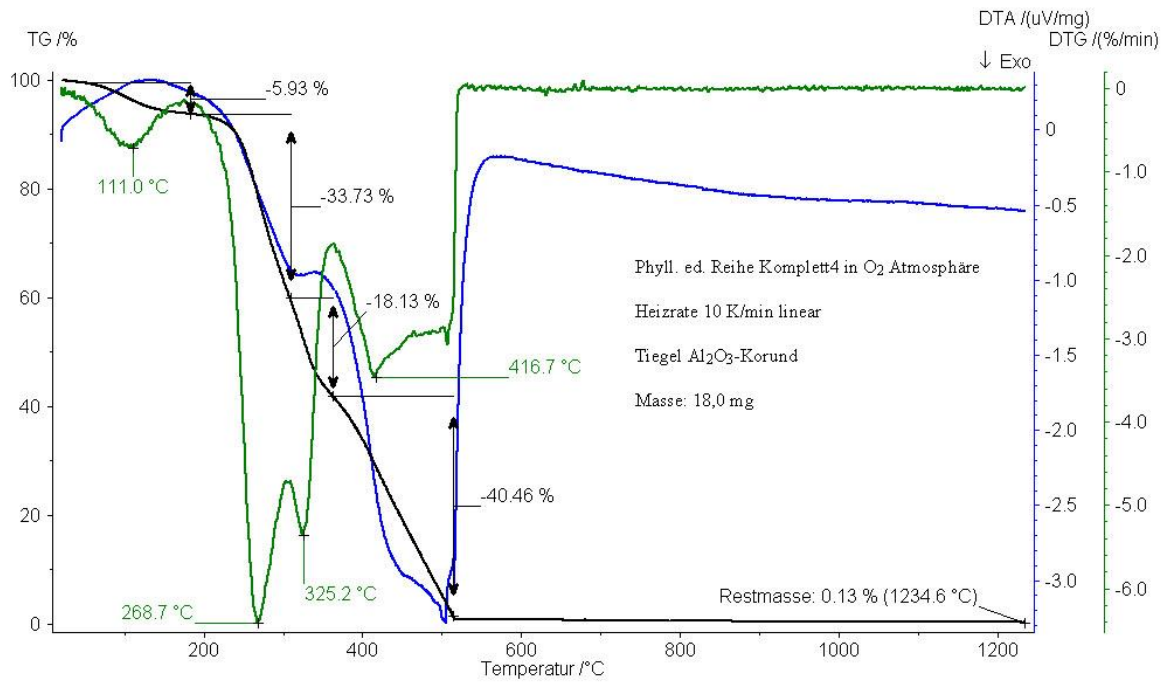
Ein weiterer Vorschlag zur nachhaltigen Weiterverwendung von Silica aus Reisspelzen, ist die Funktionalisierung des aus Spelzen gewonnenen Aerogels, um es anschließend als UV-Schutz und zur Änderung der Dielektrizität in Harze für Elektronikbausteine zu mischen [Alagar 2017].

### 3. Vorarbeiten

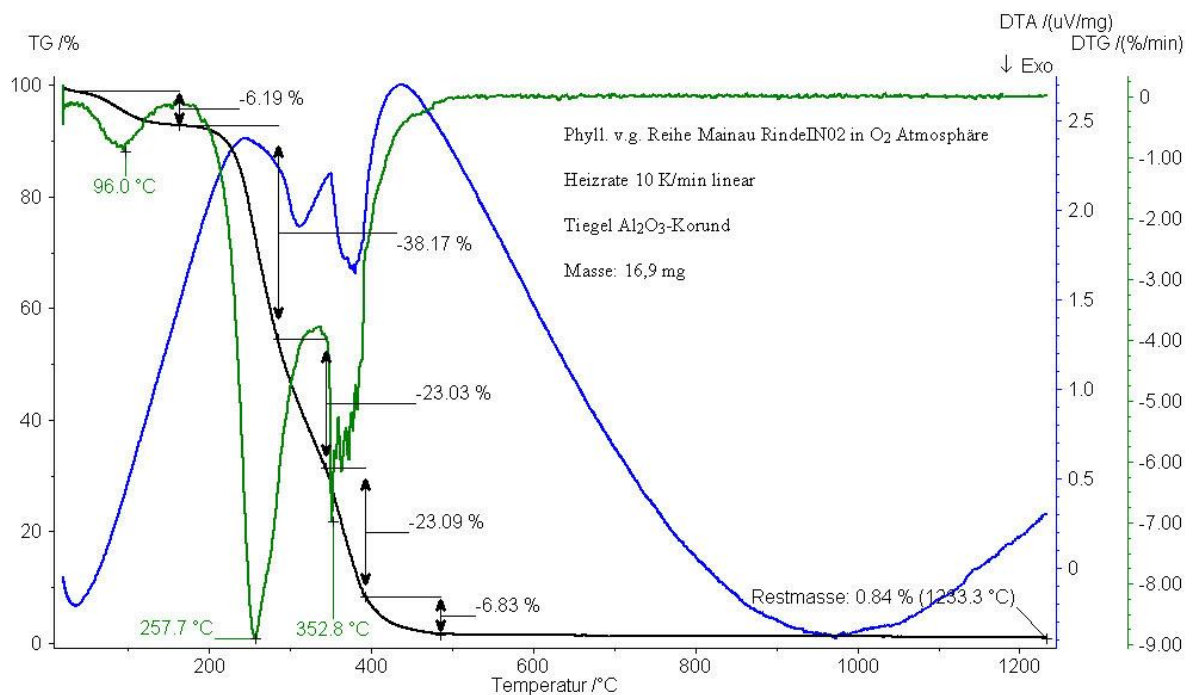
Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe und eigene Vorarbeiten im Rahmen der Diplomarbeit legten den Schwerpunkt auf den qualitativen und quantitativen Nachweis in verschiedenen Pflanzensystemen und der Etablierung von Methoden. Diese Vorarbeiten bestätigten den auch im SPP1117 verfolgten Ansatz, dass die Aufklärung nur in multi-methodischen Verfahren erfolgen kann. Dazu war eine Vernetzung der Arbeitsgruppen mit ihren verschiedenen Expertisen und der verfügbaren Methoden notwendig, da die Methodenvielfalt lokal nicht gewährleistet werden konnte.

Erfahrungen und Vorwissen bestanden in der Arbeitsgruppe durch die Arbeit von Claudio Gruler zur Biomineralisation von Silica in den Brennhaaren von Brennnesseln [Gruler 2002].

Simultane Thermoanalyse war eine der wichtigsten Methoden der Vorarbeiten, da auf diesem Weg der quantitative Gehalt an  $\text{SiO}_2$  Silica bestimmt werden konnte. Diese Arbeiten zeigten, dass ein Gehalt, abhängig von den funktionalen Aufgaben der Pflanzenkompartimente, von 0.1% (Halm) bis zu 5% (Blatt) der Trockenmasse zu erwarten ist. Die gefundenen Massenanteile stehen damit im Einklang mit der Arbeitshypothese (siehe Kapitel 4), dass Pflanzenteile mit geringen, flexiblen Fasern und Schichten von  $\text{SiO}_2$ -Silica verstärkt sind. Diese Arbeiten erfolgten im Rahmen der Diplomarbeit von Stephan Siroky. Exemplarisch werden in Abb. 3.1 und 3.2 Thermogravimetrische Messungen der Diplom-Arbeit vorgestellt. Die geringen Massenanteile stellen in der analytischen Praxis jedoch große Herausforderungen an die Methoden dar.



**Abb. 3.1:** Thermogravimetrische Messung an einer Halm-Probe von *Phyll.ed.* in O<sub>2</sub>-Atmosphäre. Die Probe wurde zur Vorbereitung gemahlen. Es sind die Zersetzungsstufen der flüchtigen Bestandteile bis 150° C, die zwei Zersetzungsstufen des Lignins zwischen 200° C und 390° C sowie die Zersetzung der Cellulose bis 500° C. Die Restmasse und damit alle anorganischen Bestandteile inklusive der Silica-Komponenten liegt unter 1%.



**Abb. 3.2:** Thermogravimetrische Messung der Rinde von *Phyll.v.g.* in O<sub>2</sub>-Atmosphäre. Der Verlauf der Zersetzungsstufen ist dem Gesamthalm vergleichbar. Der Anteil an Cellulose ist geringer und die Restmasse leicht höher.

#### ***4. Lücke in bisherigen Arbeiten und Aufgabenstellung***

Die bisherigen veröffentlichten Arbeiten konnten Mechanismen der Biomineralisation aufklären und so einen Weg zum Verständnis der Mineralisation von SiO<sub>2</sub>-Silica aufzeigen. Über diesen Weg eröffnen sich neue Synthesewege zu Materialien und energieeffizienten Synthesen. Alle dargestellten Analysen und Synthesen führen jedoch zu dreidimensional verknüpften Silica-Bausteinen mit einem starren Vernetzungsaufbau. Die Interpretation von Messungen und Daten der Analytik höherer Pflanzen beschränkt sich auf Partikel und partikelähnliche Ausscheidungen. Auf dünne, flächige oder faserige Biominerale wurde in den bisherigen Veröffentlichungen bisher keine Aufmerksamkeit gelenkt.

Genau auf diese Lücke zielt die vorliegende Arbeit mit den Untersuchungen zu überwiegend ein- und zweidimensionalen Verknüpfungen. Diese Silica-Verbindungen und Biominerale stehen nicht im Widerspruch zu den gezeigten Veröffentlichungen, sondern stellen eine Ergänzung dar, da sie eine Fortsetzung der Strukturen bei kleineren Silica zu Biomasse Verhältnissen bilden. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass bei solchen Masserelationen nicht ein Abbruch der Biomineralisation erfolgt, sondern dass weitere Strukturen mit niederer Verknüpfungsdimensionalität möglich sind. Auch werden in dieser Arbeit Methoden, wie sie sich einzeln in den oben zitierten Veröffentlichungen alle finden lassen, noch stärker miteinander verzahnt, um so weitere Aussagen über Silica in Poaceae treffen zu können.

#### **Arbeitshypothesen, Aufgabenstellung und Arbeitsplan**

Wie im Abschnitt „höhere Pflanzen“ in Kapitel 2, Stand der Technik, ausgeführt wurde, hat Silicium einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum, die Gesundheit und den Ertrag von Nutzpflanzen wie Reis, Gerste oder Hirse. Der Einfluss wurde, wie oben berichtet, in vielen Studien untersucht und nachgewiesen. Auf welchen Zusammenhängen und Mechanismen dieser Einfluss von Silicium und Silica im Einzelnen beruht, wurde jedoch bisher nicht detailliert aufgeklärt. Diese Frage nach dem Einfluss von Silica in Graspflanzen wurde durch die besonderen mechanischen Eigenschaften des Bambus, einer für die Silicium-Akkumulation bekannten Graspflanze, bezüglich seiner Zugfestigkeit noch weiter stimuliert. Bambus zeichnet sich in der mechanischen Zugfestigkeit deutlich gegenüber Holz von

Bäumen aus und stellt somit einen Leitwert für neue synthetische Materialien dar. Diese Eigenschaft führte zur zentralen These dieser Arbeit:

*In Graspflanzen findet Biomineralisation von Silica zu Kompositmaterialien von SiO<sub>2</sub> und Biomasse statt, bei der die anorganische Komponente den deutlich geringeren Anteil stellt. Dieser Silica-Anteil im Biokomposit zeichnet sich durch eine hohe Netzwerk-Bindungsenergie und durch Si-O-Si Bindungen, die in einem weiten Bereich flexible sind, aus.*

Aus dieser zentralen These ergeben sich die weiteren Fragestellungen die den Arbeitsplan zu dieser Arbeit bestimmt haben.

- 1. Befindet sich Silica in Graspflanzen, das in niedriger Konzentration vorliegt und nicht dem typischen dreidimensionalen Netzwerk des Gel-Typs entspricht?*

Der Einsatz und die Kombination vieler Methoden ist zur Beantwortung der Frage erforderlich. Der anorganische Anteil kann durch thermogravimetrische Messungen bestimmt werden. Funktionale Eigenschaften des anorganischen Anteils können nativ und nach Pyrolyse mittels Licht- und Elektronenmikroskopie untersucht werden. Zur Bestimmung der Struktur von Silica werden mit Röntgenstreuung und MAS-NMR zwei verschiedene Methoden zur strukturellen Identifikation eingesetzt. Eine orts aufgelöste Verteilung von Silica in den Pflanzengewebe soll mittels EDX und Mikrosonden-Messungen untersucht werden. Ebenso wird die LA-ICP-MS zur orts aufgelösten Ermittlung der Silica-Konzentration eingesetzt.

- 2. Lassen sich Unterschiede im Silicagehalt und in der Silicastruktur in den unterschiedlichen Bereichen Rhizom, Halm, Blatt oder sogar innerhalb dieser Bereiche, zum Beispiel zwischen Halm-Gewebe und Rinde oder innerhalb des Blattes feststellen?*

Die unterschiedlichen Bereiche werden getrennt voneinander mit dem gleichen Sortiment an Methoden untersucht. Silica-reichere Bestandteile oder Pflanzenspezies werden zur Etablierung von Verfahren und Messparametern bevorzugt eingesetzt. Orts aufgelöste und bildgebende Methoden sind für die Untersuchungen dieser Fragestellung besonders bedeutend. Zur Bestimmung der Struktur des Silica insbesondere durch MAS-NMR Experimente ist eine Anreicherung des Silica-haltigen Materials notwendig. Vorarbeiten

haben dazu gezeigt, dass sich pyrolytische Methoden eignen. Es muss exemplarisch gezeigt werden, dass durch die Pyrolyse die Strukturinformation des Silica nicht geändert wird.

3. *Findet die Aufnahme von Silica in die Pflanze als (Poly-)Kieselsäure oder als Alumosilikat statt?*

LA-ICP-MS Untersuchungen bieten durch die Geschwindigkeit, Ortsauflösung in drei Dimensionen und einer hohen Empfindlichkeit für Aluminium und Silicium dieser Methode einen Einblick in die Elementverteilung. Komplettiert und ergänzt werden die Ergebnisse durch weitergehende Untersuchungen mit  $^{29}\text{Si}$ - und  $^{27}\text{Al}$ -MAS-NMR, da auf diese Weise Ortsauflösung, elementare Zusammensetzung und Strukturinformationen zusammengebracht werden. Aus den Ergebnissen lassen sich Rückschlüsse auf den Aufnahmemechanismus und die Art der Silicium-Quelle der Pflanzen gewinnen. Ergänzt werden die Untersuchungen des Pflanzenmaterials durch Experiment mit Schwebstoffen aus natürlichen Wasserquellen, da die Löslichkeit von Orthokieselsäure bei pH7 in Wasser nicht ausreichend ist, um die Versorgung der Pflanzen mit Silicium zu decken.

4. *Bildet Cellulose, die wie Silica eine Ringstruktur der Bauelemente aufweist und über viele Hydroxylgruppen verfügt, die Matrix für die Silica-Mineralisation? Kann eine entsprechende Korrelation gefunden werden?*

Zur Beantwortung dieser Frage kann die LA-ICP-MS durch die gute Ortsauflösung eine Korrelation von Silicium Konzentrationen an Pflanzenteilen mit unterschiedlichen Cellulose Anteilen geben. Für Informationen nahe der Probenoberfläche werden EDX- und Mikrosonden-Untersuchungen eingesetzt. Strukturinformationen sind darüber hinaus mit ortsaufgelösten Röntgenbeugungsmethoden im SAXS und WAXS zu erwarten.

5. *Lässt sich an Silica anreichernden Pflanzen der Prozess der Verkieselung bei der Versteinierung fossiler Hölzer imitieren?*

Bei fossilen versteinerten Hölzern lässt sich mikroskopisch die vollständige Zellstruktur der ursprünglichen Pflanzen erkennen, obwohl der Großteil der organischen Bestandteile durch Silica ersetzt wurden. Da die Substitution durch Silica-Verbindungen so detailgetreu erfolgt, dass eine Identifizierung der Pflanzenzellen in vollständig versteinerten Proben möglich ist, kann dies auf für die Mineralisation strukturdirektierende Substanzen in den Zellen hindeuten, die auch in den toten Pflanzen noch wirken. Mit Silica-Anreicherungsexperimenten in der

flüssigen und der Gasphase soll überprüft werden, ob sich dieser Prozess in beschleunigter Form nachstellen lässt. Bereiche mit besonders schneller und Silica-strukturidentischer Anreicherung kann dabei einen Hinweis auf die beteiligten strukturdirigierenden Substanzen liefern.

*6. Finden sich strukturdirigierende Substanzen, die den Aufbau von Silica aus Kieselsäure oder löslichen Vorstufen steuern, ohne dafür auf Protein- oder Genanalytik zurückgreifen zu müssen?*

Durch Extraktion, Pyrolyse und die Identifikation von Strukturdirigenten in den Anreicherungsexperimenten werden Substanzen gewonnen, die für Synthesen mit Silica-Vorstufen eingesetzt werden können und deren strukturdirigierender Einfluss so nachgewiesen werden kann. Eine Identifizierung von strukturdirigierenden Proteinen oder über spezielle Proteine synthetisierte Substanzen ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da weder Expertise auf diesem Gebiet existiert noch die notwendigen Geräte und Methoden zur Verfügung stehen.

*7. Lässt sich der positive Einfluss von Silica auf die mechanischen Eigenschaften auch durch Entfernung von Silica aus dem natürlichen Material nachweisen?*

Um die Auswirkungen von Silica auf die mechanischen Eigenschaften des Pflanzenmaterials nachweisen zu können werden die anorganischen Silica-Bestandteile unter Erhalt der organischen Matrix und Zellstruktur durch Extraktion mit Flusssäure entfernt. Zeigen diese Proben anschließend deutlich geänderte mechanische Eigenschaften, so sind damit weitere Rückschlüsse auf die funktionelle Wirkung von Silica in diesen Pflanzenbereichen möglich.

Langfristiges Ziel der Arbeit

Als neue Materialien sind Kompositverbindungen aus Biomasse, insbesondere Cellulose, und SiO<sub>2</sub>-Silica besonders interessant, da beide Ressourcen in großem Maße zur Verfügung stehen und keine Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion darstellen. Die Verstärkung der Biomasse durch Silica profitiert dabei von der Bindungsstärke des Silica, das je nach Vernetzungsgrad von 440 kJ mol<sup>-1</sup> bis hin zu 880 kJ mol<sup>-1</sup> reicht und sich vorgegebenen Strukturen auf Grund seiner, wie oben bereits erwähnter, variablen Bindungswinkel von 120°-170° [Iler 1979, O'Keefe 1977] anpassen kann. Diese Anpassungsfähigkeit an vorgegebene

Strukturen wird bereits seit Jahrzehnten industriell in Gast-Wirt-Verbindungen bei der Zeolithsynthese genutzt.

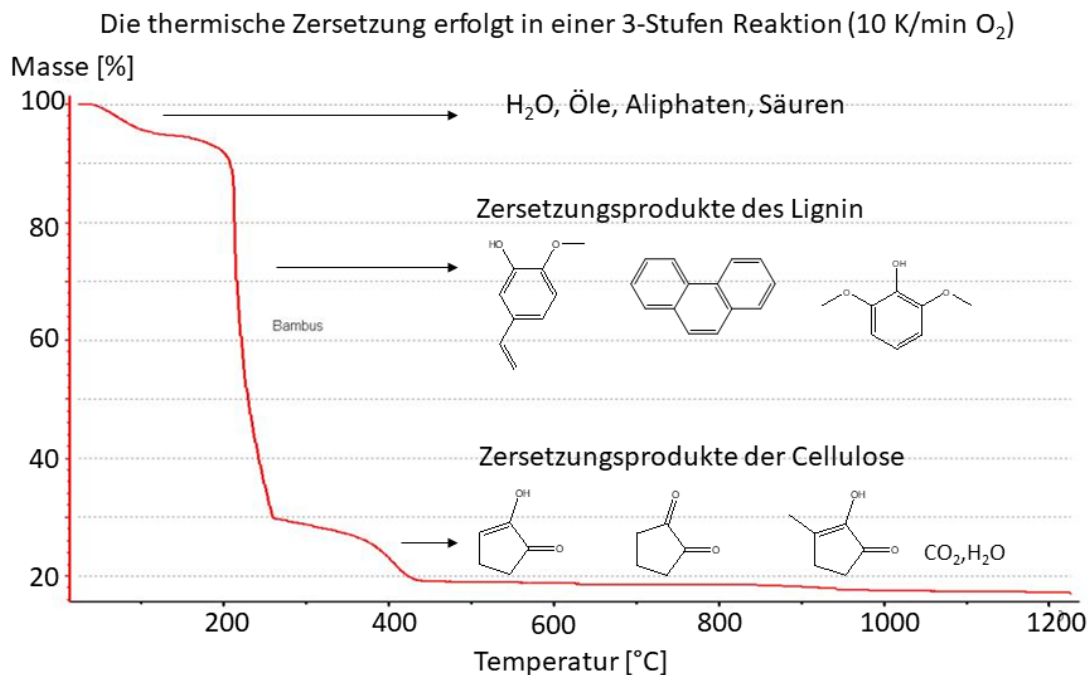
In dieser Arbeit sollen die Grundlagen zum Verständnis von geringkonzentrierten Silica-Biomineralen gelegt werden.

Mittelfristig ist die Ermittlung der genauen Strukturdirigenten und deren genetische Basis eine weitere gewichtige Grundlage, die ebenfalls bereits für verschiedene Systeme bearbeitet wird (Vgl. Kapitel 2 Stand der Technik). Damit lässt sich das BioSi-Material in 2 Schritten, zuerst als Anreicherung vorhandener Strukturen, z.B. in Getreidestroh, und danach als vollsynthetischer Schritt aus den Vorstufen, kontrollieren und realisieren.

Langfristiges Ziel dieser Forschung ist die Entwicklung neuer Materialien, die leichte und hochfeste synthetische Materialien aus den Vorstufen Sand und Pflanzenmasse liefern kann. Diese BioSi-Materialien basieren auf leicht verfügbaren Ressourcen, lassen sich energiesparend erstellen und sind vollkommen umweltverträglich, da sich das Komposit CO<sub>2</sub>-neutral abbauen lässt.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Erste Befunde zur Verteilung von anorganischen Bestandteilen und insbesondere Silica in pflanzlichen Systemen wurden durch Pyrolyseexperimente erhalten. Diese Experimente bestanden aus einer Kombination der Simultanen Thermoanalyse (STA) und heizmikroskopischer Untersuchungen. Durch die STA – Messungen konnte sowohl der Gewichtsanteil der anorganischen Bestandteile ermittelt als auch der Verlauf der Zersetzung in unterschiedlichen Gasatmosphären im Temperaturgradienten verfolgt werden. Somit lassen sich Rückschlüsse auf verschiedene Bindungsarten und Substanzgruppen innerhalb der Proben ziehen. Für die ausgewählte Modellsubstanz Bambus ergeben sich typische Zersetzungskurven wie in Abb. 5.1.



**Abb. 5.1:** Typische 3 stufige Zersetzung von Graspflanzen. Im ersten Schritt bis 120°C entweichen Wasser und leicht flüchtige organische Substanzen. In der 2. Stufe zersetzen sich die hauptsächlich aromatischen Strukturen der Ligninbestandteile. Zuletzt werden noch die Cellulose haltigen Komponenten zersetzt.

Im Bereich der ersten Zersetzungsstufe von Raumtemperatur bis 120°C kommt es zu einem Verlust des noch in den bei +4°C gelagerten Pflanzen vorhandenen Wassers. Zusätzlich verdampfen leicht flüchtige Verbindungen wie ätherische Öle und niedermolekulare

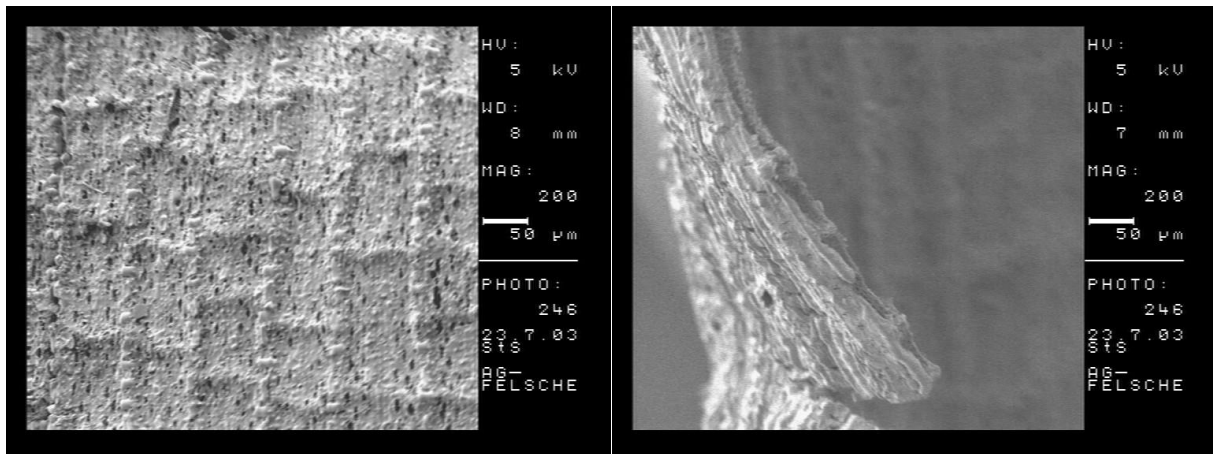
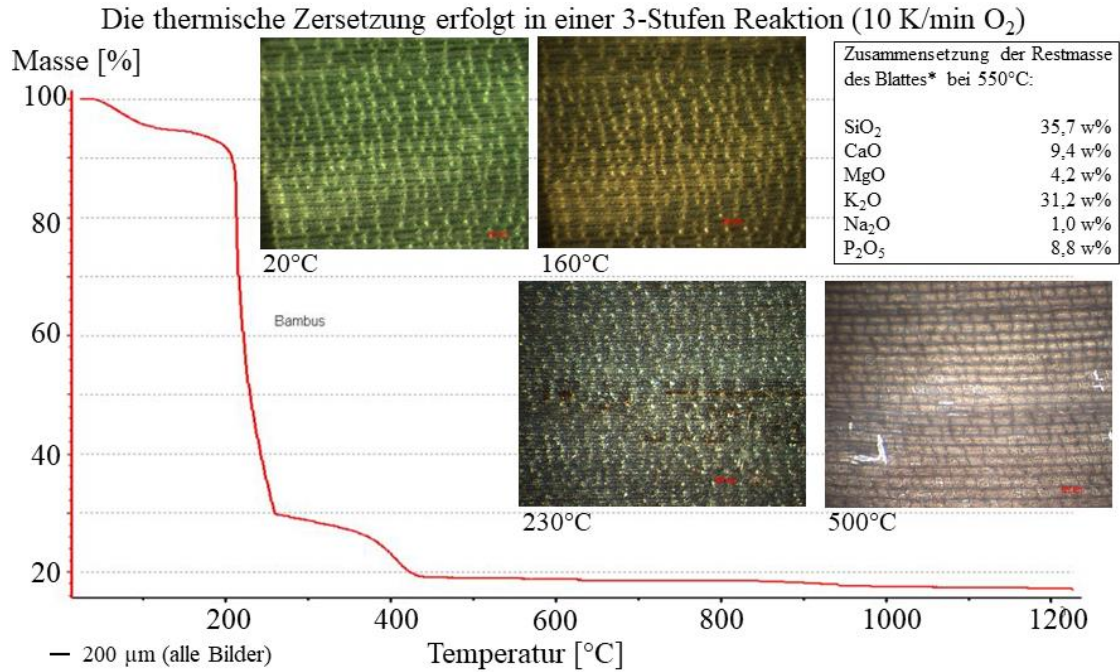
Substanzen, die nur über van-der-Waals Kräfte und einzelne Wasserstoffbrücken verbunden sind.

Die zweite Zersetzungsstufe zwischen 190°C und 260°C hängt mit der Zersetzung und Verdampfung der aromatischen Strukturen des Lignins zusammen. Je nach Zusammensetzung und Ligninanteil der Probe kann diese Zersetzungsstufe auch aus mehreren Unterschritten bestehen. (Abb. 5.3)

Der letzte Zersetzungsschritt geht schließlich mit der Zersetzung der Cellulose Strukturen in Fasern und Zellwänden einher. Dieser findet zwischen 350°C und circa 450°C statt. Anschließend werden nur noch einzelne zuvor unvollständig pyrolysierte Verbindungen und verbliebene Kohlenstoffreste verbrannt, so dass ab 550°C ein weißes Produkt zurückbleibt, das nur noch anorganische Komponenten aufweist.

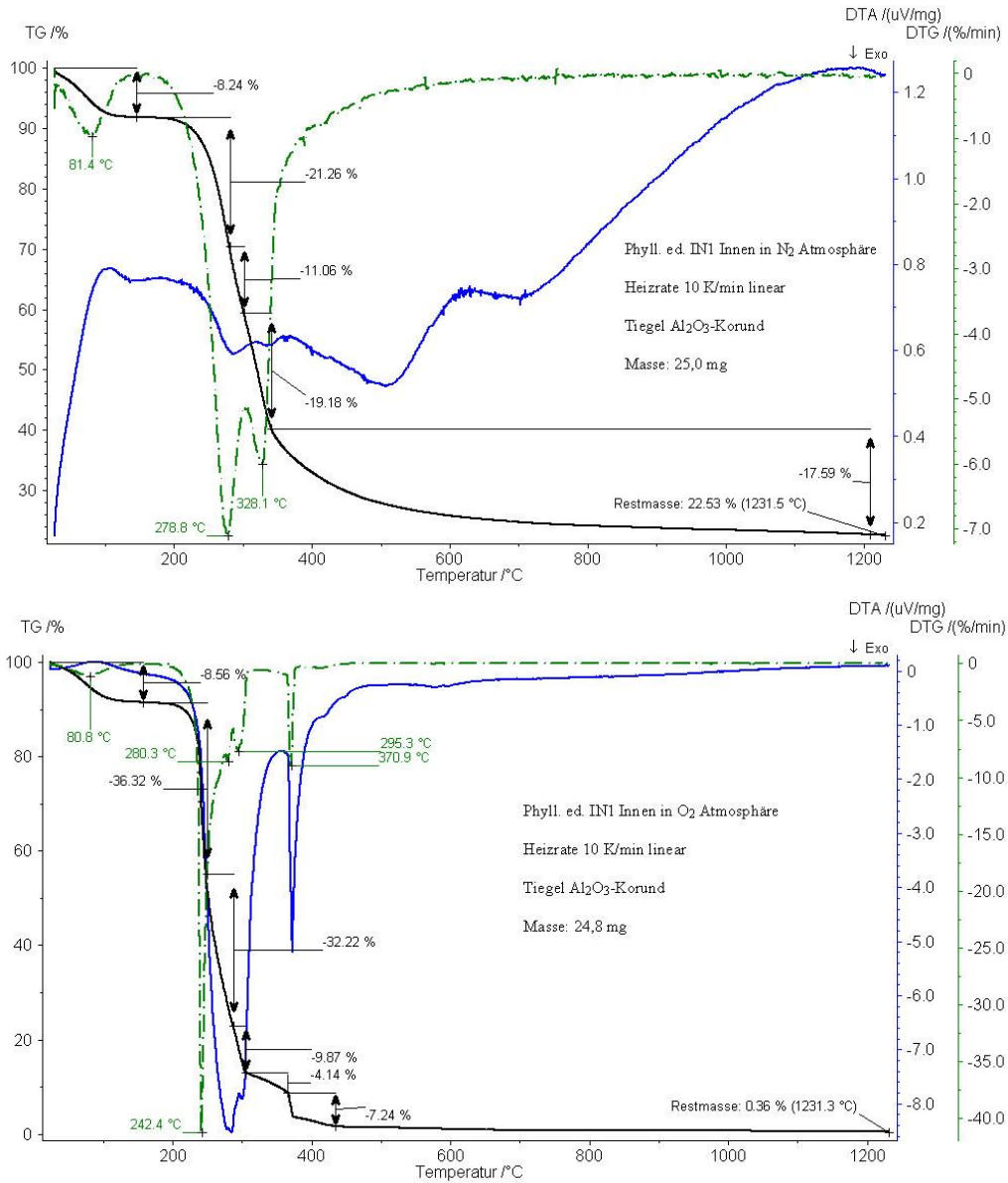
Die einzelnen Zersetzungsschritte lassen sich auch optisch unter dem Heizmikroskop verfolgen. Hier zeigt sich vor allen Dingen der Erhalt der Zellmorphologie über den gesamten Zersetzungsbereich hinweg (Abb. 5.2). Das erhaltene Zersetzungsprodukt der Pyrolyse in O<sub>2</sub>-Atmosphäre ist ein weißes, mechanisch zusammenhängendes Gewebe, in dem die ursprüngliche Zellstruktur weiterhin zu erkennen ist.

Der direkte Vergleich von Pyrolysen in reaktiver Sauerstoff- und inerte Stickstoffatmosphäre (Abb. 5.3) zeigt, dass der erste Zersetzungsschritt bis 120°C ohne Reaktion mit dem Sauerstoff verläuft. Erst bei höheren Temperaturen finden in den beiden verschiedenen Gasumgebungen auch unterschiedliche Reaktionen statt. Die durch die Reaktion mit dem Sauerstoff gewonnene Energie führt zu einem schnelleren Bindungsbruch als die rein thermische Zersetzung in der inerten Stickstoffatmosphäre. Da die Zersetzungen in N<sub>2</sub>-Atmosphäre nicht vollständig verlaufen und die Proben auch nach einer Behandlung bis 1200°C noch Reste von Kohlenstoff sowie eine schwarze Färbung aufweisen, wurden die nachfolgenden Messungen in O<sub>2</sub>-Atmosphäre durchgeführt. Hier zeigte sich bereits ab einer Temperatur von 600°C bei allen Proben eine vollständige Zersetzung der organischen Bestandteile und die auch die optische Überprüfung der Zersetzung anhand der weißen Färbung der verbliebenen Restmasse bestätigt.



**Abb. 5.2:** oben: Blatt Bambus *Phyll.v.g.* 3-stufige Zersetzungskurve in der Thermoanalyse und Lichtmikroskopische Aufnahme zu den einzelnen Zersetzungsstufen. Zusammensetzung der Restmasse, Differenz zu 100% bilden nicht einzeln nachgewiesene Substanzen, vor allem Salze. \* Die Bestimmung der Zusammensetzung der Restmasse erfolgte durch das Institut Fresenius, Stockach.

unten: elektronenmikroskopische Aufnahme des Blattes (*Phyll.v.g.*) nach Pyrolyse bei 550°C in O<sub>2</sub>-Atmosphäre links die Blattoberseite, rechts eine Bruchkante des Blattes



**Abb. 5.3:** Vergleich zweier Proben aus dem gleichen Abschnitt einer Pflanze von *Phyll.ed.* Unter N<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> Atmosphäre. Insbesondere die deutlich geringere Restmasse der durch vollständige Entfernung des Kohlenstoffanteils wir in der O<sub>2</sub> Atmosphäre deutlich.

### 5.1 Vergleiche zwischen verschiedenen Pflanzenspezies:

Der erste Zersetzungsschritt bis 120°C verläuft bei allen untersuchten Proben vergleichbar ab, da es sich hier bei allen Proben um die Verdampfung von Wasser und ätherischen Ölen handelt. Auf Grund unterschiedlicher Vorbehandlungen und Trocknungen gibt es quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Proben, jedoch ist der qualitative Verlauf gleich.

Auch die Zersetzung des Cellulose-Bestandteils der Pflanzen verläuft qualitativ sehr ähnlich ab. Die Varianz der Proben einer Pflanze ist ähnlich hoch wie die Varianz zwischen verschiedenen Spezies. Es gibt keine relevante Abweichung in der Zersetzungstemperatur, die jeweils zwischen 200°C und 350°C liegt. Quantitative Abweichungen zwischen den einzelnen Proben lassen sich leicht über folgende Punkte erklären:

- Verschiedene Pflanzenspezies weisen unterschiedliche Anteile von Lignin zu Cellulose auf;
- Verschiedene Organe der Pflanzen, wie Halm, Blatt oder Wurzel weisen auf Grund unterschiedlichen Aufbaus für verschiedene Funktionalitäten auch unterschiedliche Zusammensetzungen auf.
- Auch innerhalb einer Spezies und sogar innerhalb einer Pflanze gibt es Unterschiede in der Zusammensetzung, die sich auf die individuellen Unterschiede der einzelnen Lebewesen zurückführen lassen. Dazu gehören zum Beispiel Standort, Witterung, Alter, Krankheiten, Nährstoffe und Wasserversorgung.

Ergänzend zu den Simultanen Thermoanalytischen Untersuchungen wurden an den Proben auch gekoppelte Pyrolyse-Gaschromatographie-Massenspektrometrische (Pyro-GC-MS) Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden die Proben zur Vorbereitung bis knapp unter die zu untersuchende Zersetzungstemperatur erhitzt und dann ein kleiner Teil der Probe in einem Quarzröhrchen in die Pyrolyseeinheit eingebracht. Anschließend wurde die Probe mit einem Temperaturstoß über die nächste Zersetzungsstufe gebracht und die entstandenen Gase im GC-MS aufgetrennt und analysiert.

Diese Methode gab sowohl Aufschluss über die molekularen Bestandteile der nativen Probe als auch über die stabilen Fragmente der pyrolytischen Zersetzung. Da die Identifizierung und Weiterverwendung der organischen Bestandteile und Zersetzungsprodukte keinen Bestandteil dieser Arbeit darstellt, wurde in diesem Rahmen auf eine intensive Analytik zu den Bestandteilen verzichtet. Es konnten jedoch auf diesem Wege Hauptbestandteile der einzelnen Stufen ermittelt werden. So sind in der ersten Stufe bis 120°C, wie zuvor bei der Simultanen Thermoanalyse beschrieben, vor allem leicht flüchtige Öle und Alkohole vertreten.

Die deutlichsten Unterschiede in der Zersetzung in O<sub>2</sub>-Atmosphäre zeigen sich in der zweiten und dritten Stufe zwischen 350°C (hauptsächlich die Abspaltung langkettiger organischer Säuren und Ketone) und 450°C (2. Lignin-Zersetzungsstufe). Hier sind die Zersetzungsprodukte, identifiziert über GC-MS und die Datenbank NIST98.1, hauptsächlich phenolische und aromatische Bestandteile mit typischen Vertretern wie 2-Methoxy-4-Methylphenol, 2,3-Dihydro-Benzofuran, 2-Methoxy-4-vinylphenol und 2,6-Dimethoxyphenol. Die Ausprägung und Kinetik zeigte sich sowohl bei verschiedenen Spezies als auch innerhalb verschiedener Proben einer Spezies als sehr variabel. Die Werte in diesem Temperaturabschnitt zeigen, dass hier neben dem Lignin noch Verbindungen vorliegen, die eine stärkere Bindung aufweisen und so erst bei höheren Temperaturen zersetzt werden. Dies kann durch eine direkte chemische Bindung von organischen Verbindungen an anorganische Bestandteile des Pflanzengewebes gegeben sein.

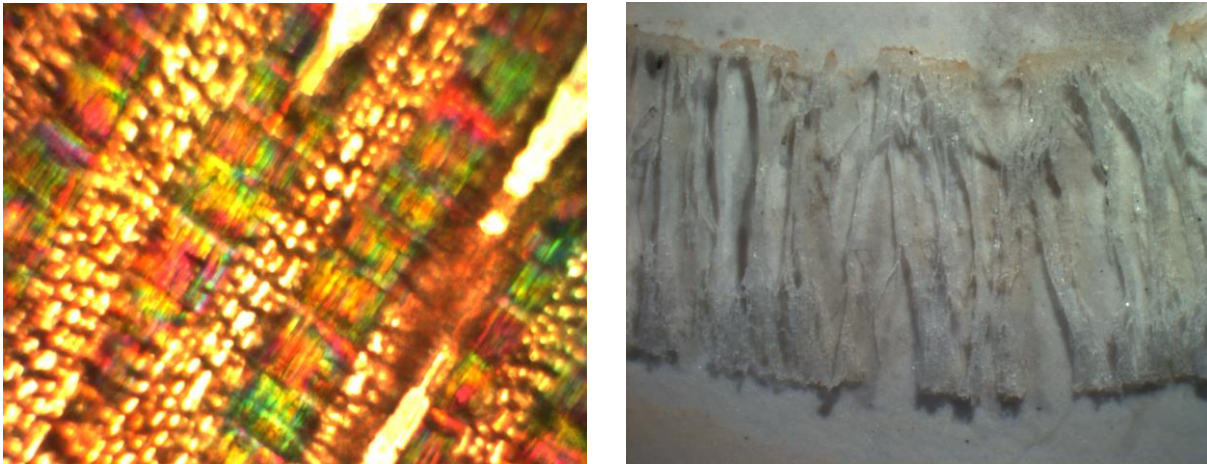
Ein Erklärungsansatz für die Varianz der Cellulose Temperatur hin zu zum Teil deutlich erhöhten Temperaturen ist auch die Möglichkeit, dass die organischen Cellulose Verbindungen als Einschluss- oder Einlagerungsverbindungen zwischen anorganischen Verbindungen eingebettet sind und somit nur langsamer reagieren und bei höheren Temperaturen stabil bleiben. Diese Stabilisierung zeigt sich besonders stark bei Pflanzen, die unter Botanikern und Forstwirten (z.B. FENGEL, Liese) für ihre Silicium Einlagerung bekannt sind sowie bei Pflanzenorganen, die einen hohen Pyrolyse-Restgehalt aufweisen. Dies ergibt ein erstes Indiz auf eine Wechselwirkung zwischen der Cellulose und einer Silicium Verbindung, die zu einer thermischen und mechanischen Stabilisierung führt.

Weitere analytische Untersuchungen im Bereich der thermischen Zersetzung fanden an ausgewählten Proben durch Heizmikroskopie und pyrolytische Zersetzung in Muffelöfen statt. Die so erhaltenen Proben wiesen einen erstaunlichen mechanischen Zusammenhalt auf und konnten in weiteren Verfahren zusätzlichen Untersuchungen zugeführt werden. In der Optischen- und Elektronenmikroskopie der Blätter zeigte sich hier besonders deutlich der Erhalt der Zellstruktur über den gesamten Temperaturbereich. Die Struktur wurde am Ende der Pyrolyse rein durch die anorganischen Verbindungen repräsentiert. (Abb. 5.2 unten). Für Untersuchungen des Halmes und des Rhizoms wurden vor allem faserige Strukturen der Leitungsbündel erhalten (Abb. 5.4).

Probe	Max der 1. Ligninzerse- zung Temp [°C]	Max der 2. Ligninzerse- zung Temp [°C]	Max der Cellulosezer- setzung Temp [°C]	Besonder- heiten	Restmasse [%]
Bambusblatt Egg	325	425	450		7,5
Braunes Gras	285	340	445		10,5
Ackerschach- telhalm	310	400	450		31
Bambusblatt braun	325	400	475		13
Bambus Sprossen Innenhaut	320	400	-	Späte Zersetzung oberhalb von 800°C	15
Dinkelspelz	305	385	455		12
Dinkelhalm Node	310	385	-	Zersetzung über 750°C	11
Brennnessel Stengel	300	370	-	Zersetzung über 700°C	17
Blatt <i>Phyll.ed.</i>	325		430		8
Bambus Stengel außen <i>Phyll.ed.</i>	310		375		9
Bambus Stengel innen <i>Phyll.ed.</i>	280	306	355		3
Ahorn Blatt	275	450	500		6

**Tabelle 5.1:** Übersicht über die Temperaturen der Zersetzungsstufenwendepunkte der Lignin- und Lignin artigen Verbindungen sowie der Cellulose verschiedener Pflanzenmaterialien.

Weitere analytische Untersuchungen im Bereich der thermischen Zersetzung fanden an ausgewählten Proben durch Heizmikroskopie und pyrolytische Zersetzung in Muffelöfen statt. Die so erhaltenen Proben wiesen einen erstaunlichen mechanischen Zusammenhalt auf und konnten in weiteren Verfahren zusätzlichen Untersuchungen zugeführt werden. In der Optischen- und Elektronenmikroskopie der Blätter zeigte sich hier besonders deutlich der Erhalt der Zellstruktur über den gesamten Temperaturbereich. Die Struktur wurde am Ende der Pyrolyse rein durch die anorganischen Verbindungen repräsentiert. (Abb. 5.2 unten). Für Untersuchungen des Halmes und des Rhizoms wurden vor allem faserige Strukturen der Leitungsbündel erhalten (Abb. 5.4).



**Abb. 5.4** links: Dünnschnitt durch einen Bambushalm bei 10facher Vergrößerung. Zu erkennen sind die großen freien Stellen der angeschnittenen Leitungsbündel, die durch die polarisierte Beleuchtung grünlich gefärbten Cellulose Fasern neben den Leitungsbündeln sowie das Zellgewebe des Halmes.  
rechts: Pyrolyseprodukt nach 650°C O<sub>2</sub>-Atmosphäre eines Bambushalmabschnittes. Länge der Fasern 1cm.

Es konnten auf diesem Wege Hauptbestandteile der einzelnen Stufen ermittelt werden. So sind in der ersten Stufe, wie zuvor bei der Simultanen Thermoanalyse beschrieben vor allem leicht flüchtige Öle und Alkohole vertreten. Die zweite Zersetzungsstufe weist überwiegend stabile aromatische Systeme auf, die aus der Lignin Zersetzung entstanden sind.

Die Ergebnisse der thermoanalytischen Verfahren ergaben neben ersten Informationen zum Aufbau und Verteilung von SiO<sub>2</sub>-Silica in den verschiedenen Pflanzenspezies und -teilen einen guten Überblick über den Gesamtgehalt an Silica und anorganischer Restmasse in den

Proben. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte eine Probenauswahl für die weiteren Experimente getroffen werden.

Die Wahl fiel dabei aus den in der Einleitung genannten Gründen auf Bambus, auch wenn in den ersten thermischen Experimenten auch weitere Pflanzenspezies zum Vergleich herangezogen wurden. Im weiteren Verlauf wurden die Experimente auf Bambus eingeschränkt und nur einige wenige Referenzexperimente mit Dinkelproben als Vertreter der Poaceae hinzugezogen.

## ***5.2 Verteilung der chemischen Elemente im Gewebe***

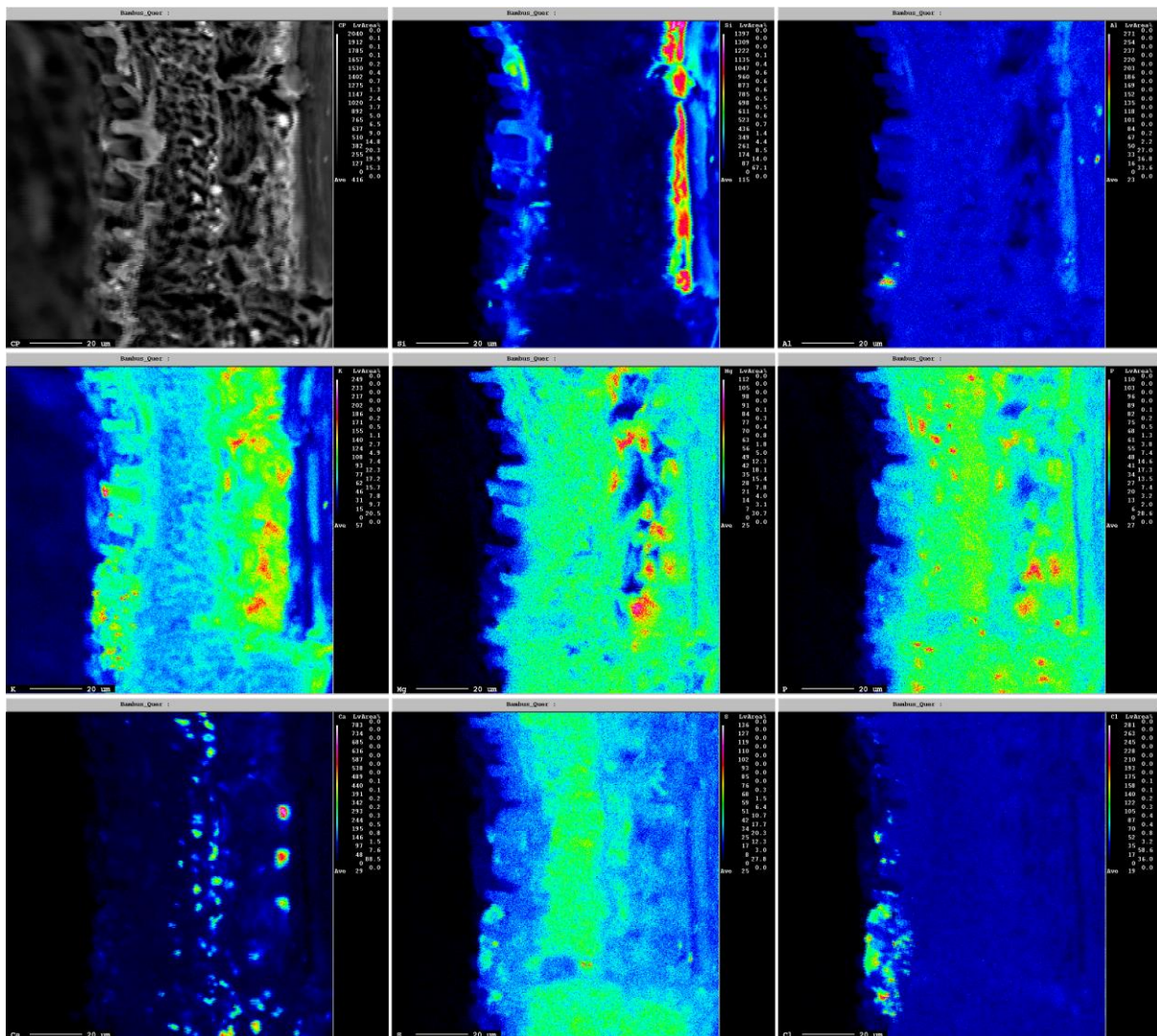
Um eine orts aufgelöste Verteilung von chemischen Elementen innerhalb der verschiedenen Proben und Pflanzengewebe zu erhalten standen, vor allem Experimente mit der Mikrosonde zur Verfügung. Diese Methode lieferte Daten, die eine visuelle Aufarbeitung der Ergebnisse möglich machte und eine direkte optische Zuordnung von Elementen zu Ortskoordinaten auf der Probe zulassen. Diese Proben entstanden in Zusammenarbeit mit Dr. Eric Reusser am Institut für Mineralogie und Petrografie (IMP) der ETH Zürich. Es wurden Bambusblätter untersucht, da bei diesen die Konzentration an Silica höher als im Halm war und so bessere Ergebnisse bei begrenzter Messzeit erwartet werden konnten.

Die Bilderfolge (Abb. 5.5) zeigt denselben Ausschnitt eines nativen Blattquerschnittes von *Phyll.v.g.*. Verglichen werden hierbei das Elektronenrückstreubild (Back Scattering Electrons; BSE) der Probe mit den elementspezifischen Aufnahmen für die Elemente Al, Ca, Cl, K, Mg, P, S und Si.

Die Verteilung von Ca, Mg, K, und P in den Zellen stellt dabei keine Besonderheit dar und entspricht den erwarteten Werten in Pflanzenblattzellen. Diese Aufnahmen dienen der Übersicht und dem Vergleich mit den Daten zu Silicium.

Die Kenntnis der über das gesamte Blattmaterial vorhandenen Kalium-Verteilung erlaubt, dieses Element für die LA ICP-MS Messungen als Markierungssubstanz für die Ablation von Probenmaterial zu nutzen (siehe unten). Die Messungen zum Cl-Gehalt wurden durchgeführt, da sich bei einer vorherigen Elementaranalyse unerwartet Cl-Werte hatten finden lassen. Das Chlorsignal erscheint bei der untersuchten Probe nur im Bereich der Blattunterseite und mit

einer engen Verteilung. Dort zeigt die Verteilung des Chlors eine Korrelation mit Kalium, damit handelt es sich höchstwahrscheinlich um KCl-Salze. Eine besondere Funktion oder pathologische Veränderung des Blattes konnte in dem entsprechenden Bereich des Blattes nicht festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich entweder um eine Form von (natürlicher) Probenkontamination handelt, oder Bambuspflanzen über das Wasser aufgenommenen Chloridionen als Kaliumchlorid an den Spaltöffnungen der Blattunterseiten ausscheiden. Da im Blattgewebe aber kein Chlor nachweisbar war, erscheint eine Kontamination als Erklärung plausibler.



**Abb. 5.5:** Elementverteilungen im Querschnitte eines nativen Blattes von *Phyllostachys viridi glaucescens*. Linke Seite der Aufnahme ist die Blattunterseite. Oberste Zeile: BSE Bild, Silicium- und Aluminiumverteilung mittlere Zeile: Kalium-, Magnesium- und Phosphorverteilung unten: Kalzium-, Schwefel- und Chlorverteilung

Silica-Konzentrationen finden sich in der in Abbildung 5.5 gezeigten Messung vor allem in den Zellwänden der Epidermis Zellen der Blattoberseite. Hier ermöglichen sie eine lichtdurchlässige, mechanische Verstärkung dieser Blattbereiche. Der direkte Einfluss von Silica und Silicium Verbindungen auf die Chlorophyllaktivität war bereits mehrfach diskutiert worden [Alsaedi 2019, Al-Aghabary 2004], konnte bisher nicht gezeigt werden. Dieses Erkenntnis steht im Einklang mit den hier gezeigten Befunden, da es keinen direkten Kontakt des chlorophyllhaltigen Gewebes mit den silicareichen Epidermis Geweben des Blattes gibt. Es zeigt sich, dass Silicium eine indirekte Rolle spielt, da durch Silicium-Aufnahme die Halme und Blätter aufrechter sind und so besser Licht sammeln können [Gao 2011].

Neben diesen extremen Konzentrationen gibt es noch eine deutliche Anreicherung von Silica in beiden Blattoberflächen. Insbesondere ist die gleichmäßige Verteilung von Silica auf den Strukturen der Blattunterseite auffällig. Diese Strukturen decken sich mit denen von Lux et al [Lux 2003] auf Grund von EDX-Messungen als Silicium-Zellen klassifizierten. Eine Funktionszuordnung erfolgt in der Veröffentlichung nicht. Jedoch machen mehrere andere Autoren Vorschläge, dass die Silicapartikel optische Eigenschaften, sowohl als Linsen für sichtbares Licht als auch als thermische Fenster im Infrarotbereich haben können [Cornellissen 2019, Yamanaka 2017, Wang 2005]. Eine Linsenfunktion lässt sich bei dieser Messung nicht erschließen, könnte aber bei den in Abb. 5.7 gezeigten Silica-Partikeln mit einer Kantenlänge von 10 µm partiell eine Rolle spielen.

Ein weiteres Ziel dieser Messung war die Untersuchung der Korrelation von Silicium und Aluminium Verteilung. Dies lässt Rückschlüsse über mögliche Aufnahmemechanismen der Pflanze zu. In den häufigsten natürlichen Silikaten gibt es einen deutlichen Anteil an Aluminium. In den Schichtsilikaten wie Glimmern und Tonen stellt Aluminium neben der Ersetzung von einzelnen Si-Positionen in der Tetraederschicht mit der Oktaederschicht sogar einen deutlichen Masseanteil des Stoffes. Findet die Aufnahme von Silicium in die Pflanze nun in Form größerer Mineralienpartikel über den Wurzelapparat statt, so sollten sich auch entsprechend hohe Aluminiumwerte im Bereich erhöhter Siliciumwerte finden. Findet die Hauptaufnahme jedoch über die Wasserkette in Form von oligomerer Kieselsäure oder Abbauprodukten der Feldspat- und Glimmer-Verwitterung statt, so ist hier der Abbau an den geladenen Fehlstellen des Aluminiums leichter und das eingebaute Silica sollte entsprechend nur geringe Konzentrationen an Aluminium enthalten.

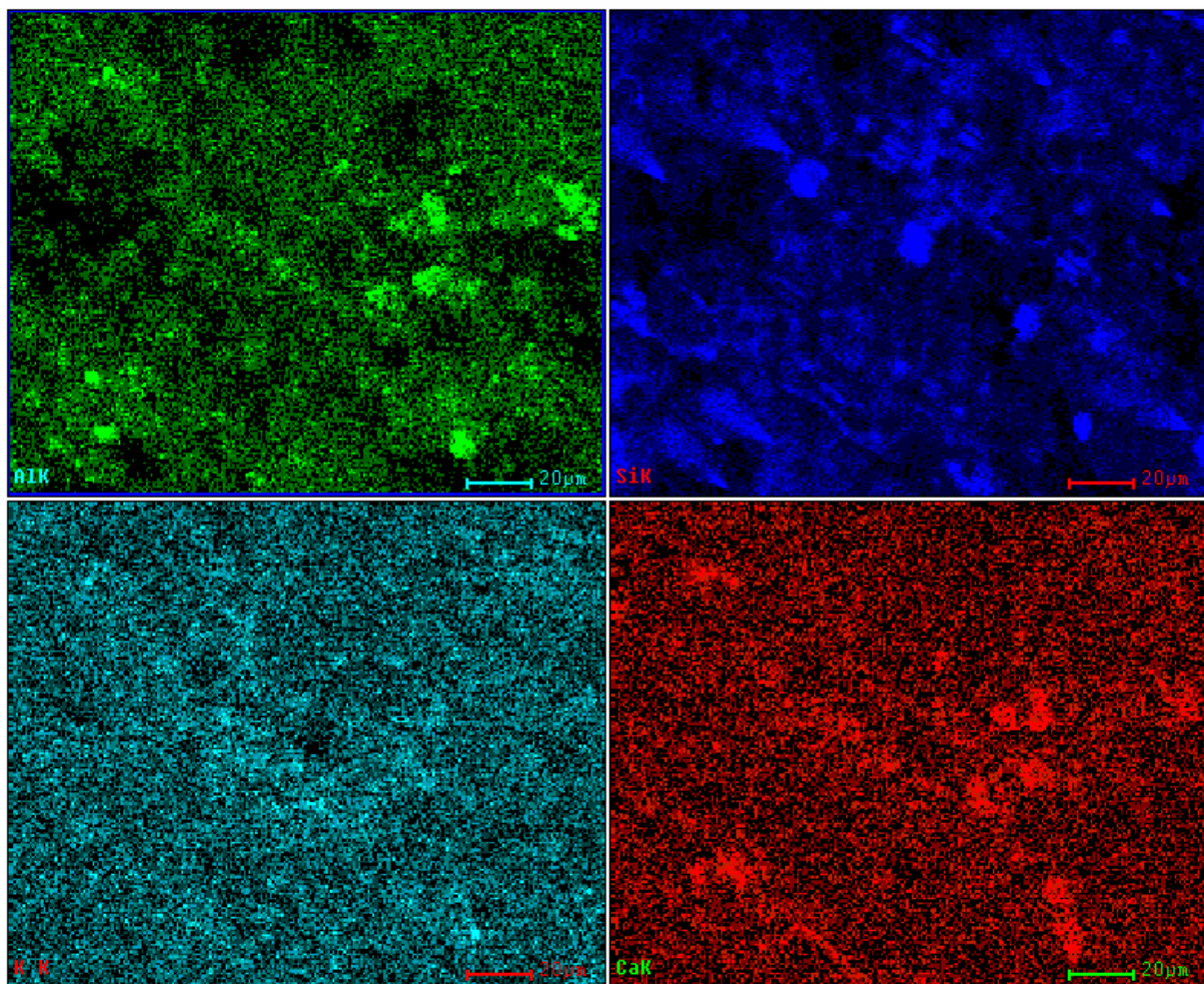
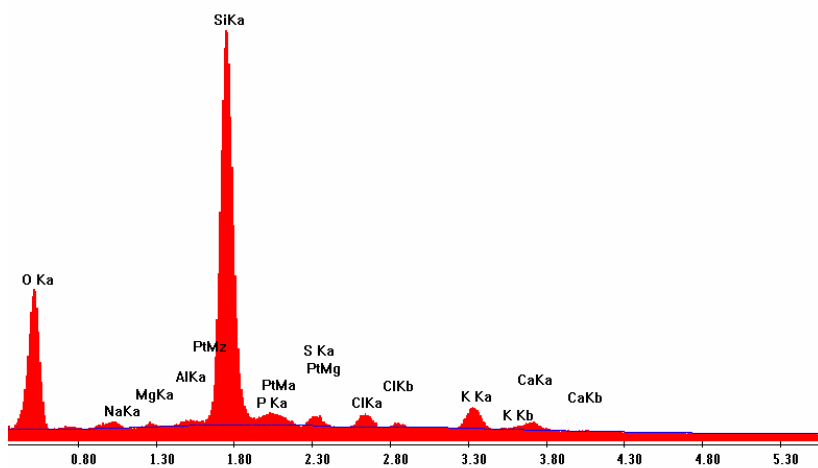
Die Daten der Aluminiummessung zeigen eine sehr gleichmäßige Verteilung des Elementes über das gesamte Blatt. Im Bereich höchster Silica Konzentrationen gibt es eine leichte Steigerung der Aluminiumrate, was auf Grund der natürlichen Verteilung von Aluminium zu erwarten war. Da aber keine stark erhöhten Aluminiumwerte zu finden sind, handelt es sich um eine Aufnahme über den Wasserweg. Die Stellen höchster Aluminiumkonzentration finden sich unmittelbar im Oberflächenbereich des Blattes. Dies deutet darauf hin, dass es sich hier um Verschmutzungen zum Beispiel durch Staub auf der Oberfläche handelt, die sich während des Wachstums der Pflanze oder der Lagerung ereignet haben. Diese Einschätzung deckt sich auch mit Befunden, die zum Umgang von Pflanzen mit Aluminium veröffentlicht wurden. Hier wird gezeigt, dass Pflanzen aktiv im über die Wurzeln organische Säuren abgeben, um Aluminium Ionen zu lösen und aus dem Umfeld der Wurzeln zu entfernen [Ma 2007].

#### *Oberflächenstrukturen der Blattoberflächen*

Von beiden, sich strukturell stark unterscheidenden, Blattoberflächen wurden ebenfalls EDX- und Mikrosondenuntersuchungen durchgeführt. Die EDX Messungen (Hitachi S4700, Schmidt, Hitachi Ratingen] ergaben einen sehr hohen Si-Anteil, repräsentiert durch das entsprechende Si-K<sub>α</sub>-Signal. Diese übersteigt sogar noch deutlich das O-K<sub>α</sub>-Signal und die Signale der Alkali- und Erdalkaliatome.

Bambus Probe	Si 43.6 Gew. %, O 37.0 Gew. %, K 5.1 Gew. %.
Dinkelspelz Probe	Si 63.3 Gew. %, O 32.3 Gew. %, K 1.1 Gew. %.

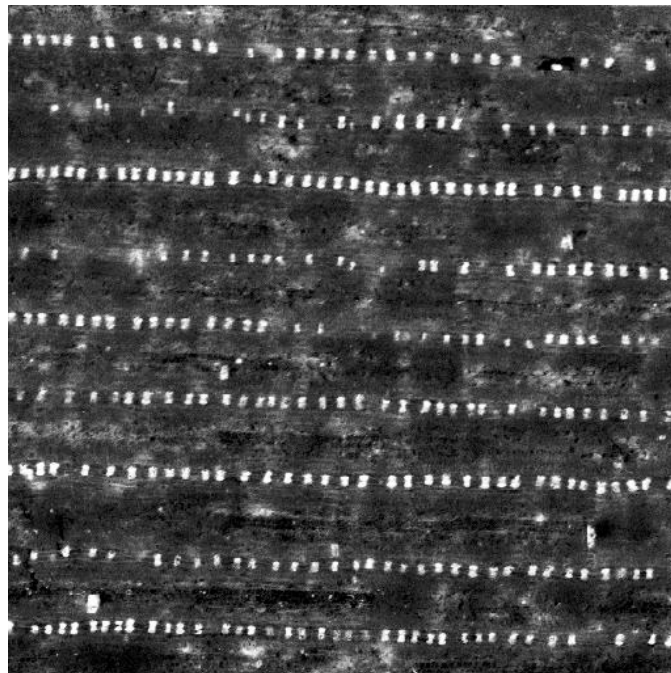
Daraus lässt sich schließen, dass die Eindringtiefe des Strahls nur gering ist und tiefer liegende Zellstrukturen nicht mit vermessen wurden, da das im gesamten Zellmaterial vorhanden Kalium ein bei größerer Eindringtiefe ein sehr starkes Signal geben würde. Die zum Vergleich herangezogenen Dinkelspelzen ergaben ein vergleichbares Bild, hier lagen die Alkali- und Erdalkaliwerte sogar noch tiefer. Diese Befunde decken sich mit den erwarteten Werten, da die Dinkelspelzen sowohl mehr Si enthalten als auch das Silica hier zum Schutz des Kornes auf der Oberfläche der Spelzen vorliegt. Ebenso wie bei dem Querschnitt des Blattes konnte mehr Information durch das Elementmapping mit der Mikrosonde gewonnen werden (Abbildung 5.6).



**Abb. 5.6:** Elementverteilung von Al, Si, K und Ca in einer Blattprobe von *Phyll.ed.* Die gemittelte Elementhäufigkeit (oben) zeigt einen sehr hohen Si-Anteil im Oberflächenbereich. Unten: Die ortsaufgelöste Verteilungsanalyse der Elemente Al, Si, K und Ca zeigt verschiedene Silica-Strukturen auf der Blattoberfläche.

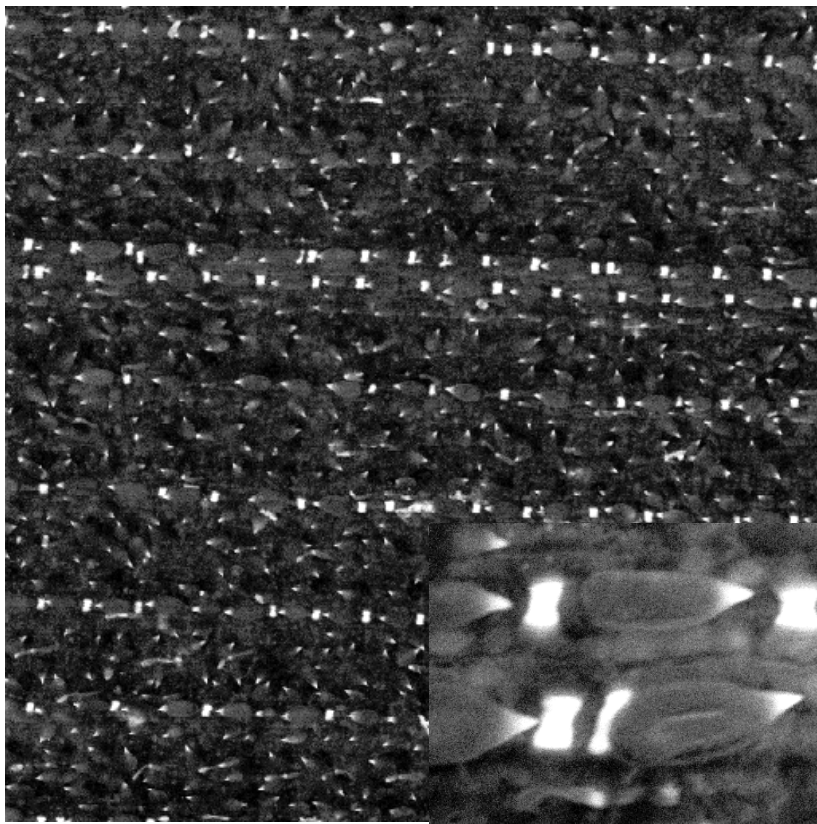
Im Si-Elementmapping (Messungen Reusser, ETH Zürich) zeigen sich deutliche Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit zwischen Ober- und Unterseite der Bambusblätter. Die Oberseite des Blattes ist durch Reihen annähernd quadratischer Silica Platten gekennzeichnet, die sich über den tiefer liegenden Zellen der Leitungsbündel, die parallel zur Blattachse verlaufen, befinden. Diese Silica-Platten weisen eine Kantenlänge von  $10\mu\text{m}$  auf und haben eine äußerst regelmäßige Anordnung. (Abb. 5.7). Ein möglicher Schluss der Funktion ist, dass es sich bei diesen kompakten Strukturen um einen mechanischen Schutz dieser Versorgungsleitungen handelt. Eine Verletzung von außen, zum Beispiel durch Insekten, werden durch diese Silica Verstärkung deutlich erschwert. Eine solche Funktion wird auch von Moise et al. vorgeschlagen [Moise 2019].

Ein weiterer Vorschlag, den Wang für Weißes Straußgras aufbringt, ist, dass durch den verstärkten Einbau von Silica in der Epidermis Infrarotstrahlung vom Inneren des Blattes abgestrahlt werden kann und so der Hitzestress minimiert werden kann [Wang 2005]. Dieser Argumentation schließe ich mich für die hier gezeigten Daten jedoch nicht an, da die bedeckte Fläche sehr gering ist und sich besonders auf die Bereiche der Leitungsbündel konzentriert und nicht der chlorophyllhaltigen Parenchymzellen befindet. Eher wird der Befund Yamanaka et al. unterstützt, die für Rasen-Gräser eine Lichtsammelfunktion der Silicapartikel zur Wärmung der Leitungsbündel untersucht haben.



**Abb. 5.7:** Si-Elementmapping der Blattoberseite von *Phyll.v.g. nativ*. Kantenlänge des Bildes ist  $1000\mu\text{m}$ . Die Silica-Flächen, die sich hauptsächlich oberhalb der Leitungsbündel befinden haben Kantenlängen von ca  $10\mu\text{m}$ .

Die Silica-Strukturen auf der Blattunterseite sind weitaus weniger regelmäßig (Abb. 5.8). Auch sie befinden sich wieder vor allem in Reihen parallel zur Blattachse. Hier ist die Grundform jedoch eher rechteckig mit  $5\mu\text{m} \cdot 10\mu\text{m}$  und befindet sich zwischen den Spaltöffnungen. Eine wahrscheinliche Funktion in dieser Position ist die Kraftaufnahme bei Bewegungen der Spaltöffnungen und damit eine Stabilisierung des gesamten Blattes. Neben den blockförmigen Silicapartikeln befindet sich auch an den Spitzen der Spiculi (spitzförmige Ausformungen an der Blattunterseite von Bambus) starke Konzentrationserhöhungen von Silica. Hierbei handelt es sich auf Grund der Form und Position eher um eine Abwehrfunktion der Blätter.



**Abb. 5.8:** Silicium-Mapping der Blatt Unterseite von *Phyll. v. g. nativ*. Die Kantenlänge des Bildes ist  $1000\mu\text{m}$ . Silizium befindet sich auf Flächen zwischen den Spaltöffnungen. Spitzförmige Ausformungen (Spiculi) besitzen ebenfalls Silicium an ihren Spitzen. Inset: Vergrößerung eines Teilbereichs, Kantenlänge Inset entspricht  $150\mu\text{m}$ . Hier sind die Spaltöffnungen besser erkennbar.

Die Festkörperstrukturen dieser drei verschiedenen Silicavorkommen (Blöcke der Oberseite, der Unterseite sowie der Spitzen der Spiculi) fanden bei den weiteren Experimenten eine besondere Beachtung.

Es konnten keine Mikrosonden-Messungen an Halmmaterial durchgeführt werden, da hierfür keine weitere Messzeit zur Verfügung stand. Auch bestand keine weitere Möglichkeit Messungen an besseren Schnitten des Blattes durchzuführen. Dies ist eine Aufgabe, die bei weiteren Untersuchungen sehr zu empfehlen sind. Die Ortsauflösung der Mikrosonde ist dabei noch vom molekularen Maßstab entfernt, gibt aber schon sehr gute Informationen über die Elementverteilung innerhalb der biologischen Strukturen auf Zellniveau. Sie stellt in diesem Zusammenhang auch eine gute Ergänzung zur EELS (electron energy loss spectroscopy) dar, wie sie beispielsweise Richmond, Sussmann, Neumann und zur Nieden [Richmond 2003, Neumann 2001] für Phytolithe und Silicaabscheidungen vorstellen.

### ***5.3 Strukturanalyse I: Röntgendiffraktometrie und Röntgenbeugung***

Nachdem durch die pyrolytischen Verfahren sowohl ein Weg zur Gehaltsbestimmung der anorganischen Pflanzenbestandteile als auch zur Anreicherung der Silicaverbindungen gefunden war, lag die Strukturbestimmung mit Pulverröntgenverfahren nahe. Dazu wurden Analysen von Pflanzenmaterialien in allen Stufen der Zersetzung durchgeführt.

Der wichtigste Befund dieser Untersuchungen ist dabei, dass es sich um röntgenamorphes Material handelt. Es handelt sich hier also um Silica-Verbindungen und nicht um Silikate. Eine Umwandlung der Silica-Verbindungen in Anwesenheit des Kaliums, das ebenfalls in größeren Anteilen in der Asche vorliegt, findet erst oberhalb einer Temperatur von 600°C an. Daraus folgt, dass die Pyrolyse bis 550°C eine gute Möglichkeit bietet die Silicaverbindungen von den organischen Bestandteilen zu trennen und anzureichern, ohne dabei die Struktur der Verbindung Silikat Strukturen zu ändern.

Die breiten Signale bei Beugungswinkeln von 15-23 °2 $\theta$  in der Röntgenbeugung mit Cu K $\alpha$  Strahlung, die das native und bis 300 °C erhitzte Probenmaterial zeigte, konnten zwar auf typische Abstände von Si-O-Si Bindungen hindeuten, passten aber auch zu typischen d-Werten von Cellulose Verbindungen. Das Verschwinden der Signale oberhalb von 500°C zeigt an, dass es sich bei diesen Signalen um Ordnungsstrukturen der Cellulose Verbindungen handelte.

Ergänzend dazu sind einige Vorarbeiten, die bei Erhitzen der Probe bis 1250 °C unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre kristalline Silica und Silikat-Signale der Restmasse zeigten. Diese Ergebnisse

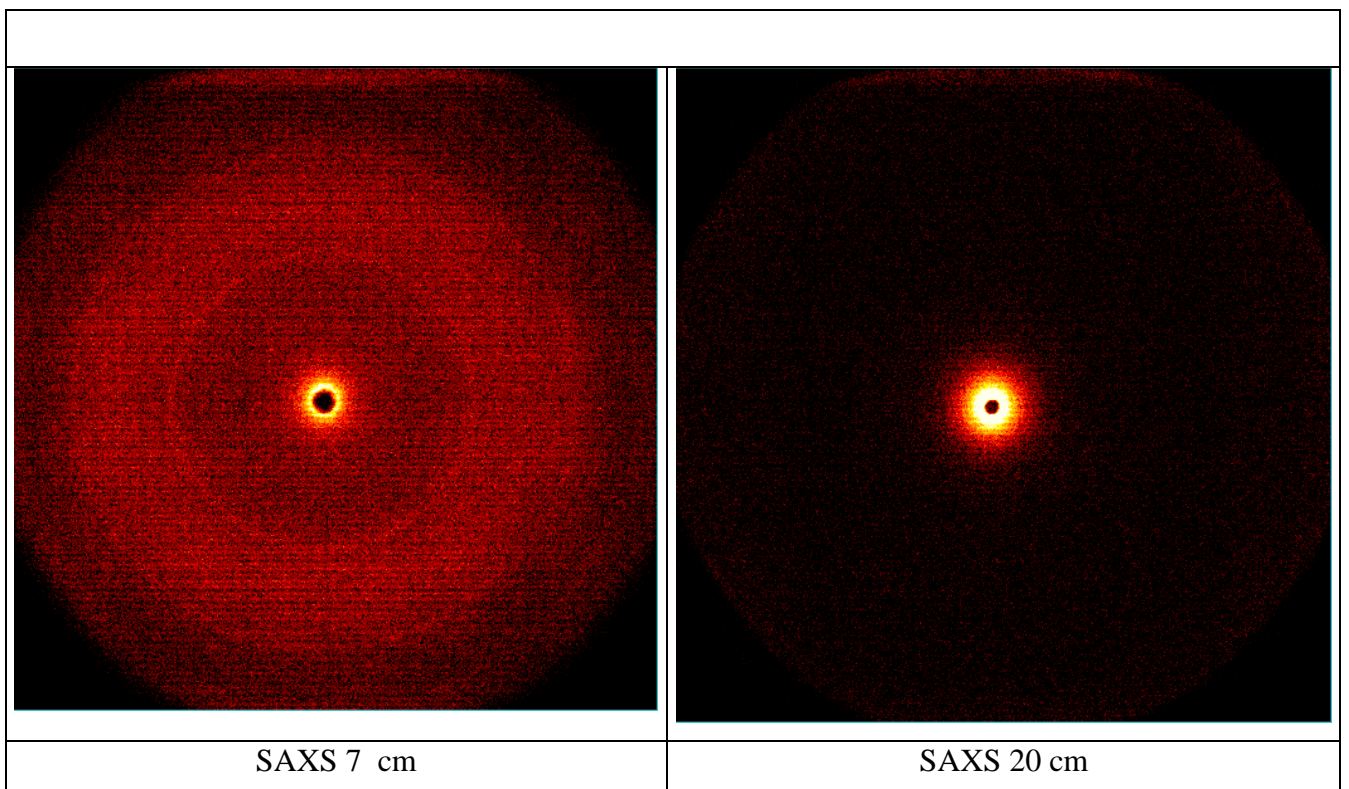
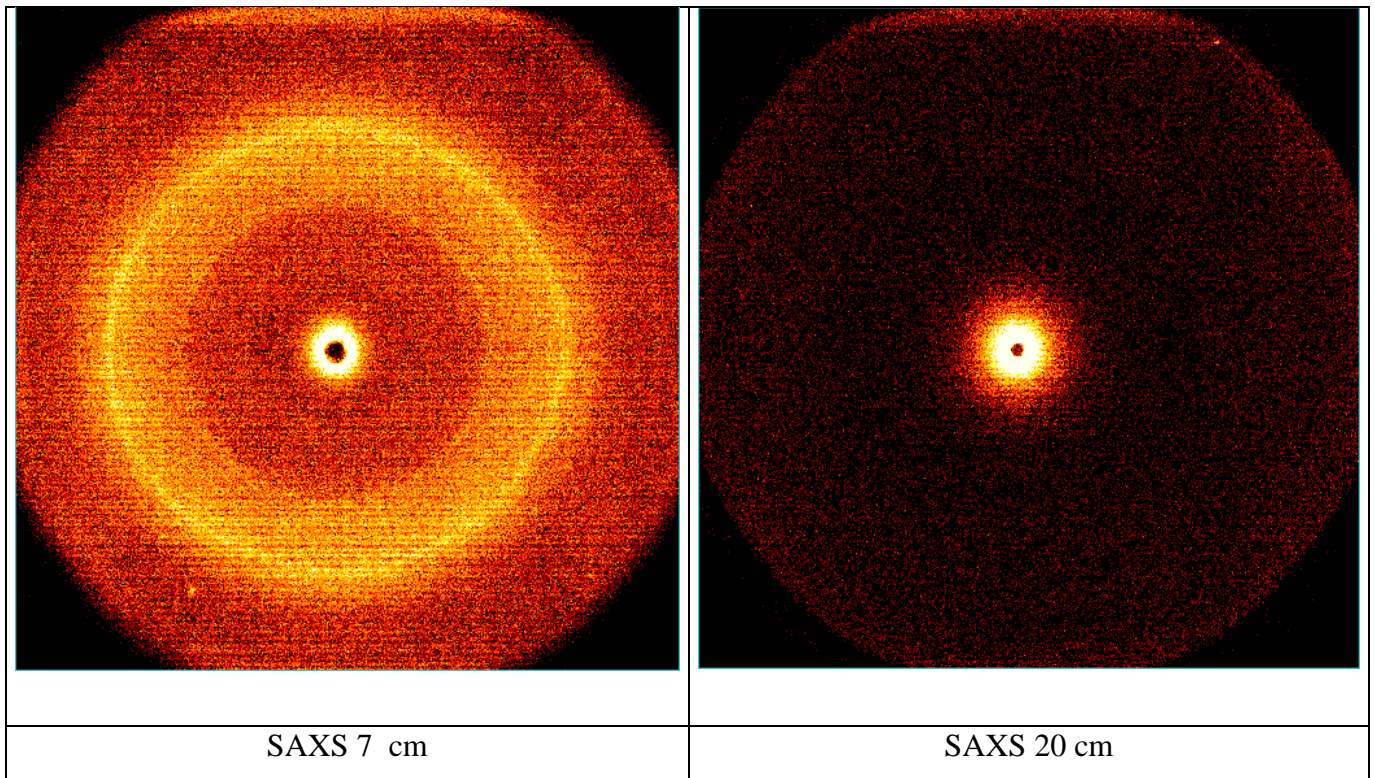
sind jedoch zur Strukturbestimmung von Silica in den Pflanzen gänzlich ungeeignet, da sich in diesem Temperaturbereich aus Silica und den anwesenden Alkali- und Erdalkaliumsilikaten Silikate bilden, die mit Blick auf Ausgangs Silica Substanz keine Aussagekraft mehr haben. So wurden diese Daten nur für den Nachweis der Anwesenheit von Silica verwendet.

Da im WAXS-Bereich der röntgenographischen Messungen keine eindeutigen Signale erhalten wurden, sollten detaillierte Untersuchungen zu möglichen Strukturinformationen durch Kleinwinkelstreuung weitere Informationen ergeben. Dazu bestand Kontakt zu zwei Arbeitsgruppen, die beide über SAXS-Streuanlagen und Fachwissen zu der Streuung von Silica und Cellulose besitzen. So wurden Messungen in Rostock bei Thomas Gerber und bei Peter Fratzl in Graz durchgeführt. Die Arbeitsgruppe Gerber hat selbst im Bereich der Biomineralisation von  $\text{SiO}_2$  an Schachtelhalm im SPP1117 gearbeitet, die Arbeitsgruppe Fratzl verfügt über große Expertise zur Streuung an Cellulose und Holzverbindungen [Gerber 2003, Fratzl 1998].

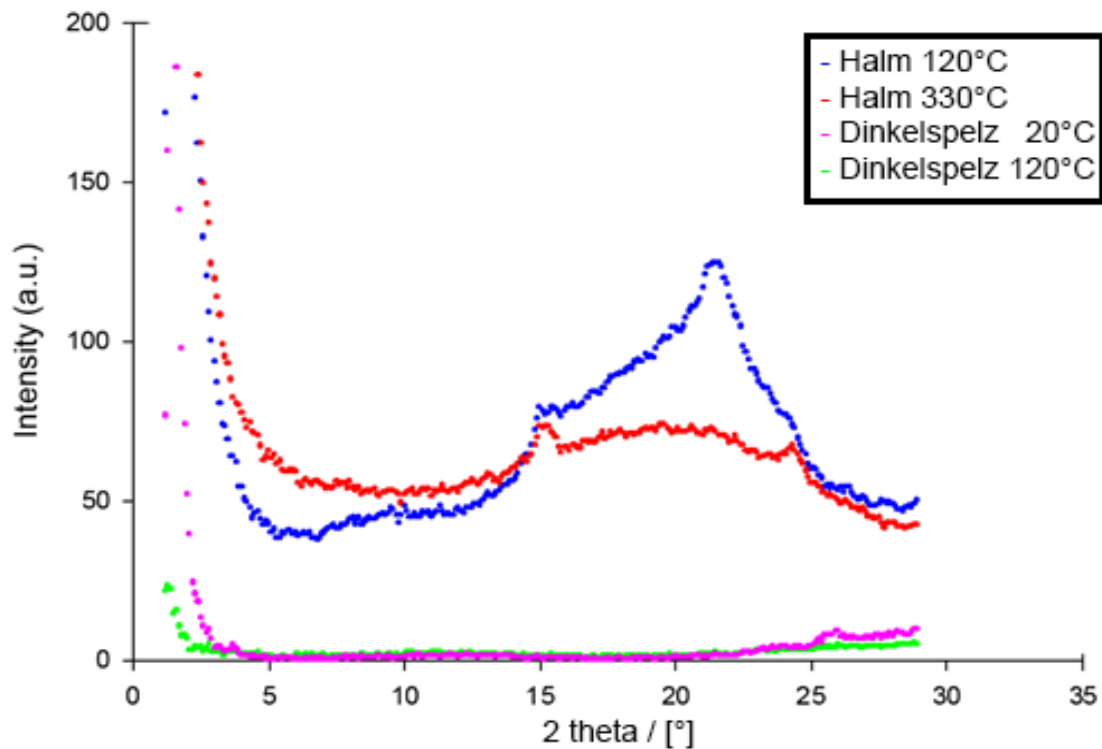
Es wurden Messungen an Proben aller Zersetzungsstufen vorgenommen, um so auch den Einfluss der Temperatur auf die Strukturen verfolgen zu können. Messungen im Kleinwinkelbereich ergaben hier keine signifikanten Ergebnisse. Ein Vorteil dieser Messungen gegenüber den hauseigenen Pulverröntgen-Messungen (PXRD Winkelbereich  $3^\circ$  bis  $110^\circ 2\theta$ ) für den Winkelbereich von  $4^\circ 2\theta$  bis  $27^\circ 2\theta$  lag darin, dass eine schmal fokussierte Röntgenquelle, die mit Hilfe eines Laserstrahls auf die zu untersuchende Stelle werden konnte, zum Einsatz kam und so sehr gezielt Messungen der gewünschten Ortskoordinaten erhalten werden konnten.



**Abb. 5.9a:** Natives Bambusblatt *Phyll.v.g.* montiert in den Probenträger für SAXS und WAXS Messungen. Der Rote Punkt markiert die Probenstelle im Bereich eines Leitungsbündels des Blattes. Analog wurden auch die pyrolysierten Proben montiert.



**Abb. 5.9b:** Oben: Messergebnis der Streuung am Halm *Phyll.v.g.* Es zeigen sich Signale, die jedoch eine breite Verteilung haben und keine Eindeutige Zuordnung zeigen.  
 Unten: Messergebnis der Streuung um pyrolysierten Halm *Phyll.v.g.* (320 °C, O<sub>2</sub> Atmosphäre), die Hauptsignale sind nicht mehr messbar und gehörten somit zu den Cellulose Signale. Es verbleibt ein breiteres noch schwächeres Streubild.



**Abb. 5.10:** Auswertung der Daten der SAXS-Messungen an *Phyll.v.g.* Blatt und Halm. blau: Halm *Phyll.v.g.* Halm pyrolysiert (120°C O<sub>2</sub> Atmosphäre), rot: Halm *Phyll.v.g.* pyrolysiert (320 °C, O<sub>2</sub> Atmosphäre), pink: Dinkelspelz nativ, grün: Dinkelspelz (120°C O<sub>2</sub> Atmosphäre).

Die Proben ließen nur eine grobe Aussage über die Bestandteile zu. Bei der pyrolysierten Probe ist der Lignin-Anteil zersetzt. Das verbleibende Signal passt nicht zu Signalen für Silica vom Typ Opal C oder Opal CT. Für den Halm konnte keine neue Aussage getroffen werden.

Die erhaltenen Reflexe konnten auch hier den organischen Bestandteilen der Pflanze zugeordnet werden. Lediglich schwache Reflexe bei 15.5° und 24.5° 2 $\theta$  blieben auch bei der vollständig pyrolysierten Probe erhalten. Dies entspricht d-Werten von 3.6 und 5.7 Å. Eine Zuordnung zu einer bestimmten Substanz oder Struktur ist damit jedoch nicht möglich, da keine weiteren Reflexe erhalten wurden. Der Ebenenabstand legt zwar nahe, dass es sich dabei um eine Si-O-Si Verbindung handeln könnte, auf Grund der röntgenographischen Daten bleibt dies aber rein spekulativ. Die Signale passen nicht auf die üblichen Silica-Modifikationen Opal-C, Opal-CT oder Cristobalit oder Tridymit [Graetsch 1994] oder zu Silica-Verbindungen. Da die Probe auch noch eine Anzahl von Salzen enthält, wäre dort eine Zuordnung denkbar, wurde aber nicht verfolgt. Das Breite Signal zwischen 16° und 23° 2 $\theta$

liegt entsteht durch amorphes Silica, in der Nativen Probe (blau) wurde es von den Signale der Cellulose überlagert.

Die Messungen im Kleinwinkelbereich, die neben Messungen in der Arbeitsgruppe FRATZL auch noch in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas GERBER in Rostock an *Phyll.ed.* durchgeführt wurden, ergaben ebenfalls keine detaillierten Auskünfte über großräumige Strukturen oder Überstrukturen in den Proben. Auf Grund der fraktalen Dimension der Kurvensteigung des Kleinwinkelbereichs ließen sich allenfalls Vergleiche zu sehr ähnlichen fraktalen Dimensionen in Kieselgelproben ziehen. Eine Zuordnung zu zugrundeliegenden Basispartikelgrößen, beispielsweise von kugelförmigen Partikel, die die Struktur aufbauen, konnte nicht erfolgen.

Gelartige Strukturen bedeutet hier, dass es sich um Silica mit einem hohen dreidimensionalen Vernetzungsgrad handelt, in dem allerdings auch noch OH-Gruppen vorhanden sind. Dem gegenüber stehen die Befunde der  $^{29}\text{Si}$ -MAS-NMR die weiter unten vorgestellt werden.

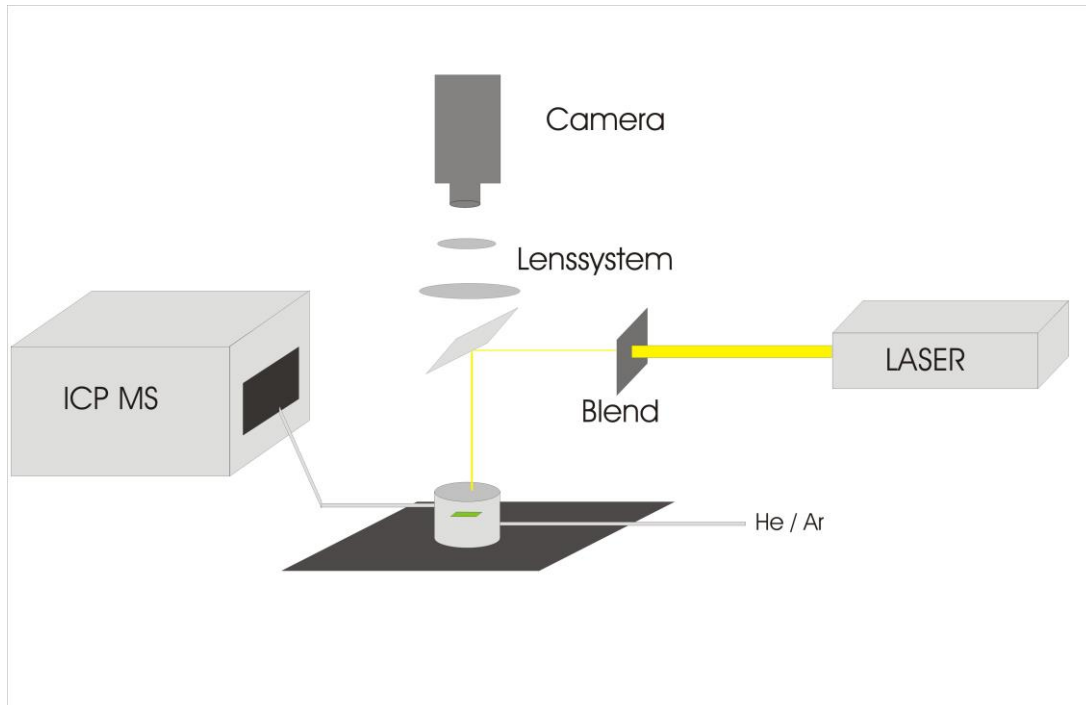
Aus den fehlenden Interferenzen bei der Röntgenbeugung und der röntgenamorphen Struktur des Silica lassen sich jedoch ebenfalls Rückschlüsse auf die Struktur ziehen. Es konnte so gezeigt werden, dass es sich nicht um kristalline oder teilkristalline Strukturen handelt. Zudem sind die Strukturen auch in Größenordnungen von wenigen  $10\text{\AA}$  nicht geordnet. Da sich mit weiteren Methoden, zum Beispiel der NMR, zeigen lässt, dass es sich nicht um typische Silicagel Strukturen handelt, erhält man aus der Kombination der Methoden weitere Rahmenbedingungen für das resultierende Modellsystem.

#### ***5.4 LA-ICP-MS Experimente***

Ähnlich dem Elementmapping bietet die Laser Ablation Induced Coupled Plasma Massenspektrometrie (LA-ICP-MS) die Möglichkeit orts aufgelöste Bestimmungen der vorliegenden chemischen Elemente einer Probe durch zu führen. Die Ortsauflösung wird dabei durch den Durchmesser des für die Ablation verwendeten Laserstrahls (Fluor-Laser) begrenzt. In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten wurden Strahldurchmesser von  $60\mu\text{m}$ ,  $40\mu\text{m}$ ,  $20\mu\text{m}$  und  $10\mu\text{m}$  an dem LA-ICP-MS der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Detlef GÜNTHER an der

ETH-Zürich verwendet. Dabei konkurriert die mögliche Ortsauflösung eines kleineren Durchmessers mit der freigesetzten Energie und damit mit der Substanzmenge, die anschließend im Massenspektrometer detektiert werden kann. Bei diesen Durchmessern im zweistelligen  $\mu\text{m}$  Bereich ist die laterale Ortsauflösung der Methode zwar deutlich schlechter als die Auflösung der Mikrosonde, dafür werden aber auch Informationen aus tieferen Zellschichten der Probe gewonnen.

Ein weiterer Vorteil ist, dass gleichzeitig eine größere Vielzahl verschiedener Elemente und Isotope vermessen werden kann. Durch die gleichzeitige Messung mehrerer Elemente an einer Probe ist die Zeit für die Probenvorbereitung kürzer und es konnten mehr Experimente in der zur Verfügung stehenden Zeit durchgeführt werden. Die Proben konnten schließlich noch nach Abschluss der LA-ICP-MS Messungen unter dem Mikroskop und Elektronenmikroskop weiter analysiert werden. Für die praktische Durchführung der Experimente hat sich ein Strahldurchmesser von  $60\mu\text{m}$  für die Halmproben und  $10\mu\text{m}$  für die Blattproben als geeignet erwiesen. Damit war es zwar nicht möglich, einzelne Zellen gezielt zu ablatieren, allerdings war dieser Durchmesser gut dafür geeignet Messungen im Bereich der Zellen oder im Bereich der Leitungsbündel durchzuführen.



**Abb. 5.11:** Schematischer Aufbau und Skizze zur Funktionsweise der LA-ICP-MS. Die Positionierung der Probe erfolgt unter Kamerakontrolle. Die Blende öffnet den Ablationslaserstrahl und definiert den Durchmesser der beprobten Stelle. Anschließend wird die verdampfte Probe durch den He/Ar Gasstrom zum Massenspektrometer transportiert.

Die relativ einfache Probenvorbereitung für diesen experimentellen Aufbau ermöglichte auch die Vermessung verschiedener Proben aus den Halm- und Blattbereichen der Bambuspflanzen. Ergänzend zu den nativen Proben wurden auch Messungen von vorbehandelten Proben durchgeführt. Hierbei handelte es sich um Proben mit Silica An- und Abreicherung gegenüber dem nativen Material.

Bei den Proben handelt es sich um heterogene Proben mit einer deutlichen Varianz der Dichte im Bereich der beprobten Bereiche. Des Weiteren unterscheidet sich die Absorption des Laserstrahls ebenfalls im Verlauf der Beprobung. Da die Messwerte und Wertänderungen der Intensität (Isotope pro Sekunde) sich über mehrere Zehnerpotenzen erstrecken, wurde eine Darstellung mit logarithmischer Ordinate gewählt. Zusätzlich wird durch die Beobachtung von zwei Silicium Isotopen mit ihren unterschiedlichen natürlichen Häufigkeiten auch eine unterschiedliche Auflösung der Daten gegenüber dem Rauschen des Systems erhalten. Es wurden sowohl die einzelnen Messungen ausgewertet und interpretiert als auch mehrere Messungen an vergleichbaren Proben gemittelt. Über die Messwerte wurde ein gleitender Mittelwert angewendet, um die Kurven zu glätten.

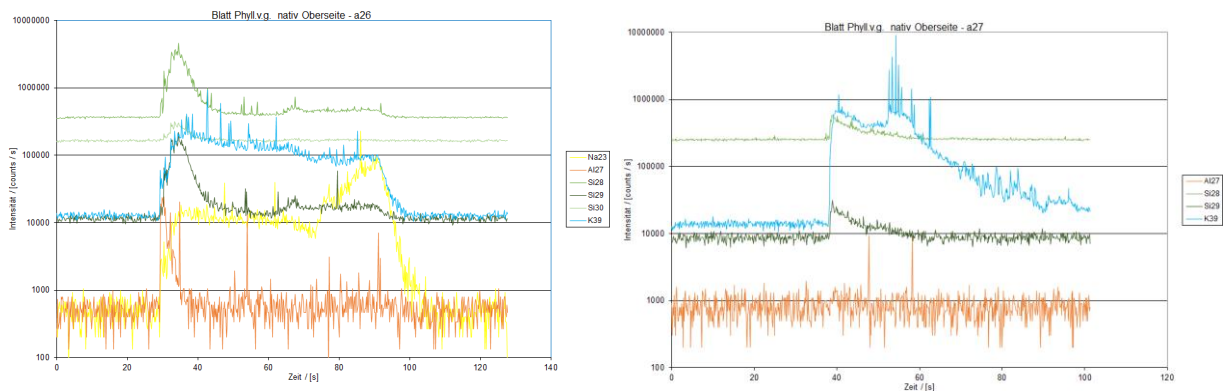
Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse und für weitere statistische Auswertungen wurde der Startpunkt  $T=0$  der Messung so gewählt, dass die Markierungssignale des Kaliums nach gleicher Vorlaufzeit einen Schwellenwert überschritten. Dies ließ sich für die Auswertung aller Messungen mit Hilfe eines Programms mit der Software R automatisieren, da mit Beginn der Ablation ein steiler Anstieg der Messwerte zu beobachten war und sich diese Stufenfunktion als Auslöser für die Zeitkalibrierung eignete. Anschließend wurde für einige Proben der Median aller zeitkalibrierten Kurven mit gleichen experimentellen Parametern gebildet und zu einem neuen Graphen zusammengeführt. Dieser Graph enthielt nun keine einzelnen, aus lokalen Ereignissen stammenden, Maxima mehr und ließ globalere Schlüsse über die Verteilung der Elemente in der der jeweiligen Probe zu.

#### *5.4.1 LA-ICP-MS der Blätter*

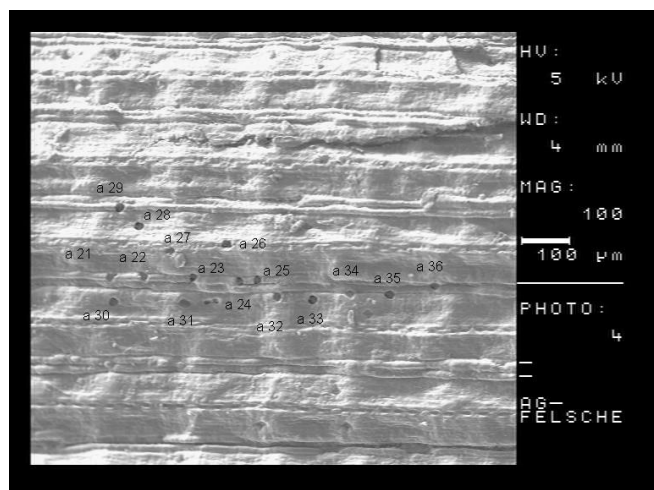
Die Messungen wurden mit einem Strahldurchmesser von  $10\mu\text{m}$  durchgeführt. Voruntersuchungen hatten ergeben, dass bei diesem Strahldurchmesser ausreichende Mengen des Blattmaterials in die Gasphase überführt werden konnten und somit auch die hohe laterale Auflösung des dünnen Strahls genutzt werden konnte.

### a) Messungen von der Blattoberseite

Auffälligste Merkmale der Signale von der Blattoberseite sind deutliche Signale von Silicium und Aluminium wie es auch nach den röntgenspektroskopischen Verfahren zu erwarten war. Die großen lokalen Unterschiede auch innerhalb einer Probe ließen sich nicht in den gemittelten Kurven, sondern nur im direkten Vergleich der Einzelproben zeigen Abb. 5.12. Unmittelbar neben einander liegende Probenstellen zeigten sehr große Abweichungen im Al-Signal. Es deckte sich mit den zuvor beschriebenen Mikrosondenbefunden, dass die Aluminiumkonzentration in den äußersten Blattschichten punktuell auftrat und nur die äußerste Schicht betraf. Da Aluminium vor allem auf der Blattoberseite und fast gar nicht auf der Blattunterseite auftrat, lässt es sich als Kontamination von Staub und im Regen transportierten Partikeln deuten, die sich während der Lebenszeit des Blattes in der äußeren Wachsschicht (Cuticula) angereichert hatten.



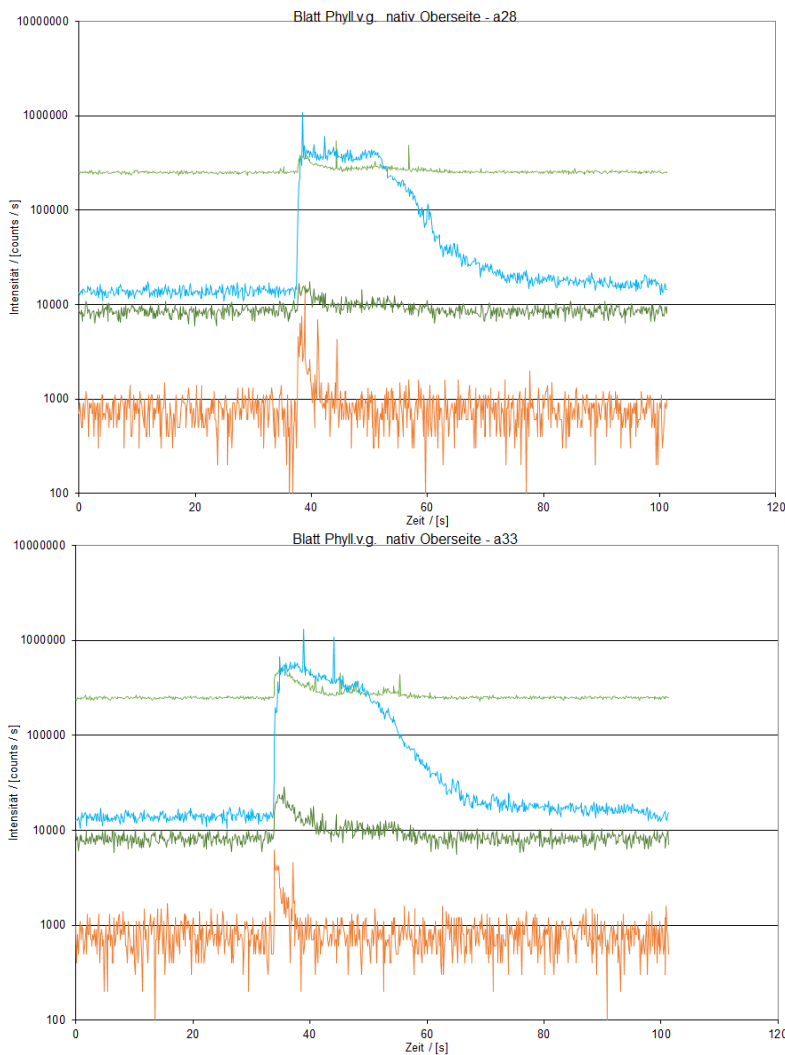
**Abb. 5.12:** LA-ICP-MS-Messung an der Blattoberseite des *Phyll.v.g.* Die beprobte Position a26 und a27 können auf dem SEM-Bild zugeordnet werden. Beginn und Ende der Messung werden durch die Signale von Kalium und Natrium sehr deutlich wiedergegeben. Nebeneinanderliegende Positionen können sich im Al und Si Gehalt deutlich unterscheiden.



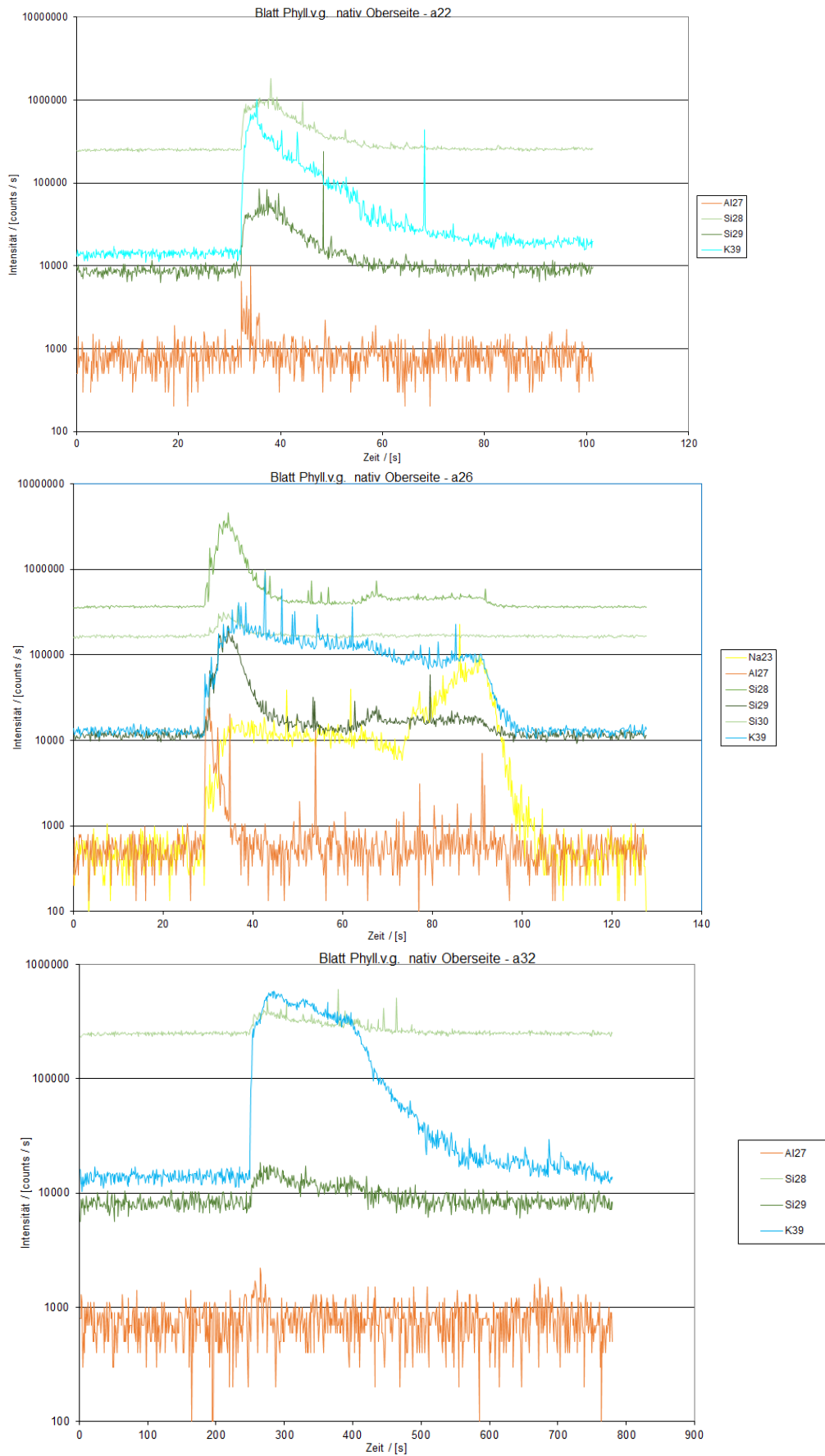
Die Silicium Signale zeigten in allen Messungen keine Korrelation zu den Aluminiumwerten, so dass hier von unabhängigen Mechanismen für den Einbau der Silicium Strukturen in das Blatt ausgegangen werden kann. Es zeigten sich bei den Messungen der Blattoberseiten in den

Silicium Signalen Unterschiede, je nachdem ob die Beprobung im Bereich der Leitungsbündel (Nervatur) des Blattes stattfand oder im Zellgewebe zwischen den Bündeln Material ablatiert wurde.

Die Daten der Ablation im Zellbereich zeigten Silicium Isotope vor allem im Bereich der oberen Zellschichten, also den Epidermis Zellen der Blätter. Dies deckt sich wiederum mit den Ergebnissen der Mikrosondenexperimente. Der Bereich der Blattmitte mit den Chloroplasten und dem Schwammparenchym weist nur geringe Silicium Konzentrationen auf. Auch dies deckt sich mit den Erwartungen, da hier keine besondere mechanische Verstärkung des Blattes erforderlich ist. Ein Zusammenhang zwischen photosynthetischer Aktivität und der Silicium Konzentration, lässt sich daher nicht bestätigen, da die Silicium Konzentration in den photosynthetisch aktiven Blattbereichen nicht erhöht ist.



**Abb. 5.13:** Messung an der Blattoberseite des *Phyll.v.g.* Die beprobte Position a28 und a33 können auf dem SEM-Bild Abb. 5.12 zugeordnet werden. Beide Proben aus Positionen zwischen Leitungsbündeln zeigen nur an der Oberfläche ein Si-Signal, das schnell wieder abfällt. Leicht erhöhte Si-Werte sind auf Verdampfungen am oberen Rand zurückzuführen, während in die Tiefe der Probe ablatiert wurde.



**Abb. 5.14:** Messungen im Bereich der Blatt-Leitungs-bündel zeigen eine erhöhte Konzentration von Silicium, Probenpunkte in Abb. 5.11

Lediglich bei tiefgehenden Beprobungen, die die Blattunterseite erreichten, ließ sich im Bereich der unteren Epidermis wieder eine Erhöhung der Silicium Konzentration zeigen (Abb. 5.13 unten, Probe a33).

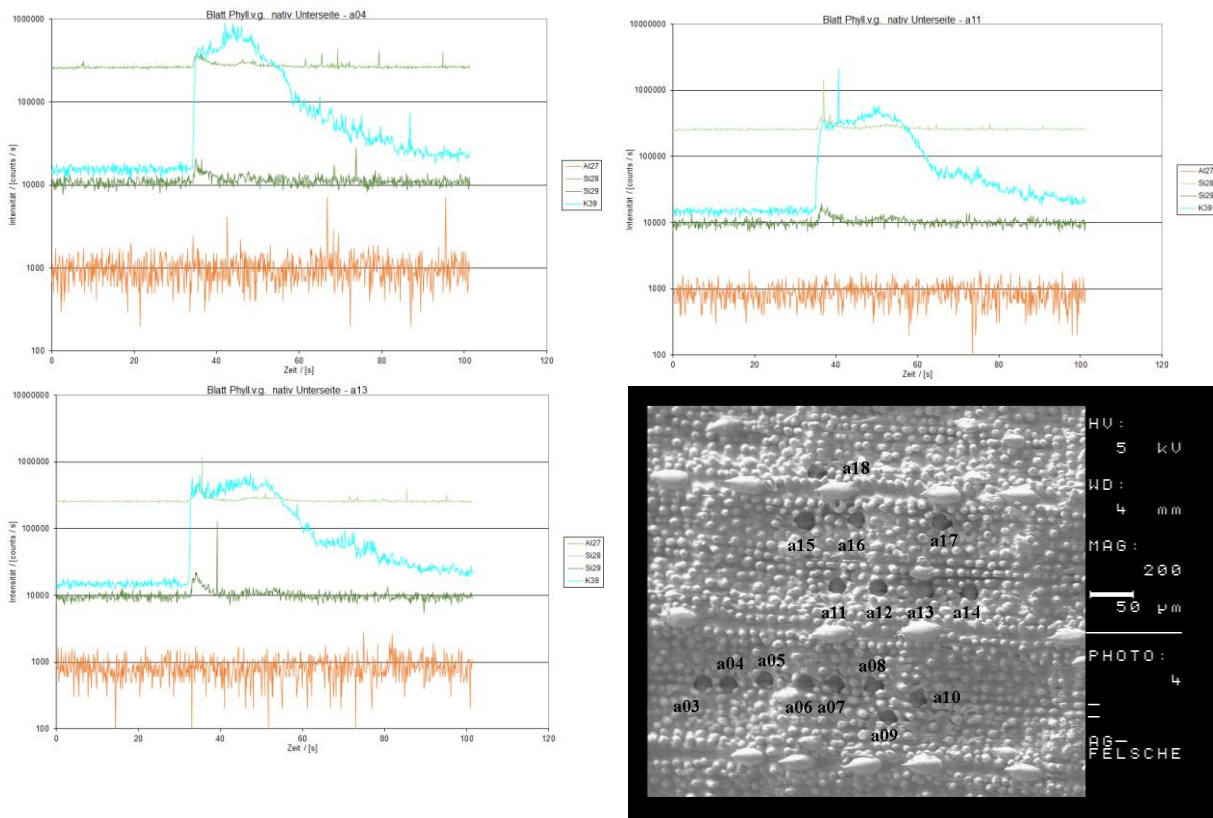
Anders stellte sich die Silicium Verteilung in Blattbereichen mit Leitungsbündeln dar. Hier reichte die erhöhte Silicium Konzentration deutlich in die Tiefe des Blattes hinein. (Abb. 5.14). Damit konnte gezeigt werden, dass es gerade im Bereich der Leitungsbündel, die für den Transport des Wassers und der Nährstoffe in der Pflanze erhöhte Drücke aushalten müssen, zu Anreicherungen von Silicium kommt. Diese Erhöhung beschränkte sich lokal unmittelbar auf die Leitungsbündel, so dass man von gezieltem Einbau und nicht von Diffusionsprozessen ausgehen kann. Hier kam der kleine Stahldurchmesser von 10µm einer hohen Ortsauflösung zu gute. Die Befunde, dass insbesondere die Leitungsbündel in den Blättern eine Erhöhung der Silicium Konzentration erfahren, sind analog zu den Befunden im Halmbereich, die weiter unten diskutiert werden. Strukturelle Daten zur Konstitution des Silica in den Bereichen der Epidermis und der Vaskulärbündel ließen sich mit der Methode der LA-ICP-MS jedoch nicht ermitteln. Informationen hierzu ließen sich nur über MAS-NMR Methoden ermittelt werden, die später noch vorgestellt und diskutiert werden. Eine Erhöhung der Silica-Konzentration in diesem Bereich ist außerdem im Einklang mit [Ma 2019], der für Reisblätter von einer Erhöhten Konzentration an Silica-Transportproteinen berichtet.

#### b) Messungen von der Blattunterseite

Ergänzend zu den Messungen der Oberseite der Blätter wurden auch Messungen von der Unterseite aus vorgenommen. Die bei zunehmender Ablationstiefe abnehmende Probenmenge konnte so kompensiert werden und bessere Vergleiche zwischen der Oberseite und der Unterseite des Blattes gezogen werden. Eine direkte Kalibrierungsmöglichkeit für den Ablationsmengengradienten gab es nicht, da das Probenmaterial dafür zu heterogen aufgebaut war. Es diente somit zumeist das Kaliumsignal als interner Standard.

Bezogen auf diesen Standard ist die Gesamtmenge an Silicium auf der Unterseite der Blätter deutlich geringer. Sie beträgt im Mittel 40%-45% der Silicium Konzentration der Blattoberseite. Dies lässt sich anschaulich auch an den Mikrosondebildern zeigen (Abb. 5.7 und 5.8). Eine so hohe Konzentration wie in den Epidermis Zellen der Oberseite findet sich auf der Blattunterseite nicht. Allerdings ließ sich auch für die Blattunterseite ein vom

Aluminiumsignal unabhängiges Silicium Signal nachweisen, das über die aus den Mikrosondenbefunden erwarteten Werte hinausging. Es gibt also auch auf der Blattunterseite Silicium Strukturen, die im oben gezeigten Querschnitt (Abb. 5.5) nicht nachgewiesen werden konnten. Dabei handelte es sich nicht um die Strukturen, die in den Elementmapping Daten (Abb. 5.8) für die unteren Flächen nachgewiesen werden konnten, da bei jeder einzelnen Messung ein Silicium Signal erhalten werden konnte (Abb. 5.15).

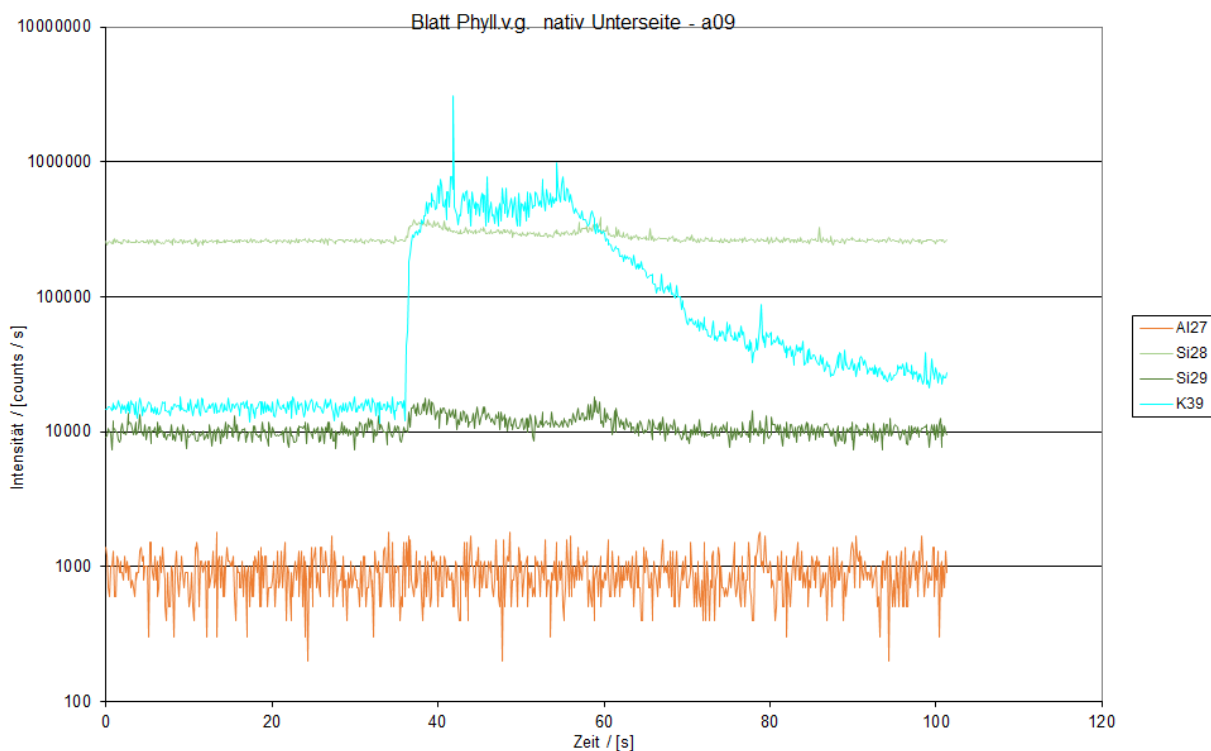


**Abb. 5.15:** LA-ICP-MS Messungen der Blatt Unterseite *Phyll.v.g.* und zugehörige Positionen. Alle Messungen lagen neben den Silica-Blockstrukturen der Spaltöffnungen, zeigen jedoch deutliche Silicium Signale.

Deutlich ließ sich auch erkennen, wenn ein im Blatt weiter an der Oberseite liegendes Leitungsbündel ablatiert wurde, da hier das Silicium Signal ein weiteres Mal auch vor Erreichen der Oberseite anstieg (Abb. 5.16).

Das weitere Ansteigen des Silicium Signals zum Ende der Messung zeigte auch an, dass das Blatt vollständig durchdrungen wurde. Auf einen Marker zwischen Proben-träger und Probe wurde verzichtet, da das abfallende Kaliumsignal hier ebenfalls als Marker diente. Darüber hinaus war keine gleichförmige Ablation möglich, so dass quantitative Aussagen

hauptsächlich aus den ersten ablatierten Schichten gewonnen werden konnten. Zudem war keine gleichzeitige optische Überprüfung der inneren ablatierten Blattstrukturen möglich, so dass eine direkte Korrelation zwischen biologischer Struktur und damit biologischer Funktion und der entsprechenden chemischen Zusammensetzung nur sehr eingeschränkt möglich war. In allen genannten Beispielen sowie der gemittelten Messung zeigte sich nahezu kein Signal von Aluminium. Dies bestärkt die Interpretation der Daten von der Blattoberfläche, dass das Aluminiumsignal weitestgehend auf Verschmutzungen und Artefakte aus der Zeit des Blattwachstums zurückgeht. Die in einzelnen Messungen aufgetretenen Aluminiumsignale beschränkten sich wiederum rein auf die Oberfläche.



**Abb. 5.16:** LA-ICP-MS Messung an der Blattunterseite *Phyll.v.g.*: Bei Erreichen der Blattoberseite beginnt das Kalium-Signal abzufallen, beide Silicium-Signale steigen aber noch einmal an. Hier wurde der Silica-reiche Bereich der Leitungsbündel auf der Blattoberseite erreicht.

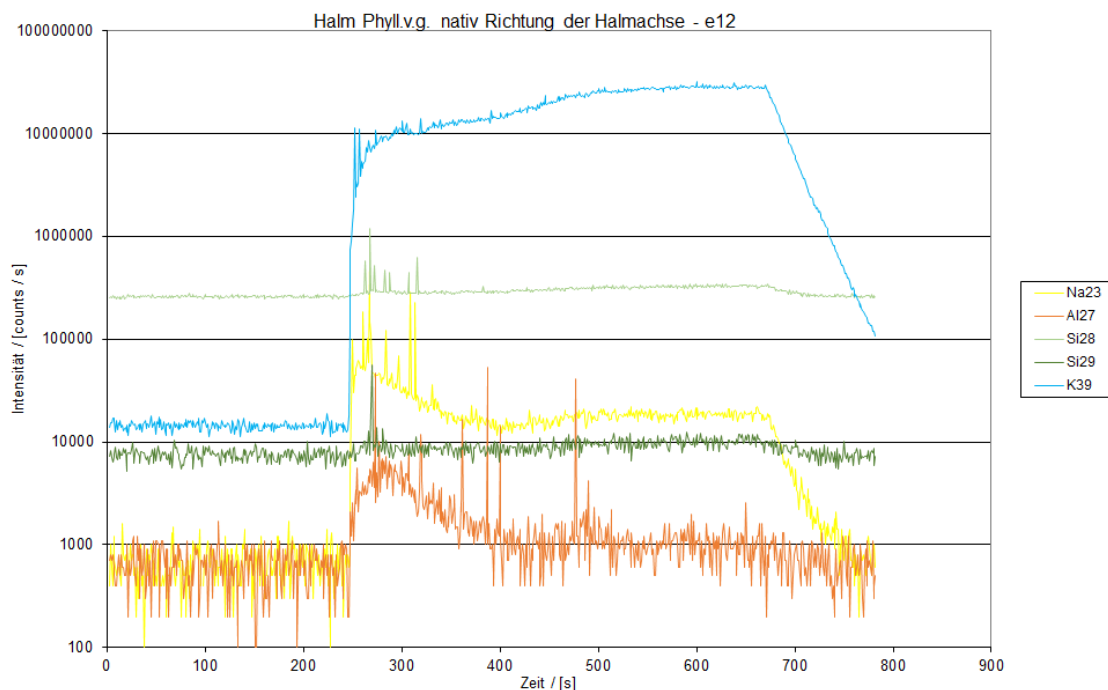
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Befunde der zuvor genannten Methoden in vollem Umfang bestätigt werden konnten. Es ließ sich zeigen, dass die Leitungsbündel besonders hohe Konzentrationen an Silicium enthalten, es aber auch eine durchgängige Silicaverteilung im Bereich der Epidermis Zellen gibt. Diese ist in den oberen Epidermis Zellen besonders ausgeprägt. Insgesamt spiegelten die Befunde der LA-ICP-MS die Vermutungen aus den

optischen Untersuchungen nach Pyrolyse gut wider. Auch der flächige Erhalt der Blattstruktur nach der Pyrolyse (Abb. 5.2 unten) und die Ergebnisse der SEM-Experimente sind so gut verständlich. Die Konzentration von Silica im Bereich der Leitungsbündel deutet hier auf eine deutliche Verstärkungsfunktion. Die Struktur des Silica konnte mit dieser Methode jedoch nicht weiter untersucht werden.

#### 5.4.2 LA-ICP-MS des Halmes

##### a) Fasern

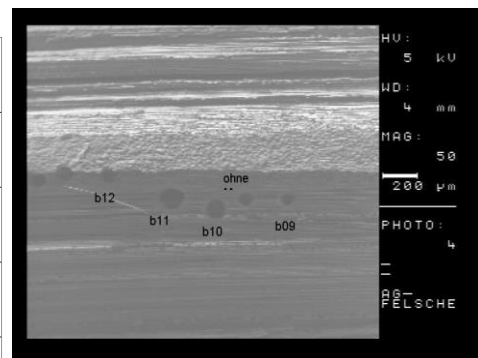
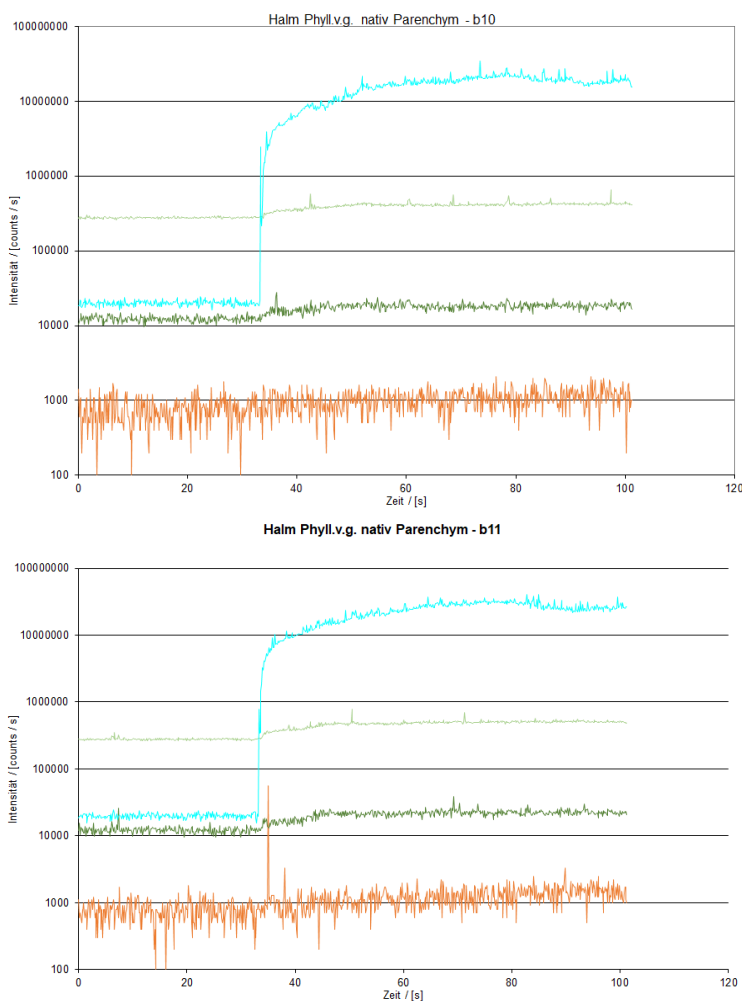
Im Bereich des Halmes wurden Messungen mit 20µm und 60µm Strahldurchmesser durchgeführt. Der 20µm Strahl bietet den Vorteil der feineren Ortsauflösung, allerdings konnten dabei in den Silicium Signalen keine signifikanten Anstiege gegenüber dem Rauschen beobachtet werden. Eine Vergrößerung des Strahldurchmessers auf die maximal möglichen 60µm brachte eine leichte Verbesserung. Es wurde zunächst eine Probe des *Phyll.* v.g. an verschiedenen Stellen in Wachstumsrichtung beprobt. Die Messungen wurden im Bereich der Cellulose Fasern durchgeführt, da diese, wie Vorversuchen gezeigt hatten, die höheren Silicium Konzentrationen aufwiesen.



**Abb. 5.17:** LA-ICP-MS Messung Halm *Phyll.v.g.* auf einen Querschnitt des Halmes. Die Natrium- und Aluminium-Signale stammen durch Werkzeugspuren zur Bearbeitung der Probe. Das Silicium Signal ist trotz eines Ablations-Strahl Durchmessers von 60 µm sehr gering.

Für die untersuchten Bereiche des Halmes ließen sich bei beiden Strahldurchmessern keine besonderen Verteilungen in Wachstumsrichtung des Halmes feststellen. Es ergibt sich ein zum Markierungsisotop  $^{39}\text{K}$  gleichbleibender Anteil an Silicium. Daraus folgt, dass es eine gleichbleibende Konzentration von Silicium über den gesamten Messbereich gab.

Die Messungen zeigen keine Korrelation der Aluminium- und Silicium-Verteilung. Hingegen gibt es eine auffällige Korrelation von Natrium mit Aluminium. Da höhere Konzentrationen an Natrium in Landpflanzen normalerweise nicht vorkommen und die Konzentration mit zunehmender Proben tiefe gegenüber dem Markierungsatom Kalium abnimmt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier um Kontaminationen der Probe durch den Schnitt mit einer Säge gekommen ist. Auf Grund der Härte des Materials ließen sich die Proben nicht schonender vorbereiten. Der Verlauf der Aluminiumkurve nähert sich wieder schnell dem Hintergrundwert und die Natriumkonzentration fällt ebenfalls auf einen niedrigeren Wert ab (Abb. 5.17).

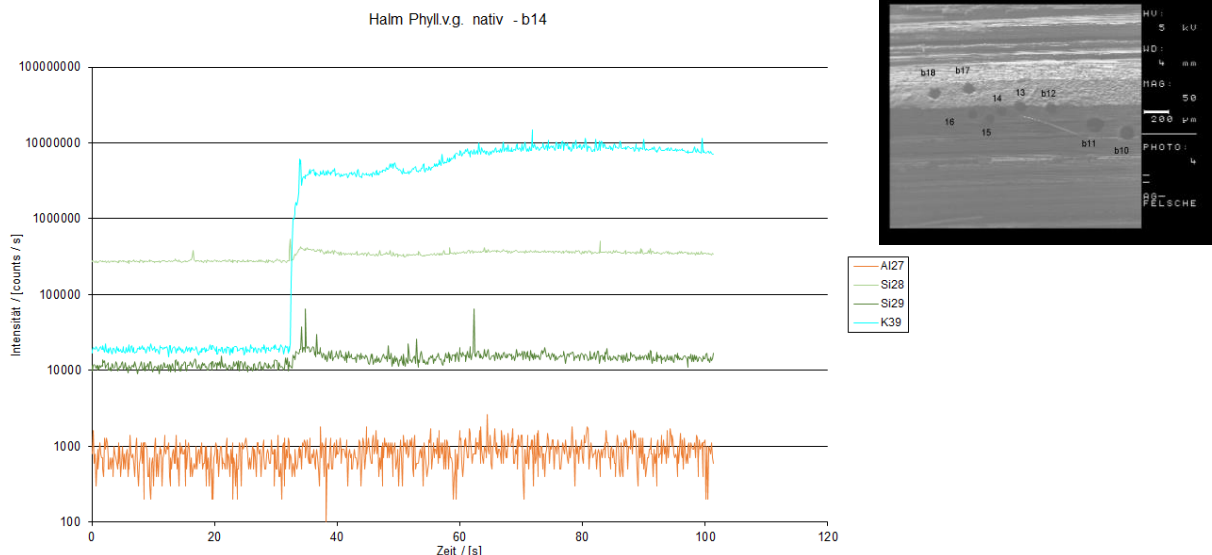


**Abb. 5.18:** LA-ICP-MS Messungen am Halm *Phyll. v.g.* senkrecht zur Wachstumsrichtung. Die Probenstellen b10 und b11 befinden sich im Cellulosefaserbereich und haben einen Durchmesser von 60  $\mu\text{m}$ . Es ist ein leichtes Silicium Signal zu erkennen. Die Aluminiumwerte sind wieder gering, da kein Werkzeug für die Bearbeitung bei der Vorbereitung gebraucht wurde.

Es wurden weiterhin Proben des Halmmaterials von *Phyll.v.g.* auch senkrecht zur Wachstumsrichtung beprobt. Dadurch war es möglich eine größere Anzahl von Cellulose Fasern während einer Messung zu beproben (Abb 5.18). Bei einem Strahl Durchmesser von 40µm konnten im Bereich der Cellulose Fasern keine signifikanten Silicium Werte erhalten werden. Eine Aufweitung des Strahldurchmessers auf 60µm führte jedoch zu erkennbaren Konzentrationen an Silicium. Da diese Probenrichtung kein Sägen zur Probenvorbereitung erforderte ist auch das Aluminium-Signal wieder unauffällig und es gibt keine Korrelation zum Silicium-Signal.

#### b) Parenchym Zellen des Halmes

Es wurden sowohl Zellen in unmittelbarer Nähe zu den Cellulose Fasern in der Probe gewählt und Messungen an äußeren, in Rindennähe gelegenen, Bereichen des Halmes durchgeführt. Die Lage dieser Zellen wurde gewählt, da im äußeren Bereich des Halmes sowohl auf Grund von Literaturangaben [Liese 1998, Strasburger 1998, Fengel 1984, Ma 2019] als auch aus eigenen Voruntersuchungen eine erhöhte Silica Konzentration erwartet wurde. Dies bestätigte sich zum Teil in den ICP-MS Untersuchungen. Die in Rindennähe gelegenen Parenchym Zellen zeigten eine geringe Silica Konzentration (Abb. 5.19), die die aber die Konzentration in den benachbarten Cellulose Fasern überstieg (Abb. 5.18).



**Abb. 5.19:** LA-ICP-MS Messung am Parenchym des Halmes in unmittelbarer Nähe zur Rinde. Es finden sich im Vergleich zu Zellen, die zu Fasern benachbart sind, leicht höhere Silica-Konzentrationen. Eine erhöhte Aluminium Konzentration konnte nicht gemessen werden. Es gibt also auch hier keine Alumosilica Biominerale.

Rechts: Position der Probenstelle am Rand zur Rinde und Morphologie der Probenlöcher.

Die beiden Messungen lassen sich jedoch nicht unmittelbar vergleichen, da auf Grund der unterschiedlichen Materialbeschaffenheit im Bereich der Zellen und der Fasern die Energie des Laserpulses zu unterschiedlichen Ablationsraten führte. Eine Kalibrierung oder Normierung der beiden Probenstellen war mit dem vorhandenen Messaufbau nicht möglich. Dies lässt sich an den Kaliumwerten erkennen, die im Bereich der Fasern um bis zu einem Faktor 10 niedriger sind als im Bereich der Parenchymzellen.

Parenchymzellen, die an weiter innen gelegenen Stellen des Halmes beprobt wurden, zeigten keine signifikanten Mengen an Silicium mehr. Von den Zellen, die zwischen großen Bereichen an Cellulose Fasern lagen, ließ sich vergleichbar viel Material, ebenso wie bei den Cellulosefasermessungen pro Laserpuls ablatieren. Das heißt, das niedrige Si-Signal liegt nicht an einer mangelnden Ablation durch den Laser, sondern zeigt an, dass im Bereich der Zellen die Silicium-Konzentration sehr niedrig ist.

Eine Aluminiumkonzentration ließ sich lediglich im Bereich der Rinde detektieren. Bereits wenige Millimeter von der Rinde entfernt wurden keine Signale des Aluminiums mehr gemessen. Dies untermauert die besondere Funktion des Aluminiums im Bereich der Rinde (vgl. Unterpunkt c) Rindenbereich).

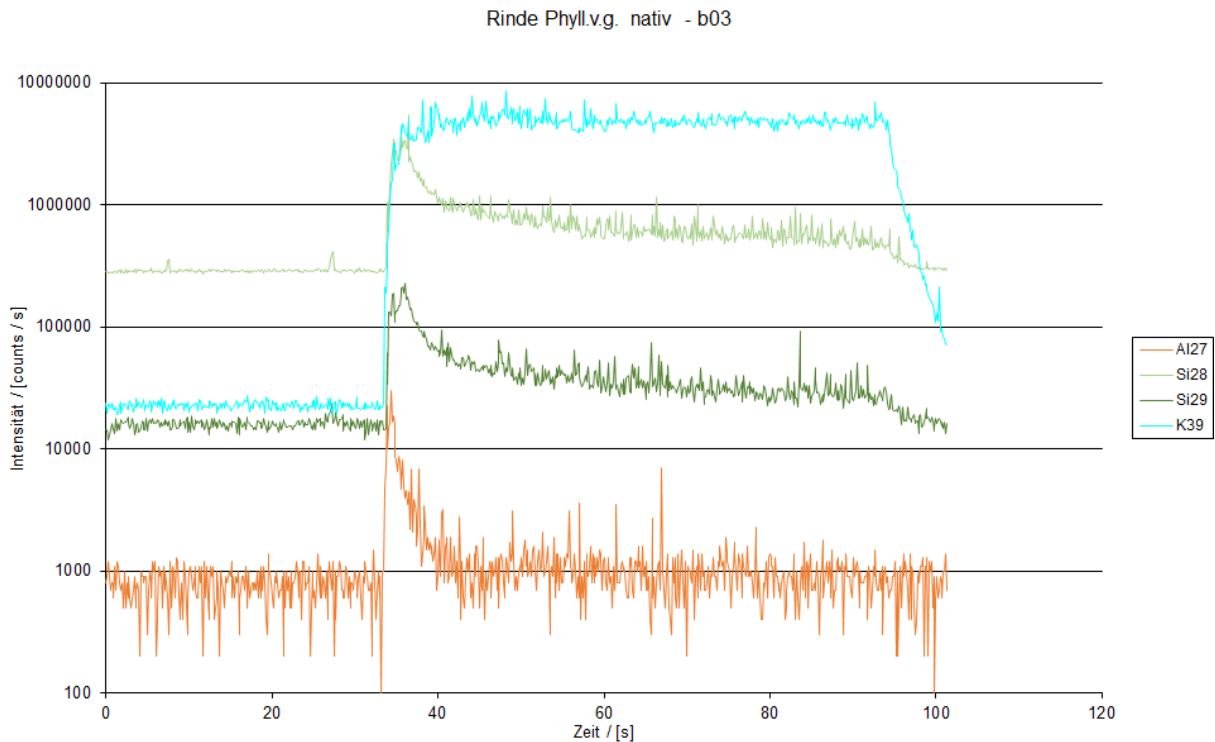
#### c) Rindenbereich

In der Rinde, die senkrecht zur Wachstumsrichtung beprobt wurde, waren zwei Effekte zu erkennen. Die Rinde erhielt insgesamt eine größere Menge an Silicium. Dies war bereits aus der Literatur [Liese 1998] und auch aus eigenen Vorexperimenten mit der Simultanen Thermoanalyse bekannt, und wurde durch die Massenspektrometrie bestätigt. Allerdings zeigten sich in der Rinde zwei unterschiedliche Verteilungen von Silica.

In der äußersten Schicht der Rinde, die bereits mit den ersten Laserpulsen ablatiert wurde, zeigte sich neben dem Silica auch eine größere Menge an Aluminium, dass hier eine Korrelation der Massenverteilung zum Silica zeigt (Abb. 5.20).

Die hohe Konzentration von Aluminium in der äußeren Rinde lässt sich als Schutzfunktion interpretieren. Ob es sich hierbei um mechanisch stabile Alumosilikate handelt, oder ob der

mechanische Schutz über Silica Verbindungen gewährleistet wird und die Aluminiumverbindungen einen chemischen Schutz vor Angreifern darstellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Ein Einbau von Alumosilikaten würde jedoch auf einen zweiten unabhängigen Synthesemechanismus deuten, der von der Aufnahme mineralischer Partikel und nicht nur von Polykieselsäure ausgeht. Eine solche Aufnahme wurde von Fu bereits für Farne einmal diskutiert [Fu 2002].

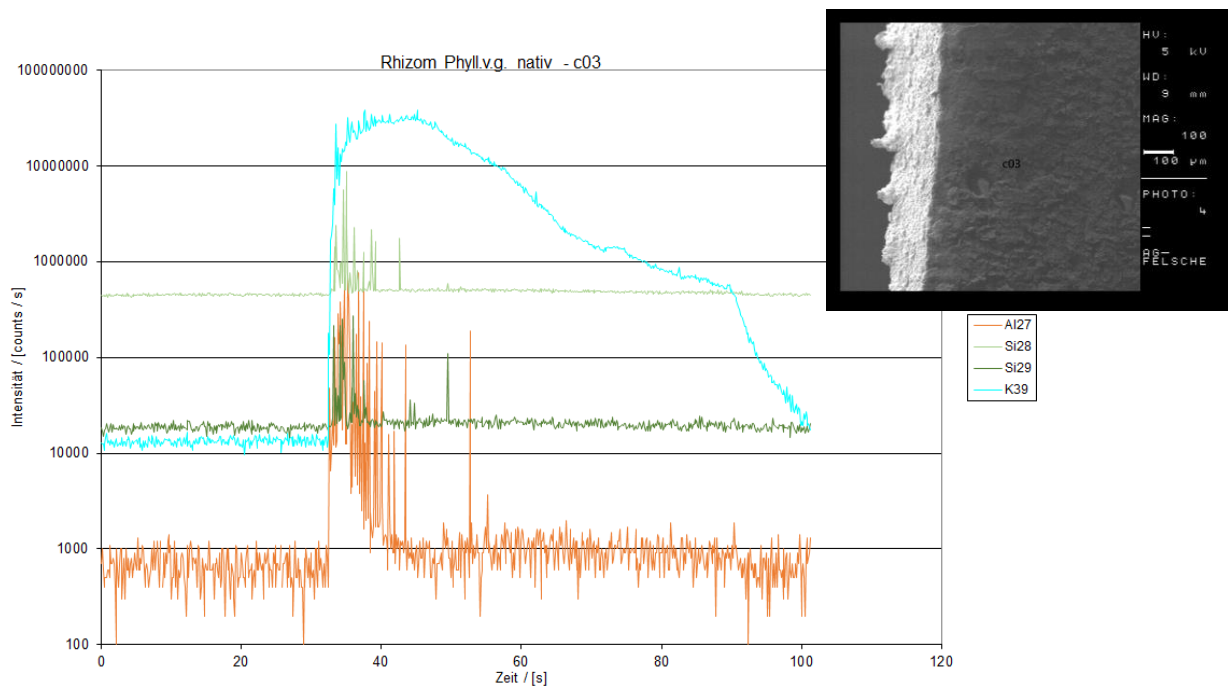


**Abb. 5.20:** LA-ICP-MS Messungen der Rinde von *Phyll.v.g.* Bereits in unmittelbarer Nachbarschaft zu Probenstelle b14 (Abb. 5.19) finden sich deutliche höhere Mengen an Silica, die auch mit dem Aluminium-Signal korrelieren. Dieses Signal findet sich so nur im Bereich der Rinde.

#### 5.4.3 LA-ICP-MS des Rhizoms

Das Rhizom wurde in den Experimenten in Wachstums- und Faserrichtung beprobt. Es wurden Bereiche in der Mitte des Materials ausgewählt, um möglichst keine Beeinflussung der Ergebnisse durch anhaftende Bodenpartikel zu erhalten. Das Material war zwar vor Durchführung des Querschnittes gereinigt worden, eine vollständige Entfernung aller Partikel aus dem Erdreich konnte jedoch nicht garantiert werden.

Die Daten der Rhizom-Messungen zeigen deutliche Unterschiede zu den zuvor gezeigten Daten aus dem Blatt- und Halmbereichen. In den besonders beobachteten Signalen von Silicium und Aluminium zeigte sich anstelle der kontinuierlichen Verteilung von Silicium mit einzelnen Maxima nun eine sehr punktuelle Verteilung sowohl der Silicium- als auch der Aluminiumsignale. Im Gegensatz zu dem auf Verunreinigungen durch die Säge zurückzuführenden starken Aluminiumsignal der Halmprobe ist es im Wurzelbereich kein Artefakt. Hier gibt es keine entsprechende Korrelation zwischen Aluminium und Natrium. Stattdessen zeigt sich ein Verteilungszusammenhang zum Silicium (Abb. 5.21).



**Abb. 5.21:** LA-ICP-MS Messungen im Rhizom von *Phyll.v.g.* Über den Messbereich zeigt sich eine deutliche Korrelation zwischen Aluminium und Silicium. Dazu besteht die Möglichkeit, dass a) im Wurzelbereich Aluminium von Kieselsäure getrennt und ausgeschieden wird, oder dass b) Alumosilikatpartikel aufgenommen werden und dann gemeinsam oder getrennt in die jeweiligen Pflanzenkompartimente transportiert wird.

Die Konzentration des Aluminiums ist im Rhizom bezogen auf die Kalibrierung mit Kalium als Referenz nicht so hoch wie im äußeren Rindenbereich, gegenüber der Silicium Konzentration ist es aber deutlich höher (Abb. 5.20 und 5.21). Dies kann die von Fu berichteten Befunde bestätigen, dass im Wurzelbereich ganze Mineralienpartikel aufgenommen werden und diese dann weiter aufgespaltet werden. Im Rhizom beginnt dann die Trennung von Aluminium- und Silicium Bestandteilen, die zu einem gezielten Einbau an den gewünschten Bereichen der Pflanze führt. Wie die Pflanze mit Überschüssigem Aluminium verfährt muss noch geklärt werden. Thesen, dass die Silica Ablagerungen in den

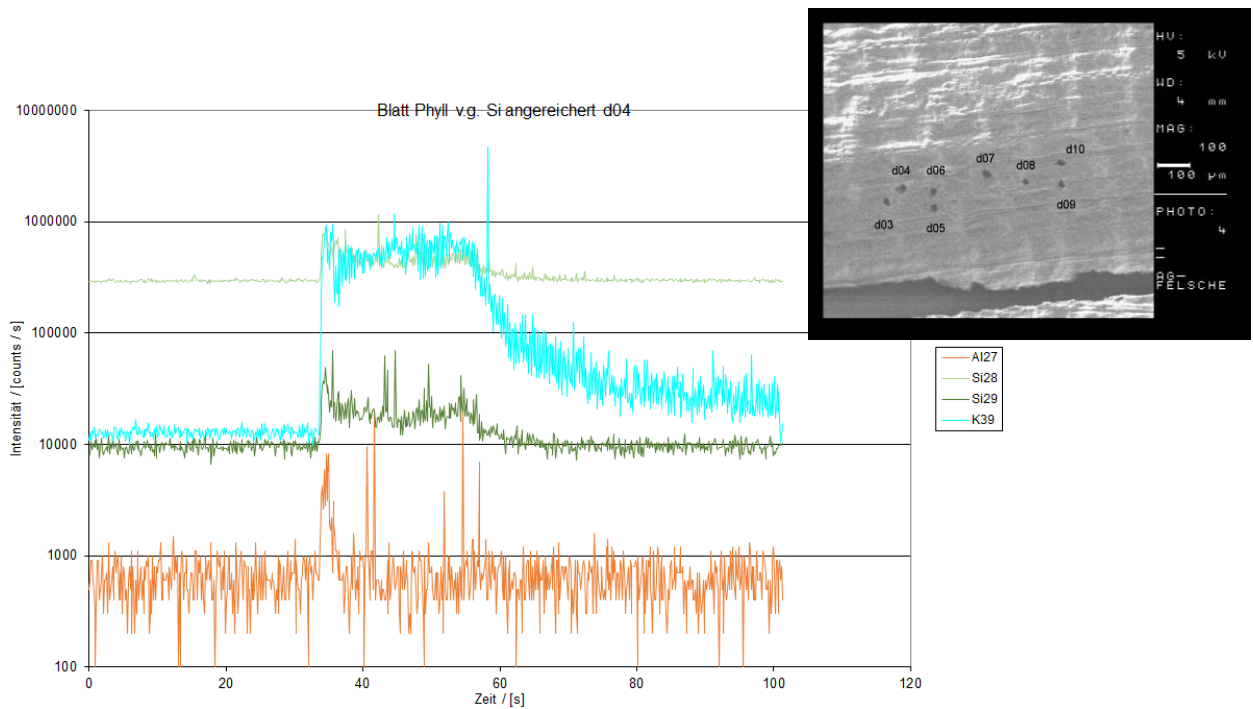
Pflanzen dazu dienen überschüssiges Aluminium zu fixieren und den biologischen Kreislauf zu entziehen konnten weitestgehend widerlegt werden, da sich in den in den Blättern gemessenen Phytolithen keine ausgezeichnete Konzentration an Aluminiumisotopen finden lässt [Sangster 1999]. Aktuell wird jedoch eher ein Mechanismus diskutiert, bei dem Aluminiumionen entweder außerhalb der Wurzeln chelatisiert und nicht aufgenommen werden, oder in die Wurzeln aufgenommen werden und dort getrennt und anschließend wieder ausgeschieden werden [Meunier 2012]. Die hier gemessene erhöhte Konzentration im Rhizombereich legt dabei den Schluss nahe, dass es eine Trennung der aufgenommenen Alumosilikate in Aluminiumionen und Silica gibt und überschüssiges Aluminium direkt im Wurzelbereich wieder ausgeschieden wird.

#### 5.4.4 LA-ICP-MS vorbehandelter Proben

##### a) Anreicherung von Silicium

Die Messungen an angereicherten Blättern zeigten in der LA-ICP-Massenspektrometrie deutliche Unterschiede zu den unbehandelten Proben. Der auffälligste und triviale Unterschied ist, dass die Gesamtkonzentration an Silicium in der Probe über der der nativen Probe liegt. Es zeigte sich außerdem am Beginn der Messkurven, dass es nun nicht mehr erst einen Anstieg der Aluminium Konzentration gab, dem die Siliciumisotope folgten, sondern dass das Silicium gleichzeitig oder sogar vor dem Aluminiumsignal anstieg. Es hatte also eine Abscheidung von Silica auf den Oberflächen der Proben noch oberhalb der Wachsschicht der Blätter stattgefunden. Dies ließ sich anschließend auch bei Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop verifizieren. Der Vergleich angereicherter und nativer Proben zeigte zudem, dass die Anreicherung nicht nur spezifisch an das vorhandene Silica erfolgte, sondern dass es in der gesamten Probe anreicherte (Abb. 5.22).

Damit erwies sich die Anreicherung über die Gasphase von Tetraethoxysilan (vgl. Versuchsbeschreibung Anreicherung) als nicht geeignet für die selektive Anreicherung im Sinne eines taktischen Wachstums. Die Konzentrationen an  $\text{Si}(\text{OEt})_4$  und die Gesamtenergie des Systems waren zu hoch, als dass es nur eine Reaktion mit den vorhandenen Si-OH Gruppen gegeben hätte. Diese Reaktion ist damit mit den durchgeführten Reaktionsbedingungen nur bedingt als Simulationsmodell für die zellgenaue Verkieselung von Pflanzenstrukturen in der Natur geeignet.



**Abb. 5.22:** LA-ICP-MS Messungen an Si-angereicherten Blättern. Die Gesamtkonzentration an Si wurde deutlich gesteigert. Ablagerungen erfolgten aber im gesamten Volumen und nicht nur an bestehenden Silica-Verbindungen. Dies ist sowohl auf der SEM-Aufnahme als auch im MS Signal an dem schon vor dem Aluminium, das in der Wachsschicht eingebettet ist, steigenden Si-Werten zu erkennen.

### b) Entfernung von Silicium

Um Vergleichsuntersuchungen zwischen nativem Material und Material ohne Silica durchführen zu können wurden sowohl Blätter als auch Halmmaterial für jeweils 24 Stunden in 2% HF bei Raumtemperatur behandelt. Die Behandlung von Proben in verdünnter Flusssäure zur Entfernung der enthaltenen Siliciumoxidverbindungen wurde anschließend an ausgewählten Proben mit Hilfe der LA-ICP-MS Technik überprüft. Es wurden dazu Proben des Halmes und der Blätter von *Phyll.v.g.* verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Behandlung mit 2% HF das Silica aus den Blättern nahezu vollständig entfernt werden konnte (Abb. 5.23). Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass es zu einer Freisetzung und anschließenden Verteilung von Aluminium über die gesamte Probe kommt. Ebenso erfolgt eine Kontamination der Probe mit Natrium und in der Folge eine Erhöhung der gefundenen Natriumwerte um einen Faktor 30 bis 40. Mit verdünnter Flusssäure vorbehandelte Proben der Blätter eigneten sich so zwar um in weiteren Experimenten den Einfluss von fehlendem Silica zu untersuchen, allerdings sind diese

Ergebnisse unter der Prämisse zu betrachten, dass es eine Verschiebung von Ionen und Material in der gesamten Probe gab.



**Abb. 5.23:** LA-ICP-MS an Blatt *Phyll.v.g.* nach 2% HF Extraktion für 24h; Das Kalium ist nahezu vollständig aus der Probe entfernt und kann daher auch nicht mehr als Marker für den Beginn der Ablation dienen. Der größte Anstieg des Aluminiumsignals bei 180s zeigt den Beginn an. Al ist über den gesamten Probenbereich verteilt, Silicium nahezu vollständig aus der Probe entfernt und nur im Bereich des Grundrauschens in der Messung zu sehen.

Für den Halmbereich stellen sich die Befunde punktuell etwas anders dar. Das gegenüber den Blättern deutlich dichtere Gewebe lässt sich mit 2% HF nicht so schnell extrahieren, so dass hier nach 24-stündiger Behandlung noch Reste von Silicium detektiert werden konnten. Die Verschleppung von Natrium und Aluminium in die Probe erfolgte in gleicher Weise wie beim Blatt. Als Konsequenz aus diesen Befunden wurden die Extraktionszeiten für Proben des Halmes auf 3 Tage verlängert.

Die gesamten Experimente der LA-ICP-MS zeigten, dass die Blätter bei weiteren Untersuchungen bedingt als Modell für die Silicastrukturen des Halmes dienen können. Dabei sind die Strukturen im Bereich der Epidermis Zellen sicher nicht auf den Halm übertragbar. Allerdings scheinen die Silica Konzentrationen im Bereich der Leitungs-bündel zu denen der Leitungs-bündel im Halm sehr ähnlich zu sein. Hier sind ähnliche Funktionen und Grundmechanismen zu vermuten. Nicht übertragbar sind in den Blättern gefundenen massiveren Strukturen mit Phytolith Charakter. Wenn es im Halm, Rinden und Rhizom Bereich ähnliche

Strukturen gegeben hätte, so wären sie bei den bisher gezeigten und kombinierten Methoden zu Tage getreten. Eine Struktur und damit eine Funktions-Wirkungsbeziehung zwischen anorganischem Biomineral und Organismus konnte bisher jedoch nur an Hand von Indizien vermutet werden. Für einen schlüssigen Beweis oder zumindest ein sehr starkes Indiz müssen die Methoden jedoch noch erweitert werden.

## ***5.5 Strukturanalyse II: MAS-NMR-Untersuchungen***

### *<sup>29</sup>Si- und <sup>27</sup>Al-Magic-Angle-Spinning Nuclear-Magnetic-Spectroscopy (MAS-NMR)*

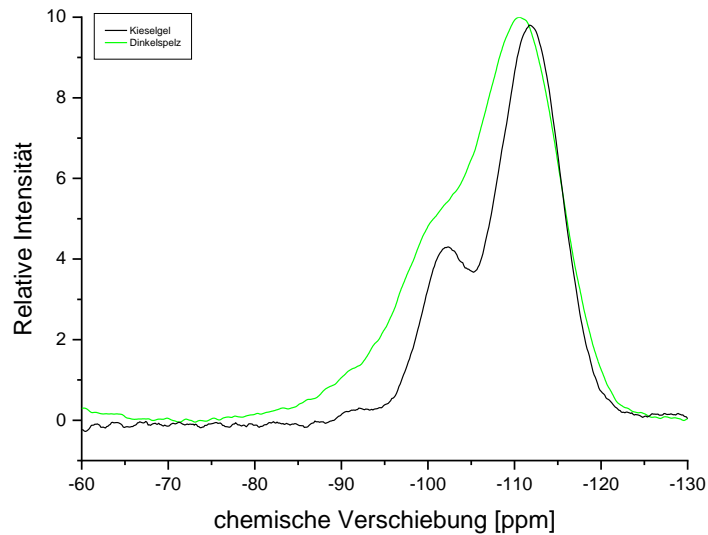
Die bisherigen Untersuchungen haben gute Informationen zur Verteilung des Siliciums in Poaceae, insbesondere in dem Referenzsystem Bambus, ergeben. Die Methoden waren jedoch, mit Ausnahme der röntgenographischen Verfahren, prinzipiell nicht in der Lage auch Strukturinformationen zu geben. Da sich auch die Röntgenverfahren auf Grund mangelnder Schichtdicken der Silicastrukturen und Kristallinität als nicht geeignet erwiesen hatte, blieb zur weiteren Strukturaufklärung nur der Einsatz der NMR.

#### *5.5.1 Native Proben*

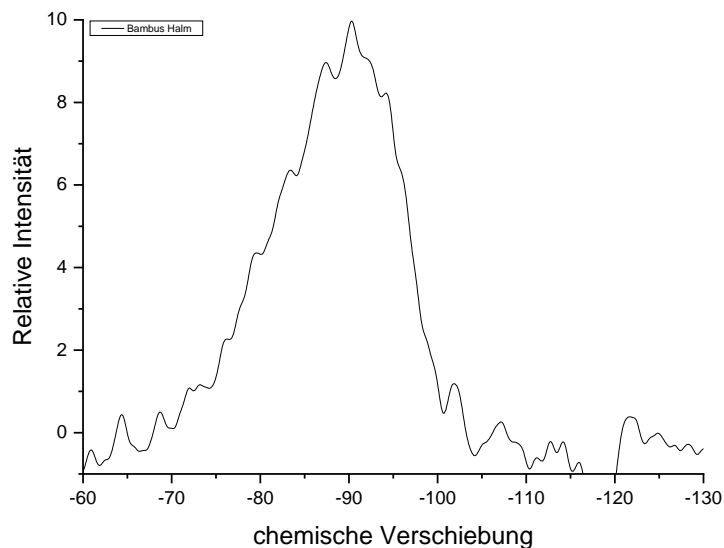
Für eine erste Einordnung und Übersicht wurden <sup>29</sup>Si-MAS-NMR Untersuchungen mit nativem, gemahlenem Material der Bioproben vorgenommen. Zum Einsatz kam hier sowohl Material vom Bambus, dessen herausragende mechanische Eigenschaften das Leitmotiv dieser Arbeit waren, als auch von Dinkel, der als bekannt Silicium reiche Pflanze bessere Ergebnisse erwarten ließ. Das Spelzmaterial des Dinkels lieferte bereits mit dem nativen Material gute Signale, so dass hier erste Auswertungen vorgenommen werden konnten. Es zeigte sich hier eine Signalverteilung von Q2, Q3 und Q4 Signalen [Engelhardt 1987], die mit einem hohen Q4-Anteil und somit einer starken dreidimensionalen Vernetzung der Struktur in Kieselgelen ähnlich war (Abb. 5.24).

Die deutlich geringere Konzentration von Silicium in Bambus führte dazu, dass mit den für Dinkel genutzten Parametern von Messzeit und Rotorgröße keine Ergebnisse erhalten werden konnten. Deshalb wurde ein 10mm Rotor mit gemörsertem Material des Bambushalms gefüllt und dieser während 96h vermessen. Selbst nach dieser langen Messzeit wurde nur ein unbefriedigendes Signal zu Rausch Verhältnis erzielt. Erst mit Kreuzpolarisierung zeigte sich

ein Q2-Signal, das also einer zweidimensionalen Verknüpfung von Si-O-Si entspricht (Abb. 5.25).



**Abb. 5.24:**  $^{29}\text{Si}$  MAS-NMR von Chromatographie Kieselgel (schwarz) und nativen Dinkelspelzen (grün). Der Dinkelspelz weist im direkten Vergleich etwas breitere Q4, Q3 und Q2 Signale auf, die durch Variation der Si-O-Si Bindungswinkel und Abstände beeinflusst sind. Dennoch trifft die Beschreibung einer Gel-typischen Struktur von Silica im Dinkelspelz zu.



**Abb. 5.25:**  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR Messung an nativem gemörserten Bambushalm. Mit einer Protonen Kreuzpolarisierung zur Zeitverkürzung findet eine Überbetonung der Q2 und Q3 Signale statt. Für systematische Untersuchungen war dieser Ansatz ungeeignet.

Die Signale des Halmes zeigen einen Schwerpunkt um Bereich Q3 mit deutlichen Anteilen an Q2. Es ist also eine vom Kieselgel-Modell abweichende Struktur von Silica, die im Halmbereich vorzufinden ist. Die Silica-Komponenten haben eine deutlich geringere 3-Dimensionale Verknüpfung.

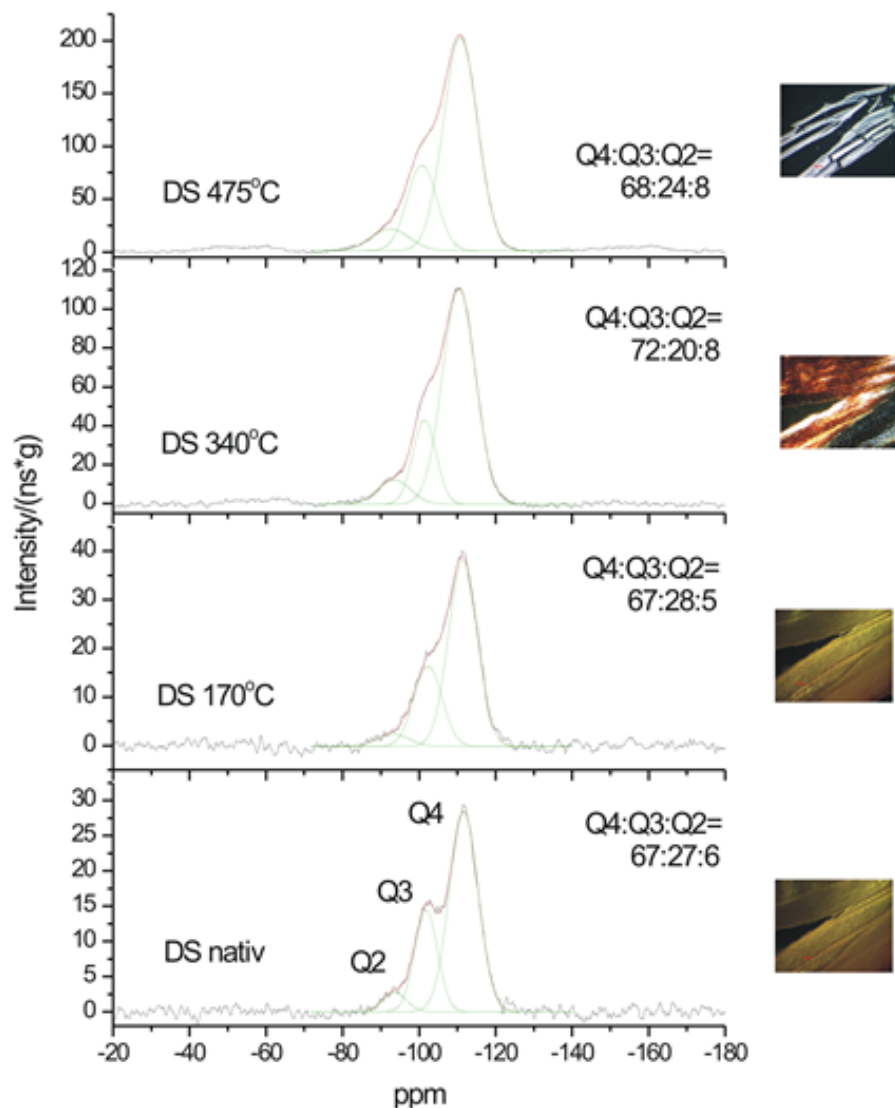
Eine weitere Erkenntnis dieses Versuches war, dass es nicht praktikabel und finanzierbar war, Reihenuntersuchungen mit diesen Proben und diesem Anregungsprogramm durchzuführen. Eine Cross-Polarisation (CP) Methode kam jedoch nicht in Frage, da dabei das Verhältnis von Q2 zu Q3 und zu Q4 verschoben worden wäre. Bei dieser Methode findet zuerst eine Anregung der Protonen der OH-Gruppen statt und anschließend wird mit einem weiteren Kontaktpuls die Anregung auf die zu messenden Kerne übertragen. Dies führt aber zu einer starken Anregung von Q2 und einer Unterrepräsentierung des Q4 Signales, da die Q2-Siliciumatome über 2 Hydroxylgruppen verfügen, von denen der Puls übertragen werden kann. Das 3-Dimensional verknüpfte Q4-Si hat jedoch keine Hydroxylgruppen und erhält daher auch keinen Impulsübertrag. Ein gutes Beispiel dafür ist hier zu finden sich bei Tacke und Ravera, die diese Effekte im Hinblick auf Biomineralien beschreiben [Tacke 2000, Ravera 2016]. Die Resultate erscheinen auf den ersten Blick eine deutliche Abweichung von den Kieselgel-typischen Mustern aufzuweisen, können aber durch die Intensitätsverschiebung der CP-Technik erklärt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung des Signal- zu Rauschverhältnisses stellte eine Erhöhung der Silicium Konzentration dar. Eine Erhöhung durch eine externe Quelle wie zum Beispiel durch Tetraethoxysilan kam hierbei jedoch nicht in Frage, da ja die natürliche Struktur aufgeklärt werden sollte. Eine Isotopenanreicherung mit  $^{29}\text{Si}$  während des Wachstums der Pflanze war mit den zur Verfügung stehenden Mitteln und Zeitrahmen ebenfalls nicht zu realisieren.

Daher musste die Konzentration der anderen Elemente ohne Strukturänderungen des Silica verringert werden. Dazu bestand die Möglichkeit zur Behandlung mit oxidierenden Säuren in einer Soxhlet Extraktion. Dies ist jedoch eine sehr zeitintensive Methode. Daher wurde die Technik der Pyrolyse, die sich bereits bei den optischen Verfahren bewährt hatte, nun auch für die Probenvorbereitung der MAS-NMR Experimente angewendet.

### 5.5.2 Anreicherung durch thermische Entfernung

Da sich die pyrolytische Entfernung der organischen Bestandteile des Biokomposits schon bei den optischen Verfahren bewährt hatte, wurde es auch zur Anreicherung der Silicium Konzentration für die NMR-Verfahren eingesetzt. Dazu musste sichergestellt sein, dass das Silica während der thermischen Behandlung keine Struktur- oder Phasenänderungen durchlief. Dazu wurde Dinkel als Silicium reichere Referenzpflanze herangezogen, da Dinkel ein allen Temperaturstufen ein messbares  $^{29}\text{Si}$ -Signal aufwies (Abb. 5.26).



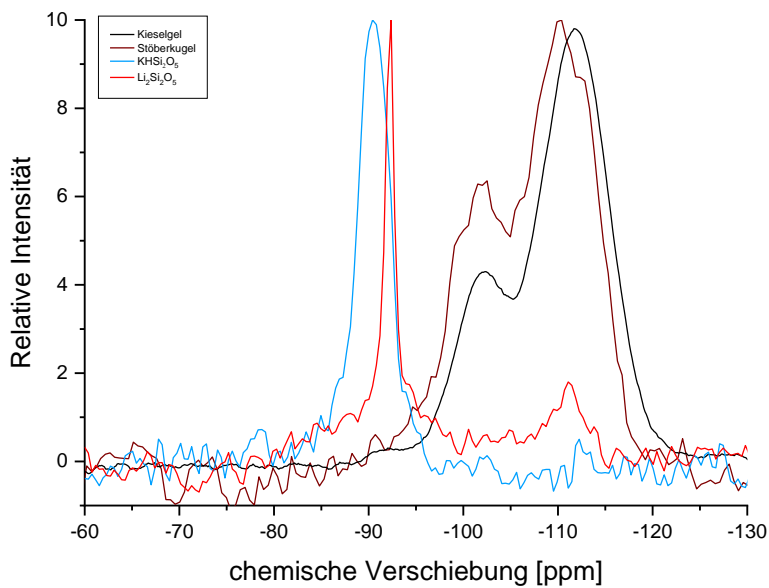
**Abb. 5.26:** Vergleich der  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR Daten über die Pyrolysestufen bei Dinkelspelz. Dinkelspelz wurde als Testsubstanz verwendet, da hier auch im unpyrolysierten Zustand ausreichend Silica für eine schnelle Messung vorliegt. Es ergeben sich nur kleine Verschiebungen zwischen den Signalen.

Die Befunde aus der Messreihe der Dinkelproben zeigte, dass sich die Verteilung von Q2:Q3:Q4 während der thermischen Anreicherung des Siliciums nicht wesentlich änderte und es auch nicht zur Bildung neuer oder kristalliner Strukturen kam. Die Halbwertsbreiten der Signale änderten sich nicht und die Integralverteilung ergab auch nur kleiner Veränderung der einzelnen Signale, die alle im Bereich der Messgenauigkeit lagen. Die Integrale wurden durch Simulation von Gaußsignalen zu einer Kurvenanpassung in Origin 6.0 vorgenommen und auf ganze Zahlen gerundet. Die Wahl der Basislinie erfolgte manuell, die Halbwertsbreiten, Intensitäten und Gaußkurvenmittelpunkte wurde iterativ ermittelt.

Die Änderungen im Temperaturverlauf zeigten sich vor allem darin, dass die einzelnen Signaltypen Q2, Q3 und Q4 immer weniger getrennt waren. Dies lässt sich dadurch erklären, dass einzelne Silica-Schichten, die zuvor durch organische Zwischenschichten getrennt waren, nun räumlich näher zu einander kommen und damit auch Wechselwirkungen möglich werden. Diese Wechselwirkungen zeigen sich im NMR-Experiment in einer Änderung der chemischen Verschiebung. Dieser Effekt zeigte sich entsprechend auch in allen untersuchten Systemen, die zur Interpretation der erhaltenen Daten hinzugezogen wurden. Die zunehmend fehlende Trennung zwischen den Signaltypen erschwerte auch die Ermittlung des entsprechenden Flächenintegrals zur Intensitätsbestimmung.

### *5.5.3 Vergleichssysteme zur Einordnung*

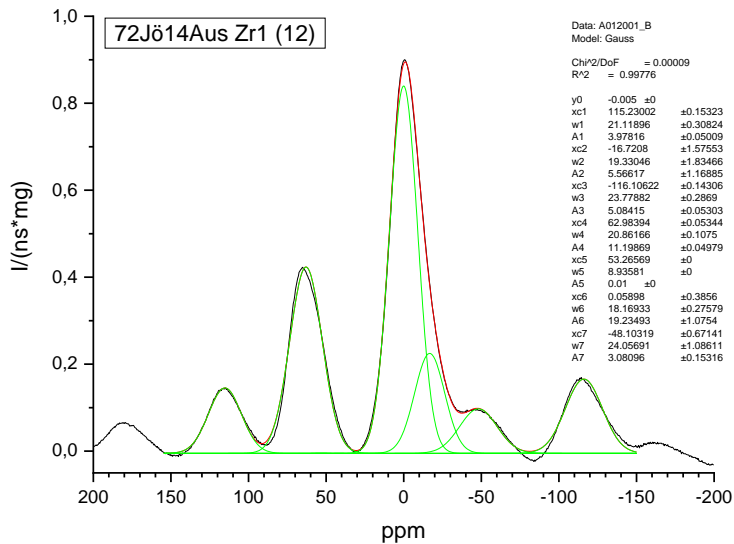
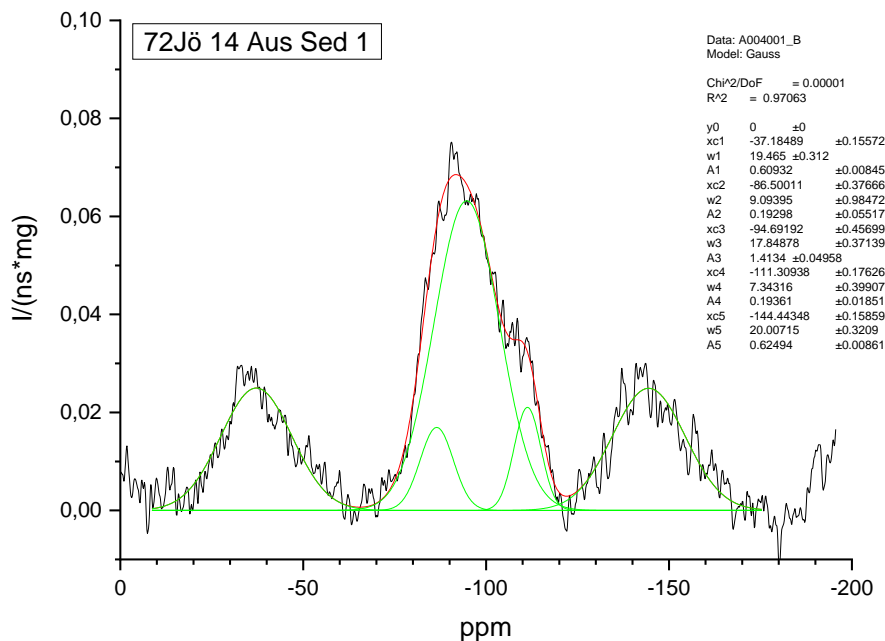
Die ungefähren Lagen der Signale Q2, Q3, Q4 für Si-O-Si Bindungen mit ihren Schwerpunkten sind gut bekannt [Iler 1979, Engelhardt 1978]. Neben der grundsätzlichen Frage der Koordination und des Vernetzungsgrades spielt aber auch der Bindungswinkel eine entscheidende Bedeutung. Die zeigt sich sehr deutlich an den MAS-NMR Spektren der Phyllosilikate. Diese Schichtsilikate des Typs  $M_2Si_2O_5$  mit  $M=H, Li, Na, K$  zeigen deutliche Abweichungen der chemischen Verschiebung, obwohl es sich bei allen Substanzen um Schichtsilikate des Q3 Typs handelt. Die unterschiedliche Faltung und die durch die verschiedenen kationischen Bestandteile gegebenen Abstandsvarianz der Silicium Kerne zueinander bedingen diese Verschiebungen. Die NMR-Befunde zu den Phyllosilikaten werden durch die aus Röntgenanalysen bekannten Strukturdaten unterstützt und geben so Hinweise zu der Interpretation der MAS-NMR Befunde der biologischen Proben (Abb. 5.27).



**Abb. 5.27:**  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR an Referenzsubstanzen zur besseren Abschätzung von Signalbreiten und chemischen Verschiebungen.

*Rot und Blau:* Synthetisierte und ionengetauschte Phyllosilikate vom Basistyp  $\text{H}_2\text{Si}_2\text{O}_5$ , die aus 3-fach vernetzten 2dimensionalen Netzwerken bestehen (Q3-Signal),  
*Braun und Schwarz:* Kieselgel und Stöber-Silica-Kugeln (Durchmesser 58nm), die als typische Vertreter des amorphen Gelyp-Silica mit überwiegendem Q4 und großem Q3-Signal vertreten sind. Zwischen den beiden Q3-Signale der beiden Typen liegen bis zu 15ppm Unterschied in der chemischen Verschiebung.

Ergänzend zu den Phyllosilikaten wurde auch ein Glimmer vermessen. Glimmer weisen eine Schichtstruktur aus Siliciumoxid Tetraederschichten und Aluminiumoxid-Oktaederschichten auf. Damit haben sie eine starre Struktur, allerdings kommt es bei Glimmern zu Besetzungen von Silicium Positionen durch Aluminium, was zu Ladungen in der Struktur und zu Verschiebungen von Signalen im MAS-NMR führt. Zum Verständnis der Aufnahme von Silica in Pflanzen und der Bioverfügbarkeit in wässrigen Systemen wurden auch  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Daten von sehr langsam sedimentierenden Partikeln aus einem Schweizer Bergsee (Jöri-See XIV, Davos, CH) aus Erosion von granitischen Felsen vermessen. Zur Trennung der feinsten Schwebepartikel wurde für 2 Tage in einem Atterbergzylinder sedimentiert und Anschließend der Überstand dekantiert, getrocknet und vermessen. Auch bei diesen bioverfügbaren Nanopartikeln und Polykondensaten zeigen sich neben dem erwarteten Q4 Signal auch Q2 aber vor allem Q3-Signale im Si-MAS-NMR (Abb. 5.28). Ein Teil dieses Q3-Signals ist dabei aber auf Al-Substitution von Si zurückzuführen. Im  $^{27}\text{Al}$ -MAS-NMR zeigen sich entsprechende Oktaeder und Tetraeder Signale des Aluminiums.



**Abb. 5.28:** oben: <sup>29</sup>Si MAS NMR von feinsten Sedimenten aus einem Gebirgssee. Diese Schwebeteilchen sind bioverfügbar und stehen Organismen als Silica-Quelle zur Verfügung. Der große Anteil an Q3-Signal ist auffällig, kommt aber zu einem Teil durch Al-Substitution zustande.

Unten: <sup>27</sup>Al MAS-NMR des gleichen Materials: Es zeigt sich die unterschiedlichen Oktaeder und Tetraeder Positionen des Al in der chemischen Verschiebung. Tetraedersignal bei 80 ppm, Oktaedersignal bei 0 ppm chemischer Verschiebung. Die Rotationsseitenbanden sind zusätzlich zu sehen.

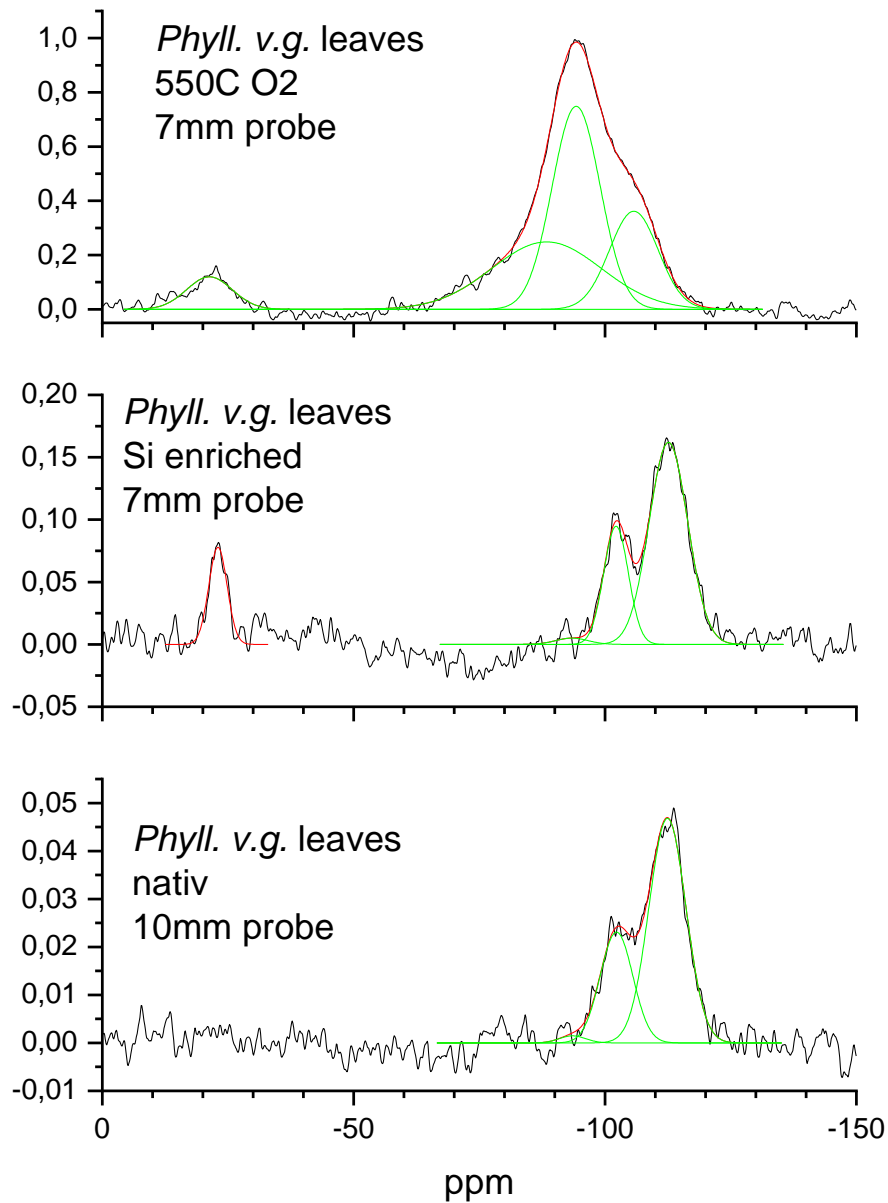
Schließlich wurde auch Chromatographie-Kieselgel als Referenz vermessen, da die in der Biomineralisation entstehenden Silicastrukturen in Diskussionen und in der Literatur (Mann 2001, Gerber 2003, Behrens/Baeuerlein 2007] wiederholt mit den Gelstrukturen gleichgesetzt wurden. Hier zeigte sich vor allem ein starkes Q4 – Signal mit einer hohen dreidimensionalen Vernetzung ( $Q4:Q3:Q2 = 91,5 : 6 : 2,5$ ). Den Signalen mit freien OH-Gruppen kommt hier nur eine Bedeutung als randständige Funktionen eines dreidimensional verknüpften Körpers zu.

Aus dem nichtkristallinen und röntgenamorphen Bereich der Referenzen wurden zudem globulare Silicapartikel, die nach dem Prinzip von Stöber [Stöber 1968] dargestellt worden waren, vermessen. Auch hier zeigte sich, dass das Q4 Signal des dreidimensional vernetzten Silica am stärksten war. Abhängig vom Kugeldurchmesser wurden jedoch höhere Q3 Anteile als bei der Kieselgel-Probe gefunden Probe: „Kugel 58“  $Q4:Q3:Q2 = 54 : 45 : 1$ . Dies hängt mit dem großen Oberflächenanteil der Nanokugeln zusammen (Abb. 5.27).

#### *5.5.4 MAS-NMR an Bambusproben*

Untersuchungen zum Bambus fanden wiederum an Materialien und Proben des Halmes und der Blätter statt. Da die Voruntersuchungen am Dinkel ergeben hatten, dass sich keine wesentlichen Änderungen während der gezielten Pyrolyse zeigten, wurde pyrolysiertes Material verwendet um eine ausreichende Silicium Konzentrationen zu erhalten. So wurde ein deutlich besseres Signal zu Rauschen Verhältnis erzielt. Die Füllung des 4mm Rotors und insbesondere auch des 10mm Rotors erforderte eine größere Menge an nativem Material, so dass keine lokale Auswahl der Probe getroffen werden konnte, sondern nur nach Blatt-, Halm- und Rindenmaterial unterschieden werden konnte. Diese Untersuchungen wurden, wie auch die am Dinkel vorgenommenen Experimente, mit einer direkten Anregung ohne Kreuzpolarisierung und unter Protonenentkopplung vorgenommen.

Zur Kontrolle wurde aus einem Blattsystem auch noch ein Vergleich von Nativem Material, Silica angereicherten und vollständig pyrolysierten Blättern gemessen (Abb. 5.29).

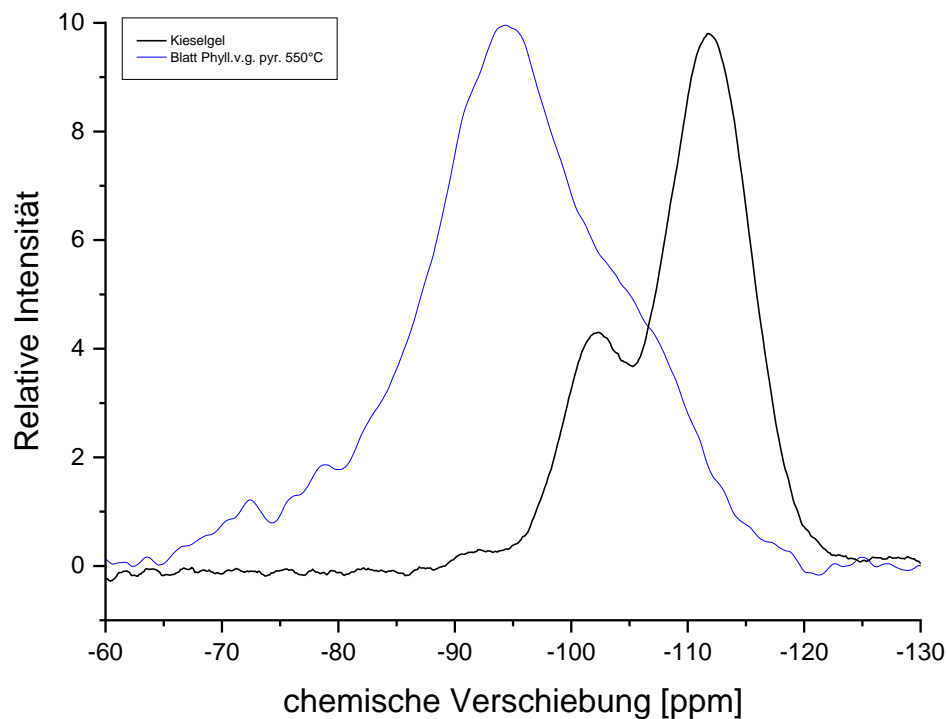


**Abb. 5.29:** Vergleich von Nativen, über die Gaspase angereichert und vollständig pyrolysierten Blättern. Die Messungen fanden auf 3 verschiedenen Spektrometern mit unterschiedlichen Rotoren statt und verschiedenen Blattproben der gleichen Pflanze statt. Mit der Pyrolyse erfolgt eine leichte Verschiebung hin zu niedrigerer Verknüpfung. Da ein temperaturbedingter Effekt eine stärkere Verknüpfung bewirken sollte, und keine Entknüpfung, also eine Verschiebung zu Q4, beruht der Effekt eher auf einem schnelleren Relaxieren der Q2 und Q3 in der organischen Matrix. Für die weiteren Untersuchungen werden die Proben daher als temperaturstabil bis 550°C verwendet.

## Blätter

Untersuchungen der Blätter wurden sowohl in Tallinn bei Prof. Dr. Ago SAMOSON als auch am hauseigenen MAS-NMR Varian INOVA 400 durchgeführt.

Allen Blattuntersuchungen am Material des Bambus *Phyll.v.g.* ist gemein, dass der Hauptteil der Signalintegrale im Bereich Q2 und Q3 lag. Der Anteil an Q4 und damit an dreidimensional vernetztem Silica war deutlich kleiner und die Grundverteilung der OH-Gruppen ist somit deutlich unterschiedlich zu den Kieselgelen, die bisher als Standardmodell für Silica aus Biomineralisationsprozessen dienten. (Abb. 5.30)



**Abb. 5.30:** Vergleich der typischen Gel-Signale im <sup>29</sup>Si MAS NMR (schwarz) mit der Verteilung des pyrolysierten Blattes (*Phyll.v.g.* 550°C O<sub>2</sub>). Es zeigt sich, dass der Anteil an 2D-Verknüpften Silica deutlich geringer ist. Das bedeutet, dass die in Abb. 5.7 und 5.8 gezeigten Blöcke entweder nicht massiv sind, oder nur einen geringen Anteil des im Blatt vorhandenen Silica darstellen.

Die einzelnen Blattproben zeigten allerdings untereinander leichte Varianzen im Verhältnis von Q2:Q3:Q4 (Tabelle 5.2). Diese Unterschiede lassen sich daraus erklären, dass die Proben von verschiedenen Pflanzen stammten und damit auch Parameter wie das Alter, die genaue Nährstoffversorgung oder die Lichtverfügbarkeit variierten und sich nicht genau bestimmen

ließen. Jede Probe enthielt Material von 3-5 Blättern. Die Stielbereiche der Blätter wurden vor der Pyrolyse entfernt und nicht vermessen.

Probe	Q2	Q3	Q4
A <i>Phyll.v.g.</i> 550°C Tallinn, 7mm Rotor	50% (+10% bei ca 80ppm)	31%	9%
B <i>Phyll.v.g.</i> 550°C Konstanz 4mm Rotor	52%	33%	14%
C <i>Phyll.v.g.</i> 550°C Konstanz 4mm Rotor	42%	31%	27%

**Tabelle 5.2:** Vergleich von Verhältnissen von Q2:Q3:Q4 von 2 verschiedenen Pflanzen des Typs *Phyll.v.g.* Abhängig von Alter der Blätter und Aufwuchs Bedingungen sind leicht unterschiedliche Verteilungen zu erwarten.

Aus der Kombination der hier erhaltenen Informationen zur Struktur des Silica im Blatt des untersuchten Bambus und der zuvor beschriebenen Befunde aus den Experimenten zur Elementverteilung lassen sich nun weitere Interpretationen zu Struktur und Funktionen des Silica in den Blättern ableiten.

Der direkte Vergleich der Blattproben mit den Referenzen aus der Gruppe der Phyllosilikate zeigte, dass es im Blattbereich Silicastrukturen mit unterschiedlichen Abständen und Faltungen des Silica-Gerüsts verglichen werden können. Gerade der flächige Schutz im Bereich der Epidermis Zellen der Blattoberseite erfordert auch die Bildung von anderen Ringweiten als den in den Referenzen vorkommenden Sechseringen (sechs Si-O pro Ring). Die Anpassung des Silicanetzes an gebogene und gewinkelte Strukturen der Zellwand erfordert neben der Verwendung von Sechseringen noch zumindest den Einsatz von Fünferingen. Dies führt zu einer Biegung, die aus der Ebene herausführt. Auch dadurch kommt es zu einer leichten Veränderung der chemischen Verschiebung im Q3 Signal. Der sehr hohe Anteil an eindimensional verknüpftem Silica, welches durch das Q2 Signal repräsentiert wird, deutet darauf hin, dass es sowohl im Bereich der Epidermis Zellen als auch in den Leitungsbündeln keine durchgängige dicke Auskleidung der organischen Strukturen mit Silica gibt, sondern dass es Fasern sind, die in die organische Matrix eingebettet liegen.

In Kombination mit dem geringen Anteil an Q4-Signalen in den Proben kann darauf geschlossen werden, dass sich das Silica in Monolagen zwischen der organischen Matrix befindet. Dabei wiesen die Proben mit einem hohen Q2 Anteil vor allem faserige Komponenten auf, die die Zugfestigkeit des entsprechenden Gewebes erhöhen. Durch den Einbau von ein- und zweidimensionalen Silica-Strukturen kann die Pflanze die Zugfestigkeit des Gewebes deutlich erhöhen und gleichzeitig die Flexibilität erhalten. [Cornelissen 2019]

Die Gesamtverteilung von Q2 zu Q3 lässt sich erklären, in dem man von eindimensionalen Fasern neben Bändern und schmale flächigen Strukturen ausgeht. Dabei müssen in der nativen Pflanze die endständigen freien OH-Gruppen der Silica Verbindungen mindestens über Wasserstoffbrücken zum umliegenden organischen Gewebe in ihrer Energie abgesenkt werden, damit nicht eine Polykondensation mit weiteren Kieselsäureoligomeren zu einer dreidimensionalen Struktur führt.

Es wurden in den mikroskopischen Untersuchungen keine Phytolithe oder Silicaausscheidungen in den Zellen gefunden, so dass der Anteil an Q4 nicht solchen Partikeln zugeschrieben werden konnte.

Der gefundene Q4 Anteil wurde auf Grund der Befunde der Experimente zur Silicium-Verteilung im nativen Gewebe den oberen Epidermis Zellen zugeordnet. Hier kann ein Anteil an dreidimensional strukturiertem Silica die mechanische Festigkeit der Blätter deutlich verbessern und helfen, die Blattform unabhängig vom Wasserdruck in den Blattzellen aufrecht zu erhalten. Die besonders hohe Konzentration an Silicium in diesen Bereichen, die sich im Elementmapping zeigte, erhöhte zudem die Wahrscheinlichkeit, dass es zu Verknüpfungen zwischen einzelnen Silica Schichten kam und somit eine dreidimensionale Q4-Verknüpfung ausgebildet wurde.

Jedoch selbst ein Anteil von 27% Q4 in der Probe bedeutet nur eine sehr geringe Dreidimensionalität. Schon eine zweifache Lage aus Silica würde den Q4 Anteil gegen 50% streben lassen. Eine Interpretation der Daten zu Gunsten globularer Partikel ist somit ausgeschlossen. Damit widersprechen die für die Blätter gefundenen Daten auch der Interpretation, dass die Silica-Anteile, die über Biomineralisation als Funktionsbausteine oder als Ablagerung für toxische Elemente in den Pflanzen ausgebildet werden, immer als kieselgelähnliche Struktur vorliegen.

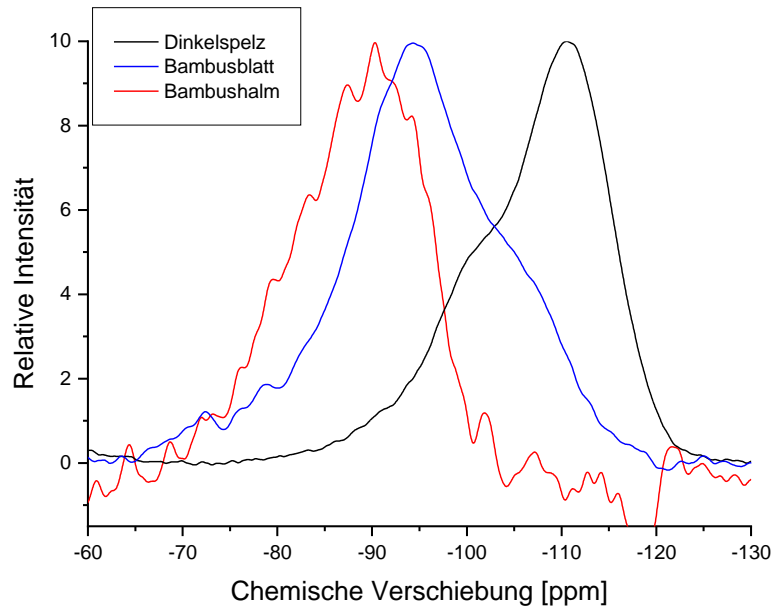
Die Daten untermauern dagegen die These, dass es in den Gräsern, speziell im Bambus, Prozesse und Funktionen zur Steuerung der Kieselsäurekondensation gibt, die ein thermodynamisch bevorzugtes Wachstum in die dritte Raumdimension verhindern. Auf diese Weise erhalten die Strukturen eine hohe Flexibilität bei gleichzeitig hoher Bindungsfestigkeit.

### *Halm*

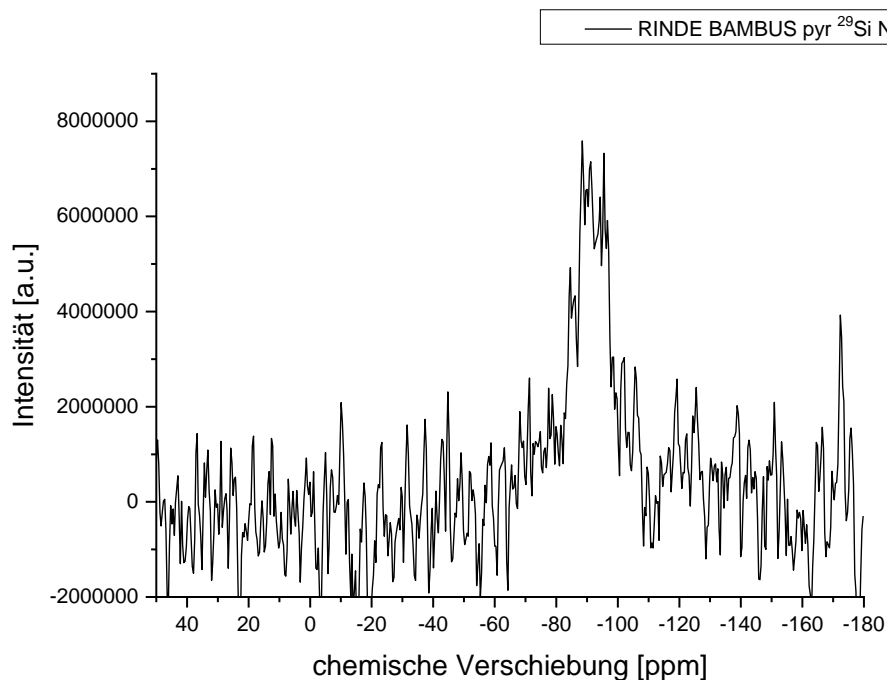
Da der Anteil an anorganischen Bestandteilen im Halm deutlich niedriger als in den Blättern war, wurde hier entsprechend mehr Material für die Pyrolyse benötigt, um die Rotoren für die MAS-NMR Experimente füllen zu können. Es wurde, wie zuvor bei den Proben der Blätter beschrieben, Material von verschiedenen Halmabschnitten benutzt, um einen Mittelwert über die Pflanze zu bekommen und lokale Effekte ausschließen zu können. Die pyrolytischen Verfahren und die optischen Untersuchungen hatten zuvor gezeigt, dass die größten Silicavorkommen im Bereich der Leitungsbündel und der sie umgebenden Cellulose vorkam. So gab es für die Befunde der NMR-Messungen aus dem Halmbereich zwei verschiedene Szenarien, die zu klären waren:

1. Es handelte sich um Diffusionsprozesse aus den Leitungsbündeln. Dies würde eine Polykondensation von Kieselsäure im Umfeld der Bündel erwarten lassen, die nach thermodynamischen Prinzipien zu einer kieselgelartigen Struktur mit einem entsprechend hohen Q4 Anteil führen müsste.
2. Es handelte sich um den gezielten und strukturierten Einbau von Silica im Bereich der Leitungsbündel, die einer Verstärkung des Halmes im Bereich der mechanisch besonders beanspruchten Bündel führte. Ein solch gezielter Einbau sollte auch die Flexibilität des gesamten Halmes erhalten und somit nicht zu einer spröden dreidimensionalen, sondern zu einer niederdimensionalen Silicastruktur führen.

Im Halmbereich zeigten die Befunde, dass es sich, noch deutlich stärker als in den Blättern, um ein Q2 Signal handelte (Abb. 5.31), also in erster Linie nur faseriges, eindimensionales Silica vorlag. Da grundsätzlich von einer ausreichenden Silicaversorgung für beide Szenarien ausgegangen werden konnte, ist dies ein sehr starkes Indiz für einen aktiven Mechanismus der Pflanze.



**Abb. 5.31:** Vergleich der  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR Spektren von pyrolysiertem Halm, Blatt (beides  $550^\circ\text{C}$ ,  $\text{O}_2$ ) und chromatographischem Kieselgel. Die Signale des Halms sind zu positiveren ppm Werten verschoben, das Silica im Halm hat noch mehr Q2-Q3 Anteile als die Blätter. Dies ist ein starker Indikator für eine gezielte faserige Verstärkung der Leitungsbündel und der Cellulose Fasern.



**Abb. 5.32:**  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR Messung an pyrolysierte Rinde von *Phyll.v.g.* ( $550^\circ\text{C}$ ,  $\text{O}_2$ ). Die Messwerte sind noch zu deutlich kleineren Q-Werten im Vergleich zu Halm und Blatt verschoben. LA-IPC-MS und Elementmapping zeigten im Bereich der Rinde aber Erhöhungen von Al-Konzentrationen an. Die Ergebnisse decken sich also mit einer Silica-Struktur mit einem Al-Austauschanteil im Rindenbereich. Da diese Struktur nur im Bereich der Rinde zu finden ist, kommt ihr sicher eine mechanische Schutzbedeutung zu.

## *Rinde*

Die in der Rinde vorkommenden Silicaanteile zeichnen sich durch eine ganz besonders ausgeprägte Eindimensionalität, also ein hohes Q2-Signal, aus. Dies ist erstaunlich, da die zuvor durchgeführten Experimente einen höheren Silicium Anteil in der Rinde als im Halm ergeben hatte. Damit wäre zumindest jedoch auch ein höherer Anteil an Q3 Signal zu erwarten gewesen (Abb. 5.32).

Die Erklärung für dieses unerwartete Resultat lässt sich mit den Ergebnissen der LA-ICP-MS Daten des Rindenbereichs finden. In den entsprechenden Messungen fiel neben dem entsprechenden Silicium Signal besonders ein erhöhter Aluminiumanteil im Rindenbereich auf. In Kombination der beiden Methoden führt dies zu dem Schluss, dass es sich im Rindenbereich nicht um reines Silica handelt, sondern dass einzelne Silicium Atome durch Aluminium ersetzt wurden. Durch diese Substitution ändert sich die chemische Verschiebung des Silicium Signals zu kleineren Q-Werten. Der hohe Q2-Anteil und der sehr niedrige Q3-Anteil zeigen hier auf, dass es sich um ein zweidimensionales Schichtsilikat handelt, in dem ein Silicium Aluminium Austausch vorliegt.

Die entsprechende Verteilung der  $^{29}\text{Si}$ -NMR Signale ließ sich auch an den Tetraederschichten von Glimmern und Tonen zeigen, in denen ebenfalls solche Substitutionen vorkommen.

[Herrero 1984]

Da für die Rindenbereiche andere Silica- und Silikatstrukturen als in den Blättern und dem Halm verwendet werden, liegt die Folgerung nahe, dass es sich bei allen Strukturen um eine gezielte Verwendung für den entsprechenden Einsatz handelt. Im Rindenbereich ist vor allem eine Funktion als mechanischer Schutz vor Fressfeinden und mikrobiellen Angriffen zu vermuten.

### *5.5.5 Strukturvorschlag*

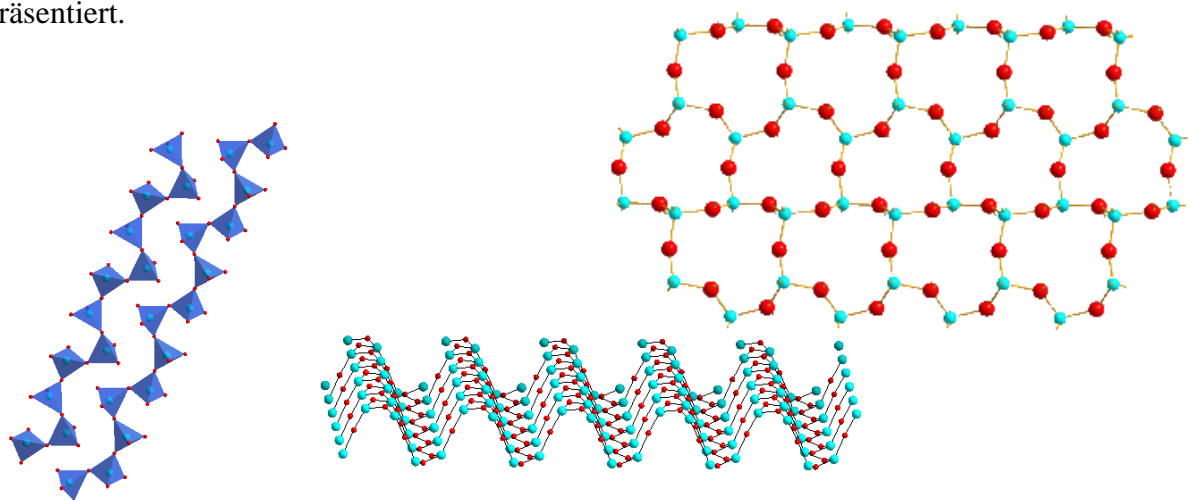
Die in den verschiedenen Experimenten gewonnenen Daten führen zu Strukturvorschlägen für Silica in Gramineae, die sich grundlegend von dem gängigen Kieselgel-Modell unterscheiden. Dies stellt eine Erweiterung des Modells innerhalb der Biomineralisation dar, da das Kieselgel

Modell sowohl bei den Phytolithen in Pflanzen als auch bei der inzwischen gut erforschten Schalenbildung der Diatomeen und Radiolarien weiterhin seine Gültigkeit behält.

Dieses Kieselgel-Konzept ist auch bei den Vertretern der Gramineae zu finden. So zeigten die Spelzen des Dinkels ebenso wie Diatomeen eine kieselgeltypische Verteilung von Q4:Q3:Q2 Signal im  $^{29}\text{Si}$  MAS-NMR. Hier erfordert der Schutz des Kornes in den Spelzen einen stabilen und starren Schutz, so dass die dreidimensionale Verknüpfung des Silica in Einklang zu den mechanischen Ansprüchen in der Pflanze steht.

Die Befunde im Bereich des Bambus lassen sich jedoch mit diesem Modell nicht erklären, so dass hier von einem anderen Bildungsmechanismus ausgegangen werden muss. Die Strukturen, die sich aus den zuvor gezeigten Daten ableiten lassen, legen drei verschiedene Strukturen nahe, die in Gramineae neben den gelartigen Strukturen vorliegen.

1. Faserige Strukturen: Hierbei handelt es sich um Silica-Verbindungen, die mit einer Kettenstruktur vorliegen. Sie zeichnen sich im NMR-Experiment durch ein Q2 Signal aus. Der Signalanteil bei circa -80 ppm, der in einigen Proben zu sehen war und der außerhalb des Q2-typischen Bereichs lag, kann dann als endständiges Silicium mit drei OH-Gruppen interpretiert werden. Die Kettenlänge lässt sich nicht genauer abschätzen, solange auch noch andere Silicastrukturen vorliegen, allerdings kann aus den vorliegenden Daten eine maximale Kettenlänge von circa 8-10 Silicium Atomen angenommen werden. Neben diesen Ketten ist auch noch die Ausbildung schmaler Silicabänder mit einer Breite von zwei bis drei Silicium Atomen denkbar. Diese Bänder werden durch den Q3-Anteil der Daten aus dem Halmbereich repräsentiert.



**Abb. 5.33:** Strukturvorschläge für Silicastrukturen in den verschiedenen Pflanzenteilen. Faserige Verbindungen und schmale Bänder im Bereich der Faserbündel, flächige Silica Verbindungen im Bereich der Zellwände und Stützstrukturen. Im Bereich der Rinde sind einzelne Si durch Al-Ionen ersetzt.

Das Vorkommen dieser faserigen Bestandteile liegt im Bereich der Leitungsbündel, sowohl im Bereich der Blätter als auch des Halmes. Sie stellen hier eine mechanische Stärkung des Gewebes um die Leitungsbündel bezüglich der Zugfestigkeit dar. Gleichzeitig bietet dieser Strukturtyp die maximale Flexibilität, die mit Si-O Bindungen erreicht werden kann.

2. Flächige Strukturen: Gerade die Befunde der Blätter zeigen, dass ein hoher Q3 Anteil mit einem sehr niedrigen Q4- Anteil von einer zweidimensionalen Struktur stammen muss. Aus der Kombination der Daten lassen sich diese Strukturen vor allem in den oberen Epidermis Zellen der Blätter finden. Die Strukturen liegen hier als Monolagen vor und weisen eine unterschiedlich starke Faltung der Ebene auf. Diese wellenförmigen Faltungen zeigen sich an den unterschiedlichen chemischen Verschiebungen innerhalb des Q3-Signals. Die Referenzsysteme der Phyllosilikate, die ebenfalls unterschiedlich starke Faltungen aufweisen, bieten einen Hinweis auf die Abstände. Die Verteilung des Silica auf unterschiedliche Faltungen und Bindungswinkel führt insgesamt zu einer Signalverbreiterung in den MAS-NMR Experimenten und für ein röntgenamorphes Verhalten. Daher konnten in diesem Rahmen keine direkten Strukturen oder Ortskoordinaten ermittelt werden.

### 3. Flächige Strukturen mit Aluminium-Substitution:

Die relativ hohe Silicium Konzentration im Rindenbereich, die sich in den LA-ICP-MS Experimenten zeigte, steht im Kontrast zu den sehr niedrigdimensionalen Verknüpfungen, die sich in den MAS-NMR Experimenten darlegten. Erklären lässt sich dieser Gesamtbefund, indem auch die erhöhte Aluminiumkonzentration in diesen Bereichen Berücksichtigung findet. Die Korrelation von Silicium und Aluminium zeigte sich ebenfalls in den LA-ICP-MS Daten. Eine Substitution einzelner Silicium Atome unter Berücksichtigung der Löwensteinregeln, also einer Vermeidung von Al-O-Al Bindungen führt in den NMR-Daten zu einer entsprechenden Verschiebung zu kleineren Q – Werten. Somit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass es sich im Rindenbereich nicht um vornehmlich faserige Strukturen mit einem geringen Flächigen Anteil wie in den Halmbereichen handelt, sondern dass hier flächige, zweidimensionale Strukturen mit einem leichten Anteil an dreidimensionalem Silica vorliegen. Entsprechende Referenzsysteme finden sich hierzu in Tonen und Glimmern, die in den jeweiligen Tetraederschichten ebenfalls vergleichbare Strukturen besitzen.

## Kompositstruktur

Die im letzten Abschnitt vorgestellten Silica-Strukturen besitzen auf Grund ihrer Bindungsenergien und ihrer jeweiligen Konstitution bereits eine bestimmte mechanische Funktionalität. Diese kann für das jeweilige pflanzliche System nur dann von Nutzen sein, wenn eine entsprechende Einbindung in die vorhandenen organischen Strukturen stattfindet. Die Vielzahl der oben gezeigten Befunde zeigt dabei, dass das Silica mit Cellulose Strukturen der Pflanze in Verbindung steht. Am deutlichsten ist dies im Halmbereich zu erkennen, da hier direkt Cellulose Fasern vorliegen, und diese auch den höchsten Silicium Anteil aufweisen. Indirekter erfolgt die Korrelation im Bereich der Blattstrukturen. Hier zeigten sich die höchsten Konzentrationen im Bereich der Epidermis Zellen und der Leitungsbündel. Mit optischen Methoden ließen sich keine Ausscheidungen von Silica innerhalb der Zellen oder der Bündel feststellen, so dass geschlossen werden kann, dass sich das Silica innerhalb der Zellwände und Leitungswände befindet. Die Zellwände wiederum bestehen zu einem Großteil aus Cellulose, somit besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass das Silica sich hier ebenfalls zwischen der Cellulose befindet.

Neben diesen Ableitungen einer Einbettung von Silica in die pflanzlichen Cellulose Strukturen aus der räumlichen Verteilung gibt es auch noch theoretische Betrachtungen, die eine Bindung nahelegen. Die Silicastrukturen verfügen allseitig über Si-OH Gruppen, über die eine Anbindung an das umliegende Gewebe stattfinden kann. Ebenso verfügen die Cellulose Strukturen, die aus überwiegend aus Glucopyranoseeinheiten aufgebaut sind, über vielfältige OH-Gruppen. Dies ermöglicht eine gute Anbindung über Wasserstoff-Brückenbindungen. Vergleiche von Röntgendiffraktogrammen sowohl von Cellulose als auch von Silicastrukturen zeigen, dass Ebenenabstände der gefalteten Strukturen in ähnlichen Abständen vorliegen und beide eine große Varianz aufweisen können. Somit kann eine gute Anpassung der Silicastruktur an die Cellulose Struktur erfolgen [Fratzl 1998].

Vergleichbare Bedingungen bietet das Lignin, der zweithäufigste Gewebetyp in den Pflanzen, nicht. Beim Lignin, einer polyaromatischen Verbindung, gibt es weder die Faltungsmöglichkeiten, die die Cellulose bietet, noch die Vielzahl an OH-Gruppen, die eine Wechselwirkung zu den freien OH-Gruppen des Silica erlauben.

Aus den oben gezeigten Befunden leitet sich demnach ein Strukturmodell ab, in dem Monolagen von Silica in einer Matrix aus Cellulose vorliegen. Diese Monolagen haben je nach mechanischer Funktion einen eindimensional faserigen Charakter oder zeichnen sich durch einen zweidimensional flächigen Typus aus. Es resultiert ein Kompositmaterial, das auf nanoskaliger Ebene einem Faserverbundwerkstoff ähnelt.

Ein Zusammenhang zwischen der Biomineralisation von  $\text{SiO}_2$  und Cellulose wurde auch zuvor schon vermutet. Daher fanden in der eigenen Arbeitsgruppe [Gruler 2002] sowie in anderen Arbeitsgruppen [Mann/Perry 1983, Sangster 1999] einige synthetische Experimente statt, die jedoch nicht zu funktionalen Silicastrukturen führten. Daher wurde ein dort ein strukturdirigierender Einfluss der Cellulose ausgeschlossen. Neuere Arbeiten greifen den Cellulose-Ansatz nun jedoch wieder auf und führen neuen Belege auf [Sato/Imay 2017, Zhang 2015, Lux 2019]

Auch im Rahmen dieser Arbeit fanden Experimente zur direkten Anreicherung des Silicium- und Silicagehaltes statt. Auf Grund der vorliegenden Literatur wurde dabei nicht mit den isolierten Einzelbestandteilen Lignin und Cellulose als Matrixsubstanz gearbeitet, sondern es wurden Teile des Pflanzengewebes vollständig eingesetzt.

Zeitgleich fanden in der Arbeitsgruppe synthetische Experimente mit verschiedenen Extrakten und Pyrolyse-Komponenten statt, die der Ermittlung von strukturdirigierenden Molekülen und Molekülgruppen für Silica dienten.

### ***5.6 Si-Anreicherungs-Experimente in der flüssigen Phase***

Die Silicaquelle für diese Experimentreihe war Tetraethoxysilan (Orthokieselsäureethylester), TEOS. Es wurden verschiedene Konzentrationen von TEOS :  $\text{H}_2\text{O}$  vorbereitet und die Bambusproben darin eingebracht. Es wurden sowohl Ausschnitte des Halmes als auch der Blätter verwendet.

Die TEOS Konzentration lag zwischen 10% und 30%. Es wurde solange intensiv gerührt, bis sich eine stabile Emulsion gebildet hatte, die langsam durch Hydrolyse in eine Lösung überging. Nach 24 Stunden Diffusionszeit in die jeweiligen Pflanzengewebe wurde ein Tropfen verdünnte Salzsäure zugegeben, um die Polykondensation zu starten oder zu

beschleunigen. Die Proben verblieben für insgesamt eine Woche in der Lösung und wurden Anschließend aus dem entstandenen Hydrogel entfernt.

Es erfolgte eine mechanische Reinigung der Probenoberflächen, um anhaftendes Hydrogel zu entfernen und anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Charakterisierung wurden die Proben anschließend in der Simultanen Thermoanalyse (STA) untersucht. Es zeigte sich dabei, dass keine signifikanten Änderungen des Zersetzungsverlaufs oder der Restmasse eingetreten waren. Es fand also keine entscheidende Diffusion in das Gewebe statt, die zu einer weiteren Anreicherung des Silica in den Proben geführt hätte.

### ***Experimente in der Gasphase***

Da in der flüssigen Phase die Polykondensation außerhalb des Gewebes schneller stattfand als die Diffusion des TEOS in das Gewebe, wurde die Diffusion in die Gasphase verlegt. Auf diese Weise wurde die Diffusion deutlich beschleunigt und die Polykondensation außerhalb des Gewebes stellte kein Problem dar, da sie von der Probe räumlich entfernt stattfand.



**Abb. 5.34:** Kolben mit eingebautem Kupfergitter für die Gasphasen-Silica Reaktion. Im Kolben wird TEOS vorgelegt, auf das Gitter kommt ein Stück der Bioprobe (Halm oder Blatt), und unter Rückfluss entlang der Kolbenwand wird TEOS verdampft.

Wie in der Skizze (Abb. 5.34) gezeigt, wurde die Probe auf einem Drahtgitter in der Gasphase über der Silicaquelle platziert. Als Silicaquelle diente auch hier wieder TEOS. Anschließend wurde das TEOS bis zum Siedepunkt erhitzt und die Gasphase über dem flüssigen TEOS so gesättigt. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Probe nicht im Reflux Bereich des am

Kühler kondensierten TEOS befand, sondern sich nur mit der Gasphase in Wechselwirkung befand.

Es wurde jeweils für 8h täglich während bis zu 2 Wochen angereichert.

Zur Aufarbeitung wurde die Oberfläche wieder mechanisch gereinigt und anschließend STA Experimente durchgeführt. Es zeigte sich eine Zunahme der Restmasse auf bis zu 25% bei Proben des Blattes. Bei der Probe, die am längsten behandelt wurde und die den höchsten Gehalt aufwies, wurden auch LA-ICP-MS und NMR Experimente durchgeführt.

Die Ergebnisse der LA-ICP-MS Messungen wurden bereits dort diskutiert und hatten ergeben, dass ein Teil des Silica, trotz der mechanischen Oberflächenreinigung auf den Blattoberflächen abgeschieden worden war.

Von den angereicherten Blättern wurden außerdem  $^{29}\text{Si}$  MAS-NMR Messungen durchgeführt, die einen hohen Anteil Q4 und Q3 aufwiesen. Es hatten sich folglich gelartige Strukturen auf der Oberfläche niedergeschlagen. Eine mögliche Anreicherung innerhalb der Gewebe erfolgte außerdem nicht als Weiterführung der vorhandenen Strukturen, sondern als thermodynamisch stabile Verstärkung der Struktur in Richtung der dritten Raumdimension. Die Messungen wurden sowohl an nativen als auch an nach der Anreicherung pyrolysierten Proben durchgeführt (Abb. 5.29).

Somit erwiesen sich die hier gezeigten Experimente als nicht geeignet, um eine Erhöhung der Silicium Konzentration mit gleicher Struktur wie in der vorliegenden Pflanze zu erhalten. Dies ist auch nicht überraschend, da zum einen viel höhere Konzentrationen an Silicium zu Verfügung standen, als dies unter natürlichen Bedingungen der Fall ist, und zum anderen die entsprechenden Proben nicht mehr Bestandteil eines lebenden Systems und damit ein Teil einer Vielzahl von aktiven Prozessen war.

Diese Experimente konnten aber zeigen, dass eine vorhandene Cellulose Struktur, auch wenn bereits Silica darin eingebettet ist, nicht dafür ausreicht, dass nur monolagige Silicastrukturen entstehen.

Cellulose ist geeignet in dem System als Inhibitor zu fungieren und freie OH-Gruppen des Silica sowohl sterisch zu blockieren als auch energetisch über die Ausbildung von Wasser-

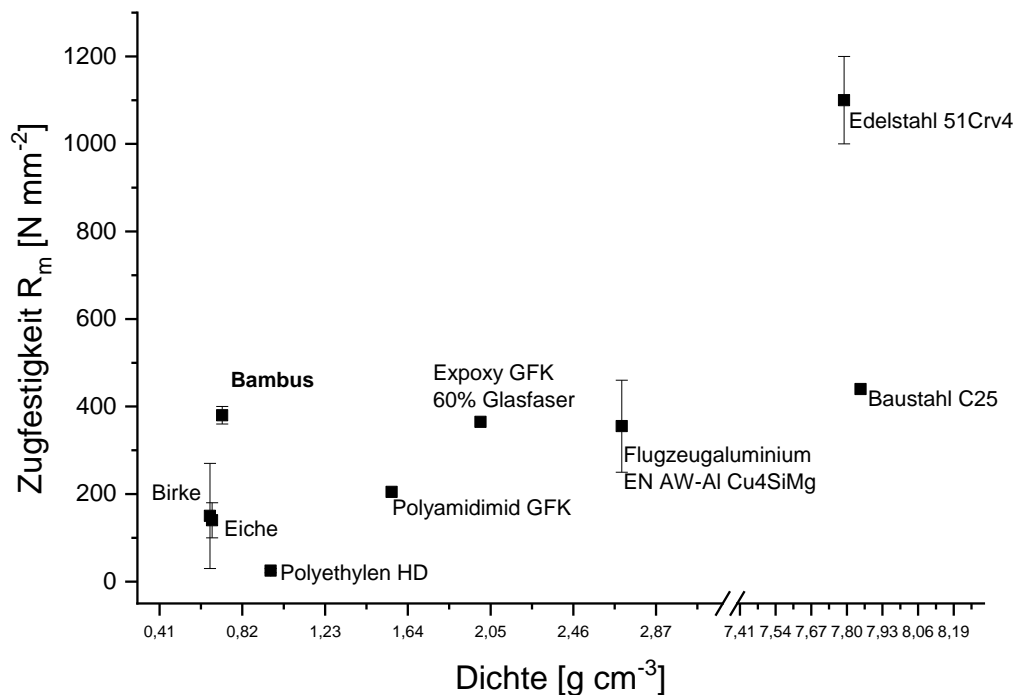
stoffbrückenbindungen abzusenken. Ein funktionierendes Gesamtsystem benötigt aber darüber hinaus Transportsysteme, die eine Silicium Zuführung so regeln, dass eine kinetische Kontrolle das thermodynamisch stabilere Wachstum in die dritte Dimension überwiegt. Zusätzlich ist beim Einbau eine Stabilisierung der entstandenen axialen OH-Gruppen nötig. Dies kann kurzfristig über Kationen geschehen, eine mechanisch stabile Einbettung der Fasern in die organische Matrix erfordert aber direktere Wechselwirkungen mit dieser Matrix.

### ***5.7 Mechanische Experimente zur Zugfestigkeit***

Parallel zu den analytischen Experimenten fanden mechanische Experimente am Halmmaterial statt, um die mechanischen Eigenschaften des Werkstoffs Bambus besser kennen zu lernen und die Auswirkungen von Modifikationen zu überprüfen. Dazu wurden, im Rahmen der Kooperation mit DaimlerChrysler, Zugfestigkeitsexperimente im Entwicklungszentrum von DaimlerChrysler in Ulm durchgeführt. Verwendet wurden sowohl unangereicherte Proben, als auch unterschiedlich überprägte Proben von *Phyll.v.g.* sowie *Phyll.ed.*. Da diese Experimente zeitlich früher als die NMR- und die meisten der LA-ICP-MS Messungen stattfanden, konnte die zuvor vorgestellten Erkenntnisse aus der Analytik noch keine Berücksichtigung in den Probenvorbereitungen finden. Motivation für die Experimente waren die herausragenden Mechanischen Eigenschaften von Bambushalmen, die bei geringem Gewicht eine außerordentliche Zugfestigkeit aufweisen, und daher sowohl auf traditionellen asiatischen als auch weltweit auf modernen Baustellen als Baumaterial zum Einsatz kommen.

Probenvorbereitung:

Um eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu erhalten wurden alle Proben auf die Größe von 10mm · 6mm · 150mm für die Zugfestigkeitsprüfung gebracht. Dies beinhaltete ein Sägen auf die gewünschte Länge und die Formung in einer entsprechenden Lehre bei 140° - 170°C, um die natürliche konkav konvexe Form eines Halmausschnittes in eine rechteckige Form zu überführen und dabei den gesamten Holzquerschnitt verwenden zu können. Die Formung in der Lehre erwies sich nicht als ausreichend, um bei den Probenkanten zu 90° Winkeln zu gelangen, so dass die Proben mit einer Säge zu rechtwinkligen Probenstücken weiterbearbeitet werden mussten. Für die Berechnung der der Zugfestigkeit  $R_m$  und des E-Modul wurden die realen Maße der jeweiligen Probe verwendet.

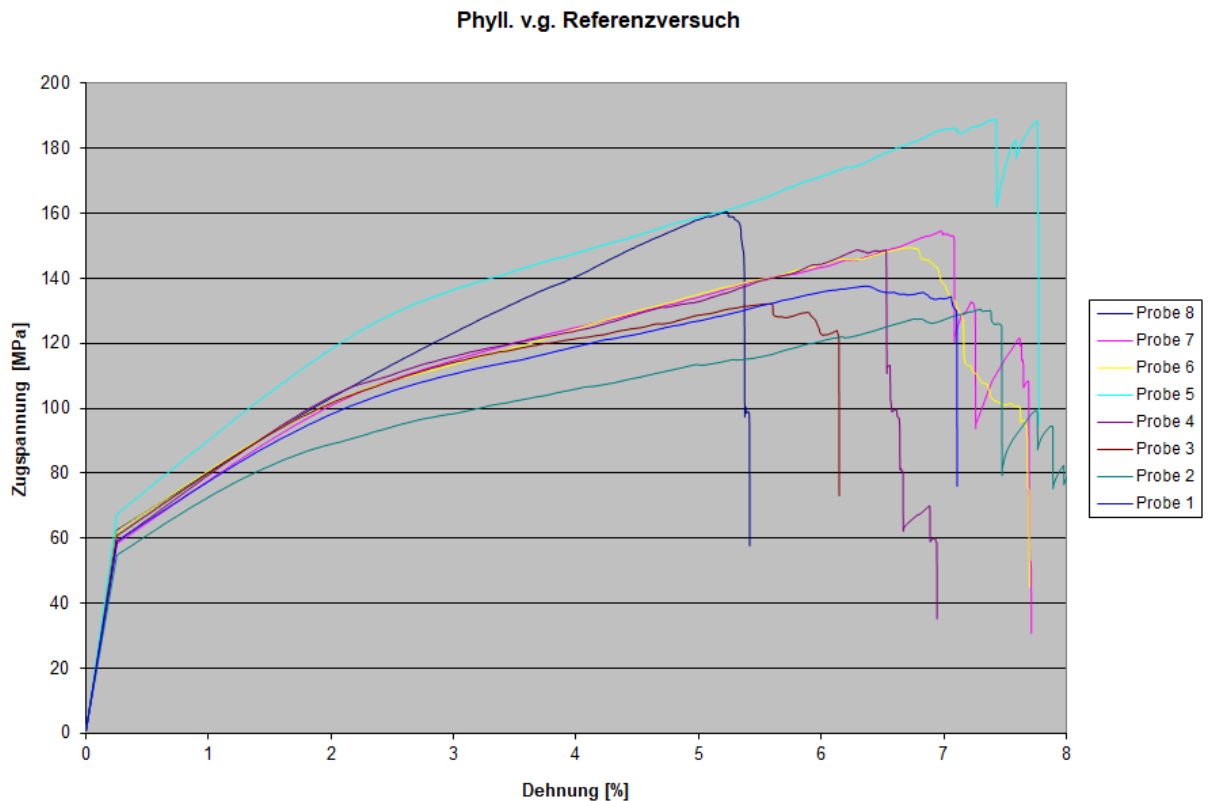


**Abb. 5.35:** Übersicht über die Zugfestigkeit verschiedener Werkstoffe in Bezug auf ihre Dichte. Bambus weist für seine Dichte eine außerordentliche Zugfestigkeit auf.

Die erste Versuchsreihe diente als Vorexperiment der Ermittlung der besten Bedingungen für die Probenpräparation. Gesuchte Parameter waren hier die Temperatur und der Einfluss einer Wasserzugabe zu den Proben für den Verformungsprozess. Ein Teil der Proben wurde bei unterschiedlichen Temperaturen ohne Zugabe von Wasser behandelt. Weitere Proben wurden für 24h bei Raumtemperatur in Wasser eingelegt und anschließend geformt um eine vergleichbare Quellung zu den mit Silica angereicherten Proben zu erzielen.

Weitere Versuchsreihen wurden mit Proben von *Phyll.v.g.* und *Phyll.ed.* Anreicherungsexperimenten unterzogen. Dazu wurde 10 Vol% TEOS mit Wasser gemischt und so lange gerührt, bis eine stabile Suspension entstanden war und die Hydrolyse einsetzte. Anschließend wurden Autoklaven mit der Suspension befüllt und die Halmproben hinzugegeben. Die Proben wurden für je 4h bei Temperaturen von 140°C oder 160°C bei einem Druck  $p_{\max}$  von 4 bar behandelt.

Ein weiterer Satz von Proben wurde bei Temperaturen von 160°C beziehungsweise 220° bei 40 bar für 4h in Autoklaven überprägt. Innerhalb der jeweiligen Versuchsreihen wurden jeweils 4 nicht überprägte Proben als Referenz mit vermessen.



**Abb. 5.36:** Zugfestigkeit Messungen an unbehandelten Normproben von *Phyll.v.g.* zur Referenz für die überprägte Proben. Die Kurven zeigen das typische mehrstufige Delaminierungsverhalten von Kompositwerkstoffen

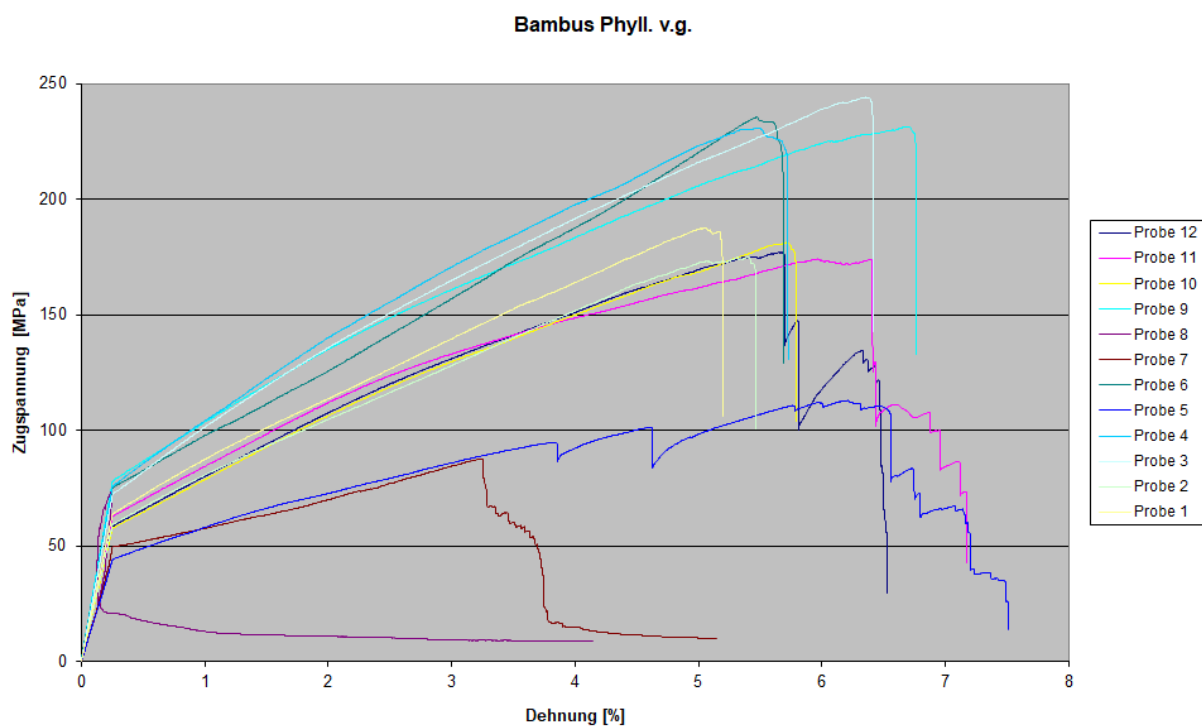
Die im Autoklav behandelten Proben wurden anschließend von äußeren Anhaftungen von Polykondensierter Kieselsäure mit einem Tuch gesäubert und bei Raumtemperatur getrocknet. Somit standen die Halmproben für die Messungen der mechanischen Festigkeiten bereit.

In allen Messungen ist der Übergang von elastischer zu plastischer Verformung deutlich zu erkennen. Alle Probe zeigten einen heterogenen Bruch, wie er für Komposit Materialien typisch ist. Es erfolgte bei der Überbelastung eine Delaminierung des Werkstoffs und keine homogene Bruchkante oder ein Fließverhalten. Darüber hinaus ließ sich in den Messungen sowohl der Einfluss der Temperatur bei der Vorbehandlung als auch der Einfluss der Wasserbehandlung ermitteln.

Messungen der Vorversuche zur Probenpräparation von *Phyll.v.g.*

Probe	E <sub>1</sub> [kN/mm <sup>2</sup> ]	E <sub>2</sub> [kN/mm <sup>2</sup> ]	Zugfestigkeit max [N/mm <sup>2</sup> ]
1) trocken 170°C	23,3	2,4	138
2) trocken 160°C	21,3	2,3	130
3) trocken 160°C	24	2,6	132
4) trocken 160°C	23,2	2,7	148
5) trocken 140°C	25,7 - 27	3	188
6) 24h H <sub>2</sub> O 160°C	24,5	2,5	150
7) 24h H <sub>2</sub> O 160°C	22 - 23,3	2,7	155
8) 36h H <sub>2</sub> O 160°C	24,7	2,4	160

**Tabelle 5.3:** Probenkennwerte der Messungen *Phyll.v.g.*.. im Zugfestigkeitsversuch.



**Abb. 5.37:** Zugfestigkeit Messungen an Normproben von *Phyll.v.g.* Die Proben wurden nun zusätzlich mit Silica behandelt. Die Gesamtfestigkeit liegt aber deutlich unter den Literaturwerten. Proben 9-12 sind die nicht überprüfte Referenz.

Eine Erhöhung der Temperatur führte somit zu einer mechanischen Schwächung, die sich besonders im ersten E-Modul zeigte. Ebenso wurde die maximale Zugfestigkeit herabgesetzt.

Es stand bei dieser Versuchsreihe keine native Probe zur Verfügung, so dass es keine Vergleichswerte zu dieser spezifischen Pflanze gibt. Insgesamt sind aber alle gemessenen Werte unterhalb der Literaturangaben zur Zugfestigkeit von Bambus [Liese 1998].

Die Behandlung mit Wasser vor der plastischen Verformung der Prüfkörper für die Erzielung der Standardform führte zu einer Erhöhung der maximalen Zugfestigkeit gegenüber den trockenen Proben gleicher Temperatur, die Werte der E-Module befinden sich jedoch in einem vergleichbaren Wertebereich. Daraus folgt, dass der Einsatz von Wasser zu einer leichteren Formbarkeit der Probe führte und eine geringere Schädigung der Gesamtprobe im makroskopischen Maßstab erfolgte. Die Festigkeit auf molekularer Ebene wurde hingegen durch die Behandlung nicht verändert, wie sich aus den vergleichbaren E-Modulen schließen lässt.

#### Überprägung von Halmproben *Phyll.v.g.*

Probe	E <sub>1</sub> [kN/mm <sup>2</sup> ]	E <sub>2</sub> [kN/mm <sup>2</sup> ]	Zugfestigkeit max [N/mm <sup>2</sup> ]
1) 140°C – 4 bar	25,4	3,2	187
2) 140°C – 4 bar	23,3	3,1	173
3) 160°C – 4 bar	28,6	3,9	242
4) 160°C – 4 bar	29,5	3,8	230
5) 160°C – 40 bar	16,3 – 18,3	1,9	111
6) 160°C – 40 bar	29,5	3	234
7) 220°C – 40 bar	17,4 – 24,1	1,1	89
8) 220°C – 40 bar	-	-	Messung fehlerhaft
9) Referenz	30,2	3,4	230
10) Referenz	22,6	2,7	180
11) Referenz	24,5	2,9	174
12) Referenz	23,1	2,9	177

**Tabelle 5.4:** Zugfestigkeit Messungen an Normproben von *Phyll.v.g.*

Für die Behandlung der zur Überprägung mit TEOS vorgesehenen Proben wurde dennoch eine Temperatur von 160°C gewählt, da die Verformung bei dieser Temperatur am besten durchführbar war. Es wurde außerdem nur die Lehre bewässert nicht aber die Proben zuvor in Wasser eingelegt, damit bei der anschließenden Überprägung die TEOS –Suspension schnell-

ler in das Holz eindringen konnte und nicht erst Wasser ersetzt werden musste. Den beiden so erhaltenen Messreihen von *Phyll.v.g.* und *Phyll.ed.* wurden nicht überprägte Proben hinzugefügt, die bei gleicher Vorbehandlung als Referenz dienten.

Die Messungen 6) und 9) stellen mit ihren maximalen Zugfestigkeiten innerhalb ihrer Gruppe von gleichbehandelten Proben Ausreißer dar, mit denen bei natürlichen gewachsenen Proben immer gerechnet werden muss.

Durch die Überprägung mit Silica konnten lediglich unter den Parametern 160°C und 4 bar maximalem Druck bei der Polykondensation Verbesserungen der maximalen Zugfestigkeit festgestellt werden. Bei 140°C bleibt die Zugfestigkeit auf dem gleichen Niveau und auch der E-Modul änderte sich kaum. Die Überprägungen bei 40 bar maximalem Druck führte hingegen bei den Proben zu Schwächungen der Festigkeit.

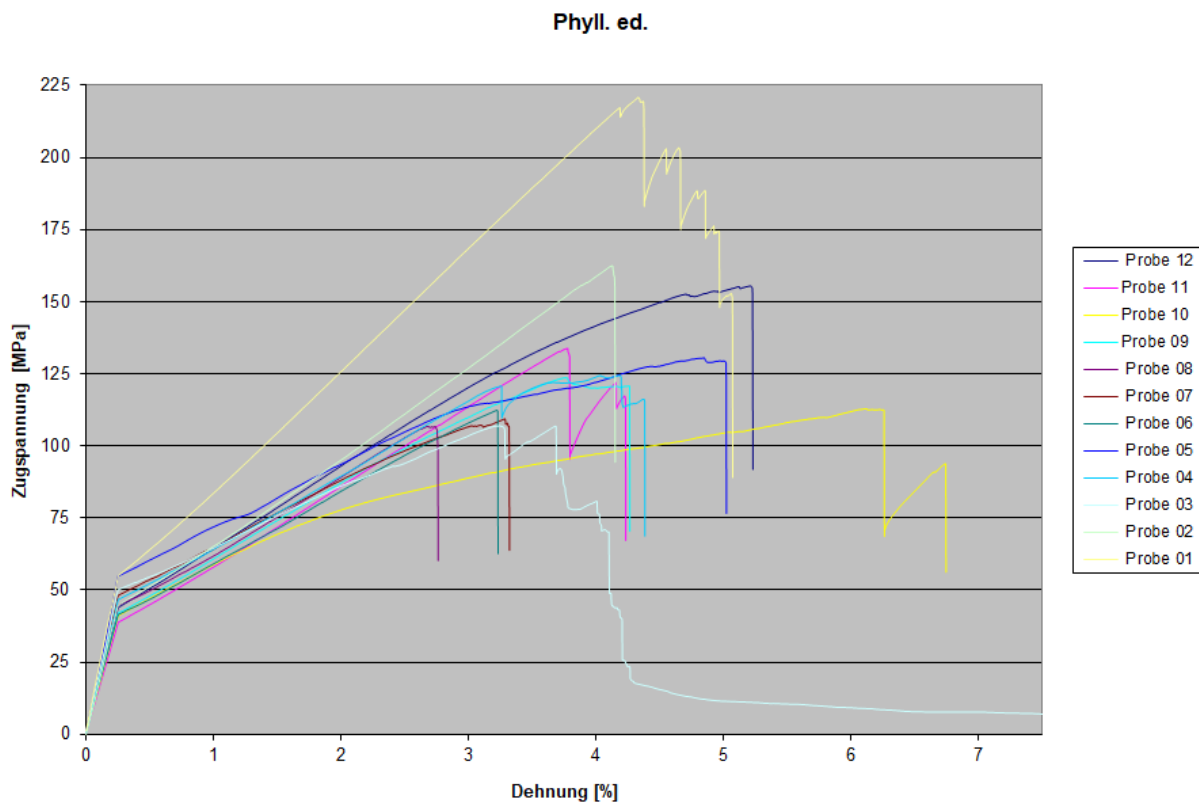
Die Proben zeigten aber keine starke Verbesserung der Zugfestigkeit gegenüber den nicht überprägten Referenzen. Die Erhöhung der E-Module lässt sich auf chemischer Ebene so interpretieren, dass es zu einer Verstärkung der vorhandenen Strukturen kam und die Probe insgesamt spröder wurde. Dies entspricht einer Ausbildung von vornehmlich dreidimensional verknüpftem Silica, was unter den gegebenen Bedingungen ein zu wahrscheinliches Resultat ist. Der Einsatz von 220°C führte auch zu einer beginnenden Zersetzung der Holzstruktur und damit verbunden zu einer Schwächung des Gesamtverbundes, der nicht durch neu gebildete Silicastrukturen ersetzt werden konnte.

Insgesamt zeigte sich sowohl bei den Referenzproben als auch bei den bei 4bar überprägten Proben eine höhere maximale Zugfestigkeit als bei den Proben der Vorversuchsreihe. Die Proben für beiden Reihen stammten dabei aus dem gleichen Internodenabschnitt derselben Pflanze, um eine gute Vergleichbarkeit zu erhalten. Die aus den Vorversuchen abgeleitete Technik für die Formgebung erwies sich also als geeignet.

Überprägung von Halmprogen *Phyll.ed.*

Probe	E <sub>1</sub> [kN/mm <sup>2</sup> ]	E <sub>2</sub> [kN/mm <sup>2</sup> ]	Zugfestigkeit max [N/mm <sup>2</sup> ]
1) 140°C – 4 bar	21,7	4	219
2) 140°C – 4 bar	16,3 – 18,1	2,8	160
3) 160°C – 4 bar	17,6 – 21,1	2	105
4) 160°C – 4 bar	18,5	2,4	124
5) 160°C – 40 bar	20,6	2,1	131
6) 160°C – 40 bar	16,3	2,5	111
7) 220°C – 40 bar	18,7	2,1	110
8) 220°C – 40 bar	17,6	2,5	105
9) Referenz	16,7	2,6	123
10) Referenz	15,7	2,2	113
11) Referenz	15	2,7	132
12) Referenz	17,1	2,7	154

**Tabelle 5.5:** Kenndaten für die Zugfestigkeitsversuche von überprägtem *Phyll.ed.*



**Abb. 5.38:** Zugfestigkeit Messungen an Normproben von *Phyll.ed.* Proben 9-12 Referenz.

Die Ergebnisse bei *Phyll.ed.* ähneln den Ergebnissen von *Phyll.v.g.* stark. Die Proben wiesen insgesamt eine niedrigere Zugfestigkeit auf. Auch der E-Modul lag niedriger, was einer insgesamt weniger festen aber flexibleren Probe entsprach. Es handelte sich hier um eine circa 3 Jahre alte Pflanze, die sich im Bereich des Optimums aus Festigkeit und Spröde für den Baueinsatz befinden sollte. Bei dieser Versuchsreihe zeigte sich ebenfalls eine leichte Schwächung des E-Modul bei Überprägungen mit einem maximalen Druck von 40 bar. Überprägungen bei 4 bar zeigten wiederum eine leichte Stärkung, wobei der stärkste Effekt bei *Phyll.ed.* bereits bei 140°C erreicht wurde. Der thermoanalytisch ermittelte Gesamtgehalt an anorganischen Bestandteilen lag bei nativen Proben von *Phyll.ed.* im gleichen Größenbereich wie bei den *Phyll.v.g.* Proben, so dass davon ausgegangen wurde, dass auch die Silicaanteile vergleichbar sind. Allerdings hatte die Pflanze deutlich unterschiedliche Wachstumsbedingungen und andere klimatische Voraussetzungen. Die *Phyll.ed.* Proben stammten aus Norditalien (Carascu), wohingegen die *Phyll.v.g.* Proben aus Süddeutschland (Konstanz) stammten. Daher ist ein direkter Vergleich zwischen den beiden Bambusarten so nicht möglich.

Die Versuche zur mechanischen Festigkeit ergaben in diesem Stadium nur begrenzte Informationen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überprägung mit Silica zu einer Erhöhung der maximalen Zugfestigkeit und des E-Modul führen kann. Weitere Experimente zeigten jedoch, dass diese Art der Überprägung zu einer dreidimensionalen Variante des Silica führt und damit nicht die gesamten mechanischen Vorteile zeigen kann, die ein Komposit aus zweidimensionalem Silica und Cellulose zeigen kann. Ein entscheidender Faktor, der zur Schwächung der Zugfestigkeit der Proben führte, war die Verformung der Proben und Druck und Temperatur. Wäre es möglich gewesen, die Proben ohne vorherige Verformung zu messen, hätte dieser variable Parameter aus den Messungen ausgeschlossen werden können.

In diesen Versuchsreihen sollte sowohl die Probenvorbereitung erprobt werden als auch geeignete Temperaturbereiche gefunden werden, die eine schnelle Polykondensation erlauben aber die Struktur des Bambus noch nicht durch Zersetzungsprozesse schwächen. Hier zeigte sich, dass die Vorbereitung für verschiedene Bambusarten und Bambusrassen unterschiedlich erfolgen muss, da die Strukturen innerhalb der Pflanzen individuelle Festigkeiten zeigen. In Verbindung mit geeigneten Strukturdirigenten für zweidimensionale Polykondensationen lassen sich Erfolge der Synthese aber gut in der mechanischen Festigkeit zeigen.

Leider stand der Versuchsaufbau zu späteren Zeitpunkten nicht mehr zur Verfügung, da die Kooperation endete. Daher konnte neue Experimentreihen zu nativen nicht gepressten Proben sowie zu weiteren Syntheseexperimenten nicht mehr durchgeführt werden.

## 6. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

Durch die Kombination der unterschiedlichen analytischen und experimentellen Methoden konnte gezeigt werden, dass auch im Bereich weniger Massenprozent anorganischer Biomineralien am Biokomposit entscheidende Funktionen verbessert werden können. Dies entspricht der Umkehr des häufig in der Biomineralisation gefundenen Grundsatzes, dass durch den Einbau von wenigen Massenprozent organischer Bestandteile in anorganische Materialien die Eigenschaften deutlich verbessert werden. So ist es inzwischen allgemein anerkannt, dass Perlmutter, Knochen oder Zähne ihre Eigenschaften dem hierarchischen Aufbau aus Proteinen, Kohlenhydraten und Enzymen in ihre jeweilige anorganische mineralische Hauptkomponente verdanken. Ebenso verhält es sich bei der Biomineralisation von Silica bei Diatomeen oder auch Reis und Getreidespelzen. Hier gibt es einen großen Anteil der anorganischen Komponente, der durch wenige Anteile dirigiert und gesteuert wird.

Doch auch ein kleiner Anteil der anorganischen Komponente kann entscheidende Veränderungen der organischen Bestandteile bewirken. Die besondere Festigkeit und gleichzeitige Flexibilität der Si-O-Si-Bindung in Netzwerkstrukturen kann, wenn sie nicht zu starren 3Dimensionalen Strukturen aufgebaut wird, einem flexiblen lebendigen System zielgerichtete Unterstützung und Verbesserung bieten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch den komplementären Einsatz von Analytiken eine Indizienkette soweit verdichtet werden konnte, dass neue Informationen zum Aufbau von anorganischen Biomaterialien im unteren Masseprozentbereich und mit einer Dicke von wenigen Atomlagen vorhanden sind und wichtige Aufgaben, die von anderen Forschern bereits in Zusammenhang mit der Biomineralisation von Silica gebracht wurden, erfüllen können.

Insbesondere die Kombination von Festigkeit mit Flexibilität stellt die herausragende Eigenschaft dieser Gruppe von Silica-Materialien dar. Es konnte gezeigt werden, dass in Graspflanzen, insbesondere im Bambus, verschieden starke Kondensationsgrade und Formen von SiO<sub>2</sub>-Silica mit Unterschiedlichen Aufgaben vorhanden sind. Im Bereich der Rinde ist es die Kombination von Silica mit dem Einbau von Aluminiumionen, die eine besondere Festigkeit bieten kann. Der Einbau faseriger ein- und zweidimensionaler Bänder im Bereich

der Cellulose Fasern erhöht dort die Zugfestigkeit und äußert sich bei den Getreiden beispielsweise in einer erhöhten Bruchstabilität der Halme. Schließlich bieten Silicastrukturen den Blättern, in die wie Ma zeigen konnte [Ma 2019] besonders aktiv Silica transportiert wird, in Form von flächigen dünnen Strukturen, Ankerpunkten und Auskleidungen der Leitungsbündel besonders viele Funktionen, die der Pflanze dabei helfen, mit aufrechten und vor Fraßfeinden geschützten Blättern besonders gut Photosynthese betreiben zu können.

Die recht einfachen ersten Syntheseansätze, die hier gezeigt wurden, haben noch keine neuen Eigenschaften hervorgebracht. Die Kombination mit den inzwischen entdeckten und nutzbar gemachten Silica-Transport-Proteinen kann aber ein gezielt niederprozentiger Einbau von Silica in organische Schichten gelingen und damit eröffnet sich die Möglichkeit zu neuen, nicht-toxischen und energetisch nicht anspruchsvollen Materialsynthesen und Materialien.

Die Ergebnisse der Frage- und Aufgabenstellungen im Einzelnen zusammengefasst:

*1. Befindet sich Silica in Graspflanzen, das in niedriger Konzentration vorliegt und nicht dem typischen dreidimensionalen Netzwerk des Gel-Typs entspricht?*

Im Modellsystem Bambus, das auf Grund seiner mechanischen Eigenschaften der herausragenden Zugfestigkeit ausgewählt wurde, ließ sich durch  $^{29}\text{Si}$ -MAS-NMR Experimente zeigen, dass die vorliegenden Silica-Strukturen nicht dem Gel-Typ entsprechen. Röntgenbeugungsexperimente zeigten keine Struktur, weder einer Kristallinität noch von Ordnungsparametern die den Systemen Opal C oder Opal CT entsprechen. Selbst großflächige Silica-Strukturen der Blätter von *Phyll.v.g.*, die mit Kantenlängen von 10  $\mu\text{m}$  in den Mikrosonde Experimenten gezeigt wurden, weisen keinen sehr großen Anteil eines Q4-Signals und damit einer dreidimensionalen Verknüpfung des Si-O-Si-Netzwerkes auf. Eine Verschiebung der Signale zu kleineren Q-Signalen mit geringerer Verknüpfungsdimensionalität durch einen Einbau von Al-ionen in das Silica-Netzwerk konnte auf Grund der Verteilung des Al-Signals in den EDX- und Mikrosonde Messungen ausgeschlossen werden.

2. *Lassen sich Unterschiede im Silicagehalt und in der Silicastruktur in den unterschiedlichen Bereichen Rhizom, Halm, Blatt oder sogar innerhalb dieser Bereiche, zum Beispiel zwischen Halm-Gewebe und Rinde oder innerhalb des Blattes feststellen?*

Für die unterschiedlichen Bereiche Halm, Blatt und Rhizom ließen sich in den thermogravimetrischen Messungen in der verbleibenden Restmasse der Pyrolyse signifikante Unterschiede zeigen. Das Blatt hat den höchsten Silica-Gehalt und diente daher innerhalb der Pflanze als das System, an dem Methoden und Parameter getestet werden konnten.

Die Unterschiede konnten insbesondere für die Blätter auch durch die bildgebenden Methoden der EDX- und Mikrosonde-Messungen gezeigt werden. Hier traten Unterschiede zwischen der oberen und unteren Blattseite in Bezug auf die Silicium-Strukturen sehr deutlich zu Tage.

Ebenso konnten in MAS-NMR-Experimenten nicht nur Unterschiede zwischen den einzelnen Pflanzenbereichen Halm, Blatt und Rinde gezeigt werden, sondern auch Unterschiede zwischen Rinde und Halm. Die Blätter zeigen noch einen wenn auch geringen Anteil an Q4 Signal von 10 – 30%. Dieser geht möglicherweise auf die Blockstrukturen zurück, bedeutet aber immer noch, dass es nur wenige dreidimensionale Verknüpfungen gibt. Ob diese Signale auf die Block-Strukturen in den Blättern zurückzuführen sind, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht klären. Im Halmbereich fanden sich überwiegend Signal von Faser- und Band-Strukturen des Silica. Diese Ergebnisse decken sich wiederum gut mit den mikroskopischen Befunden an den Pyrolyseprodukten des Bambus. Diese zeigten für Blätter einen kompletten Erhalt der äußeren Blattstruktur, im Bereich des Halmes wurden jedoch nur die Strukturen der Cellulose Fasern entlang der Leitungsbündel erhalten.

Beide Ergebnisse sind wiederum in Übereinstimmung mit den von diesen Orten erhaltenen LA-ICP-MS Messungen. Insbesondere im Halmbereich konnte auch mit LA-ICP-MS gezeigt werden, dass die Silica-Konzentration nicht im Bereich des Zellgewebes, sondern im Bereich der Cellulose Fasern vorzufinden ist.

Im Bereich der Rinde ergab die Kombination von MAS-NMR und LA-ICP-MS sogar den überraschenden Befund, dass hier auch Alumosilikate vorkommen, die nicht wie an einzelnen

Stellen im Blattbereich auf Kontamination der Pflanze zurückzuführen ist. Hier zeigten beide Methoden einen deutlichen Hinweis auf den gezielten Einbau von Aluminium in die Silica-Struktur. Auch hier ließ sich wieder eine scharfe räumliche Trennung der Signale der Rinde und des Halm-Parenchyms in der LA-ICP-MS zeigen.

Da die Silica-Konzentration in der Pflanze insgesamt gering ist, mussten für die NMR-Untersuchungen Konzentrationsanreicherungen vorgenommen werden. Diese wurden durch Pyrolyse in O<sub>2</sub>-Atmosphäre bei bis zu 550°C erreicht, bei der die organischen Bestandteile entfernt wurden und nur die anorganischen Bestandteile verblieben. Vergleiche zwischen nativem und pyrolysiertem Material von Dinkelspelzen und Bambusblättern als Testsystemen im <sup>29</sup>Si-MAS-NMR, zeigten, dass es zu keiner signifikanten Änderung der Silica-Struktur kam.

*3. Findet die Aufnahme von Silica in die Pflanze als (Poly-)Kieselsäure oder als Alumosilikat statt?*

Hauptantwort auf diese Fragestellung lieferte die LA-ICP-MS, mit der schnell und orts aufgelöst die elementare Zusammensetzung der Proben mit Auflösung in alle drei Raumrichtungen gemessen werden konnten. Dabei zeigte sich für die Blätter und den Halmbereich keine Korrelation zwischen der Silicium- und Aluminium-Verteilung in den Proben. Für diese Kompartimente muss also von einer Aufnahme und einem Synthesemechanismus über die (Poly-)Kieselsäureroute ausgegangen werden. Da eine Aufnahme von Orthokieselsäure auf Grund der geringen Löslichkeit in neutralem Wasser für eine Versorgung der Pflanze nicht ausreichend ist, wird von einer Aufnahme von Kieselsäureoligomeren ausgegangen. Es konnte nicht geklärt werden, ob diese Kieselsäure-Oligomere bereits aus Erosion des Gesteins außerhalb der Pflanze entstehen, oder im Rhizombereich aktiv aus der Zersetzung von Alumosilikaten gewonnen und vom Aluminium getrennt werden.

Untersuchungen an natürlichen Gewässern zeigten jedoch, dass in der Schwebfracht des Wassers sowohl Polykieselsäure als auch Alumosilikate transportiert werden und somit den Pflanzen zur Verfügung stehen.

Es werden aber auch sicher Alumosilikate direkt und aktiv von der Pflanze aufgenommen, da sich Entsprechende Signale im Bereich der Rinde mit LA-ICP-MS und  $^{29}\text{Si}$ - sowie  $^{27}\text{Al}$ -NMR nachweisen ließen. Das zeigt auf, dass in der Graspflanze ebenfalls ein Mechanismus besteht, sich die Eigenschaften diese Stoffgruppe nutzbar zu machen. Auf Grund der sehr engen räumlichen Verteilung dieser Alumosilica-Signale auf die Rinde wird nicht davon ausgegangen, dass es sich um ein Entsorgungsdepot des für die Pflanze toxischen überschüssigen Aluminiums handelt, sondern dass die ionischeren Eigenschaften der Silica-Derivaten mit Aluminiumsubstitution von Silicium aktiv genutzt werden.

*4. Bildet die Cellulose, die wie Silica eine Ringstruktur der Bauelemente aufweist und über viele Hydroxylgruppen verfügt, die Matrix für die Silica-Mineralisation? Kann eine entsprechende Korrelation gefunden werden?*

Die Verteilung von Silica in den Blättern, die über den gesamten Blattbereich vorhanden war und im pyrolysierten Blatt sogar die Struktur der oberen und unteren Epidermis repräsentierte, kann für die Fragestellung nicht verwendet werden. Die Zellwände der Epidermis Zellen bestehen zwar zum überwiegenden Teil aus Cellulose, jedoch finden sich hier auch noch viele andere für die Strukturbildung in Frage kommende Substanzen.

Bessere Antwort lieferten die Ergebnisse aus dem Halmbereich, da hier mit LA-ICP-MS nur signifikante Silicium-Konzentrationen im Bereich der Cellulose-Fasern entlang der Leitungsbündel gefunden wurden. Dass es sich hierbei um Diffusionsprodukte des durch die Leitungsbahnen transportierten Silica handelt ist unwahrscheinlich, da eine ungesteuerte Kondensation der Kieselsäurederivate zu gel-ähnlichen Kondensationsprodukten führen würde. Die  $^{29}\text{Si}$ -MAS-NMR zeigte dagegen jedoch ein Signal, das zur Struktur von Faser- oder Band-Silicastrukturen gehört. Daher ist von einem gezielten Aufbau der Strukturen auszugehen, die neben den Strukturdirigenten auch die Anwesenheit eines Inhibitors erfordert, der eine weitere Kondensation verhindert oder zumindest stark bremst. Für diese Aufgabe kommt ebenfalls die Cellulose in Frage, da über die freien Hydroxylgruppen einer Cellulose- $\beta$ -Faltblattstruktur Wechselwirkungen zur energetischen Absenkung der freien Hydroxylgruppen der Silica-Struktur möglich sind. Da die Empfindlichkeiten der Messungen jedoch nicht ausreichend waren, um die MAS-NMR-Untersuchungen im nativen Material durchzuführen konnte die Frage nicht abschließend geklärt werden.

5. *Lässt sich an Silica anreichernden Pflanzen der Prozess der Verkieselung bei der Versteinierung fossiler Hölzer imitieren?*

Anreicherungsexperimente des nativen Materials mit Silica Vorstufen in Form von TEOS und Kieselsäureoligomeren sowohl in wässriger Phase als auch in der Gasphase erbrachten einen ersten, wenn auch nur groben, Eindruck, ob sich Prozesse der Verkieselung von Hölzern nachstellen lassen.

Die experimentellen Bedingungen waren jedoch zu schnell gewählt, um eine gezielte Verstärkung nur der vorhandenen Silica-Strukturen zu erhalten oder eine gleichmäßig Silicifizierung zu erreichen. Unter den gewählten Bedingungen ist eine strukturdirigierende Wechselwirkung notwendig, die so aber nur im lebenden System zu gewährleisten gewesen wäre.

Die Ergebnisse der Zugfestigkeits-Experimente zeigen jedoch, dass unter den gewählten Bedingungen auch Verbesserungen zu erreichen sind. Das ist ein Hinweis darauf, dass unter diesen Bedingungen eine Wechselwirkung von Silicavorstufen mit der vorhandenen Biomasse stattgefunden hat. Dies ist zwar kein positives Ergebnis im Sinne der Fragestellung, gibt aber Anlass in den verstärkten Bereichen nach strukturdirigierenden Substanzen zu suchen.

6. *Finden sich strukturdirigierende Substanzen, die den Aufbau von Silica aus Kieselsäure oder löslichen Vorstufen steuern, ohne dafür auf Protein- oder Genanalytik zurückgreifen zu müssen?*

Die Untersuchungen zu strukturdirigierenden Substanzen, die den Aufbau steuern, wurden im Rahmen dieser Arbeit nur in Form der Anreicherungsversuche im nativen Material durchgeführt. Auf Synthesen mit Extrakten und Kondensationsprodukten der Pyrolyse wurde verzichtet, da sich bereits eine größere Zahl weiterer Arbeitsgruppen mit Ansätzen zu Biomolekül strukturdirigierten Synthesen beschäftigen (vgl. Kapitel 2, Stand der Forschung, Abschnitt Anwendungen von Biminerisationsverfahren, S.19). Viele dieser Arbeitsgruppen verfügen zudem über die Expertise zur Auswertung von Protein- und DNA/RNA Informationen, das in dieser Arbeitsgruppe nicht möglich war.

Die Korrelationen von Silica und Cellulose, die sich bei den Untersuchungen am Halm zeigten, deuten aber auf eine strukturdirigierende Rolle der Cellulose hin. Die  $\beta$ -Faltblattstruktur der Cellulose in den Fibrillen der Fasern hat das Potential sowohl als

Kondensationspunkt für den Beginn einer definierten Biomineralisation zu dienen, als auch, über Wechselwirkungen zu den freien OH-Gruppen des Silica, ein Wachstum in die dritte Dimension verhindern.

Ergebnisse dazu waren aus den SAXS-Messungen in der Arbeitsgruppe Fratzl erwartet worden. Leider zeigte sich die Faserstruktur der Bambusproben als nicht ausreichend stark geordnet, um über die Röntgenbeugung Informationen über den Aufbau der Cellulose Fibrillen und mögliche Silica-Einlagerungen zu erhalten.

*7. Lässt sich der positive Einfluss von Silica auf die mechanischen Eigenschaften auch durch Entfernung von Silica aus dem natürlichen Material nachweisen?*

Abreicherungsexperimente mit Extraktion durch Flusssäure zeigten in der LA-ICP-MS eine erfolgreiche Entfernung des Silica aus der Biostruktur. Pyrolyseexperimente mit so extrahierten Blättern zeigten, dass sich die Blätter zersetzten ohne eine erkennbare Pflanzenstruktur in der Asche zu hinterlassen. Erkennbare Epidermis-Strukturen wurden bei diesen Experimenten nicht mehr erhalten.

Da die Kooperation mit DaimlerChrysler geendet hatte konnte ein zweiter Durchgang mit Zugfestigkeitsexperimenten auch an abgereichertem Material, der entsprechend vorgesehen war, nicht mehr durchgeführt werden.

*Ausblick:*

Die genaue Wechselwirkung von Silica und Cellulose bleibt eine interessante Fragestellung für zukünftige Untersuchungen. Gelingt es, die Cellulose Fasern des Bambushalms unter Erhaltung ihrer Struktur von den Parenchym Zellen zu trennen, so lassen sich wahrscheinlich ausreichende Konzentrationen erreichen, um über MAS-NMR  $^{13}\text{C}$ -Spektren die Signale soweit aufzulösen, dass eine Wechselwirkung der Cellulose mit den Hydroxylgruppen des Silica sichtbar werden kann. Die inzwischen verbesserte Technik erlaubt gegebenenfalls auch die Ermittlung von  $^1\text{H}$ -MAS-NMR Daten zu dieser Fragestellung.

Auch die Verfügbarkeit von HR-TEMs mit elementspezifischer Detektion kann neue Erkenntnisse über die Struktur und Verteilung von Silica in den Zellwänden und Faserbestandteilen aufzeigen. Denn gerade in den Faserstrukturen bietet sich die Möglichkeit, biologisch verfügbare Werkstoffe mit einem geringen Material und Energieaufwand so zu

verstärken, dass sie bei Erhalt der Flexibilität einem Vielfachen an Kräften widerstehen können.

Vergleichbares gilt auch für die Struktur und die genaue Morphologie der Alumosilikate der Rinde. Zum weiteren Verständnis des genauen Aufbaus können ebenfalls TEM-Techniken mit Elementmapping zum Einsatz kommen. Die Auflösungsgrenze der bildgebenden Verfahren ist inzwischen zumindest technisch in der Lage, in die Größenordnung der Polymer-Strukturen vorzudringen. Damit kann mindestens eine weitere Stufe der Hierarchieleiter in Richtung kleinerer Strukturen überwunden werden und dieser Bereich steht der Analytik somit offen.

Durch die Zusammenarbeit mit molekularbiologischen Arbeitsgruppen kann sich zudem die Möglichkeit ergeben, wichtige molekulare Verbindungen an der Schnittstelle der Transportproteine für Silica zu identifizieren, welche die aus den Leitungssystemen freigesetzten (Poly-)Kieselsäurebausteine zielgerichtet und strukturdirigiert weiter in den Pflanzenzellen verwenden.

## 7. Literatur

- [Alagar 2017] P. Prabunathan, P. Thennarasu, J.K. Song and M. Alagar, Achieving low dielectric, surface free energy and UV shielding green nanocomposites via reinforcing bio-silica aerogel with polybenzoxazine, *New J. Chem.* 2017, 41, 5313
- [Al-aghabary 2004] K. Al-aghabary, Z. Zhu and Q. Shi, Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress, *Journal of Plant Nutrition* 2004, 27, 12, 2101
- [Alizadeh 2017] F.A. Dourbash, P. Alizadeh, Organosilane modified bioactive glass/poly (amido amine) generation 5 hybrids: Effect of solvent and synthesis route on structural properties, thermal stability and apatite formation, *Materials Chemistry and Physics* 2017, 202, 104
- [Alsaeedi 2019] A. Alsaeedi, H. El-Ramady, T. Alshaal, M. El-Garawany, N. Elhawat and A. Al-Otaibi, Silica nanoparticles boost growth and productivity of cucumber under water deficit and salinity stresses by balancing nutrient uptake.
- [Baeuerlein 2000] E. Baeuerlein (Ed), *Biom mineralization*, Wiley-VCH 2000, ISBN 3-527-29987-4
- [Baeuerlein 2007] E. Baeuerlein (Ed), *Handbook of Biom mineralization – Biological Aspects and Structure Formation*, Wiley-VCH 2007, ISBN 978-2-527-31804-9
- [Barbosa 2019] J. Zimmer Barbosa, A.C. Vargas Motta, A. Rodrigues dos Reis, R. Studart Corrêa and S.A. Prior, Spatial distribution of

structural elements in leaves of *Ilex paraguariensis*:  
physiological and ecological implications

- [Behrens/Baeuerlein 2007] P. Behrens, E. Baeuerlein (Eds), Handbook of Biom mineralization – Biomimetic and Bioinspired Chemistry, Wiley-VCH 2007, ISBN 978-3-527-31805-6
- [Brunner / Baldus 2015] A. Jantschke, E. Koers, D. Mance, M. Weingarth, E. Brunner and M. Baldus, Insight into the Supramolecular Architecture of Intact Diatom Biosilica from DNP-Supported Solid-State NMR Spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 15069
- [Cölfen, Garcia-Riuz 2019] J. Opel, N. Unglaube, M. Wörner, M. Kellermeier, H. Cölfen and J.M. Garcia-Riuz, Hybrid Biomimetic Materials from Silica/Carbonate Biomorphs, *Crystals* 2019, 9, 3, 157
- [Cornelissen 2019] Y.B. Song, Y.-K. Hu, X. Pan, G.-F. Liu, W. Xiong, M. Dong, J.H.C. Cornelissen, Association of leaf silicon content with chronic wind exposure across and within herbaceous plant species, *Global Ecology and Biogeography* 2020, 29, 711
- [Devine/Arndt 1987] R.A.B. Devine and J. Arndt, Si-O bond-length in pressure-densified amorphous SiO<sub>2</sub>, *Phys. Rev. B* 1987, 35, 17, 9376
- [Engelhardt 1978] G. Engelhardt, D. Michel, High-Resolution Solid-State NMR of Silicates and Zeolites, John Wiley and Sons 1987, ISBN 0471915971
- [Epple/Baeuerlein 2007] M. Epple, E. Baeuerlein (Eds), Handbook of Biom mineralization – Medical and Clinical Aspects, Wiley-VCH 2007, ISBN 978-3-527-31806-3
- [Fengel 1984] D. Fengel, G. Wegener, Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions, de Gruyter, Berlin 1984, ISBN 3-11-008481-3

- [Fratzl 1998] A. Reiterer, H.F. Jakob, S.E. Stanzl-Tschegg and P. Fratzl, Spiral angle of elementary cellulose fibrils in cell walls of *Picea abies* determined by small-angle x-ray scattering, *Wood Science and Technology* 1998, 32, 335
- [Fu 2002] F.F. Fu, T. Akagi, S. Yabuki, Origin of Silica Particles Found in the Cortex of *Matteuccia* Roots, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2002, 66, 1265
- [Gao 2011] D. Gao, K. Cai, J. Chen, S. Luo, R. Zeng, J. Yang and X. Zhu, Silicon enhances photochemical efficiency and adjusts mineral nutrient absorption in *Magnaporthe oryzae* infected rice plants. *Acta Physiol Plant* 2011, 33, 675–682
- [García-Gaytán 2019] V. García-Gaytán, E. Bojórquez-Quintal, F. Harnández-Mendoza, D.K. Tiwari, N. Corona-Morales and Z. Moradi-Shakoorian, Polymerized Silicon ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) in *Equisetum arvense*: Potential Nanoparticle in Crops, *J. Chil. Chem. Soc.* 2019, 64, 1
- [Gautam 2019] S. Gautam, M. Kaur and A.K. Rohilla, The Role of Physical Chemical Parameters on Diatom Growth – A Review, *Plant Archive*, 19, 2, 570.
- [Gerber 2003] G. Holzhüter, K. Narayanan, T. Gerber, Structure of silica in *Equisetum arvense*, *Anal. Bioanal Chem* 2003, 376, 512
- [Ghavami 2005] K. Ghavami, Bamboo as reinforcement in structural concrete elements, *Cement and Concrete Composites* 2005, 27, 6, 637
- [Görlich / Kröger 2019] S. Görlich, D. Pawolski, I. Zlotnikov and N. Kröger, Control of biosilica morphology and mechanical performance by the

conserved diatom gene Silicanin-1, *Communications Biology* 2019, 2, 245

- [Graetsch 1994] H. Graetsch, H. Gies and I. Topalovic, NMR, XRD and IR study on microrcrystalline opals, *Phys Chem Minerals* 1994, 21, 166
- [Gruler 2002] C.R. Gruler, *Biomineralisation von SiO<sub>2</sub> am Beispiel der Urtica Dioica*, Der Andere Verlag 2002, ISBN 3-936231-22-2
- [Herrero 1984] C.P. Herrero, J. Sanz, J.M. Serratosa, Si, Al distribution in micas: analysis by high resolution <sup>29</sup>Si NMR spectroscopy, *Journal of Physics C: Solid State Physics* 1984, 18, 13
- [Hildebrand 2018] M. Hildebrand, S.J.L. Lerch and R.P. Shrestha, Understanding Diatom Cell Wall Silification – Moving Forward, *Frontiers in Marine Science* 2018, 5, 125
- [Iler 1979] R.K. Iler, *The Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons 1979, ISBN 978-0-471-02404-0
- [Klinowski 1998] J. Klinowski, C.-F. Cheng, J. Sanz, J.M. Rojo and A.L. Mackkay, Structural studies of tabasheer, an opal of plant origin, *Philosophical Magazin A* 1998, 77, 1, 201
- [Kröger / Sandhage 2010] N. Kröger and K.H. Sandhage, From Diatom Biomolecules to Bioinspired Syntheses of Silica- and Titania-Based Materials, *MRS Bulletin* 2010, 35, 122
- [Kröger / Schlierf 2016] P. Gröger, N. Poulsen, J. Klemm, N. Kröger and M. Schlierf. Establishing super-resolution imaging for proteins in diatom biosilica. *Science Reports* 2016, 6, 36824

- [Kröger 2011] N.R. Haase, S. Shian, K.H. Sandhage, N. Kröger, Biocatalytic Nanoscale Coatings Through Biomimetic Layer-by-Layer Mineralization, *Advanced functional materials* 2011, 21, 22, 4243
- [Kumari / Kröger 2020] E. Kumari, S. Görlich, N. Poulsen, N. Kröger, Genetically Programmed Regioselective Immobilization of Enzymes in Biosilica Microparticles, *Advanced Functional Materials*, 2020, DOI: 10.1002/adfm.202000442
- [Lei 2018] Y. Li, Y. Guo, J. Ge, P.X. Ma, B. Lei, In situ silica nanoparticles-reinforced biodegradable poly(citrate-siloxane) hybrid elastomers with multifunctional properties for simultaneous bioimaging and bone tissue regeneration, *Applied materials today* 2018, 10, 153
- [Lenoci / Camp 2006] L. Lenoci, P.J. Camp, Self-Assembly of Peptide Scaffolds in Biosilica Formation: Computer Simulations of a Coarse-Grained Model, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 10111
- [Leroy 2019] N. Leroy, F. de Tombeur, Y. Walgraffe, J.T. Cornélis and F.J. Verheggen, Silicon and Plant Natural Defenses against Insect Pests: Impact on Plant Volatile Organic Compounds and Cascade Effects on Multitrophic Interactions, *Plants* 2019, 8, 11, 444
- [Lewin 1969] J. Lewin, B.E.F. Reimann, Silicon and Plant Growth, *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 1969, 20, 289
- [Liese 1998] W. Liese, the anatomy of bamboo culms, technical report, International Network for Bamboo and Rattan, ISBN 81-86247-26-2

- [Luque 2018] A. Franco, S. De, A.M. Balu, A.A. Romero and R. Luque, Integrated Mechanochemical/Microwave-Assisted Approach for the Synthesis of Biogenic Silica-Based Catalysts from Rice Husk Waste, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2018, 6, 9, 11555
- [Lux 2003] A. Lux, M. Luxová, J. Abe, S. Morita and S. Inanga, Silicification of bamboo (*Phyllostachys puberula* Mitf.) root and leaf, *Plant and Soil* 2003, 255, 85, 91
- [Ma 2005] N. Mitani, J.F. Ma, and T. Iwashita, Identification of the siliconiferous xylem sap of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* 2005, 46 279
- [Ma 2006] J.F. Ma, K. Tamai, N. Yamaji, N. Mitani, S. Konishi, M. Katsuhara, M. Ishiguro, Y. Murata, and M. Yano, A silicon transporter in rice. *Nature* 2006, 440, 688
- [Ma 2007] J.F. Ma, Plant Root Responses to Three Abundant Soil Minerals: Silicon, Aluminum and Iron, *Critical Reviews in Plant Sciences* 2005, 4, 267
- [Ma 2007b] J.F. Ma, N. Yamaji, N. Mitani, K. Tamai, S. Konishi, T. Fujiwara, M. Katsuhara, and M. Yano, An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* 2007, 448, 209
- [Ma 2008] J.F. Ma, and N. Yamaji, Functions and transport of silicon in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008, 65, 3049
- [Ma 2008b] N. Mitani, N. Yamaji, and J.F. Ma, Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, Lsi1. *Plant Physiol.* 2008, 148, 679

- [Ma 2014] N. Yamaji, J.F. Ma, The node, a hub for mineral nutrient distribution in graminaceous plants, *Trends in Plant Science* 2014, 19, 9, 556
- [Ma 2015] N. Yamaji, G. Sakurai, N. Mitani-Ueno, and J.F. Ma, Orchestration of three transporters and distinct vascular structures in node for intervascular transfer of silicon in rice, *PNAS* 2015, 112, 36, 11401
- [Ma 2019] N. Yamaji, J.F. Ma, Bioimaging of multiple elements by high-resolution LA-ICP-MS reveals altered distribution of mineral elements in the nodes of rice mutants, *The plant journal* 2019, 99, 6, 1254
- [Majumdar 2019] A. Majumdar, M.K. Upadhyay, J.S. Kumar, Sheena, A. Barla, S. Srivastava, M. Kumar Jaiswal and S. Bose, Ultra-structure alteration via enhanced silicon uptake in arsenic stressed ricecultivars under intermittent irrigation practices in Bengal delta basin, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2019, 180, 770
- [Mann 2001] S. Mann, *Biomineralization*, Oxford Chemistry Masters 2001, ISBN 9780198508823
- [Mann, Perry 1983] S. Mann, C.C. Perry, R.J. P. Williams, C.A. Fyfe, G.C. Gobbi, and G.J. Kennedy, The Characterisation of the Nature of Silica in Biological Systems, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1983, 168
- [Mann, Perry 1984] C.C. Perry, S. Mann and R.J. Paton Williams, Structural and analytical studies of the silicified macrohairs from the lemma of the grass *Phalaris canariensis* L, *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1984, 222, 427

- [Mann, Perry 1991] S. Mann, C.C. Perry, Solid-State Bioinorganic Chemistry: Mechanisms and Models of Biomineralization, *Advances in Inorganic Chemistry*, 1991, 36, 137
- [Meunier 2012] F. Guntzer, C. Keller, J.-D. Meunier, Benefits of plant silicon for crops: a review, *Agronomy for Sustainable Development*, 2012, 32, 201
- [Moise 2019] E.R.D. Moise, J.N. McNeil, S.E. Hartley, H.A.L. Henry, Plant silicon effects on insect feeding dynamics are influenced by plant nitrogen availability, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2019, 167, 2, 91
- [Müller 2003] W.E.G. Müller (Ed.), *Silicon Biomineralization*, Springer Verlag 2003, ISBN 3-540-00537-4
- [Neumann 2001] D. Neumann, U. zur Nieden, Silicon and heavy metal tolerance of higher plants, *Phytochemistry* 2001, 56, 685
- [O’Keefe/Hyde 1977] M. O’Keefe and B.G. Hyde, On Si-O-Si Configurations in Silicates, *Acta Cryst.* 1978, B34, 27
- [Perry 2000] C.C. Perry, T. Keeling-Tucker, Biosilicification: the role of the organic matrix in structure control, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2000, 5, 537
- [Perry 2016] R. Plowright, N. Dinjaski, S. Zhou, D.J. Belton, D.L. Kaplan and C.C. Perry, Influence of silk–silica fusion protein design on silica condensation in vitro and cellular calcification, *RSC Advances* 2016, 6, 21776
- [Presti 2018] M.L. Presti, R. Ragni, D. Vona, G. Leone, S. Cicco and G.M. Farinola, *In vivo* doped biosilica from living *Thalassiosira*

weissflogii diatoms with a triethoxysilyl functionalized red emitting fluorophore, *Biomaterials and Soft Materials* 2018, 3, 27, 1509

- [Rao 2017] G.B. Rao, O.Y. Pi and E.K. Syriac, Silicon Nutrition in Rice, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2017, 6, 390
- [Ravera 2016] E. Ravera, T. Martelli, Y. Geiger, M. Fragai, G. Goobes, C. Luchinat, Biosilica and bioinspired silica studied by solid state NMR, *Coordination Chemistry Reviews* 2016, 327-328, 110
- [Richmond 2003] K.E. Richmond, M. Sussmann, Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient, *Current Opinion in Plant Biology* 2003, 6, 3, 268
- [Rickus 2016] J.L. Kahn, N.M. Eren, O. Campanella, S.L. Voytik-Harbin and J.L. Rickus, Collagen-fibril matrix properties modulate the kinetics of silica polycondensation to template and direct biomineralization, *Journal of Materials Research* 2016, 31, 3
- [Rudall 2014] P.J. Rudall, C.J. Prychid and T. Gregory, Epidermal Patterning and Silica Phytoliths in Grasses: An Evolutionary History, *The Botanical Review* 2014, 80, 59
- [Sangster 1999] M.J. Hodson and A.G. Sangster, Aluminium/silicon interactions in conifers, *Journal of Inorganic Biochemistry* 1999, 76, 2, 89
- [Stöber 1968] W. Stöber, A. Fink and E. Bohn, Controlled Growth of Monodispers Silica Spheres in the Micron Range, *J. Colloid a. Interf. Sci.* 1968, 26, 62

- [Strasburger 1998] P. Sitte, H. Ziegler, F. Ehrendorfer and A. Besinsky, Strasburger – Lehrbuch der Botanik 34. Auflage, Gustav Fischer Verlag 1998, ISBN: 9783437255007
- [Sumper / Kröger 2004] M. Sumper, N. Kröger, Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins, *J. Mater. Chem.* 2004, 14, 2059
- [Sumper/Kröger 1999] N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation, *Science* 1999, 286, 1129
- [Sumper/Kröger 2002] N. Kröger, S. Lorenz, E. Brunner and Manfred Sumper, Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis, *Science* 2002, 298, 584
- [Tacke 1999] R. Tacke, Meilensteine in der Biochemie des Siliciums: von der Grundlagenforschung zu biotechnologischen Anwendungen, *Angew. Chem.* 1999, 111, 3197
- [Tacke 2000] R. Bertermann and R. Tacke, Solid-State <sup>29</sup>Si VACP/MAS NMR Studies of Silicon-Accumulating Plants: Structural Characterization of Biosilica Deposits, *Z. Naturforsch* 2000, 55b, 459
- [Takahashi 1977] E. Takahashi and Y. Miyake, Silica and plant growth, *Proc. Int. Semin. Soil Environ. Fert. Manage Intensive Agric*, 1977, 603
- [Terracciano 2018] M. Terracciano, L. De Stefano and I. Rea, Diatoms Green Nanotechnology for Biosilica-Based Drug Delivery Systems, *pharmaceutics* 2018, 10, 4, 242

- [v.Blaaderen 1992] A. van Blaaderen and A.P.M. Kentgens, Particle morphology and chemical microstructure of colloidal silica spheres made from alkoxysilanes, *J. Non-Cryst. Solids* 1992, 149, 161
- [van Santen / Gieskes 2004] E.G. Vrieling, T.P.M. Beelen, Q. Sun, S. Hazelaar, R.A. van Santen and W.W.C. Gieskes, Ultrasmall, small, and wide angle X-ray scattering analysis of diatom biosilica: interspecific differences in fractal properties, *J. Mater. Chem.* 2004, 14, 1970
- [Vega 2019] I. Vega, M. Nikolic, S. Pontigo, K. Godoy, M. de La Luz Mora and P. Cartes, Silicon Improves the Production of High Antioxidant or Structural Phenolic Compounds in Barley Cultivars under Aluminum Stress, *Agronomy* 2019, 9,7, 388
- [Wang 2005] L. Wang, Biosilicified structures for cooling plant leaves: A mechanism of highly efficient midinfrared thermal emission, *Applied Physics Letters* 2005, 87, 194105
- [Yamanaka 2017] S. Yamanaka, H. Usami, K. Kakegawa, S. Yoneda, K. Fukuda, K. Yoshino, N. Hayashida, Y. Markami and H. Morikawa, Strategy of optical path of daylight signal into tissues in cold-season turfgrasses using small, concave silica bodies, *Scientific Reports* 2018, 8, 10260
- [Zhang 2015] J. Zhang, W. Zou, Y. Li, Y. Feng, H. Zhang, Z. Wu, Y. Tuz, Y. Wang, X. Cai, L.Peng, Silica distinctively affects cell wall features and lignocellulosic saccharification with large enhancement on biomass production in rice, *Plant Sci.* 2015, 239, 84

## 6. Experimentelle Informationen:

### *Verwendete Instrumente:*

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden durch Experimente an unterschiedlichsten analytischen Geräten erhoben. Die Anschaffungs- und Unterhaltskosten sowie die nötige Expertise im Umgang konnten nicht ausschließlich durch den eigenen Arbeitskreis geleistet werden, so dass für die nötigen Daten auch auf Geräte auswärtiger Arbeitsgruppen und Institute zurückgegriffen wurde, um die für die Fragestellung benötigten Daten zu erhalten.

### *Elektronenmikroskopie*

#### a) Raster Elektronen Mikroskopie

Vorwiegend wurden die Daten mit einem Zeiss DSM 940 Rasterelektronenmikroskop untersucht. Beschleunigungsspannungen lagen dabei im Bereich von 5-10 kV und der Strahlstrom wurde mit einer Stromstärke von 60-85  $\mu\text{A}$  verwendet. Zur Verbesserung der elektrischen Leitfähigkeit der Probe und für einen besseren Kontrast wurden die Proben in einer Sputteranlage der Firma Balzers bei einem Strom von 12 mA und einem Druck von  $5 \cdot 10^{-3}$  Pa in Argon Atmosphäre für 30s mit Gold besputtert.

#### b) EDX (Energy Dispersive X-Ray Spektroskopie)

Die EDX Untersuchung der Proben wurden in der Arbeitsgruppe PANNE der Technischen Universität München durchgeführt. Dabei wurden die Proben nativ eingesetzt oder mit Kohlenstoff besputtert.

Des Weiteren stand ein Hitachi S4700 mit EDX bei Hitachi für einige Testmessungen zur Verfügung.

#### c) Mikrosonde

Elementspezifische bildgebende Verfahren mit höchster Auflösung an den Proben wurden durch Dr. E. REUSSER der ETH Zürich im Institut für Mineralogie und Petrographie mittels einer Mikrosonde durchgeführt. Verwendet wurde eine Mikrosonde von JEOL, Modell JXA-8200 mit 5 WDX und EDX empfindlichen Kameras.

## ***Röntgenographische Methoden***

### a) Pulver Röntgen Beugung (Powder X-Ray Diffraction; PXRD)

Pulverröntgenuntersuchungen fanden an einem Huber Guinier G690 Diffraktometer in unserer Arbeitsgruppe statt. Es wurde durchgängig eine Kupferröntgenröhre mit einer Beschleunigungsspannung von 40 kV verwendet. Im Strahlengang befand sich ein fokussierender Monochromator, der auf die Wellenlänge von Cu K<sub>α1</sub> Strahlung, 1,5406 Å, justiert war. Die Detektion der Reflexe erfolgte mittels einer Huber Imagefoil, die direktes Auslesen an einem Computer ermöglichte.

### b) Röntgenkleinwinkelstreuung (Small Angle X-Ray Scattering; SAXS)

Die Untersuchungen zur Kleinwinkelstreuung, die Informationen über eventuelle lokale Ordnungen und sehr weitreichende Periodizitäten in den Proben aufzeigen konnten, wurden bei Dr. PARIS an der Universität Leoben in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. FRATZL durchgeführt. Hier gab es neben den technischen Voraussetzungen vor allem auch die Expertise im Bereich der Analyse von Cellulose Verbindungen, von denen das stärkste Signal in den Untersuchten Proben erwartet wurde. Weitere SAXS Untersuchungen fanden durch Prof. Dr. GERBER an der Universität Rostock im Rahmen eines Probenaustausches im DFG Schwerpunktprogramms SPP 1117 statt.

## ***Festkörper Kernspin-Untersuchungen (Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance; MAS-NMR)***

### a) Bruker MAS-NMR Systeme

<sup>29</sup>Si MAS-NMR Untersuchungen sowie spezielle Untersuchungen am Nativen Material fanden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Samoson bei Dr. Heinmaa in Tallinn, Estland, statt. Hier standen verschiedene Spektrometer von 200 bis 400 MHz mit unterschiedlichen Rotorensystemen zur Verfügung. Gearbeitet wurden mit 5mm, 7mm und 10mm Rotoren, um ausreichend Probenmasse zur Verfügung zu haben, da im nativen Material die Si Konzentration sehr gering ist. Spinningraten lagen zwischen 5kHz und 15kHz.

b) Varian Inova 400

Der größte Teil der MAS-NMR Messungen fand auf der hauseigenen Varian Inova 400 statt, einem 400MHz Spektrometer, das nach entsprechendem Umbau von flüssigen Proben auf Festkörperproben mit einem MAS-Messkopf ausgerüstet werden konnte. Es wurden  $^{27}\text{Al}$  und  $^{29}\text{Si}$  Spektren vermessen. Die Spinningraten lagen zwischen 10 kHz und 20 kHz.

Es wurden immer protonenentkoppelte  $^{29}\text{Si}$  Spektren aufgenommen. Auf eine Kreuzpolarisierung der Protonen mit den  $^{29}\text{Si}$ -Kernen wurde verzichtet, um eine quantitative Aussage über die unterschiedlichen Verknüpfungen der Si-O Zentren zu erhalten. Um Sättigungseffekte bei der Anregung der  $^{29}\text{Si}$  Spins zu vermeiden wurden T2-Relaxationszeiten von 300 s – 500 s gewählt.

### *Zugfestigkeit*

Messungen der Zugfestigkeit unterschiedlicher Bambusproben wurde im Rahmen der Kooperation mit der Daimler Chrysler AG in der Entwicklungsabteilung in Ulm durchgeführt. Die Proben wurden gemäß den DIN-Vorgaben vorbereitet und vermessen.

### *Optische Polarisations-Mikroskopie*

a) Es wurde ein Zeiss Durchlichtmikroskop, ausgestattet mit einer digitalen Zeiss AxioCam Farbkamera verwendet. Ausgestattet ist das Mikroskop mit Polarisationsfiltern zur Polarisations-Mikroskopie sowie einem Heiztisch, der ein Beheizen der Probe im Gasstrom,  $\text{N}_2$  oder  $\text{O}_2$ , bis zu  $1000^\circ\text{C}$  erlaubt.

b) Für Übersichtsaufnahmen wurde ein Wild Photomakroskop M400 mit Photoaufsatz verwendet. Es wurde sowohl chemischer Farbfilm mit einer Empfindlichkeit von 100 ASA als auch die Zeiss AxioCam Digitalkamera verwendet. Das Photomakroskop hat einen Vergrößerungsbereich von 6,5- bis 32fach. Es wurde für

die meisten Aufnahmen im Auflichtverfahren verwendet, erlaubt aber auch Aufnahmen im Durchlicht mit und ohne linearer Polarisierung.

### ***Thermische Verfahren***

#### a) Simultane Thermo Analyse (STA)

Für simultane Ermittlung von Temperatur, Gewichtsänderung und Reaktionsenthalpie in verschiedenen Gasatmosphären eine Netzsch STA 429 verwendet. Die Experimente fanden ausschließlich in Korundtiegeln mit und ohne Deckel statt. Es wurden Experimente in O<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> Atmosphäre durchgeführt. Zur Entfernung des Untergrundes wurden Leermessungen des Tiegels in den entsprechenden Temperaturprogrammen und Gasatmosphären durchgeführt. Heizraten lagen bei 10 K min<sup>-1</sup> wenn nicht explizit anders angegeben.

#### b) Pyrolyse GC-MS

Zur Analyse der Zersetzungsprodukte der Temperaturstufen, die in den STA-Experimenten ermittelt wurden, wurde ein HP 6890 GC und HP5973 Quadrupol-MS mit vorgeschalteter Flash-Pyrolysestufe verwendet. Die Pyrolyseeinheit erlaubt dabei die Zersetzung der Probe bei einer gewählten Temperatur innerhalb weniger Millisekunden, so dass die entstandenen Produkte im Gaschromatographen über eine 30m Phenyl- und Methylsilansäule aufgetrennt und im Quadrupol-Massendetektor registriert werden können. Im Gaschromatographen wurden dabei verschiedene Temperaturprofile verwendet, um eine optimale Trennung der eingebrachten Substanzen zu erhalten.

#### c) Öfen

Die Vorbereitung größere Probemengen für weitere analytische Untersuchungen wie zum Beispiel die MAS-NMR erfolgt durch thermische Zersetzung in Muffelöfen unter Gasatmosphäre. vom Typ Heraeus W10/10A mit maximal Temperaturen von 1000°C, standardmäßig jedoch bei 600°C Temperatur verwendet, dienen der Pyrolyse der Substanzen. Die Proben wurden im Ofen manuell unter Kontrolle einer externen Temperaturregelung von Raumtemperatur in Stufen von 50°C und Verweilzeiten von 10 – 30 min auf die gewünschte Endtemperatur erhitzt, die zuvor

in STA-Experimenten ermittelt worden war. Über einen Keramikeinlass kann der Brennraum mit N<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> Atmosphäre normobar gespült und betrieben werden.

### ***Laser Ablation Induced Coupled Plasma Mass Spectroscopy (LA-ICP-MS)***

Ortsaufgelöste Informationen über die elementare Zusammensetzung der untersuchten Proben konnten durch den Einsatz der LA-ICP-MS erhalten werden. Die Messungen dazu fanden bei Prof. Dr. D. GÜNTHER an der ETH Zürich statt. Bei diesem Verfahren werden die Proben punktuell in einem Bereich von einigen µm Durchmesser durch Beschuss durch einen fokussierten Fluoridlaserstrahl so stark erhitzt, dass sie in die Gasphase übergehen. Die verdampften Substanzen und Partikel werden dann mit einem Inertgas Strom in ein Argon Helium Plasma transportiert, in dem sie durch die hohe Energie des Plasmas in ihre atomaren Bestandteile zerlegt werden. Diese können anschließend nach Isotopen getrennt detektiert werden.

Zur Ablation wurde ein Fluorid-Laser (ArF) mit einer Strahlenergie von 64 mJ bzw 118 mJ pro Puls und Pulsfrequenzen von 5 Hz und 10 Hz bei einer Wellenlänge von 193nm sowie mit Durchmessern von 10 µm, 40 µm und 60 µm verwendet.

### ***Anreicherungsexperimente***

Für die Anreicherungsexperimente wurde handelsübliches Tetraethoxysilan (TEOS) eingesetzt.

#### **Experimente in der flüssigen Phase**

Es wurden verschiedene Konzentrationen von TEOS : H<sub>2</sub>O vorbereitet und die Bambusproben darin eingebracht. Es wurden sowohl Ausschnitte des Halmes als auch der Blätter verwendet.

Die TEOS Konzentration lag zwischen 10% und 30%. Es wurde solange intensiv gerührt, bis sich eine stabile Emulsion gebildet hatte, die langsam durch Hydrolyse in eine Lösung überging. Nach 24 Stunden Diffusionszeit in die jeweiligen Pflanzengewebe wurde ein Tropfen verdünnte Salzsäure zugegeben, um die Polykondensation zu starten oder zu beschleunigen. Die Proben verblieben für insgesamt eine Woche in der Lösung und wurden

Anschließend aus dem entstandenen Hydrogel entfernt.

Es erfolgte eine mechanische Reinigung der Probenoberflächen, um anhaftendes Hydrogel zu entfernen und anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur getrocknet.

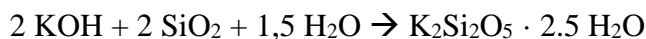
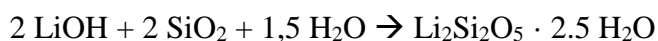
Experimente in der Gasphase:

Wie in der Skizze (Abb. 4.34) gezeigt, wurde die Probe auf einem Drahtgitter in der Gasphase über der Silicaquelle platziert. Als Silicaquelle diente wieder TEOS. Anschließend wurde das TEOS bis zum Siedepunkt erhitzt und die Gasphase über dem flüssigen TEOS so gesättigt. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Probe nicht im Refluxbereich des am Kühler kondensierten TEOS befand, sondern sich nur mit der Gasphase in Wechselwirkung befand. Es wurde jeweils für 8h täglich während bis zu 2 Wochen angereichert. Zur Aufarbeitung wurde die Probe aus dem Kolben entnommen, mit Wasser abgespült, anhaftendes Silica mechanisch entfernt und die Probe anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

### ***Darstellung der Phyllosilikate***

*Li<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und K<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub>*

Reaktionsgleichung:

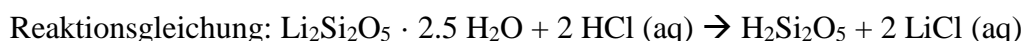


Durchführung

LiOH bzw. KOH wird in Wasser gelöst. Anschließend wird unter Rühren SiO<sub>2</sub> Kieselgel zugegeben. Das entstandene Gel wird in Autoklaven gefüllt und die Edukte werden für 6 Wochen bei 100°C erhitzt. Zur Aufarbeitung wird der Autoklav abkühlen gelassen, das Produkt wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Das entstandene Produkt wird röntgenographisch charakterisiert.

*Ionentausch von Li<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub> · 2,5 H<sub>2</sub>O zu H<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub> -IV*



Durchführung

Li<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub> · 2,5 H<sub>2</sub>O wird in einen Eiswasser gekühlten Kolben vorgelegt. Anschließend werden unter Rühren 2 Äquivalente verdünnte HCl zugetropft. Die Reaktion rührt bei 4°C im

Kühlraum 2 Tage. Zur Aufarbeitung wird das Produkt abfiltriert und mit der ca. 10fachen Menge Wasser gewaschen, bis das Wasser chloridfrei ist (pH 5-6). Das Produkt wird getrocknet und röntgenographisch charakterisiert.

Zur Darstellung von  $\text{LiHSi}_2\text{O}_5$  und  $\text{KHSi}_2\text{O}_5$  wurde jeweils nur 1 Äquivalent HCl verwendet.