

**Nanoindentation an Phytolithen ausgewählter
Nahrungspflanzen herbivorer Säugetiere
und der potentielle Einfluss der Härte
auf die Usur der Dentition**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Caroline Braune

geboren am 08. Juni 1983 in Zossen

Hamburg, 2014

Tag der Disputation: 26. Januar 2015

Gutachter:

1) Prof. Dr. Thomas M. Kaiser

2) Prof. Dr. Reinhard Lieberei

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung (deutsch/englisch)	7
Einleitung	9
1. Kapitel 1 – Silikatkontrollierte Anzucht von ausgewählten Nahrungspflanzen	11
1.1 Einleitung	11
1.2 Stand der Forschung	12
1.2.1 Silikatgehalte in Pflanzen	12
1.2.2 Silikataufnahme und Einlagerung	12
1.2.3 Funktion des Silikats in der Pflanze	13
1.3 Material	16
1.4 Methoden	18
1.4.1 Aufbau der Anzucht	18
1.4.2 Nährstoffzusammensetzung und Bewässerung	20
1.4.3 Erntezeitpunkt	21
1.4.4 Biomassebestimmung	21
1.4.5 Bestimmung des SiO ₂ -Gehaltes	21
1.4.6 Auswertung	22
1.5 Ergebnisse	23
1.5.1 Biomasse	23
1.5.2 Wuchshöhe	25
1.5.3 SiO ₂ -Gehalt	26
1.6 Diskussion	27
1.6.1 Diskussion	27
1.6.2 Kontamination	29
1.6.3 Schlussfolgerung	30

2. Kapitel 2 – Extraktionsmethoden für Phytolithe: Vergleich von Veraschung und Wasser-Siede-Aufschluss mit Bestimmung der Härte durch Nanoindentation	31
2.1 Einleitung	31
2.2 Stand der Forschung	32
2.3 Material	33
2.4 Methoden	34
2.4.1 Veraschung	34
2.4.2 Wasser-Siede-Aufschluss	34
2.4.3 Einbettung der Phytolithe von <i>Phragmites australis</i>	35
2.4.4 Anschleifen der Phytolithe	35
2.4.5 Nanoindentation	37
2.4.6 Auswertung	38
2.5 Ergebnisse	38
2.6 Diskussion	42
2.6.1 Diskussion	42
2.6.2 Schlussfolgerung	43
3. Kapitel 3 – Qualitative Dokumentation der Phytolithe von <i>Hordeum vulgare</i> mittels Transmissionselektronenmikroskopie	45
3.1 Einleitung	45
3.2 Stand der Forschung	46
3.3 Material	47
3.4 Methoden	47
3.5 Ergebnis	48

3.6 Diskussion	50
3.6.1 Diskussion	50
3.6.2 Schlussfolgerung	50
4. Kapitel 4 – Härte-Bestimmung durch Nanoindentation an Phytolithen bei <i>Themeda triandra</i> aus der silikatkontrollierten Anzucht (Kapitel 1.3 – 1.4)	52
4.1 Einleitung	52
4.2 Stand der Forschung	53
4.3 Material	55
4.4 Methoden	55
4.5 Ergebnis	56
4.6 Diskussion	57
4.6.1 Diskussion	57
4.6.2 Schlussfolgerung	59
5. Gesamtdiskussion	60
5.1 Kernaussagen	60
5.2 Härtemessungen an Phytolithen	60
5.3 Phytolithbildung im Blattgewebe	61
5.4 Abrasivitätsverhalten von Phytolithen	62
5.5 Limitierungen	65

6. Schlussfolgerung und Ausblick	67
6.1 Schlussfolgerung	67
6.2 Ausblick	68
Danksagung	69
Literaturverzeichnis	70
Abkürzungsverzeichnis	76
Anhang	78
Eidesstattliche Erklärung	82

Zusammenfassung (deutsch/englisch)

Phytolithe sind Biomineralisationen, die vorwiegend in Gräsern vorkommen. Die silikathaltigen Gräser sind wichtiger Bestandteil der Nahrung vieler pflanzenfressender Säugetiere und galten lange als wichtigste Hauptursache der Zahnabnutzung (Baker et al. 1959). Diese These wird in Studien von Sanson et al. (2007) und Lucas et al. (2013) widerlegt und die Ursache der Zahnabnutzung wird mit bodennah auftretenden Staub- und Bodenpartikeln erklärt. Biomechanische Materialeigenschaften von endogenen Phytolithen und exogenen Staub- und Bodenpartikeln können zur Klärung der tatsächlichen Ursache der Usur beitragen. Die Bestimmung der Materialeigenschaften an nativ extrahierten Phytolithen wird jedoch bisher nur unzureichend durchgeführt.

In dieser Arbeit wird eine silikatkontrollierte Anzucht mit 12 ausgewählten Nahrungspflanzen durchgeführt und die Biomasseproduktion, die Wuchshöhe und der SiO_2 -Gehalt bestimmt. Es wird eine Extraktionsmethode zur Gewinnung von nativen Phytolithen entwickelt (Wasser-Siede-Aufschluss), an denen anschließend die Härte mittels Nanoindentation bestimmt wird. An Phytolithen von *Themeda triandra* der Anzucht mit 10 und 100 mg SiO_2/L wird die potentielle Abhängigkeit der Phytolithhärte von der Silikatkonzentration im Substrat getestet. Durch Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop wird der innere Aufbau von Phytolithen untersucht und ihre Entstehung nachvollzogen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Silikatverfügbarkeit des Substrates keinen Einfluss auf die Biomasseproduktion, Wuchshöhe und Phytolithhärte hat. Allerdings kann eine SiO_2 -Einlagerung nachgewiesen werden. Die ermittelten Phytolithhärten liegen im ähnlichen Bereich wie die von Sanson et al. (2007) und Lucas et al. (2013) bestimmten Phytolithhärten und bestätigen somit deren Ergebnisse. Es wird abgeleitet, dass die standortbedingenden Faktoren in der Charakterisierung der Materialeigenschaften von Phytolithen vernachlässigt werden können. Die untersuchten Phytolithe zeigen eine härtere Materialeigenschaft als das Säugetierzahngewebe Dentin und können dieses in Folge dessen abradieren. Sie

sind jedoch weicher als Zahnschmelz. Die Zahnabnutzung durch Phytolithe ist somit auf Basis der Materialeigenschaften möglich und naheliegend.

Phytoliths are biomineralisations that occur predominantly in grasses. The siliceous grasses are an important part of the diet of many herbivorous mammals and have long been regarded as the most important cause of tooth wear (Baker et al. 1959). Sanson et al. (2007) and Lucas et al. (2013) refuted this hypothesis and explained the cause of tooth wear with dust and soil particles occurring at ground level. The determination of biomechanical material properties of endogenous phytoliths and exogenous dust and soil particles can help to clarify the cause of tooth wear. The material properties of natively extracted phytoliths have, however, been studied insufficiently.

Biomass production, plant height and SiO₂ content are determined in silica-controlled cultivations of selected forage plants. An extraction method for obtaining native phytoliths (water-boiling method) is developed, and native phytolith hardness is determined with nanoindentation. The potential dependence of the phytolith hardness with silicate concentration in the substrate is tested on phytoliths of 10 and 100 mg SiO₂/L cultures of *Themeda triandra*. Transmission electron microscopy imaging is used to investigate internal structures and origin of phytoliths.

The results indicate, that the silica concentration of the substrate has no influence on biomass production, plant height and phytolith hardness. However a SiO₂ deposition is detected. The phytolith hardness lies within the phytolith hardness range determined by Sanson et al. (2007) and Lucas et al. (2013) and thus confirms their results. It is concluded that the habitat-specific conditions do not influence the material properties of phytoliths. The studied phytoliths are harder than mammalian tooth tissue dentin, but softer than enamel. Hence their material properties are suitable to wear dentin.

Einleitung

Die Untersuchung von Zähnen und deren Usur im Bereich der Säugetiere dient seit langem der Interpretation von Ernährungsverhalten, -typen und der Rekonstruktion von Lebensräumen (z. B. Kaiser und Brinkmann 2006, Kaiser et al. 2013). Da silikathaltige Poaceen ein Bestandteil der herbivoren Nahrung vieler Säuger sind, wird angenommen, dass diese mineralischen Einschlüsse die Hauptursache der Zahnabnutzung sind (Baker et al. 1959). In neueren Studien wird die These kontrovers diskutiert, da ausgewählte Verfahren der Härteprüfung zeigen, dass Opal-Phytolithe weicher als Zahnschmelz sind (Lucas et al. 2013, Müller et al. 2014a, 2014b, Sanson et al. 2007). In den Arbeiten fehlen jedoch entscheidende Materialparameter als auch Angaben zur Herkunft des Pflanzenmaterials. Die Studien sind daher kritisch zu betrachten.

Die Materialeigenschaften von biogen entstandenen Materialien zu bestimmen, ist ein neues Forschungsfeld, bei dem auf interdisziplinärer Ebene Ingenieurwissenschaften, Biowissenschaften und Veterinärmedizin kooperieren. Die Materialprüfung von biogenen Materialien, wie Opal-Phytolithe aus Gräsern, ist eine Herausforderung, da sie stets auf morphologisch mikroskopisch kleinen ungleichen Partikeln im Nanometerbereich durchgeführt werden muss.

Phytolithe, griechisch: „Pflanzensteine“, bezeichnen nach Piperno (2006) alle Formen der mineralischen Ablagerungen in Pflanzen, die aus silikat- oder kalkhaltiger Zusammensetzung bestehen. In dieser Arbeit wird der Begriff Phytolith ausschließlich für silikathaltige Pflanzenkörper, den sogenannten Opal-Phytolithen, verwendet.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung der Härte von nativ extrahierten Phytolithen mit der „Instrumentierten Eindringprüfung“ nach DIN EN ISO 14577 im Nanometerbereich (im Folgenden „Nanoindentation“). Anhand der Härte wird eine potentielle Abhängigkeit mit dem lebensraumspezifischen Parameter, Silikatkonzentration des Substrates, getestet.

Die ermittelten Phytolith-Härten, die als Indikator der Materialeigenschaft von Phytolithen stehen, sollen abschließend Aufschluss geben, ob das Abrasivitätsverhalten der Phytolithe die Oberflächen von Säugetierdentitionen beeinflussen kann.

1. Kapitel 1 – Silikatkontrollierte Anzucht von ausgewählten Nahrungspflanzen

1.1 Einleitung

Die chemische Zusammensetzung der Erdkruste enthält 46,6 % Sauerstoff und 27,7 % Silizium (Richter 1992). Auf Oxide berechnet, hat Siliziumdioxid SiO_2 in der Oberkruste einen Anteil von 59,1 % (Richter 1992) und scheint allgegenwärtig zu sein.

Die Kieselsäure Si(OH)_4 als Derivat des Siliziumdioxids ist pflanzenverfügbar und wird von allen Pflanzen aktiv oder passiv aufgenommen. In viele Studien werden die Zusammenhänge von aufgenommener Kieselsäure anhand verschiedener Parameter untersucht. Es wird z. B. gezeigt, dass die Photosyntheseleistung und die Resistenz gegenüber Schädlingen positiv mit der Silikat-Zufuhr korreliert ist (Adatia und Besford 1986).

Nur in einigen wenigen Studien wird der Zusammenhang zwischen der Biomasse von ausgewählten Pflanzen und der zugeführten Silikat-Menge untersucht und eine positive Korrelation festgestellt (Schaller et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit erfolgt eine Anzucht von ausgewählten typischen Nahrungspflanzen von herbivoren Huftieren auf silikatkontrolliertem Medium. Neben einer Nullkontrolle (0 mg SiO_2/L) werden zwei unterschiedliche Silikatkonzentrationen (10 mg SiO_2/L und 100 mg SiO_2/L) dem Nährmedium zugefügt. Die Silikat-Konzentration orientiert sich an einer Studie von Adatia und Besford (1986), die eine silikatkontrollierte Anzucht mit Vertretern der Dikotyledoneae vornehmen.

Folgende Hypothese wird erstmalig an einer Auswahl von 12 typischen Nahrungspflanzen geprüft: Die Biomasseproduktion und die Wuchshöhe korrelieren positiv mit der pflanzenverfügbaren Silikatkonzentration im Substrat. Der Standort könnte sich aufgrund erhöhter Silikatverfügbarkeit positiv auf die Produktion von Nahrungspflanzen für herbivore Konsumenten auswirken.

1.2 Stand der Forschung

1.2.1 Silikatgehalte in Pflanzen

Silikate werden von Pflanzen in unterschiedlicher Menge aufgenommen. Es lassen sich Silizium-Akkumulatoren (Si-Akkumulatoren) und Nicht-Silizium-Akkumulatoren (Nicht-Si-Akkumulatoren) unterscheiden (Ma und Takahashi 2002). Ein Si-Akkumulator hat einen Silikatgehalt von über 1,0 % der Trockenmasse, während ein Nicht-Si-Akkumulator weniger als 0,5 % Silikat enthält. Bei Silikatgehalten zwischen 0,5 und 1,0 % wird von intermediären Typen gesprochen.

Unter den Angiospermae werden ausschließlich die Poaceae und Cyperaceae der Monocotyledoneae als Si-Akkumulatoren beschrieben. Der Silikatgehalt von *Oryza perennis* MOENCH (Poaceae) ist z. B. mit bis zu 7,67 % in der Trockenmasse dokumentiert (Ma und Takahashi 2002).

1.2.2 Silikataufnahme und Einlagerung

Si-Akkumulatoren nehmen pflanzenverfügbares Silikat in Form von Kieselsäure $\text{Si}(\text{OH})_4$ mit Wasser und anderen Nährstoffen aus dem Boden auf. Die Löslichkeit der Kieselsäure aus Quarz ist pH-Wert- und temperaturabhängig (Runge 2000, Jones und Handreck 1965, Ma und Takahashi 2002). Während die Aufnahme der Kieselsäure von vielen Autoren als passiver Prozess beschrieben wird (Runge 2000, Adatia und Besford 1986, Jones und Handreck 1965), konnten Ma et al. (2006) Gene zur Ausbildung von speziellen Silizium-Aquaporinen an der Endo- und Exodermis der Wurzel von *Oryza sativa* L. identifizieren.

mit dem Transpirationsstrom gelangt die Kieselsäure aus dem Boden über das Xylem in die oberirdischen Organe. Transpirationsbedingt polymerisieren Teile der Kieselsäure im Apo- und oder Symplasten zu einer kolloidalen Lösung, einem SiO_2 -Sol, einem SiO_2 -Gel oder zu amorphen Opal ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), der „Phytolith“ genannt wird (Piperno 2006, Runge 2000, Jones und Handreck 1965). Verkieselte Gewebe, sogenannte ‚Kieselskelette‘, oder kompakte Einzelkörper, meist epidermale Kurzzellen, können silifizieren (Runge 2000).

Der Prozess der Silikataufnahme unterliegt lebensraumspezifischen Parametern. Ist z. B. der Aluminiumoxidgehalt des Bodens erhöht, kann die Silikataufnahme stark reduziert sein (Jones und Handreck 1965). Die Aufnahme von Silikat konkurriert mit der Phosphat-Aufnahme. Entscheidend ist der pH-Wert des Bodens: Zwischen 6,0 und 9,7 nimmt Reis mehr Silikat als Phosphat auf. Bei pH-Werten größer als 11,0 ist die Silikataufnahme durch Phosphat gehemmt (Ma und Takahashi 2002).

Ein feuchter Standort kann ebenfalls durch die Morphologie von mikroanatomisch ausgewerteten Phytolithen nachgewiesen werden. Bei erhöhter Wasserzufuhr oder künstlicher Bewässerung gelangen große Mengen an Kieselsäure in die Pflanze und führen zur Entstehung von mehreren Lagen Kieselskeletten (Rosen und Weiner 1994). Weiter zeigen sich neben primär verkieselten Kurzzellen, verkieselte Langzellen, die als Indikator für eine erhöhte Wasserzufuhr dienen (Madella et al. 2009).

1.2.3 Funktion des Silikats in der Pflanze

Nach Epstein (1994, 1999) wirkt sich pflanzenverfügbares Silikat, ob als Mikro- oder Makronährstoff zugeführt, vorteilhaft auf Pflanzen aus (Abb.1).

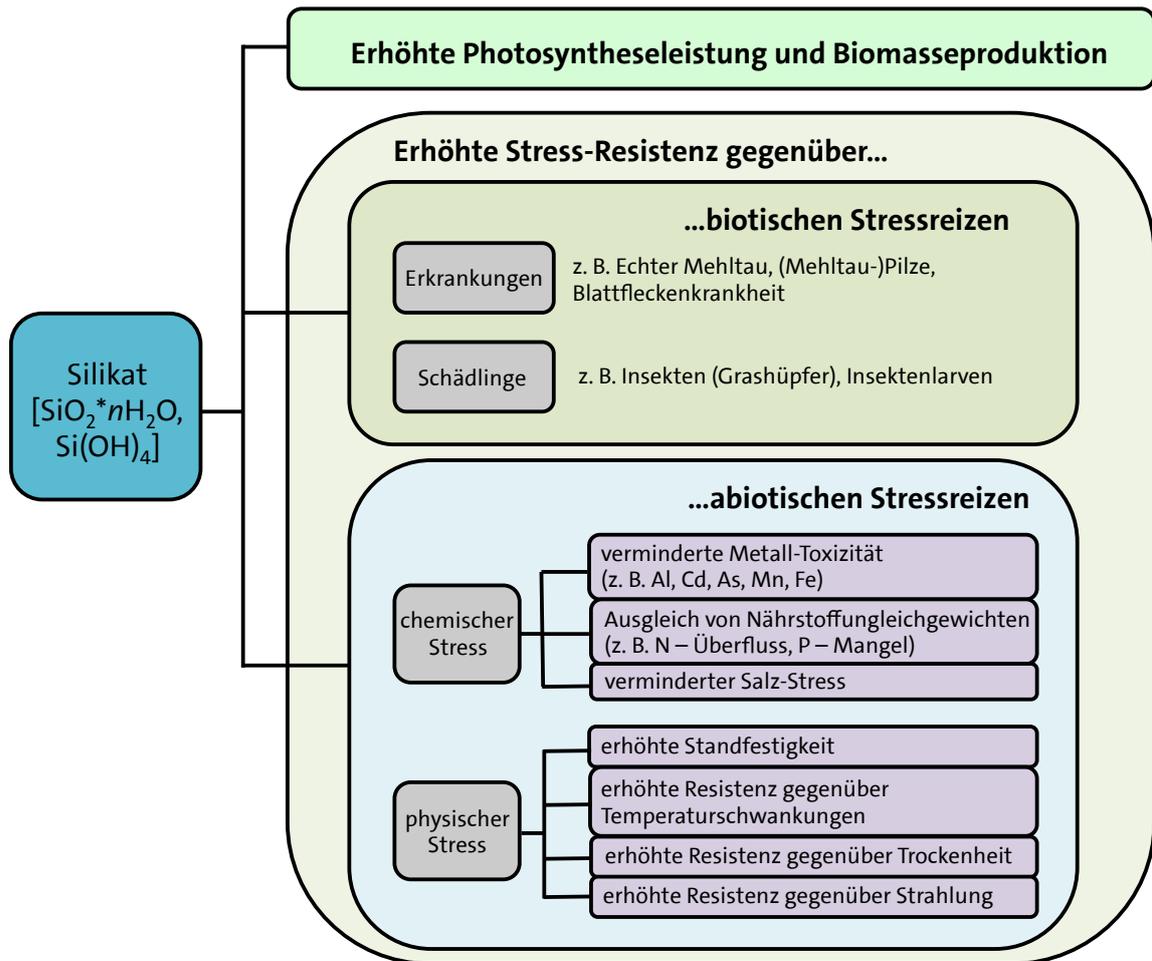


Abb. 1 Funktionen des Silikats, bearbeitet nach Ma und Takahashi (2002). Al: Aluminium, As: Arsen, Cd: Cadmium, Fe: Eisen, Mn: Mangan, N: Stickstoff, P: Phosphor, SiO₂*nH₂O: Opal, Silikatgel, Si(OH)₄: Kieselsäure.

Die Funktionen des Silikats für die Pflanze sind im Allgemeinen Schutzfunktionen gegenüber biotischen und abiotischen Stressreizen. Nur auf Funktionen, die mit biomechanischen Eigenschaften verknüpft sind, wird in dieser Arbeit eingegangen (für einen detaillierten Überblick über alle Funktionen siehe Ma und Takahashi 2002, Ma und Yamaji 2006, Ma 2004).

Die Einlagerung von Silikaten in oberirdische Pflanzenorgane erhöht die Festigkeit des Gewebes, stützt und erhöht die Standfestigkeit. Durch die Fähigkeit, die Blätter dem Licht zugewandt zu halten, erhöht sich die belichtete Blattfläche, Photosyntheseleistung und Biomasseproduktion steigen (Adatia und Besford 1986). Si-Akkumulatoren bilden mit ihren verkieselten Geweben eine mechanische Barriere gegenüber Pilzen, Bakterien und Insekten. Diese Schutzfunktion kann aktiv von der

Pflanze gesteuert werden und wird bei den genannten Angreifern als Abwehrstrategie gegenüber Fressfeinden interpretiert (Massey et al. 2006). Massey und Hartley (2006) weisen eine erhöhte Einlagerung von Silikaten nach, nachdem Wühlmäuse an Gräsern, wie *Lolium perenne* L. und *Festuca ovina* L., gefressen hatten. McNaughton et al. (1985) zeigen in Freilandstudien eine erhöhte Einlagerung von Silikaten, nachdem das zu untersuchende Gebiet beweidet wurde und formulieren die folgende Silikataufnahme als Wachstumspromoter.

1.3 Material

Zwölf ausgewählte Nahrungspflanzen von verschiedenen natürlichen Standorten sind in Tab. 1 zusammengefasst. Die Standorte dienen modellhaft als Lebensräume herbivorer Säugetiere. Hier sind die Konsumenten der Nahrungspflanzen dem jeweiligen eurasischen, asiatischen, afrikanischen bzw. nordamerikanischen Ökosystem zugeordnet. Die vollständige zoologische Nomenklatur in Tab. 1 wird in der angegebenen Literatur nicht oder nur teilweise verwendet und wird daher in dieser Arbeit nicht angegeben.

Tab. 1: Auswahl der Nahrungspflanzen, ihrer natürlichen Standorte und Konsumenten ([1] Owaga (1975), [2] Stewart & Stewart (1970), [3] Steuter et al. (1995), [4] Casebeer & Koss (1970), [5] Pereladova et al. (1999), [6] Xu et al. (2012), [7] Mouissie et al. (2004), [8] Petrak et al. (1991), [9] Schmidt et al. (2004), [10] Herrero et al. (2006), [11] Schley & Roper (2003), [12] Bugalho et al. (2001), [13] Stevens (1966), keine Angabe (k. A.))

Nr.	Nahrungspflanzen [Familie]	natürliche Standorte	Konsumenten
1	<i>Aegilops cylindrica</i> HORST [Poaceae]	k. A.	k. A.
2	<i>Festuca pratensis</i> HUDS. [Poaceae]	Europa: Deutschland, Norddeutschland	Reh [8] Damhirsch [8]
3	<i>Hordeum vulgare</i> L. [Poaceae]	Europa: Spanien	Wildschwein [10, 11]
4	<i>Lolium perenne</i> L. [Poaceae]	Europa: Deutschland, Norddeutschland	Reh [8] Damhirsch [8]
		Europa: Frankreich	Wildschwein [11]
		Europa: Niederlande	Damhirsch [7]
5	<i>Poa annua</i> L. [Poaceae]	Europa: Frankreich	Wildschwein [11]
		Europa: Niederlande	Damhirsch [7] Rothirsch [7]
6	<i>Phragmites australis</i> (CAV.) STEUD. [Poaceae]	Asien: China, Nordwest-China, Kalamaili Mountain Ungulates Nature Reserve	Asatischer Wildesel [6]
		Asien: Usbekistan, Kyzylkum Wüste, Bukhara Breeding Centre	Przewalski-Pferd [5]
		Europa: Polen; Niederlande; Spanien; Italien; Deutschland	Wildschwein [11]
7	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) PERS. [Poaceae]	Afrika: Kenia	Streifengnu [1, 2] Steppenzebra [1, 2] Grant-Gazelle [2] Zebu [2] Thomson-Gazelle [2]
8	<i>Panicum virgatum</i> L. [Poaceae]	Asien: Usbekistan, Kyzylkum Wüste, Bukhara Breeding Centre Amerika: USA: Nebraska, Niobrara Valley Preserve	Przewalski-Pferd [5] Bison [3]
9	<i>Themeda triandra</i> FORSSK. [Poaceae]	Afrika: Kenia	Streifengnu [1, 2, 4] Steppenzebra [1, 2, 4] Grant-Gazelle [2] Zebu [2, 4] Thomson-Gazelle [2] Kuhantilope [4]
10	<i>Erysimum diffusum</i> HEGETSCHW. [Brassicaceae]	k. A.	k. A.
11	<i>Trifolium repens</i> L. [Fabaceae]	Amerika: USA: Montana Europa: Frankreich Europa: Portugal	Wapitihirsch [13] Wildschwein [11] Rothirsch [12]
12	<i>Chenopodium album</i> L. [Amaranthaceae]	Asien: Usbekistan, Kyzylkum Wüste, Bukhara Breeding Centre Europa: Deutschland, Norddeutschland	Przewalski-Pferd [5] Wildschwein [9]

Die Auswahl der Nahrungspflanzen enthält 9 Vertreter der Poaceae (*Aegilops cylindrica* HORST, *Cynodon dactylon* (L.) PERS., *Festuca pratensis* HUDS., *Hordeum vulgare* L., *Lolium perenne* L., *Panicum virgatum* L., *Phragmites australis* (CAV.) STEUD., *Poa annua* L., *Themeda triandra* FORSSK.). Zusätzlich wurden drei Vertreter der Dikotyledoneae angezogen: *Erysimum diffusum* HEGETSCHW. (Brassicaceae), *Trifolium repens* L. (Fabaceae) und *Chenopodium album* L. (Amaranthaceae).

Saatgut für *P. australis* wurde von Jelitto Staudensamen (Schwarmstedt, Deutschland), für *T. triandra* von KPR-Gardeners Club (www.kpr.eu, letzter Zugriff: 08.09.2011) und für die weiteren Pflanzen vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK, OT Gatersleben, Stadt Seeland, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

1.4 Methoden

1.4.1 Aufbau der Anzucht

In den Sommermonaten 2011 wurde im Gewächshaus des Biozentrums Klein Flottbek und Botanischer Garten der Universität Hamburg die silikatkontrollierte Anzucht vorgenommen (Abb. 2 a-e).



Abb. 2 Aufbau der Anzucht **a)** Pikierkiste mit Kokosfasersubstrat und Bewässerungsmatte für die einzelnen Taxa jeder Population **b)** Wannentische für die Nullkontrolle und der silikatkontrollierten Populationen **c)** Keimlinge von *Aegilops cylindrica* der Population B mit 100 mg SiO₂/L nach ca. 1 Woche **d)** Aufnahme nach ca. 4 Wochen **e)** Aufnahme nach ca. 8 Wochen: *A. cylindrica* (links), *Hordeum vulgare* (mitte) und *Poa annua* (rechts) der Population B mit 100 mg SiO₂/L.

Drei Wannentische wurden für die Nullkontrolle, für Population A mit 10 mg SiO₂/L und Population B mit 100 mg SiO₂/L nach gründlicher Reinigung und Abdichtung mit zwei Lagen Bewässerungsmatten ausgelegt. Pro Tisch wurden 12 am Boden gelochte Pikierkisten mit den Maßen 50x32x6 cm positioniert, die eine Schicht von ca. 5 cm Kokosfasersubstrat (Baldur, Bensheim, Deutschland) enthielten (Abb. 2a). Auf diese Schicht wurde eine weitere Bewässerungsmatte gelegt, auf die das Saatgut aufgetragen wurde. Die Bewässerungsmatten wurden mit vollentsalztem Wasser (im Folgenden „VE-Wasser“) getränkt. Das Saatgut wurde ebenfalls mit VE-Wasser und mit Hilfe eines Zerstäubers vorsichtig genässt. Zwei Wochen lang kamen Verdunstungsschutzhauben über den Pikierkisten zum Einsatz (Abb. 2b). Als die Keimlinge eine Größe von 5 cm erreicht hatten und/oder die Wärmeentwicklung unter der Haube zu stark war, wurden diese entfernt (Abb. 2c).

1.4.2 Nährstoffzusammensetzung und Bewässerung

Nach 7 Tagen wurde die Anzucht zwei Mal wöchentlich mit 1-2 Litern kontrolliert bewässert. Jeder Tisch hatte einen Ablauf, sodass überschüssiges Wasser entweichen konnte und das Wurzelwerk vor Sauerstoffmangel durch stehendes Wasser geschützt war. Die Nährstoffzusammensetzung (Braune et al. 2012) wurde geringfügig geändert: Cobalt(II)nitrat Hexahydrat (Co(NO₃)₂*6H₂O) wurde durch Cobalt(II)chlorid Hexahydrat (CoCl₂*6H₂O) ersetzt.

Aus den aufgelisteten Chemikalien (Braune et al. 2012) wurde 1 L einer Stammlösung hergestellt. Zur Arbeitslösung (1/10 der Stammlösung) wurde vor der Bewässerung Eisen, in Form von EDTA-Eisen(III)Natriumsalz-Hydrat (36,7 mg/L), und Silikat, in Form von Natronwasserglas SiO₂:Na₂O₃ (3,7 g für Population A, entsprechen 10 mg SiO₂ oder 37 g für Population B, entsprechen 100 mg SiO₂), zugeführt. Weiter wurde ein *Bacillus thuringiensis israelensis* – Präparat (1 mL/L, Neudomück, W. Neudorff GmbH KG, Emmerthal, Deutschland) gegen Mückenlarvenbefall zur Lösung hinzugefügt. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure und Natronlauge auf 5,8-6,0 eingestellt.

1.4.3 Erntezeitpunkt

Nach 83 Tagen wurden die Pflanzen geerntet. Entscheidend für den Zeitpunkt waren die bereits vertrockneten Spitzen der Gräser, die darauf deuteten, dass die vegetative Vermehrung abgeschlossen war. Da viele Gräser mehrjährig ausdauernd sind, war im Gegensatz zu den dikotylen Pflanzen keine Blüte zu erwarten. Die dikotylen Vertreter standen beim Erntezeitpunkt in der Blüte.

1.4.4 Biomassebestimmung

Die Biomasse wird durch die Bestimmung von Trockengewichten charakterisiert.

$$\text{Biomasse [\%]} = \frac{\text{Trockengewicht} * 100}{\text{Frischgewicht}}$$

Nach Bestimmung der Frischgewichte (n=10 pro Art der Population) von oberirdischen Pflanzenteilen wurden die Proben über Nacht bei 103 °C im Trockenschrank (bis zur Gewichtskonstanz) nach der amtlichen Methode der Feuchtigkeitsbestimmung (Naumann und Bassler 1997) getrocknet.

1.4.5 Bestimmung des SiO₂-Gehaltes

Die Bestimmung des SiO₂-Gehaltes ist eine indirekte Messung, bei der die säureunlösliche mineralische Asche als SiO₂-Gehalt angenommen wird (Van Soest 1963, 1973, Goering und Van Soest 1972, zit. in Naumann und Bassler 1993). Zunächst erfolgt die Bestimmung der Säure-Detergenzien Faser (Acid Detergent Fiber = ADF), die als Maß für den Gehalt an Zellwandgerüstsubstanzen, wie Cellulose und Lignin, angenommen wird. In einem Detergenzien-Bad aus Schwefelsäure und N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromid wird die Probe nach ihren Säure-Detergenzien-Fasern bestimmt. Der unlösliche Rückstand wird in einem mit Quarzsand gefüllten Filtertiegel abgetrennt, gewaschen, getrocknet und gewogen. Für die Bestimmung der Silikate wird abschließend der Filtertiegel mit Inhalt 1 h bei 500 °C verascht und die Glührückstände erneut nach Abkühlen gewogen. Der Wert wird als Silikatgehalt

gedeutet (Van Soest 1963, 1973, Goering und Van Soest 1972, zit. in Naumann und Bassler 1993).

1.4.6 Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden zwei Statistikprogramme kombiniert verwendet. Mit „Jmp“ (Version 10.0.2, SAS Institute Inc., 2012) wurde eine deskriptive Statistik zu den Parametern Biomasseproduktion, Wuchshöhe und SiO₂-Gehalt mit Mittelwerten und Standardabweichungen erstellt. Das Statistikprogramm „R“ (Version 2.13.2, Development Core Team, 2011) diente zum Auffinden von signifikanten Unterschieden zwischen den drei verschiedenen Populationen Nullkontrolle, Population A mit 10 mg SiO₂/L und Population B mit 100 mg SiO₂/L (Signifikanzniveaus: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)). Es wurden folgende R-Pakete verwendet: doBy (Version 4.2.3, Højsgaard et al. 2010), R.utils (Version 1.6.2, Bengtsson 2010), RSvgDevice (Version 0.6.4.1, Luciani 2009), und xlsReadWrite (Version 1.5.4, Suter 2010). Es wurden Funktionen von Wilcox (2005) aus dem Paket WRS verwendet (Wilcox und Schönbrodt 2010). Da die Daten nicht normalverteilt sind, wurden folgende heteroscedastische Tests ohne Trimmung durchgeführt: Welch-Yuen Omnibus – Test (Wilcox 2003, 2005) und ein paarweiser Vergleichstest analog zu Dunnett's T3 test (Dunnett 1980). Sämtliche Kennwerte zu den Tests sind im Anhang dargestellt (Tab. 2, 3).

1.5 Ergebnisse

1.5.1 Biomasse

Die Biomasseproduktion der Anzucht ist im ersten Teil der Abb. 3 dargestellt. Die Taxa in Abb. 3 werden entsprechend ihrer phylogenetischen Zugehörigkeit angeordnet: die BEP-Clade enthält die 5 Poaceae *Aegilops cylindrica*, *Festuca pratensis*, *Hordeum vulgare*, *Lolium perenne* und *Poa annua*. Da diese 5 Taxa zur Unterfamilie Pooideae gehören, werden sie zusätzlich alphabetisch sortiert. Die Arten *Phragmites australis*, *Cynodon dactylon*, *Panicum virgatum* und *Themeda triandra* gehören zum PACCAD-Clade und werden entsprechend ihrer jeweiligen Unterfamilie angeordnet (Grass Phylogeny Working Group 2001). Die Vertreter der Dikotyledoneae *Erysimum diffusum* und *Trifolium repens* stehen sich phylogenetisch näher als *Chenopodium album* aus der Familie der Amaranthaceae und werden entsprechend gruppiert angeordnet (Angiosperm Phylogeny Group 2003).

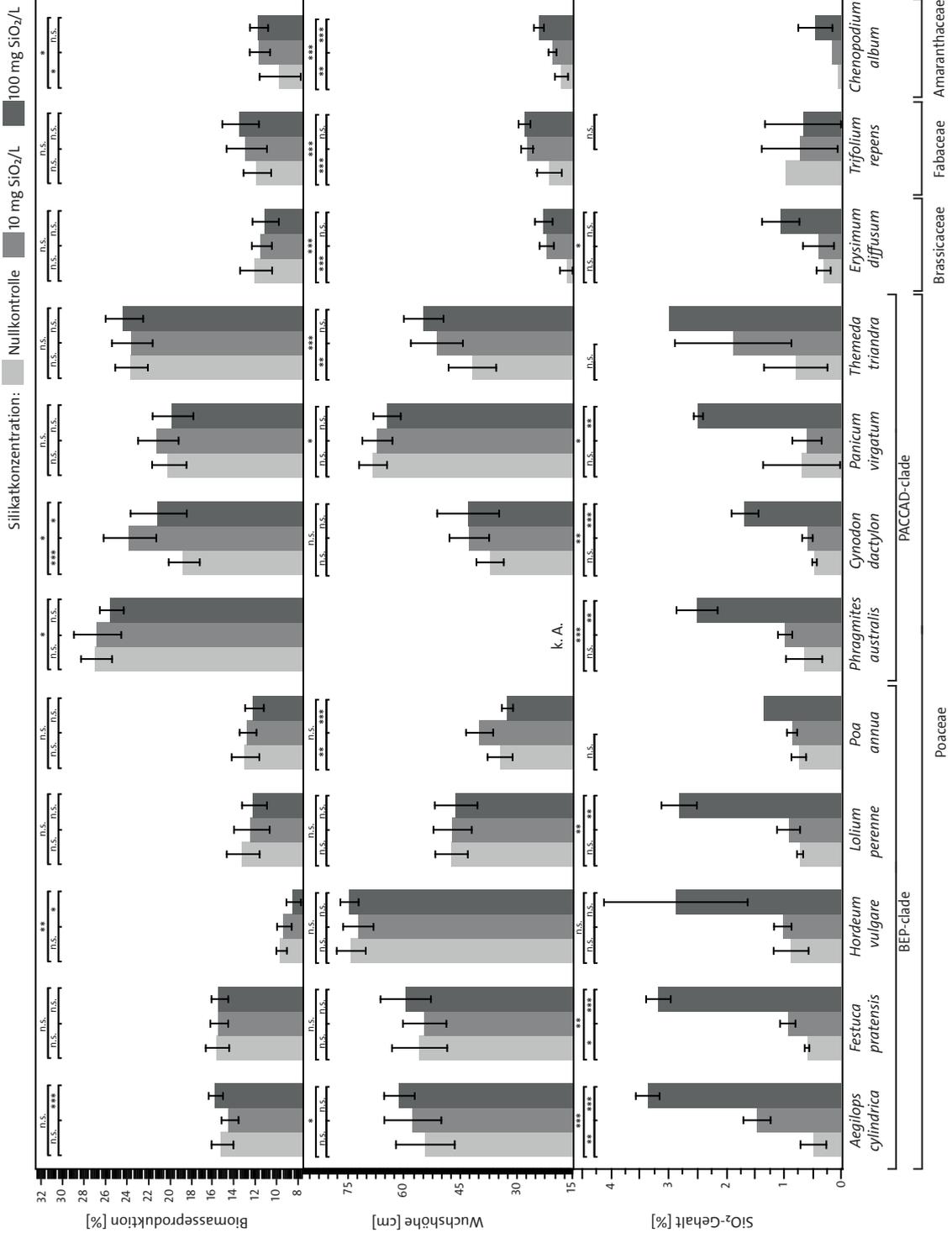


Abb. 3 Biomasseproduktion, Wuchshöhe und Siilikonzentration der Nullkontrolle, Population A (10 mg SiO₂/L) und Population B (100 mg SiO₂/L). Statistische Signifikanzniveaus: p ≤ 0,05 (*), p ≤ 0,01 (**), p ≤ 0,001 (***), n.s.: nicht signifikant, k. A.: keine Angabe.

Die Arten des BEP-Clades produzieren deutlich weniger Biomasse als Arten des PACCAD-Clades. Die Mittelwerte der Biomasseproduktion (n=9-10) der BEP-Clade reichen von minimal $9,2 \pm 0,5$ % bei *H. vulgare*_B bis maximal $13,6 \pm 0,4$ % bei *A. cylindrica*_B. Während *F. pratensis*, *L. perenne* und *P. annua* keine signifikanten Unterschiede zwischen Populationen A und B zeigen, korreliert bei *A. cylindrica* die Biomasse positiv mit der Silikatzufuhr, während sie bei *H. vulgare* negativ korreliert. Der PACCAD-Clade der Poaceae zeigt insgesamt eine deutlich höhere Biomasseproduktionen von minimal $19,3 \pm 1,4$ % (n=9-10) bei *C. dactylon*₀ bis maximal $27,3 \pm 2,8$ % bei *P. australis*_A. Bei *P. australis* und *C. dactylon* gibt es einen signifikanten Rückgang der Biomasse wenn mehr Silikat zugeführt wurde. Die Biomasseveränderung von *C. dactylon*₀ > *C. dactylon*_A < *C. dactylon*_B zeigt an, dass es sich bei *C. dactylon*_A möglicherweise um ein Optimum in der Silikatzufuhr handelt. Während *E. diffusum* und *T. repens* keine Unterschiede in der Biomasseproduktion zeigen, erhöht sich signifikant die Biomasse bei *C. album* bei Zugabe von Silikat.

1.5.2 Wuchshöhe

Die Wuchshöhe wird an maximal 10 einzelnen Individuen der jeweiligen Art der Population gemessen und grafisch in Abb. 3 dargestellt. Die Wuchshöhe von *P. australis* kann nicht bestimmt werden, da einzelne Individuen aufgrund des Rhizomwachstums nicht bestimmt werden können.

Bei den Gräsern *A. cylindrica*, *P. annua*, *P. virgatum* und *T. triandra* gibt es signifikante Reaktionen auf die erhöhte Silikatzufuhr. *A. cylindrica* und *T. triandra* reagieren mit Wuchshöhenzunahme, je mehr Silikat zur Verfügung steht. Beispielsweise wies *T. triandra*₀ eine Höhe von $45,2 \pm 5$ cm (n=10) auf, während *T. triandra*_B $55,8 \pm 5$ cm (n=10) erreichte.

P. annua und *P. virgatum* reagieren negativ auf die stark erhöhte Silikatzufuhr: Individuen von *P. annua* wachsen in Population A 5,5 cm höher als in Population B.

Die drei Vertreter der Dikotyledoneae korrelieren in ihrer Wuchshöhe signifikant positiv zur Silikatzufuhr. *E. diffusum*₀ zeigt eine Höhe von $14,1 \pm 1,2$ cm (n=10) und erreicht bei *E. diffusum*_A $18,1 \pm 1,4$ cm (n=10). Während die Zunahme bei *C. album* von

der Nullkontrolle zur Population B ebenfalls nur 4 cm beträgt, erreicht *T. repens* eine Wuchshöhenzunahme von 10 cm.

1.5.3 SiO₂-Gehalt

Die schrittweise Wässerung der Pflanzen mit Silikat führt in jedem Fall zu einer Aufnahme des Silikats in den Pflanzen, was durch Silikat-Bestimmungen signifikant bestätigt werden kann (Abb. 3). Die SiO₂-Gehalte in der Biomasse korrelieren in den Poaceen bei 6 von 9 Gräsern signifikant positiv zur verstärkten Silikatzufuhr in der Nährlösung. *A. cylindrica*_B erreicht den höchsten SiO₂-Gehalt mit 3,4±0,2 % (n=3) und lagert mehr als doppelt so viel Silikat ein wie *A. cylindrica*_A (1,5±0,2 %, n=3).

Innerhalb der Dikotyledoneae kann lediglich bei *E. diffusum* eine signifikant erhöhte Silikatmenge in Population B gemessen werden.

Da die Silikatbestimmung sehr viel getrocknetes Pflanzenmaterial erfordert, können nur maximal 3-4 SiO₂-Bestimmungen durchgeführt werden. Bei *T. repens*, *C. album*, *T. triandra* und *P. annua* erfolgt eine statistische Auswertung nur teilweise oder gar nicht, da nur 1-2 Bestimmungen durchgeführt wurden.

1.6 Diskussion

1.6.1 Diskussion

Die erfassten Biomassen und Wuchshöhen von den Nahrungspflanzen der Anzucht sind nahezu unbeeinträchtigt von Silikatzugaben in der Nährlösung. Nur 7 von 12 untersuchten Pflanzen lagern nachweislich das zugeführte Silikat ein.

Gänzlich neu in der vorliegenden Arbeit ist die Erhebung der Wuchshöhe, die die Biomasse charakterisiert. Da einige Poaceen der Anzucht mit minimal erhöhtem Längenwachstum auf die Silikatzufuhr reagieren, können in der Biomasse keine Gewichtsveränderungen, was z. B. auf eine erhöhte Bestockung weisen könnte, festgestellt werden. Die eingangs aufgestellte Hypothese, dass die Biomasse mit der Silikatzufuhr positiv korreliert, kann nicht bestätigt werden.

Nur bei *Cynodon dactylon* gibt es eine positive Korrelation der Biomasseproduktion mit dem zugeführten Silikatgehalt. In einigen wenigen Studien (Adatia und Besford 1986, Ma et al. 1989, Schaller et al. 2012) wird die Biomasse in Abhängigkeit zur Silikatzufuhr untersucht und zeigt, dass die Biomasseproduktion signifikant durch die Silikatzugabe angeregt wird. Das in dieser Arbeit vorliegende Ergebnis kann die Studien nicht bzw. nur zum Teil bestätigen.

Wießmann (1925) studierte den „Einfluss von Kieselsäure auf den morphologischen und anatomischen Bau von Roggenhalmen bei unzureichender Phosphorsäureernährung“. Eine klassische Biomassebestimmung wird nicht durchgeführt. Halmgewicht, Korngewicht je Ähre und Bestockung korreliert positiv mit der Silikatzufuhr und unterstützt die Studien der o. g. Autoren. Die in dieser Arbeit festgestellte Unveränderlichkeit der Biomasse mit dem weiteren Charakteristikum der Wuchshöhe deckt sich nicht mit den Befunden von Wießmann (1925).

Schaller et al. (2012) untersuchen die Biomassesproduktion von *Phragmites australis*. Bei den Pflanzen kommt Silikat als Aerosol, welches auf die Blätter der Pflanzen gesprüht wird, zum Einsatz. Veränderungen der Biomasse bei der Nullkontrolle und der Pflanzen, die moderate 10 g Silikat erhalten, können nicht beobachtet werden,

obwohl der Silikatgehalt positiv zur Silikatzugabe korreliert. Einen Biomasse-Rückgang wird bei Pflanzen, die 100 g Silikat bekamen, festgestellt. Das Ergebnis wird als Silikatstress interpretiert und deutet auf ein Optimum bei der moderaten Silikatzugabe von 10 g Silikat. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse der Biomasse von *C. dactylon* entsprechen denen von Schaller et al. (2012). *C. dactylon* weist ebenfalls einen signifikanten Anstieg und Rückgang der Biomasse verteilt über die Stufen Nullkontrolle, 10 und 100 mg SiO₂/L auf. Weiterhin untersuchen Schaller et al. (2012) die Phytolith-Einlagerungen und den Silikatgehalt, die jeweils positiv zur Silikatzugabe korrelieren: Pflanzen, die 10 g Silikat erhalten, zeigen 0,56 (0,32-0,94) mmol Si/g Trockenmasse (n=12), während Pflanzen der 100 g Silikat-Einheit mit 1,76 (1,20-3,54) mmol Si/g Trockenmasse (n=12) bestimmt wurden. Diese Silikatgehalte sind nicht mit den Werten der vorliegenden Arbeit vergleichbar, da Darreichungsform und Einheiten unterschiedlich sind, bestätigen aber die große Spannweite der gemessenen Gehalte.

In der vorliegenden Arbeit kann bei den Vertretern der Dikotyledoneae keine Silikataufnahme nachgewiesen werden. Die Nachweismethode stützt sich auf Ascherückstände, die als Ausschlussmethode nur noch silikathaltige Verbindungen vermuten lässt. Da die Ausbildung von Phytolithen bei diesen Pflanzen unbekannt ist, liegt der Schluss nahe, dass sich nur Kieselsäure in den Transpirationsströmen befindet, die durch Ascherückstände nicht zu identifizieren sind. Eine Reaktion auf die Silikatzugabe zeigt bei allen drei Vertretern einen signifikanten Anstieg der Wuchshöhe, der mit dem Silikatgehalt positiv korreliert. Die gleichzeitige Biomassezunahme kann nur bei *Chenopodium album* festgestellt werden.

Ma et al. (1989) vergleichen in einer Studie die Aufnahme von Silikat bei *Oryza sativa* L. während der vegetativen, reproduktiven und reifenden Entwicklungsphase. In der reproduktiven Phase nehmen die Blätter die siebenfache Menge an Silikat auf als in der vegetativen Phase. Die Biomasse erhöht sich ebenfalls am stärksten in dieser Entwicklungsphase. In der vegetativen Phase wird nur ein geringer Effekt durch Silikatzuführung beobachtet und die erreichte Wuchshöhe bleibt in folgenden

Entwicklungsphasen unverändert, unabhängig, ob Silikat zugefügt oder vernachlässigt wird.

Obwohl die Gräser *Hordeum vulgare*, *Poa annua* und *Phragmites australis* einjährig ausdauernde Pflanzen sind und die beiden erst genannten Arten die Reifephase erreicht hatten, kann dennoch keine signifikant erhöhte Biomasseproduktion bei stufenweise erhöhter Silikatzufuhr festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den publizierten Ergebnissen von Ma et al. (1989).

1.6.2 Kontamination

Die Methode der SiO_2 -Gehaltsbestimmung kann bei genauerer Untersuchung Aufschluss über die mit Silikaten kontaminierte Nullkontrolle geben: Nach dem Bestimmen der Säure-Detergenzien-Fasern wird die Probe in einem mit Quarzsand gefüllten Filtertiegel verascht. Hier kann die Verunreinigung der Probe durch Quarzsand zu einer Kontamination der Nullkontrolle geführt haben.

Der letzte Schritt in der Bestimmung des SiO_2 -Gehaltes (Kapitel 1.4.5), die Veraschung bei $500\text{ }^\circ\text{C}$ für 1 h, soll die verbliebenen organischen Bestandteile der Probe eliminieren. Die Ascherückstände werden als Silikate interpretiert, jedoch nicht analysiert (Van Soest 1963, 1973, Goering und Van Soest 1972, zit. in Naumann und Bassler 1993). Alle säureunlöslichen mineralischen Bestandteile werden unter dem Silikatgehalt erfasst, was dazu führt, dass die Bestimmung des SiO_2 -Gehaltes mit einem großen Maß an Ungenauigkeit verbunden ist.

Eine Veraschung, verwendet als Teil einer Silikatbestimmung, ist umstritten, da die biogenen Pflanzensilikate in verschiedenen Derivaten des SiO_2 vorkommen (Jones und Milne 1963). In der Folge werden die Rückstände mit den Phytolithen durch die Hitzeeinwirkung beeinflusst und erfahren Veränderungen ihrer physikalischen Eigenschaften. Eine Gewichtsveränderung durch Schmelzen und Schrumpfen der Phytolithe ist nicht ausgeschlossen und führt dazu, dass die Ergebnisse der Population A und B nur als Richtwerte interpretiert werden können. Des Weiteren gilt es festzuhalten, dass in der SiO_2 -Gehaltsbestimmung maximal 4 Werte

bestimmt werden konnten. Unter diesen Rahmenbedingungen müssen die ermittelten SiO₂-Gehalte der Anzucht unter Vorbehalt betrachtet werden.

1.6.3 Schlussfolgerung

In der durchgeführten silikatkontrollierten Anzucht wird der Silikatgehalt, die Biomasse und die Wuchshöhe bestimmt und auf Korrelationen getestet. Bei 8 Poaceen und drei Vertretern der Dikotyledoneae kann kein Zusammenhang zwischen den Parametern ermittelt werden. Lediglich der Silikatgehalt korreliert bei einigen Pflanzen positiv mit der Silikatzufuhr. Bei nur einer Pflanze, *C. dactylon*, kann ein Biomasse-Anstieg bei der Silikatkonzentration von 10 mg SiO₂/L beobachtet werden, der in der 100 mg SiO₂/L – Anzucht wieder abnimmt. Dies erlaubt die Vermutung, dass eine optimale Silikatversorgung bei 10 mg SiO₂/L gewährleistet ist. Die Erfassung der Wuchshöhe dient als Nachweis einer Reaktion auf die Silikatzufuhr bei den Dikotyledonen, deren Wuchshöhe signifikant mit dem im Substrat enthaltenen Silikat korrelieren.

Die in der Literatur getestete Hypothese, dass die Biomasse durch eine erhöhte Silikatzufuhr angeregt werden sollte, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Biomasse der Nahrungspflanzen entwickelt sich unabhängig zur pflanzenverfügbaren Silikatkonzentration im Substrat. Dieses Anzuchtexperiment stellt lediglich ein Modell zur Simulation eines Habitats für Konsumenten dar und lässt viele Parameter eines natürlichen Habitats offen, wie z. B. den von McNaughton et al. (1985) formulierten Wachstumspromoter für Pflanzen, die regelmäßige Beweidung erfahren.

2. Kapitel 2 – Extraktionsmethoden für Phytolithe: Vergleich von Veraschung und Wasser-Siede-Aufschluss mit Bestimmung der Härte durch Nanoindentation

2.1 Einleitung

Phytolithe können sich im Sym- und Apoplasten in Form von Verkieselungen bilden. Im Blattgewebe der Poaceae verkieseln primär epidermale Kurzzellen (u. a. Piperno 2006, Runge 2000).

Die Extraktion bzw. Isolierung von Phytolithen aus ihrer starren pflanzlichen Matrix wird prinzipiell mit zwei Methoden durchgeführt: „Veraschung“ und „feuchte Oxidation“ (Bowdery 1989, Piperno 2006, Runge 2000, Jones und Milne 1963). Während die erste Methode mit sehr hohen Temperaturen im Bereich von 500 °C arbeitet, wird die zu extrahierende Probe in der zweiten Methode in einem ca. 5 stündigem Säurebad angesetzt.

Um die Struktur, die chemische Zusammensetzung und den qualitativen Charakter von Phytolithen im Detail zu verstehen, werden ausschließlich morphologisch intakte bzw. native Phytolithe für die Untersuchungen benötigt. Aus diesem Grund müssen Phytolithe in ihrer ursprünglichen oder äquivalenten Lösung bleiben um ihre molekulare Struktur zu schützen. Da Phytolithe aus einer amorphen opalartigen Struktur bestehen ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) und einen unbestimmten Anteil von molekularem Wasser enthalten (Piperno 2006, Runge 2000), muss eine Dehydrierung unter trockenen Bedingungen verhindert werden. Daher sind beide oben beschriebenen Methoden für Untersuchungen nativer Phytolithe nicht oder nur bedingt geeignet.

Im Folgenden wird ein Wasser-Siede-Aufschluss entwickelt, der ohne Mineralsäuren oder hohen Temperaturen durchgeführt werden kann und die pflanzliche Matrix in ihrer Starrheit auflöst (Braune et al. 2012). Phytolithe werden in Lösung gehalten, so dass die molekulare Struktur vor Austrocknung geschützt ist. Um den Aufschluss auf Zuverlässigkeit zu testen, wird er an allen Poaceen der Anzucht (Kapitel 1.3) aus der Population B getestet.

Nach der Extraktion mittels des Wasser-Siede-Aufschlusses und einer Veraschung nach Piperno (2006) wird die Härte der Phytolithe von *Phragmites australis* durch Nanoindentation ermittelt und verglichen. Anhand dieses Vergleichs soll die Wahl der Extraktionsmethode kritisch betrachtet werden.

2.2 Stand der Forschung

Phytolithe aus ihrem organischen pflanzlichen Gewebe zu isolieren, erfolgt traditionell nach zwei Methoden: „feuchte Oxidation“ oder „Veraschung“ (Bowdery 1989).

In der feuchten Oxidation kommen konzentrierte Mineralsäuren, meist in Kombination, zum Einsatz. Durch den Einsatz der feuchten Oxidation zur Phytolith-Extraktion soll das umgebende Gewebe mazeriert bzw. verdaut werden. Bowdery (1989) gibt eine Übersicht der gängigen Oxidationsmittel und deren Kombinationen für die feuchte Oxidation. Sehr bekannt ist z. B. die „Schulze Lösung“, bestehend aus konzentrierter Salpetersäure, Kaliumchlorat und Natriumchlorat, die in einem Wasserbad bei 95 °C für 2-4 h die organische Substanz verdauen soll. Ist die Reaktion unvollständig und die Phytolithe nicht von ihrem pflanzlichen Gewebe befreit, kann mit konzentrierter Schwefelsäure und konzentrierter Salpetersäure nachgeholfen werden (Runge 2000). Nach diesem Schritt wird die Probe in 10%iger Salzsäure gewaschen um potentiell vorhandene Calcium-Verbindungen zu lösen.

Oft ist die feuchte Oxidation nicht ausreichend, um Phytolithe vollständig zu extrahieren und eine zusätzliche Veraschung findet im Anschluss statt. Bei der Veraschung pflanzlicher Proben werden diese in Porzellantiegeln in einem Muffelofen auf maximal 500 °C erhitzt und 1-2 h verascht (Piperno 2006).

Die Veraschung ist jedoch eine umstrittene Methode, da die Temperatur eine Veränderung der opalhaltigen Phytolithe im Bereich der Morphologie und der chemischen Zusammensetzung bewirken kann (Piperno 2006, Pironon 2001, Runge 2000, Jones und Milne 1963, Wu et al. 2012).

Pironon et al. (2001) untersucht die Opalstruktur von Phytolithen und dokumentiert eine veränderte Oberfläche, die nach einer Veraschung von 400 °C durch die Diffusion von molekularem Wasser von der Oberfläche des Phytolithen auftritt.

Runge (2000) dokumentiert vielfältig die Veränderungen der Phytolithe ab 500 °C. Schwach verkieselte Gewebe wie Haarspitzen epidermaler Schichten schmelzen bei 600 °C bereits zu einem Tropfen und verlieren folglich charakteristische Merkmale, während stark verkieselte Gewebe kompakte Körper mit glatter Oberfläche bilden.

Runge (2000) beschreibt weiter einen veränderten Brechungsindex nach der Veraschung, mit dem sich Vorstufen des Siliziumdioxids identifizieren lassen: Tridymit und Cristobalit. Diese bereits sehr frühe chemische Umwandlung von Opal zu Derivaten des Siliziumdioxids wird noch gefördert durch die Präsenz von Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumionen, die der Phytolith als ehemalige pflanzliche Zelle enthält (Runge 2000).

Während die feuchte Oxidation geeignete Laborbedingungen und ein ausreichendes Budget für die Beschaffung von Chemikalien voraussetzt, ist die Alternative der Veraschung nicht zuverlässig genug, um qualitative Eigenschaften von Phytolithen exakt zu bestimmen. Um den Einfluss auf die Materialeigenschaften in der Extraktion zu umgehen, wird im Folgenden eine neue native Extraktionsmethode, der Wasser-Siede-Aufschluss (Braune et al. 2012), entwickelt.

2.3 Material

Neun Gräser (*Aegilops cylindrica*, *Cynodon dactylon*, *Festuca pratensis*, *Hordeum vulgare*, *Lolium perenne*, *Panicum virgatum*, *Phragmites australis*, *Poa annua* und *Themeda triandra*) wurden unter Gewächshausbedingungen (Kapitel 1.3-1.4.3) angezogen. Nach dem Ernten wurden die Pflanzen aus der Population B mit 100 mg SiO₂/L verpackt und bei -20 °C gelagert.

2.4 Methoden

2.4.1 Veraschung

Vegetatives Material von *Phragmites australis* aus der Population B, ca. 1 g, wurde in Aluminiumfolie, anstelle des Porzellantiegels, verpackt und für 100 min in einem Muffelofen bei 500 °C nach Piperno (2006) verascht. Anschließend wurde der Rückstand mit 10%iger Salzsäure und anschließend mit VE-Wasser gewaschen. Zum Schutz vor Mikroorganismenbefall wurde Natriumazid NaN_3 in einer 0,2%igen Endkonzentration hinzugefügt und diese gekühlt aufbewahrt. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Qualität der Isolate mittels eines Frischpräparates geprüft.

2.4.2 Wasser-Siede-Aufschluss

Bei -20 °C gelagertes Pflanzenmaterial von 9 Gräsern, jeweils ca. 5-8 g, wurde mit einem Schwingmesser zerkleinert und jeweils in ein 250-mL-Becherglas gegeben. Mit VE-Wasser wurde auf 100 mL aufgefüllt. Um den Siedeverzug im kommenden Schritt zu verringern, wurden Petrischalen auf die Bechergläser gesetzt. In einem gewöhnlichen Mikrowellengerät wurden die Proben 4,5 h bei 900 W gekocht. In einem 30-min-Intervall wurde der Kochvorgang kontrolliert und bei Bedarf mit VE-Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Mit einer Messermühle (Grindomix GM200, Retsch, Haan, Deutschland) wurden die Proben nach kurzem Abkühlen zwei mal 5 s bei 10.000 U homogenisiert. Anschließend wurden die Proben zurückgeführt, dass 100-mL-Volumen mit VE-Wasser wieder aufgefüllt und weitere 1,5 h in der Mikrowelle gekocht. Wiederholt wurde der Aufschluss in 30-min-Intervallen kontrolliert. Über ein Planktonsieb mit einer Maschengröße von 80 μm wurden die Proben gefiltert und die wässrige Phase mit den sich gelösten Phytolithen in verschließbare 50-mL-Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Um die Probenmenge zu verdichten, wurden die Zentrifugenröhrchen 5 min bei 2.000 U zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der konzentrierte Rückstand wurde in 2-mL-Reaktionsgefäße überführt. Zum Schutz vor Mikroorganismenbefall wurde Natriumazid NaN_3 in einer 0,2%igen

Endkonzentration zu den Proben gegeben und diese bei -20 °C gelagert. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Extraktion direkt als ungefärbtes Frischpräparat dokumentiert.

2.4.3 Einbettung der Phytolithe von *Phragmites australis*

Die extrahierte Probe von *P. australis* wurde 5 min bei 13.000 U zentrifugiert und der Überstand verworfen um den Wassergehalt zu reduzieren. Epoxidharz wurde im Verhältnis 1:2 mit den Chemikalien „Technovit EPOX Hardener regular“ zu „Technovit EPOX Resin“ (Technovit EPOX, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) angesetzt und bis zur Homogenität vermengt. In leere 2-mL-Reaktionsgefäße wurde ca. 1 mL Harz vorgelegt und eine Spatelspitze der konzentrierten Probe mit Phytolithen beigemengt. Vorsichtig und langsam, um Blasenbildung zu vermeiden, wurde mit Hilfe einer Pipette das Gemisch hergestellt. Zwei ca. 50- μ L-große Tropfen wurden auf leicht angeschliffene Objektträger gegeben und mit Kunststoff-PP-Folie abgedeckt. Das Epoxidharz härtete ca. 24 h aus.

2.4.4 Anschleifen der Phytolithe

Nach dem Entfernen der PP-Folie wurden unter dem Lichtmikroskop einzelne Phytolithe identifiziert, die einen klaren ganzheitlichen Umriss zeigten und sich somit in optimaler Lage auf den Grund des Objektträgers befanden. Markierungen wurden mit einem Diamantstift und Tusche auf den Objektträgern in der Nähe der ausgewählten Phytolithe gesetzt (Abb. 4a). Mit Siliziumkarbid-Nassschleifpapier verschiedener Körnung (1200, 2000, 3000 und 5000, Starcke, Melle, Deutschland) wurde das Epoxidharz auf den Objektträgern abgeschliffen (Abb. 4b). Zwischendurch wurde stets im Mikroskop überprüft, wie viel Epoxidharz abgetragen worden war. Wenn der Phytolith an die Oberfläche kam, wurde auf ihm vorsichtig eine Schlieffläche erzeugt, die im Abschluss mit Diamantfolie mit einer 1- μ m-Körnung (661X Diamond Lapping Filmscheiben, 3M, Saint Paul, USA) poliert wurde (Abb. 4 d-e). Wasser diente als Schleifmittel.

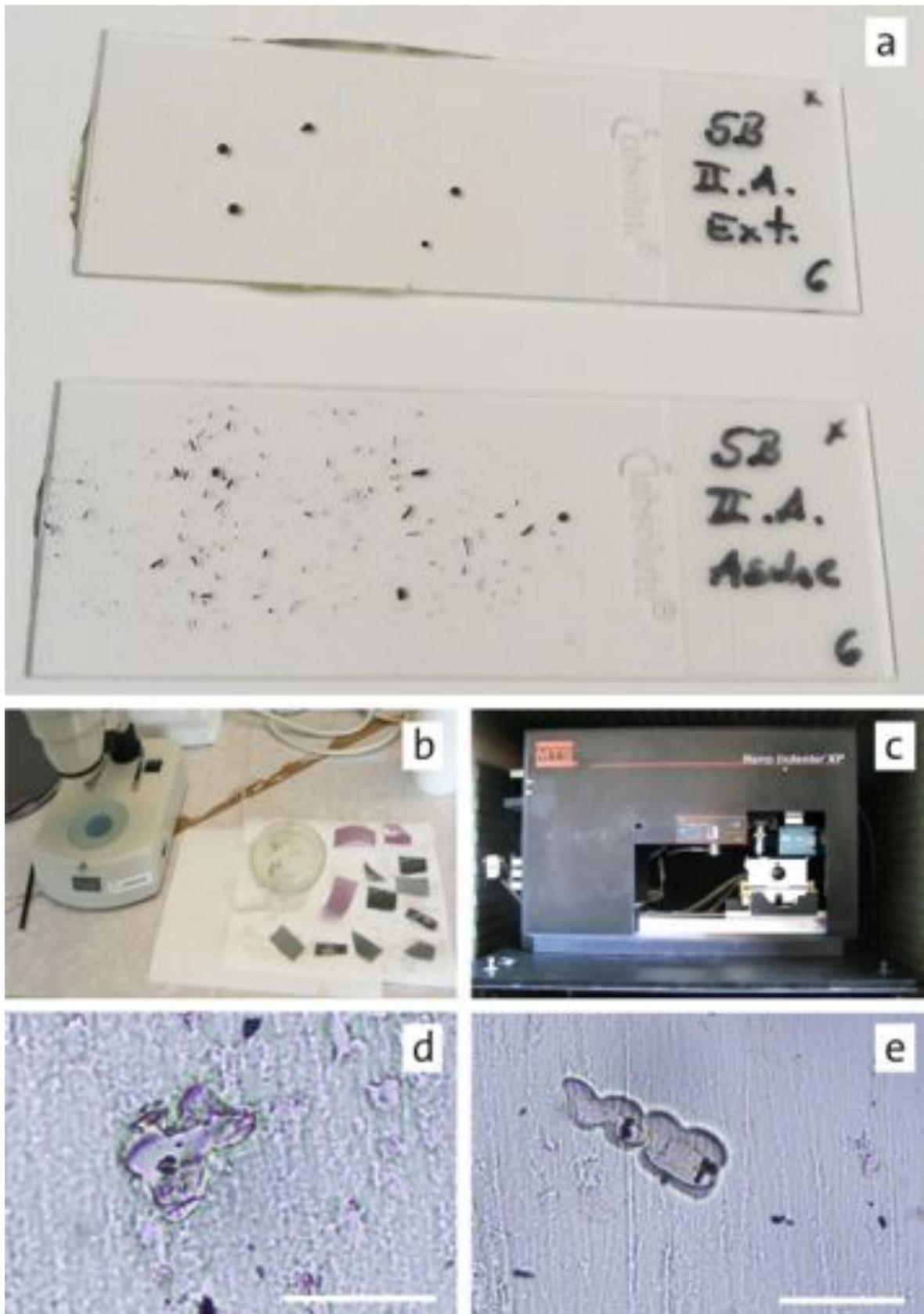


Abb. 4 a) Proben von *Phragmites australis*: Objektträger mit Epoxidharz und eingebetteten Phytolithen aus dem Wasser-Siede-Aufschluss (oben) und Objektträger mit Epoxidharz und eingebetteten Phytolithen aus der Veraschung (unten) **b)** Arbeitsplatz mit verschiedenen Schleifmaterialien **c)** Prüfgerät mit Diamant-Berkovich-Indenter **d),e)** Phytolithe mit Anschliffflächen von *P. australis*, die aus einer Veraschung isoliert wurden, Maßstab: 20 μm .

2.4.5 Nanoindentation

Die Nanoindentation wurde nach der DIN EN ISO 14577 an der Bundesanstalt für Materialforschung und –Prüfung (Berlin, Deutschland) unter der Leitung von Dr. M. Griepentrog und P. Reinstädt durchgeführt. Als Prüfgerät diente ein Nanoindenter XP (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) (Abb. 4c). Der Berkovich-Diamant-Indenter, im Folgenden „Indenter“, wurde auf die angeschliffene Oberfläche des Phytolithen gesetzt und führte einen Eindruck, im Folgenden „Indent“, durch. Dieser reichte über einen Eindringbereich von 600 nm. Einen Ausschnitt der Indentationskurve findet sich in Abb. 5.

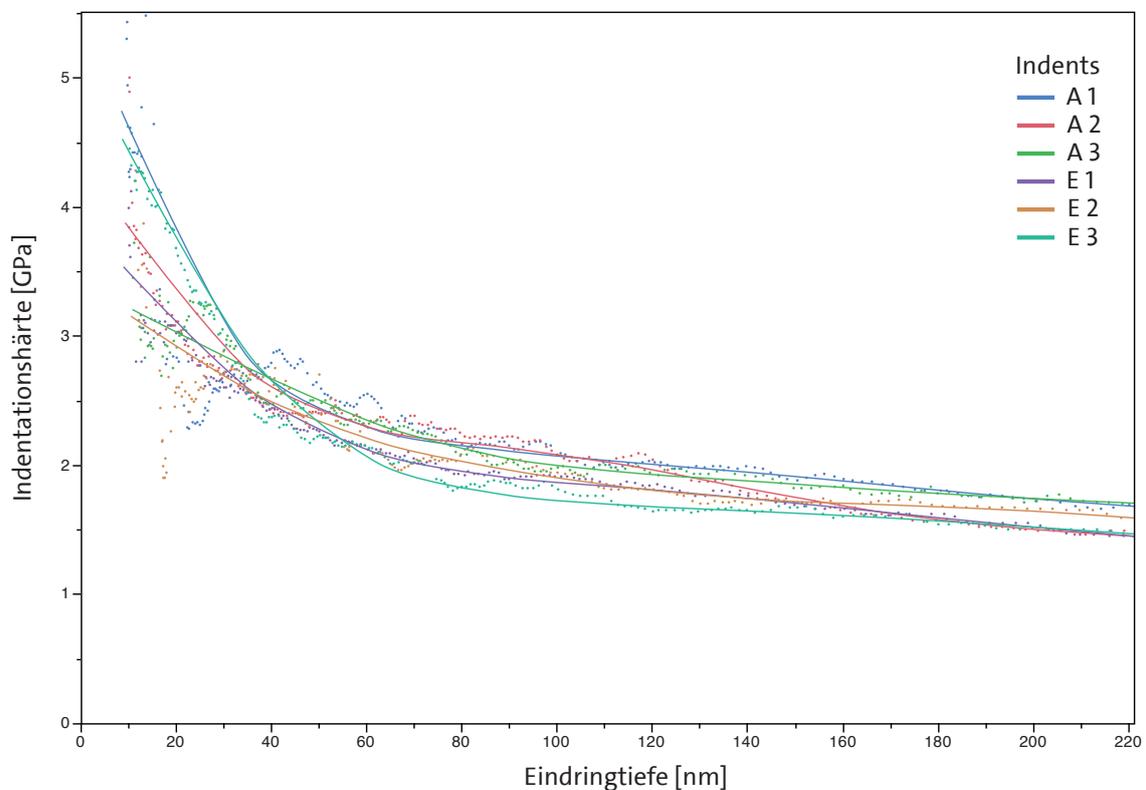


Abb. 5 Indentationskurve von zwei Phytolithen mit jeweils drei Indents. Phytolith aus der Veraschung: A1, A2, A3. Phytolith aus dem Wasser-Siede-Aufschluss: E1, E2, E3. Dargestellt ist nur der Eindringbereich bis 220 nm von insgesamt 600 nm. Die Linien zeigen die Glättung der Messpunkte der Indents.

2.4.6 Auswertung

Die Indents wurde im Eindringbereich von 100-200 nm gemittelt. Im Anschluss wurden diese mit dem Statistikprogramm „R“ (Version 2.13.2, Development Core Team, 2011), wie in Kapitel 1.4.7 beschrieben, ausgewertet. Sämtliche Signifikanz- und Test-Werte finden sich im Anhang (Tab. 4, 5).

2.5 Ergebnisse

Mit der entwickelten Methode Wasser-Siede-Aufschluss können erfolgreich Phytolithe von 9 Gräsern extrahiert werden (Abb. 6). Vor der Extraktion befinden sich die Kurzzellen-Phytolithe in ihrem pflanzlichen Gewebe in einer Abfolge von Lang- und Kurzzellen in der Epidermis. Unter einem Lichtmikroskop lassen sich diese bei 200facher Vergrößerung dokumentieren (Abb. 7). Durch die Veraschung und durch den Wasser-Siede-Aufschluss kann in beiden Fällen die pflanzliche Matrix gebrochen und Phytolithe einzeln isoliert dokumentiert werden (Abb. 6).

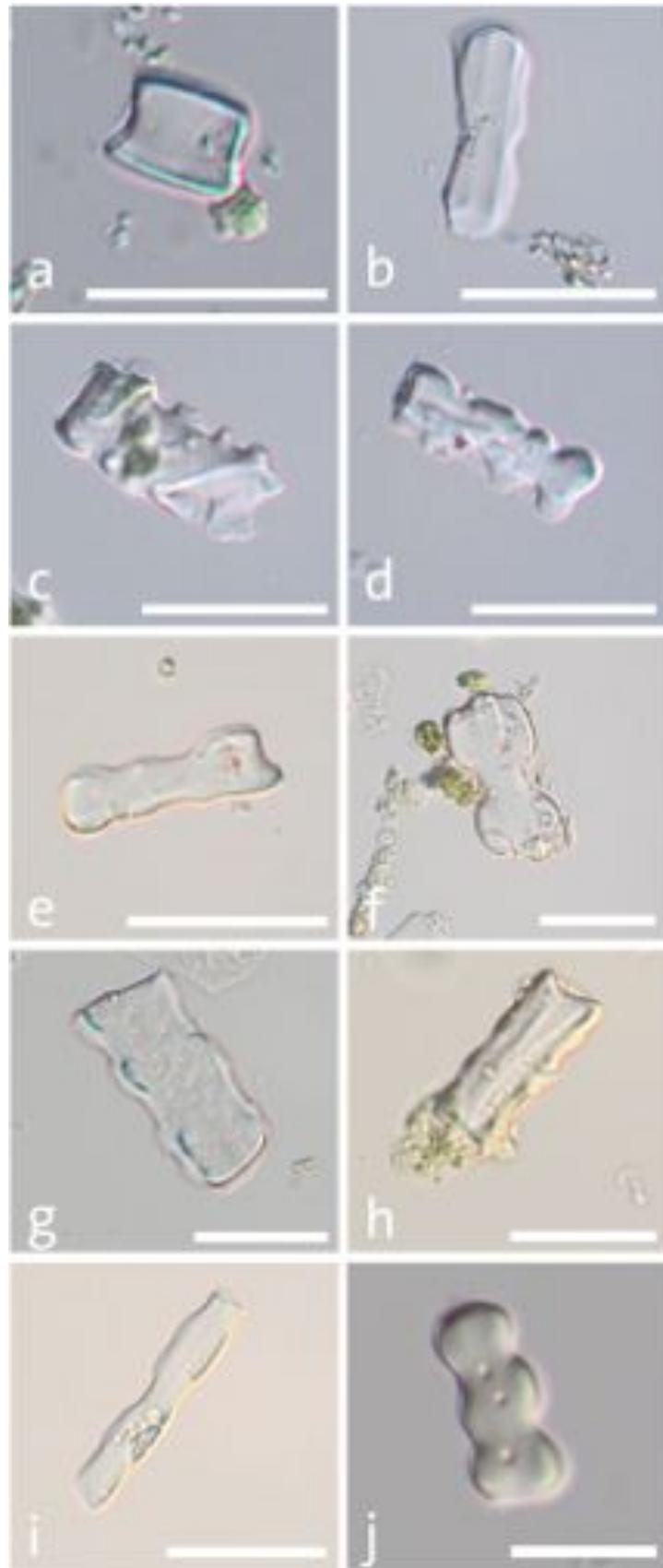


Abb. 6 Extrahierte Phytolithe der Gräser der silikatkontrollierten Anzucht (Kapitel 1.3-1.4.3). Aus einem Wasser-Siede-Aufschluss: a) *Cynodon dactylon*, b) *Festuca pratensis*, c) *Lolium perenne*, d) *Panicum virgatum*, e) *Phragmites australis*, f) *Themeda triandra*, g) *Aegilops cylindrica*, h) *Hordeum vulgare*, i) *Poa annua*. Phytolithe aus einer Veraschung: j) *Phragmites australis*. Maßstab: 25 µm.

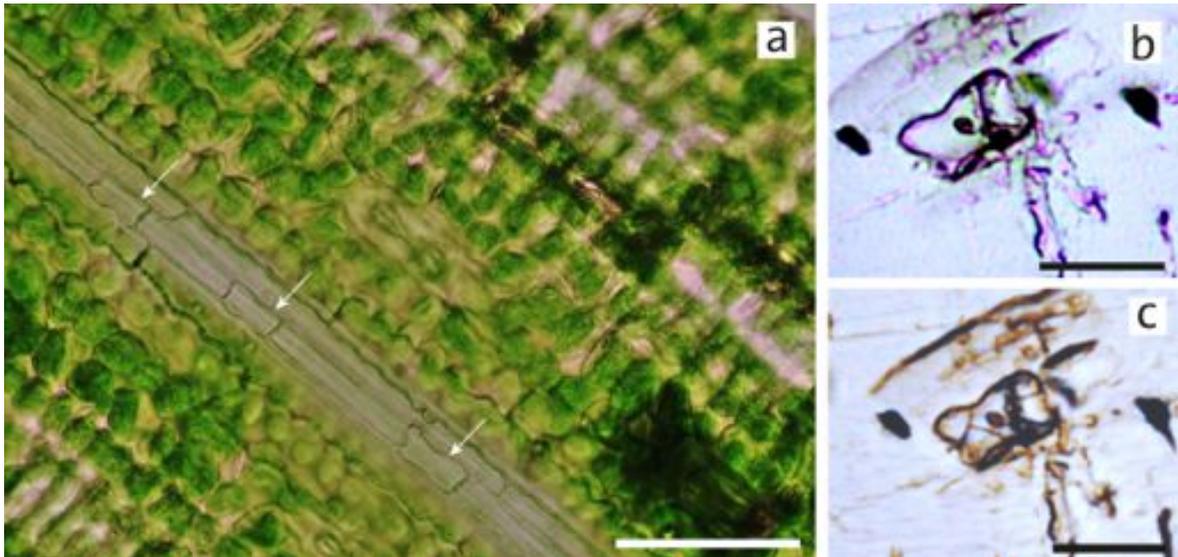


Abb. 7 Phytolithe von *Phragmites australis* **a**) im pflanzlichen Gewebe (Pfeile) **b**), **c**) aus einer Veraschung extrahiert vor (**b**) und nach (**c**) der Nanoindentation. Maßstab: a) 50 μm , b),c) 20 μm .

Die Härte von Phytolithen aus beiden beschriebenen Methoden wird mittels Nanoindentation bestimmt. Für diese wurden 8 Phytolithe aus der Veraschung und 7 Phytolithe aus dem Wasser-Siede-Aufschluss getestet. Die Streuung der Indents (Abb. 8) wird mittels Boxplots (Median, Interquartilsabstand (IQR), Antennen = $1.5 \cdot \text{IQR}$, milde und extreme Ausreißer) dargestellt. Aus der statistischen Auswertung wird ersichtlich, dass die Indentationswerte der Phytolithe aus der Veraschung (Mittelwert bei $1,9 \pm 0,8$ GPa) im gleichen Bereich liegen wie die der Phytolithe aus dem Wasser-Siede-Aufschluss ($1,5 \pm 0,5$ GPa) und es keinen signifikanten Unterschied beider Gruppen gibt (Signifikanzniveau bei 0,065, siehe Anhang Tab. 8) (Abb. 8). Die Minimal-Werte beider Phytolith-Gruppen liegen bei 0,75 GPa, während der Maximal-Wert der Phytolithe aus der Veraschung bei 3,58 GPa und der aus dem Wasser-Siede-Aufschluss bei 2,38 GPa liegt. Der Nanoindentationswert des Epoxidharzes liegt bei $0,2 \pm 0,07$ GPa und ist signifikant verschieden zu den gemessenen Phytolithen.

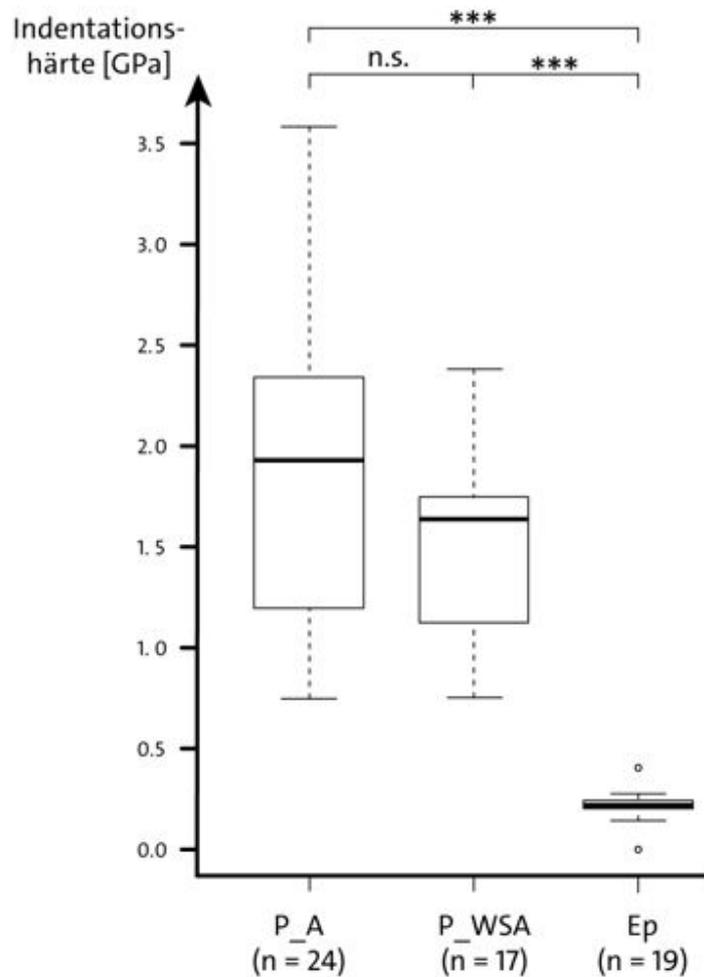


Abb. 8 Boxplots der Nanoindentationswerte der Phytolithe aus der Veraschung (P_A), aus dem Wasser-Siede-Aufschluss (P_WSA) und Epoxidharz (Ep). Phytolith-Indents (n) wurden bei einer Eindringtiefe von 100-200 nm ermittelt (Vergleich Abb. 5). Signifikanzniveau: $p \leq 0,001$ (***), nicht signifikant (n.s.).

Nur bei den Phytolithen aus der Veraschung konnte nach der Nanoindentation einiger Phytolithe ein Zerspringen des getesteten Phytolithe dokumentiert werden (Abb. 7).

2.6 Diskussion

2.6.1 Diskussion

Der Wasser-Siede-Aufschluss kann zuverlässig bei 9 Gräsern angewendet werden (Abb. 6). Unter kontrollierten Bedingungen wird hier eine native Extraktionsmethode etabliert, die bei maximal 100 °C, dem Siedepunkt des Wassers, arbeitet. Während des gesamten Prozesses sind die Phytolithe in wässriger Lösung, wodurch ein molekularer Wasserverlust des biogenen Opals ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) verhindert wird. Nach Piperno (2006) beläuft sich der Wasseranteil auf 5-9 %.

Das Mikrowellengerät erzeugt ein elektromagnetisches Feld mit einer Frequenz von 2,45 GHz und einer Wellenlänge von 12,24 cm. Es wird angenommen, dass das pflanzliche Gewebe die Mikrowellenenergie absorbiert und in Wärme umwandelt. Die Suspension mit Wasser und Pflanzenmaterial enthält Dipole und Ionen. Vorrangig Dipole und Ionen des Wassers richten sich im Feld aus, wobei Wärme durch molekulare Reibung und dielektrischer Verlust abgegeben wird (Kappe 2004). Nach Prof. C. Oliver Kappe (Universität Graz, Österreich, persönliche Korrespondenz) sind die Felder bei weitem nicht stark genug, um den Wassergehalt des Opals der Phytolithe zu beeinflussen. Die im Überschuss vorhandenen externen Wassermoleküle absorbieren mit hoher Wahrscheinlichkeit alle einwirkende Mikrowellenstrahlung. Morphologische Veränderungen, z. B. ein Schrumpfen, welches durch den Einfluss von hohen Temperaturen z. B. bei einer Veraschung hervorgerufen werden kann, können bei den mikroskopisch ausgewerteten Phytolithen nicht festgestellt werden.

Die Extraktionsmethode der Veraschung bringt ebenfalls eine große Ausbeute an einzelnen Kurzzellen-Phytolithen und bewährt sich in der Dokumentation von isolierten Phytolithen.

Die Phytolithe aus beiden Extraktionsansätzen zeigen zwar überwiegend ähnliche Härtewerte, die Phytolithe aus der Veraschung können jedoch über 1 GPa härter sein als die Phytolithe aus dem Wasser-Siede-Aufschluss (Abb. 8). Des Weiteren können die Phytolithe aus der Veraschung während der Messung zerspringen (Abb.

7). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die Veraschungsmethode die Materialeigenschaften von Phytolithen verändert und sie härter werden lässt. Eine Ursache könnte eine bedingt durch hohe Temperaturen geschmolzene Oberfläche sein, was von Runge (2000) beschrieben wird (Kapitel 2.2).

Die statistischen Wahrscheinlichkeiten, dass es zwischen den Phytolithen aus der Veraschung und denen aus dem Wasser-Siede-Aufschluss keinen signifikanten Unterschied gibt, zeigen jedoch einen schwachen Trend, dass die Phytolithe härter sind, wenn sie verascht werden. Das Signifikanzniveau liegt mit 0,065 nur knapp über dem gemeinhin zugrunde gelegten Signifikanzniveau von 0,05.

Die Bestimmung der Härte durch Nanoindentation ist eine sehr zeitaufwändige Messung, da jeder Phytolith einzeln mit dem Indentor angesteuert und manuell gemessen werden muss. In der Regel können an einem Arbeitstag ein bis zwei Phytolithe mit jeweils zwei bis drei Indents vermessen werden. Aus diesem Grund enthält die Stichprobe nur 15 Phytolithe.

Die Messwerte zeigen jedoch deutlich, dass der Indenter tatsächlich auf der Oberfläche des Phytolithen aufgesetzt wurde, da die Kontrollmessungen des Epoxidharzes signifikant weicher sind als jeder jemals gemessene Phytolith.

2.6.2 Schlussfolgerung

Die Phytolithkunde findet in vielen Bereichen der Wissenschaft unterschiedliche Anwendungen. In der Paläo- und Archäobotanik werden Phytolithe oft als Werkzeug genutzt um vergangene Vegetationen zu rekonstruieren (z. B. Barboni et al. 1999, 2007, Barczi et al. 2009, Bremond et al. 2008). Für einfache quantitative Nachweisstudien genügt es, mit Veraschungen oder sogenannten „Aschebildern“ zu arbeiten. Bei Studien zur Qualität oder bei zellphysiologischen Studien zur Entstehung von Phytolithen kann von der vorliegenden Studie abgeleitet werden, dass die Untersuchung von möglichst nativ extrahierten Phytolithen sehr vielversprechende Ergebnisse liefert. Der Wasser-Siede-Aufschluss ist ohne Chemikalien und hohe Temperaturen durchführbar und prädestiniert für das

Arbeiten an einzelnen Phytolithen zu qualitativen Tests. Die molekulare Struktur des Opals der Phytolithe bleibt stabil, da ein Austrocknen der Phytolithe verhindert wird.

3. Kapitel 3 – Qualitative Dokumentation der Phytolithe von *Hordeum vulgare* mittels Transmissionselektronenmikroskopie

3.1 Einleitung

Das Durchführen von qualitativen Untersuchungen an Phytolithen zum Verständnis der biomechanischen Eigenschaften setzt das Wissen der Phytolith-Entstehung in Silikat-akkumulierenden Pflanzen voraus. Um den Blick in die Zelle, in diesem Fall den Phytolithen, zu richten, dient eine Analyse am Transmissionselektronenmikroskop (im Folgenden „TEM“). Hierbei werden mit einem Mikrotom Ultradünnschnitte gefertigt, die im Anschluss unter dem TEM untersucht werden. Die Vorbereitung der Proben setzt in den meisten Fällen eine Infiltration der Probe und eine anschließende Einbettung voraus, wobei die Infiltrationsflüssigkeit aus Ethanol oder Aceton besteht. Die Entwicklung der Epoxidharzeinbettung für Phytolithe (Kapitel 2.4.3) kann jedoch auch für Ultradünnschnitte genutzt werden.

Die Erforschung der zellphysiologischen Prozesse, die an der Phytolith-Entstehung beteiligt sind, wurde in den letzten Jahrzehnten stark vernachlässigt und führte bei namenhaften Wissenschaftlern der Phytolithforschung zu einer z. T. gänzlichen Ausblendung des Prozesses.

Kaufman et al. (1981, 1970) untersuchen mit dem TEM die verschiedenen Stufen der Silifizierung von Gras-Zellen, ohne jedoch den Begriff „Phytolith“ zu verwenden. Folglich gerät diese Arbeit in Vergessenheit.

In der vorliegenden Arbeit werden TEM-Analysen an Phytolithen von *Hordeum vulgare* durchgeführt, die aus der Population B mit 100 mg SiO₂/L der silikatkontrollierten Anzucht (Kapitel 1.3-1.4.3) stammen. *H. vulgare* wurde gewählt, da die epidermalen Phytolithe ausschließlich langzellig und in großer Anzahl vorhanden sind. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Homogenität der internen Ultrastruktur der Phytolithe zu untersuchen und den Prozess der Phytolith-Entstehung besser nachvollziehen zu können.

3.2 Stand der Forschung

Analysen zum Silifizierungsprozess von Phytolithen am TEM werden ausführlich von Kaufman et al. (1970, 1981) durchgeführt. Die Polymerisation des Silikats wird wie folgt beschrieben: aus Kieselsäure bildet sich irreversibel amorphes Silikat-Gel ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), welches ein nichtkristallines Produkt ergibt, das einem hydrophoben SiO_2 -Molekül mit an der Oberfläche befindlichen hydrophilen OH-Gruppen entspricht.

In 4 Stufen wird der Silifizierungsprozess eines Phytolithen von *Avena sativa* L. mit Bildern einer TEM-Untersuchung dargestellt (Kaufman et al. 1981). In einer Interphase entstehen im interkalaren Meristem eines Internodiums eine Abfolge von Lang- und Kurzzellen. Die Kurzzellen können sich zu einem Paar Silikat- und Korkzelle, Stomata-Zellen oder Trichomen entwickeln. In der 1. Stufe der Silifizierung teilt sich eine Kurzzelle in ein Paar aus zukünftiger Silikat- und Korkzelle, die vorerst morphologisch gleich erscheinen. In der 2. Stufe differenzieren sich beide Zellen in Größe und Form. In der 3. Stufe geht der Zellkern der zukünftigen Silikat-Zelle zugrunde, wobei in der letzten Stufe Silikat eindringt, während sich die Korkzelle mit allen Zellbestandteilen weiterentwickelt (Kaufman et al. 1981).

Beim Abbau des Zellkerns entstehen aus diesem und weiteren Zytoplasma-Elementen fibrilläre Elemente, die sich durch das Zelllumen verbreiten. Einzige noch bestehende Organellen in dieser Entwicklung sind dunkle osmiophile Tröpfchen, wobei es sich um potentielle Lipidtröpfchen handelt. Des Weiteren werden beim Silifizierungsprozess verdickte Zellwände beschrieben, die sich um die Kork- und Silikat-Zelle bilden (Kaufman et al. 1981).

Die Silikat-Aggregate, die nun im Zelllumen der Silikat-Zelle gedeihen, sind nach Kaufman et al. (1981) nichtkristallin, enthalten 13,5 % gebundenes Wasser und werden als Silikat-Gel verstanden. Sie wachsen entlang der fibrillären Elemente in parallelen prismenartigen Aggregaten (Kaufman et al. 1981).

Ein mechanischer Prozess der Silifizierung von Silikat-akkumulierenden Pflanzen wird von Kaufman et al. (1981) wie folgt angenommen: Durch das interkalare

Meristem, welches basal in jedem Internodium vorhanden ist, fließt Kieselsäure entlang des Transpirationsstromes in die Spitzen des Grashalmes. Da in diesem Meristem stets neue Zellen entstehen, wird dort eine Silikat-Ablagerung verhindert. Am oberen Ende des Internodiums, welches am weitesten vom interkalarem Meristem entfernt ist, fungiert das Gewebe als eine Art Filtersystem oder feinporige Membran, in der das Silikat-Gel angereichert wird, Kieselsäure jedoch weiter fließen kann. Dieser sog. „Upside-down filter-cake“ (Kaufman et al. 1981) entsteht an jedem oberen Teil eines Internodiums eines Grashalmes. Je älter ein Internodium, desto dicker und länger ist die silikatreiche Zone. Die Ansammlung von Silikat kann hier Verbindungen mit Zellwandbausteinen, wie Zellulose, und anderen organischen Polymeren eingehen oder Kanäle durch den interzellularen Raum bilden. Da die Silikat-Gele jedoch sehr große Makromoleküle darstellen, ist zweifelhaft, ob Zellmembrane durchbrochen werden können. Jedoch können in der Teilungsphase von Kurzzellen zu Silikat- und Korkzelle, Membranbarrieren überwunden werden mit der Folge, dass Silikat im Zelllumen angereichert werden kann.

3.3 Material

Pflanzenmaterial von *Hordeum vulgare* wurde unter Gewächshausbedingungen (Kapitel 1.3-1.4.3) angezogen. Nach dem Ernten wurden die Pflanzen aus der Population B mit 100 mg SiO₂/L verpackt und bei -20 °C gelagert.

3.4 Methoden

Die Phytolithe von *Hordeum vulgare* wurden in einem Wasser-Siede-Aufschluss (Kapitel 2.4.2) extrahiert. Die Einbettung in Epoxidharz erfolgte wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, jedoch mit folgender Abwandlung: Die angesetzte Epoxidharz-Phytolith-Mischung wurde in eine flache aus Silikonkautschuk bestehende

Einbettungsgießform gefüllt. Nach der Aushärtung wurden die Proben mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert-Jung, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) geschnitten und mit einem TEM (LEO 906E, LEO, Oberkochen, Deutschland) bei 100 kV untersucht. Aufnahmen wurden mit einer computergebundenen Kamera (CCD camera, MultiScan Typ 794, Gatan, Abingdon, Groß-Britannien) durchgeführt und mit der Software Gatan Microscopy Suite 2.0 (Gatan, Abingdon, Großbritannien) bearbeitet.

3.5 Ergebnis

Die Aufnahmen des TEM zeigen einen geschnittenen Langzellen-Phytolithen mit Aggregaten aus Silikat (Abb. 9a-d) im inneren der Zelle. Die Schichtungen weisen kleine spaltförmige Zwischenräume auf und sind in Abb. 9a bei dunkleren Stellen überlagert, da der Ultradünnschnitt leicht verzerrt auf der Oberfläche aufliegt. In Abb. 9b befinden sich „Löcher“ (Pfeile) innerhalb des Phytolithen. Detailaufnahmen der Aggregate sind in Abb. 9c dokumentiert. Hier zeigt sich der Randbereich (Abb. 9d) in einer undifferenzierten Schicht.

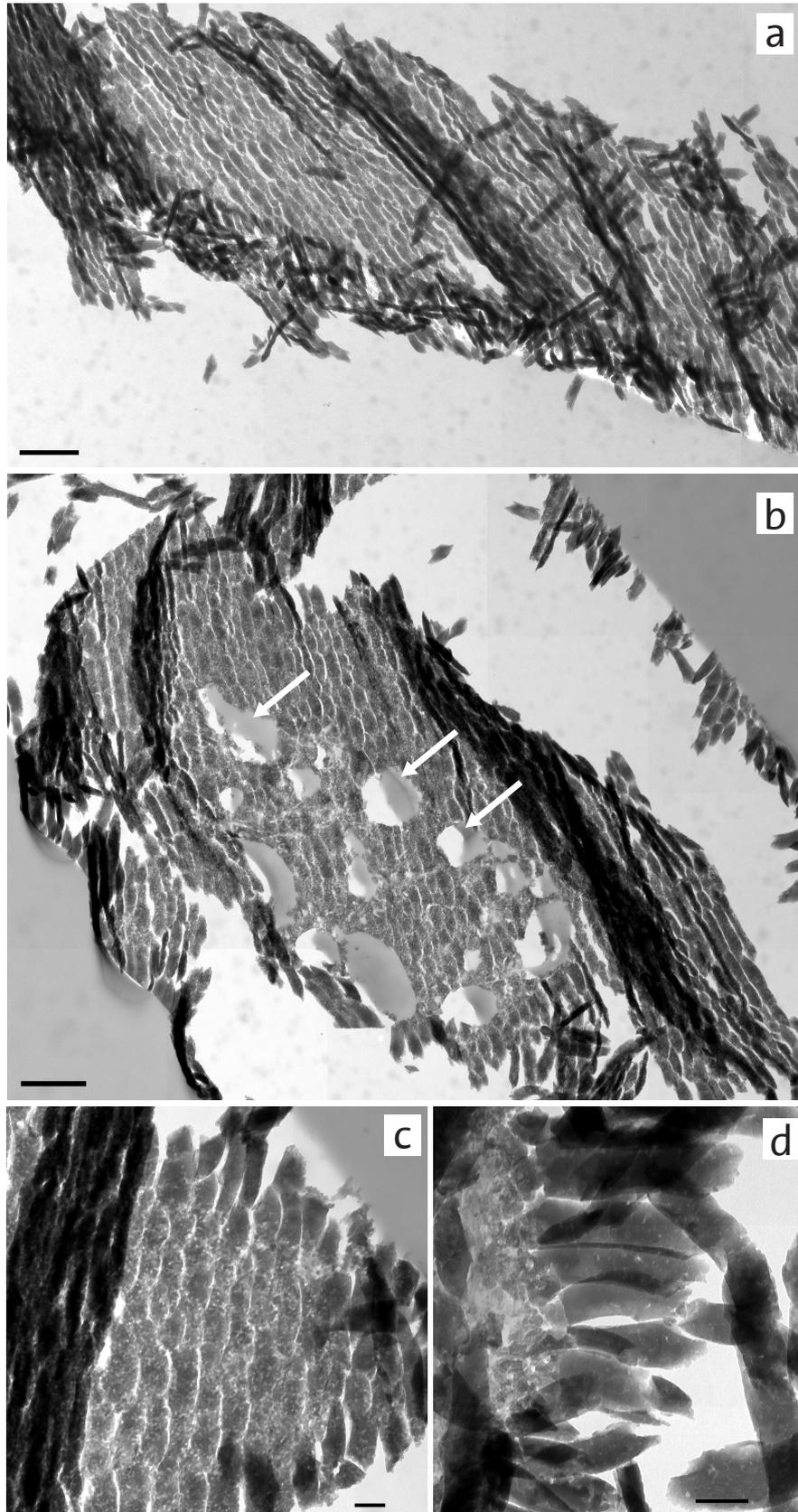


Abb. 9 TEM-Aufnahme eines Phytolithen von *Hordeum vulgare* **a)** Deutlich sichtbar sind geschichtete Silikat-Aggregate, dunklere Schichten zeigen eine Überlagerung der Aggregate verursacht durch den Ultradünnschnitt **b)** kleine Aussparungen („Löcher“) in den Silikat-Aggregaten (Pfeile) **c)** Detailaufnahme der geschichteten Silikat-Aggregate **d)** Detailaufnahme des Randbereiches. Maßstab: a), b) 1 μm c), d) 200 nm.

3.6 Diskussion

3.6.1 Diskussion

Die Ergebnisse der TEM-Analyse zeigen Silikat-Aggregate im Inneren von Phytolithen von *Hordeum vulgare*, wie sie auch von Kaufman et al. (1981) beschrieben werden. Die in Abb. 18 gezeigten „Löcher“ scheinen von osmophilen Tröpfchen zu stammen, die als einzige Zellorganellen im Phytolithen überdauern (Kaufman et al. 1981).

Die Entstehung des Phytolithen könnte wie in Kapitel 3.2 beschrieben aus dem interkalaren Meristem entstanden sein, wobei sich nach der Zellteilung die Primärwand neu auf der Mittellamelle bildet und eine Einlagerung von Silikaten in diesem Schritt denkbar wäre. Die verdickten Zellwände, die Morphologie und die Anordnung der Aggregate stimmen mit den Aussagen von Sangster und Parry (1981) und Kaufman et al. (1981) überein.

Weiter zeigen die untersuchten Phytolithe eine deutliche Inhomogenität in ihrer Struktur, da die Aggregate an undifferenzierten fibrillären Elementen entlang von außen nach innen wachsen.

Unklar bleibt, ob es sich bei den Aggregaten um biogenes Opal oder Silikat-Gel handelt. Jones und Milne (1963) als auch Lanning et al. (1958) bestimmen die Silikatablagerungen in Pflanzen mittels Röntgendiffraktion als Opal und α -Quarz, während sie Kaufman et al. (1981) als Silikat-Gel beschreiben.

3.6.2 Schlussfolgerung

Die Analyse von Phytolithen mit dem TEM bringt Aufschluss über die Ultrastruktur von Phytolithen und eignet sich für das Verständnis der Phytolith-Entstehung. Mit der plausiblen Theorie zur Silifizierung nach Kaufman et al. (1981) lassen sich die Beobachtungen am TEM erklären: Im Inneren von Phytolithen wachsen entlang von fibrillären Elementen Silikat-Aggregate, die aus polymerisierter Kieselsäure entstehen und sogar die Stufe des α -Quarzes (Jones und Milne 1963) erreichen können. Das Wissen über die Entstehung von Phytolithen hat einen entscheidenden

Einfluss auf die Auswahl von geeigneten qualitativen Material-Prüfverfahren und kann abschließend zu eindeutigen und nachvollziehbaren Ergebnissen zur Bestimmung von biomechanischen Eigenschaften führen.

4. Kapitel 4 – Härte-Bestimmung durch Nanoindentation an Phytolithen bei *Themeda triandra* aus der silikatkontrollierten Anzucht (Kapitel 1.3 – 1.4)

4.1 Einleitung

Die Zahnabnutzung bei herbivoren Säugetieren wird kontrovers diskutiert. Durch die Mastikation von Gräsern treffen mineralische Einschlüsse (Phytolithe) im Tribosystem der antagonistischen Zähne auf Zahngewebe (Dentin und Zahnschmelz) und hinterlassen Spuren im Zahnschmelz. Neben den exogenen Staubpartikeln, die überwiegend aus Siliziumdioxid bestehen, sind Phytolithbildner unter den Pflanzen, als Verschleißagentien ebenfalls im Fokus der Tierernährer und Zoologen.

Die Bestimmung von biomechanischen Materialeigenschaften von Phytolithen tragen zur Klärung der tatsächlichen Ursache der Usur bei. Aufgrund dessen soll in dieser Arbeit die Bestimmung der Phytolithhärte im Detail mit erstmals präzisen Angaben zur Herkunft des Pflanzenmaterials durchgeführt werden. Mittels Nanoindentation werden Phytolithe von *Themeda triandra* aus der silikatkontrollierten Anzucht (Kapitel 1.3-1.4.3) mit 10 und 100 mg SiO₂/L getestet. Ziel der Arbeit ist es, die Silikatkonzentration des Substrates mit der Härte von Phytolithen zu vergleichen und auf eine mögliche Korrelation zu prüfen.

Wenn die Silikatkonzentration einen Einfluss auf die Härte von Phytolithen ausübt, könnte sich bereits der Standort der Pflanze als Schutz vor Fressfeinden auswirken. Bestimmte Ökosysteme, wie z. B. offene Grashabitate, könnten weniger attraktiv auf Herbivoren wirken, wenn z. B. die Schmackhaftigkeit der Nahrung herabgesetzt ist (Massey et al. 2009) oder aber die Abrasivität relativ groß ist.

4.2 Stand der Forschung

Die Bestimmung der Härte kann mit vielen etablierten Verfahren im Mikro- und Makrobereich durchgeführt werden. Entscheidend für die Auswahl des Verfahrens ist die Beschaffenheit des Prüfmaterials. In jedem Fall dringt ein Prüfkörper bei gegebener Kraft in das Prüfstück ein und hinterlässt auf dessen Oberfläche einen Eindruck. Aus der Geometrie des Eindrucks wird auf die Härte geschlossen. Die Härteprüfung nach Vickers wird z. B. bei einzelnen Kristallen und dünnen Schichten eingesetzt und mit einer Prüfkraft von 0,01 – 1 N eingesetzt (Weißbach 2007). Die „Instrumentierte Eindringprüfung“ (im Folgenden „Nanoindentation“) kann sehr kleine Eindringtiefen mit sehr genauen Messsystemen vornehmen (Bargel und Schulze 1999) und dient u. a. der Homogenitätsprüfung von Werkstoffen (DIN ES ISO 14577).

Um die Härte von biogenen Phytolithen zu bestimmen und das geeignete Prüfverfahren auszuwählen, muss im Vorfeld abgeschätzt werden, welche Materialeigenschaften dem Prüfmaterial, in diesem Fall den Phytolithen, zu Grunde liegen. Bisherige Studien zeigen daher unterschiedliche Prüfverfahren mit verschiedenen Ergebnissen.

Baker et al. (1959) bestimmen als erste die Härte von Phytolithen. Unter Verwendung der Härteprüfung nach Knoop (HK), bei dem ein Prüfkörper unter statischer Belastung in das Material eindringt (Bargel und Schulze 1999), werden Phytolithe von *Avena sp.* und Zahngewebe vom Hausschaf untersucht. Der Zahnschmelz als härteste Substanz des Zahngewebes erreicht 366 HK, während die Phytolithe 620 HK messen und somit deutlich härter sind, als die Zahngewebetypen. Ziel der Arbeit von Baker et al. (1959) ist die Beurteilung der Rolle, die Phytolithe als Verursacher der Zahnabnutzung von herbivoren Säugetieren spielen könnten. Es wird gezeigt, dass Phytolithe in der Lage sind, Zahnschmelz zu ritzen. Baker et al. (1959) geben jedoch nicht an, welche Extraktionsmethode für die Phytolithe verwendet und wie viele einzelne Phytolithe gemessen werden.

In einer weiteren Studie zur Härtebestimmung testeten Sanson et al. (2007) Phytolithe von 4 verschiedenen Gräsern und ebenfalls Zahngewebe vom Hausschaf unter Verwendung des Vickershärteverfahrens. Der Härtewert (HV) leitet sich aus der Eindruckfläche ab, die mit einer Diamantpyramide als Eindringkörper durchgeführt wird. Die Ergebnisse zeigen, dass Phytolithe mit 51-211 HV weicher als Zahnschmelz (257-397 HV) sind und widerlegen damit die Studie von Baker et al. (1959). Zur Bestimmung der Härte dient die Software des verwendeten Prüfgerätes, welche die Höhe detektiert bei der der Indenter auf die Phytolith-Oberfläche trifft und bei der er nach der Belastung die Oberfläche verlässt. Die Differenz als anzunehmende bleibende Eindringtiefe wird zur Bestimmung der Härte genutzt.

Ein möglicher und wahrscheinlicher Drift des Phytolithen in das weiche Epoxidharz, das als Einbettmedium diente, wird nicht als Ursache der geringen Härtewerte in Erwägung gezogen und führt zu einer kritischen Rezeption der Studie. Der Eindringweg, der die Summe bildet aus dem Eindringweg des Indenters in den Phytolithen hinein und aus dem Eindringweg des Phytolithen in die Matrix hinein, könnte zu groß berechnet worden sein und ergäbe somit eine zu geringe Härte (nach Dr. G. Kalinka, persönliche Korrespondenz).

Unter Verwendung der Nanoindentation testeten Lucas et al. (2013) Phytolithe von Poaceen und Dikotyledonen sowie Zahngewebe vom Orang-Utan und Staubpartikel. Die Ergebnisse zeigen eine Stufung der Härte nach folgendem Rang: Dikotyledonen-Phytolithe ($0,89 \pm 0,48$ GPa) < Poaceen-Phytolithe ($2,56 \pm 0,81$ GPa) < Zahnschmelz ($5,0 \pm 0,28$ GPa) < Staubpartikel ($12,8 \pm 1,07$ GPa). Eine Überlappung der Werte um 0,16 GPa zeigte sich vor allem bei den Poaceen-Phytolithen und dem Zahnschmelz und lässt vielfältige Interpretationen zu, ob Phytolithe die tatsächliche Hauptursache für Zahnabnutzung sein können oder nur indirekt auf den Abnutzungsprozess einwirken. Die Datenermittlung aus den Eindringbereichen des Prüfkörpers und deren Auswertung wurde nicht beschrieben.

Der exakte Vergleich von Härtewerten kann nach Bargel und Schulze (1999) nur unter Verwendung gleicher Prüfverfahren vorgenommen werden. Bei Verwendung unterschiedlicher Verfahren kann ein Vergleich nur unter der Voraussetzung von

sehr ähnlichen zu prüfenden Materialien durchgeführt werden. Wenn spezielle Umrechnungsfaktoren gegeben sind, sollte darauf geachtet werden, dass sich diese nicht auf andere Werkstoffklassen übertragen lassen (Bargel und Schulze 1999).

4.3 Material

Pflanzenmaterial von *Themeda triandra* wurde unter Gewächshausbedingungen (Kapitel 1.3-1.4.3) angezogen. Nach dem Ernten wurden die Pflanzen aus der Population A mit 10 mg SiO₂/L und B mit 100 mg SiO₂/L verpackt und bei -20 °C gelagert.

4.4 Methoden

Die Phytolithe von *Themeda triandra* wurden in einem Wasser-Siede-Aufschluss (Kapitel 2.4.2) extrahiert. Die Einbettung in Epoxidharz, das Anschleifen der Phytolithe (Abb. 10), die Nanoindentation und Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.4.3-2.4.6 beschrieben. Statistische Kennwerte finden sich im Anhang (Tab. 6, 7).

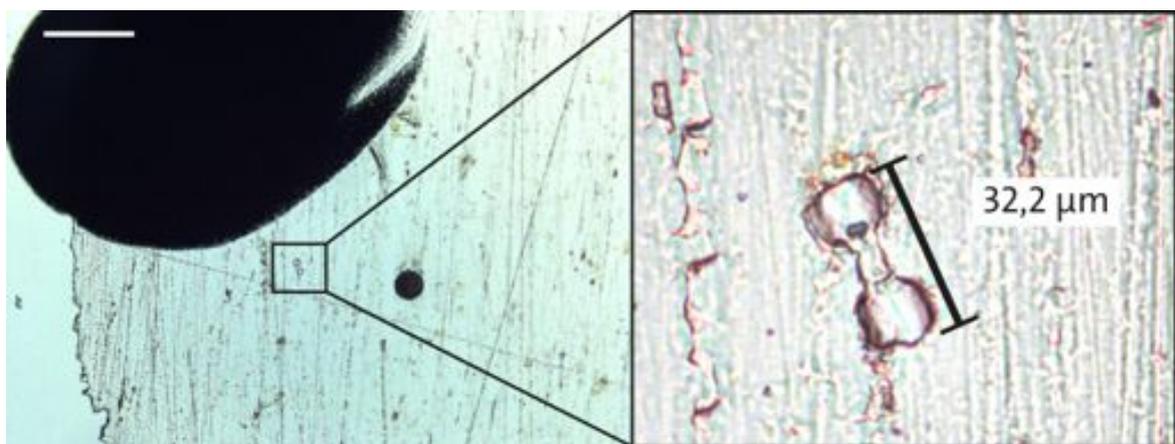


Abb. 10 Übersicht der Epoxidharz-Anschlifffläche eines Objektträgers mit einem Phytolithen von *Themeda triandra*. Links: Markierung mit Tusche (links oben) und sichtbare Kante des Epoxidharzes (links). Rechts: Detailansicht des Phytolithen. Maßstab (links): 200 μm.

Die Indentationskurven der Indents wurden visuell überprüft und zeigten Plateaus in unterschiedlichen Eindringbereichen. Bei diesen Plateaus wurde je Phytolith ein individueller Eindringbereich für die 1-4 Indents festgelegt (Anhang, Tab. 8). Für jeden Indent wurde dieser Bereich gemittelt und in die statistische Analyse einbezogen.

4.5 Ergebnis

Die Nanoindentation wird an 9 Phytolithen aus der Population A mit 10 mg SiO₂/L und 12 Phytolithen aus der Population B mit 100 mg SiO₂/L von *Themeda triandra* durchgeführt (Abb. 11). Die Streuung der Indents wird mittels Boxplots (Median, Interquartilsabstand (IQR), Antennen = 1.5*IQR, milde und extreme Ausreißer) dargestellt. Die Indents beider Populationen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Signifikanzniveau 0,065, siehe Anhang Tab. 7). Population A mit dem Mittelwert 2,03±0,91 GPa liegt Nahe bei Population B mit 2,50±0,88 GPa, erreicht aber eine größere Variabilität als Population B. Die Messungen der Population A mit 23 Indents zeigen eine Härte von minimal 0,71 GPa und maximal 3,97 GPa, während Population B mit 29 Indents von minimal 1,63 GPa bis maximal 5,24 GPa reicht, wobei die höheren Werte lediglich Ausreißer darstellen.

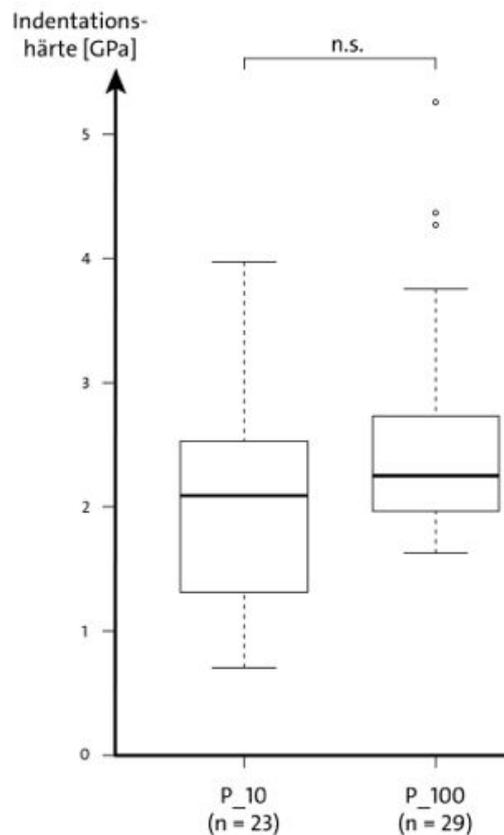


Abb. 11 Boxplots der Nanoindentationswerte. Phytolithe von *Themeda triandra* extrahiert mit dem Wasser-Siede-Aufschluss aus der Population A mit 10 mg SiO₂/L (P_10) und aus der Population B mit 100 mg SiO₂/L (P_100). Phytolith-Indents (n), Signifikanzniveau ($p \geq 0.05$, nicht signifikant (n.s.)).

4.6 Diskussion

4.6.1 Diskussion

Phytolithe von *Themeda triandra* aus einer Anzucht mit 10 mg SiO₂/L zeigen die gleiche Härte wie Phytolithe aus der Anzucht mit 100 mg SiO₂/L. Die Streuung der Messwerte verschiebt sich zur Anzucht mit 100 mg SiO₂/L und zeigt einen schwachen Trend, bei dem Phytolithe härter werden, je mehr Silikat der Pflanze zur Verfügung steht. Der Signifikanztest, der aus einer Stichprobe mit insgesamt 21 getesteten Phytolithen berechnet wurde und ein nicht signifikantes Ergebnis brachte, könnte bei einer größeren Stichprobe zu einer statistischen Signifikanz führen.

Die Eingangshypothese wird daher abgelehnt: Die Silikatkonzentration im Substrat beeinflusst nicht die Härte der Phytolithe und spricht somit für eine standortunabhängige Phytolithhärte.

Entscheidend für die Ergebnisse der Nanoindentation ist das Auswählen der Daten aus dem Eindringbereich, die gemittelt werden. Anhand der Indentationskurve wird entschieden, ab welchem Punkt der Indenter zuverlässig in die Oberfläche eingedrungen ist. Mit Hilfe von Physikern und Ingenieuren der Bundesanstalt für Materialforschung und –Prüfung (BAM, Dr. M. Griepentrog und P. Reinstädt, Berlin, Deutschland) wird in der vorliegenden Arbeit der zu mittelnde Bereich von jedem einzelnen Phytolithen individuell festgelegt und mit dem Hinweis ergänzt, dass durchaus auch höhere bzw. härtere Werte bei Phytolithen realistisch und reproduzierbar wären, abhängig von der gewählten und zu begründenden Eindringtiefe.

Der ebenfalls erfasste Elastizitätsmodul (nach Oliver und Pharr 1992) ist ein gleichwertiger Bestandteil der Nanoindentation, der Aussagen über die Verformung des Prüfmaterials nach der Indentation angibt. Um eingebettete Partikel zu testen, sollte das Einbettungsmaterial ähnliche Materialeigenschaften besitzen. Ist dieses weicher, kann der Partikel einen Drift durch die Kraft des Indenters erfahren und das Ergebnis verfälschen.

Obwohl die Einbettungsprozedur ein Wegrutschen des Phytolithen unterbinden soll, da diese am Grund des Objektträgers aufliegen, können zahlreiche Artefakte durch den Einfluss des Epoxidharzes innerhalb der Messung dokumentiert werden. Die Indentationskurve fällt zum Teil nach ca. 300 nm Eindringtiefe ab und verzeichnet ein Nachgeben des Phytolithen in die Matrix hinein.

Nanoindentation an Phytolithen wird ebenfalls von Lucas et al. (2013) durchgeführt. Über die Methode „feuchte Oxidation“ (Kapitel 5.2) werden Phytolithe von einem Gras, *Ampelodesmos mauritanicum* (POIR.) T. DURAND & SCHINZ, extrahiert, die eine Indentationshärte von $2,56 \pm 0,81$ GPa (minimal 1,35 bis maximal 4,24 GPa) betragen. Diese sind im gleichen Messbereich wie die Härtewerte der vorliegenden Arbeit. In der publizierten Arbeit fehlen allerdings Angaben zur Eindringtiefe der Indents, die

zur Mittelung der Werte herangezogen werden. Auf Grund dessen kann die Ähnlichkeit der Messwerte der Härte ein zufälliges Ereignis sein.

Die Phytolithhärte-Bestimmung wird neben Lucas et al. (2013) auch von Sanson et al. (2007) und Baker et al. (1959) durchgeführt, die jeweils ein anderes Prüfverfahren verwenden. Angaben zur Herkunft des Pflanzenmaterials werden nicht gemacht. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals die Bestimmung der Härte mittels Nanoindentationen an Pflanzen einer silikatkontrollierten Anzucht mit 10 und 100 mg SiO₂/L.

4.6.2 Schlussfolgerung

Die Phytolithhärte, die mittels Nanoindentation an nativ präparierten Phytolithen durchgeführt wird, zeigt keine signifikante Korrelation zwischen Silikatverfügbarkeit im Substrat und der Härte. Durch diese Unabhängigkeit lässt sich ableiten, dass der Lebensraumparameter Silikatverfügbarkeit in der Bildung der Härte von Phytolithen keinen Einfluss hat.

5. Gesamtdiskussion

5.1. Kernaussagen

In einer silikatkontrollierten Anzucht mit ausgewählten Nahrungspflanzen wird festgestellt, dass zwar Silikat von den Nahrungspflanzen aufgenommen wird, jedoch die Biomasseproduktion und Wuchshöhe unabhängig von der zugeführten Silikatkonzentration im Substrat ist (Kapitel 1).

Der Wasser-Siede-Aufschluss wird als neue Methode zur Extraktion von nativen Phytolithen aus Pflanzengewebe entwickelt (Kapitel 2). Mit dieser Methode werden native Phytolithe aus *Phragmites australis* extrahiert, bei denen anschließend eine Prüfung der Härte als Materialeigenschaft durchgeführt wird. An Phytolithen von *Themeda triandra* der Anzucht mit 10 und 100 mg SiO₂/L wird ebenfalls eine Härteprüfung mittels Nanoindentation durchgeführt und gezeigt, dass die Härte unabhängig von der zugeführten Silikatkonzentration im Substrat ist (Kapitel 4).

In einer Untersuchung am TEM wird der innere Aufbau von Phytolithen von *Hordeum vulgare* überprüft (Kapitel 3). Es wird dargestellt, dass Phytolithe aus einzelnen Silikataggregaten aufgebaut sind.

5.2 Härtemessungen an Phytolithen

Die Phytolithhärte ist unbeeinflusst von der Silikatkonzentration im Substrat (Kapitel 4) und ist folglich standortunabhängig.

Die Phytolithhärten von *Phragmites australis* aus dem Wasser-Siede-Aufschluss (Kapitel 2) und *Themeda triandra* aus der Anzucht mit 10 und 100 mg SiO₂/L (Kapitel 4) liegen in ähnlichen Messbereichen. Die Phytolithhärte von *Phragmites australis* stammt von Phytolithen aus der Anzucht B mit 100 mg SiO₂/L. Im Vergleich

zu *Themeda triandra* aus der Anzucht mit 100 mg SiO₂/L fallen die Messwerte deutlich kleiner aus.

Die größte Spannweite der Phytolithhärte wird bei *Themeda triandra* aus der Anzucht im 10 mg SiO₂/L ermittelt (von minimal 0,71 GPa bis maximal 3,97 GPa, Abb. 11).

Erstmalig wird die Eindringtiefe bei der Messung der Phytolithhärte zusätzlich ermittelt (Kapitel 4.6.1). Die Indentationskurve (Abb. 5) zeigt, dass Phytolithe im Eindringbereich von 50 nm deutlich härter sind als im Eindringbereich von 300 nm, da die Kurve einen abnehmenden Charakter aufweist. Um zukünftig Phytolithhärten besser interpretieren zu können, wird somit empfohlen, Eindringtiefen stets anzugeben. Es ist somit nicht ausgeschlossen, dass in Zukunft noch größere Härtewerten bei Phytolithen gemessen werden könnten.

5.3 Phytolithbildung im Blattgewebe

Die Phytolithbildung kann durch umweltbedingte Lebensraumparameter beeinflusst und gesteuert werden. Bei erhöhter Wasserverfügbarkeit verkieseln nicht nur epidermale Kurzzellen sondern auch Langzellen (Madella et al. 2009). Es ist bekannt, dass eine deutlich erhöhte Phytolithbildung im Blattgewebe bei Silikatzuführung stattfindet (Schaller et al. 2012). Die Abrasivität der Blätter ist ebenfalls erhöht (Massey et al. 2006), wobei nicht geklärt ist, ob eine erhöhte Phytolithbildung oder eine erhöhte Härte einzelner Phytolithe diese Reaktion auf zugeführtes Silikat herbeiführt.

Die ermittelte Phytolithhärte (Kapitel 4), die unabhängig von der Silikatkonzentration im Substrat ist, zeigt erstmals, dass sich eine erhöhte Silikatverfügbarkeit nicht auf die Härte von Phytolithen sondern eher auf die Quantität der Phytolithbildung ausübt. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen daher die Ergebnisse von Schaller et al. (2012) und erklärt die erhöhte Abrasivität bei Silikatzuführung von Massey et al. (2006).

Die Härte eines Phytolithen im pflanzlichen Gewebe kann aus folgenden Gründen limitiert sein: zum einen begrenzt ein für das Verkieseln prädestinierter Raum ein weiteres unkontrolliertes Verkieseln mit Silikataggregaten (Kaufman et al. 1970, 1981) und zum anderen wirkt der Wasserhaushalt der Pflanze auf die Struktur der Phytolithe. Eine Dehydrierung innerhalb der Pflanze, sowie eine gänzliche Kristallisierung der Phytolithe im pflanzlichen Gewebe wird entgegengewirkt.

5.4 Abrasivitätsverhalten von Phytolithen

Dem Zahnverschleiß, der prinzipiell über Attrition (Zahn-Zahn-Kontakt) oder Abrasion (Zahn-Nahrungs-Kontakt) geschehen kann (Kaiser und Brinkmann 2006, Kaiser et al. 2013), geht eine Zahnfunktion voraus, deren räumliche Voraussetzung die Occlusionsfläche und der Occlusionsspalt bilden.

Der Nahrungsbrei und seine Fließrichtung formt die Occlusionsfläche, wobei variable Kräfte und Bewegungen auf die Nahrungspartikel ausgeübt werden und einen Nahrungsaufschluss bewirken (Kaiser und Brinkmann 2006, Schulz et al. 2010). Texturen auf Abrasionsfacetten auf der Occlusionsfläche sind das Ergebnis harter Nahrungseinschlüsse, die mit dem Zahngewebe ein antagonistisches Reibsystem bilden (Kaiser und Brinkmann 2006, Schulz et al. 2010). Somit haben die biomechanischen Eigenschaften der Nahrungseinschlüsse einen großen Einfluss auf das Fließ- und Reibverhalten auf der Occlusionsfläche.

Mit verschiedenen Analysen (Mesowear-, Mikrowear-, Mikroweartextur- und Oberflächentexturanalysen) lassen sich unterschiedliche Muster in der Zahnabnutzung erkennen (Fortelius und Solounias 2000, Schulz et al. 2010, Schulz et al. 2013a, Ungar et al. 2003, Walker et al. 1978).

Die Mikrowear-Analyse zeigt z. B. eine positive Korrelation zwischen dem Konsum von Poaceen und der Häufigkeit von „Scratches“ (Kratzern) auf

Zahnschmelzfacetten der Occlusionsfläche (z. B. Teaford 1988, Rivals und Deniaux 2003, Solounias und Hayek 1993, Merceron et al. 2004, Solounias et al. 1988, Walker et al. 1978).

Die Ursache der Zahnabnutzung wurde lange auf die in Poaceen enthaltenden Phytolithe zurückgeführt, da diese nach Baker et al. (1959) als grundsätzlich härter als Zahnschmelz angesehen wurden. Die Verallgemeinerung wird jedoch von Sanson et al. (2007) und Lucas et al. (2013) relativiert. Die Ursache der Zahnabnutzung wird in beiden Studien und in der aktuellen Diskussion zunehmend durch extrinsisch aufgenommene Staub- und Bodenpartikel erklärt (siehe auch Zahnabnutzung von Sandgazellen durch erhöhte Staubbelastung in trockenen Lebensräumen in Schulz et al. 2013b).

Der komplexe Prozess der Zahnabnutzung wird jedoch nicht nur über silikathaltige Partikel (intrinsische Phytolithe oder extrinsische Staub- und Bodenpartikel) gesteuert. Viele Parameter, wie Speichel (Mau et al. 2006), Nahrungszusammensetzung und die daraus resultierende Viskosität des Nahrungsbreis (Schulz et al. 2013c) sind zu berücksichtigen als auch die Adaptionen der Zähne herbivorer Mammalia (z. B. Hypsodontie) (siehe Review in Damuth und Janis 2011, Janis und Fortelius 1988).

Ergebnisse aus kontrollierten Fütterungsexperimenten bilden daher die Basis zum Verständnis der Zahnabnutzung.

Müller et al. (2014a, 2014b) führen zwei Studien mit Fütterungsexperimenten durch. Es werden jeweils 4 verschiedene pelletierte Futtergemische und Heu an 16 Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus* f. domestica) in Müller et al. (2014a) und an 16 Meerschweinchen (*Cavia porcellus* f. domestica) in Müller et al. (2014b) verfüttert. Die 4 Typen Nahrungspellets bestehen aus 1. Luzerne (*Medicago sativa* L.), 2. Gras, 3. Gras mit Reis-Spelz und 4. Gras mit Reis-Spelz und Sand. Das als „Gras“ formulierte Futter der Pellets als auch das Heu wurde taxonomisch nicht weiter bestimmt.

Beide Studien zeigen, dass die Abnutzung der Zähne am größten bei dem Futtergemisch „Gras mit Reis-Spelz und Sand“ ist, gefolgt vom Gemisch „Gras mit Reis-Spelz“. Das bedeutet, dass sowohl mineralische Bodenpartikel als auch Pflanzeninhaltsstoffe mit internen Biomineralisationen wie Phytolithen, die Zähne von herbivoren Mammalia abradieren können, wobei der Einfluss der mineralischen Bodenpartikel eine stärkere Wirkung auf den Zahnverschleiß hat als die Pflanzeninhaltsstoffe (Müller et al. 2014a, 2014b).

Die Charakterisierung der Materialeigenschaften von Phytolithen im Detail schließt eine wichtige Wissenslücke innerhalb der möglichen Ursachen für die Zahnabnutzung durch Pflanzeninhaltsstoffe. Die Härte als Indikator der Materialeigenschaften gibt Aufschluss über die Fähigkeit, weichere Materialien ritzen zu können und ein potentiell Abrasionsverhalten (Materialabtrag) abzuschätzen.

Die in dieser Arbeit ermittelten Phytolithhärten sind ähnlich zu den Werten von Sanson et al. (2007) und Lucas et al. (2013) und zeigen ebenfalls, dass Phytolithe weicher sind als Zahnschmelz.

Obwohl in den Studien (Lucas et al. 2013, Sanson et al. 2007) verschiedene Versuchspflanzen, Extraktions- und Prüfmethode angewendet werden, zeigen Phytolithe zusammengefasst eine Härte von minimal 0,5 GPa (Sanson et al. 2007, umgerechnet nach Chudoba und Griepentrog 2005) und maximal 4 GPa (Kapitel 7.5).

Da sich die ermittelten Phytolithhärten dieser Arbeit unabhängig zum wichtigsten Lebensraumparameter, der Silikatkonzentration im Substrat, zeigt, wird hier davon abgeleitet, dass die Standortbedingungen in der Charakterisierung der Materialeigenschaften von Phytolithen vernachlässigt werden können.

Die Rolle der Phytolithe im Zusammenhang der Zahnabnutzung wird von Lucas et al. (2014) aufgegriffen. Die Autoren postulieren die Annahme, dass phytolithenthaltende Gräser eine mögliche Nachahmung von staub- und

bodenpartikelbehafteter Nahrung darstellen. Die Partikelgrößen-Dimension von Phytolithen und Sandkörnern sind ähnlich, wobei Phytolithe darüber hinaus auch die gleiche Bruchfähigkeit haben (Lucas et al. 2014). Lucas et al. (2014) weisen darauf hin, dass auch der Mensch zwischen Sand, als lautes und unangenehmes Geräusch im Kauvorgang, und verholzten oder versteinerten Zellbestandteilen pflanzlicher Nahrung, z. B. bei einer Birne, unterscheiden kann. Diese Wahrnehmung, hervorgerufen durch Mechanorezeptoren in der Wange, scheint auch bei hypsodonten Herbivoren zu existieren und deckt sich mit Ergebnissen von Massey et al. (2009). Da Phytolithe nicht als hauptsächlicher Grund für Zahnabnutzung fungieren, ist die Theorie der Nachahmung von sandhaltigen Partikeln denkbar, da einerseits der Konsum der Pflanze gestoppt wird (Fraßabwehr) und andererseits der Zahnverschleiß des Konsumenten vermieden wird (Lucas et al. 2014).

Die These einer Fraßabwehrstrategie gegenüber Fressfeinde mit hypsodonte Bezahnung konnte bisher nicht direkt nachgewiesen werden (Damuth und Janis 2011).

Es können lediglich Fraßpräferenzen bei Hausschafen, die Gräser mit verschiedenen Kieselsäurekonzentrationen bekommen, festgestellt werden (Massey et al. 2009): „... Die Schafe fraßen länger, sie bissen häufiger ab und sie hatten eine höhere Bissrate bei dem Gras mit den geringsten Kieselsäurekonzentrationen ...“ (Massey et al. 2009).

Demgegenüber zeigen die Studien von Müller et al. (2014a, 2014b), dass die phytolith-enthaltende Nahrung von den Versuchstieren toleriert und keine Abneigung zu dieser festgestellt wird.

5.5 Limitierungen

Um den Einfluss von Phytolithen auf die Occlusionsfläche von Dentitionen abzuschätzen, wurde die Härte als Indikator der Materialeigenschaften von

Phytolithen bestimmt. Weitere Materialeigenschaften, die ebenfalls eine Rolle bei der Zahnabnutzung durch mineralische Partikel spielen könnten, sind z. B. Dichte, Elastizität und Festigkeit sowie die chemische Zusammensetzung. Die ermittelten Phytolithhärten unterstützen daher nur den theoretischen Ansatz, dass Abrieb grundsätzlich auf der Occlusionsfläche von Säugetierdentitionen möglich ist.

Die Präparation nativer Phytolithe für das ausgewählte Härteverfahren ist kompliziert und sehr aufwendig, da die Phytolithe mikroskopisch klein sind und aufgrund ihrer molekularen Struktur eine mögliche Dehydrierung erfahren können. Aufgrund dessen sind die Datensätze der Phytolithhärten sehr klein (Kapitel 2.6.1, 4.6.1).

Da Phytolithe aus zahlreichen Silikat-Aggregaten bestehen (Kapitel 3), besteht die Option, dass mit der Nanoindentation womöglich nur der Zusammenhalt der Aggregate, nicht jedoch die Härte der Aggregate selbst getestet wird. Die Entwicklung eines stärker auf die Silikataggregatgeometrie angepassten Prüfverfahrens sowie eine verbesserte Fixierung wäre wünschenswert, um so noch deutlicher ausschließen zu können, dass die Materialeigenschaft des zu prüfenden Partikels unbeeinflusst ist.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

6.1 Schlussfolgerung

Die Härte von Phytolithen in Poaceen ist standortunabhängig. Zwar zeigt sich eine angeregte Phytolith-Bildung auf umweltbedingte Faktoren, wie Wasser- oder Silikatverfügbarkeit (Schaller et al. 2012, Massey et al. 2006), jedoch ist die Materialeigenschaft Härte ein unbeeinträchtigter Faktor.

An nativ präparierten Phytolithen aus dem neu entwickelten Wasser-Siede-Aufschluss können Materialeigenschaften, insbesondere Härtebestimmungen mit Nanoindentation, durchgeführt werden.

Die ermittelten Phytolithhärten aus dieser Arbeit sind im ähnlichen Messbereich wie die Härtebestimmungen von Sanson et al. (2007) und Lucas et al. (2013) und bestätigen deren Ergebnisse. Es wird abgeleitet, dass die standortbedingenden Faktoren in der Charakterisierung der Materialeigenschaften von Phytolithen vernachlässigt werden können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit leisten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Phytolithbildung und den Materialeigenschaften von Phytolithen. Die untersuchten Phytolithe zeigen eine härtere Materialeigenschaft als Dentin und können dieses in Folge dessen abradieren. Sie sind jedoch weicher als Zahnschmelz. Die Zahnabnutzung durch Phytolithe ist somit auf Basis der Materialeigenschaften möglich und wird von Müller et al. (2014a, 2014b) in kontrollierten Fütterungsexperimenten bestätigt.

6.2 Ausblick

In Untersuchungen zum Prozess der Zahnabnutzung bedarf es weiterer Versuche, in der z. B. ein exemplarischer Nahrungsbrei im Fokus stehen könnte. Die unbekannt Parameter des Nahrungsbreies, wie Viskosität, Partikelgrößen und weitere mögliche abrasiv wirkende Pflanzeninhaltsstoffe (z. B. Lignin, Cellulose) könnten nach der Mengen- und Materialeigenschaftsbestimmung weiteren Aufschluss über das Abrasivitätsverhalten der Nahrung geben. Darüber hinaus könnten kontrollierte tribomastikatorische Versuche als ein *ex vivo* durchgeführtes Experiment Einblicke in den Kauvorgang geben.

In vivo durchgeführte kontrollierte Fütterungsexperimente, wie sie von Müller et al. (2014a, 2014b) publiziert werden, sind auch zukünftig die experimentelle Basis für die Untersuchung von Zahnabnutzungen herbivorer Mammalia. Ergebnisse der Mesowear-, Mikrowear- und Mikroweartextur- und Oberflächentexturanalysen, die die Zahnabnutzung von hypsodonten oder brachyodonten Zähnen untersuchen, können so mit direkten Versuchen getestet werden (Müller et al. 2014a).

Danksagung

Meinem größten Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas M. Kaiser für die Initiierung des Forschungsprojektes und der Möglichkeit durch dieses meine Promotion abzuschließen. Ich bedanke mich darüber hinaus herzlich für die stetige Motivation für das Thema sowie die immer währende Unterstützung und Loyalität in wirklich jeder Situation.

Für die Durchführung des botanischen Teils meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Lieberei danken, dessen oft weise gesprochenen Worte mich bis heute begleiten.

Ich bedanke mich des Weiteren besonders bei Frau Dr. Ellen Schulz-Kornas, Frau Dr. Barbara Rudolph und Daniela Winkler für die immer sofortige Hilfe bei meiner Arbeit und seelische Unterstützung in schwierigen Zeiten. Gleichzeitig sei hier allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Säugetiere“ (Biozentrum Grindel und Zoologisches Museum Hamburg) und „Biodiversität, Evolution und Ökologie der Pflanzen“ (Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten Hamburg) gedankt.

Für das Durchführen von Messungen und umfangreiche technische Diskussionen danke ich herzlich Herrn Dr. Gerhard Kalinka, Dr. Michael Griepentrog und Philipp Reinstädt (Bundesanstalt für Materialforschung und –Prüfung, Berlin).

Für die immer währende Unterstützung und das aufrichtige Interesse an meinem Forschungsprojekt danke ich meiner Familie, besonders meinen Eltern Barbara Braune und Hans-Jürgen Braune sowie meinen engen Freunden.

Literaturverzeichnis

- Adatia, M. H. & Besford, R. T. (1986). The Effects of Silicon on Cucumber Plants grown in Recirculating Nutrient Solution. *Annals of Botany* **58**, 343-351.
- Angiosperm Phylogeny Group. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**, 399-436.
- Baker, G., Jones, L. H. P. & Wardrop, I. D. (1959). Cause of Wear in Sheeps' Teeth. *Nature* **184**, 1583-1584.
- Barboni, D., Bonnefille, R., Alexandre, A. & Meunier, J. D. (1999). Phytoliths as paleoenvironmental indicators, west side Middle Awash Valley, Ethiopia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **152**, 87-100.
- Barboni, D., Bremond, L. & Bonnefille, R. (2007). Comparative study of modern phytolith assemblages from inter-tropical Africa. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **246**, 454-470.
- Barczy, A., Golyeva, A. A. & Peto, Á. (2009). Palaeoenvironmental reconstruction of Hungarian kurgans on the basis of the examination of palaeosoils and phytolith analysis. *Quaternary International* **193**, 49-60.
- Bargel, H.-J. & Schulze, G. (1999). *Werkstoffkunde*, Springer, Berlin Heidelberg.
- Bengtsson, H. (2010). R.utils: Various Programming Utilities. <http://CRAN.R-project.org/package=R.utils> (letzter Zugriff 01.06.10).
- Bowdery, D. (1989). Phytolith Analysis: Introduction and Applications. In *Plants in Australian archaeology* (Beck, W., Clarke, A. & Head, L., eds.), pp. 161-196. Anthropology Museum, University of Queensland, Queensland.
- Braune, C., Lieberei, R., Steinmacher, D. & Kaiser, T. M. (2012). A simple microwave extraction method for the isolation and identification of plant opal phytoliths. *Biologia* **67**, 927-930.
- Bremond, L., Alexandre, A., Wooller, M. J., Hély, C., Williamson, D., Schäfer, P. A., Majule, A. & Guiot, J. (2008). Phytolith indices as proxies of grass subfamilies on East African tropical mountains. *Global and Planetary Change* **61**, 209-224.
- Bugalho, M. N., Milne, J. A. & Racey, P. A. (2001). The foraging ecology of red deer (*Cervus elaphus*) in a Mediterranean environment: is a larger body size advantageous? *Journal of Zoology* **255**, 285-289.
- Casebeer, R. L. & Koss, G. G. (1970). Food habits of wildebeest, zebra, hartebeest and cattle in Kenya Masailand. *East African Journal* **8**, 25-36.
- Chudoba, T. & Griepentrog, M. (2005). Comparison between conventional Vickers hardness and indentation hardness obtained with different instruments. *Zeitschrift für Metallkunde* **96**, 1242-1246.
- Damuth, J. & Janis, C. M. (2011). On the relationship between hypsodonty and feeding ecology in ungulate mammals, and its utility in palaeoecology. *Biological Reviews* **86**, 733-758.
- Dunnett, C. W. (1980). Pairwise multiple comparisons in the unequal variance case. *Journal of American Statistical Association* **75**, 796-800.

- Epstein, E. (1994). Review. The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* **91**, 11-17.
- Epstein, E. (1999). SILICON. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 641-664.
- Fortelius, M. & Solounias, N. (2000). Functional characterization of ungulate molars using the abrasion-attrition wear gradient: a new method for reconstructing paleodiets. *American Museum Novitates* **3301**, 1-36.
- Grass Phylogeny Working Group. (2001). Phylogeny and Subfamilial Classification of the Grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **88**, 373-457.
- Herrero, J., García-Serrano, A., Couto, S., Ortuño, V. & García-González, R. (2006). Diet of wild boar *Sus scrofa* L. and crop damage in an intensive agroecosystem. *European Journal of Wildlife Research* **52**, 245-250.
- Højsgaard, S., Wright, K. & Leidi, A. A. (2010). doBy: Groupwise Computations of Summary Statistics, General Linear Contrasts and Other Utilities. <http://CRAN.R-project.org/package=doBy> (letzter Zugriff 01.06.10).
- Janis, C. M. & Fortelius, M. (1988). On the means whereby mammals achieve increased functional durability of their dentitions, with special reference to limiting factors. *Biological Reviews* **63**, 197-230.
- Jones, L. H. P. & Handreck, K. A. (1965). Studies of silica in the oat plant: III. Uptake of silica from soils by the plant. *Plant soil* **23**, 79-96.
- Jones, L. H. P. & Milne, A. A. (1963). Studies of Silica in the Oat Plant: I. Chemical and Physical Properties of the Silica. *Plant and Soil* **18**, 207-220.
- Kaiser, T. M. & Brinkmann, G. (2006). Measuring dental wear equilibriums - the use of industrial surface texture parameters to infer the diets of fossil mammals. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **239**, 221-240.
- Kaiser, T. M., Müller, D. W. H., Fortelius, M., Schulz, E., Codron, D. & Clauss, M. (2013). Hypsodonty and tooth facet development in relation to diet and habitat in herbivorous ungulates: implications for understanding tooth wear. *Mammal Review* **43**, 34-46.
- Kappe, C. O. (2004). Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition* **43**, 6250-6284.
- Kaufman, P. B., Dayanandan, P., Takeoka, Y., Bigelow, J. D., Jones, J. D. & Iler, R. (1981). Silica in Shoots of Higher Plants. In *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems* (Simpson, T. L. & Volcani, B. E., Hrsg.), pp. 409-449. Springer-Verlag, New York.
- Kaufman, P. B., Petering, L. B. & Smith, J. G. (1970). Ultrastructural development of cork-silica cell pairs in *Avena* internodal epidermis. *Botanical Gazette* **131**, 173-185.
- Lanning, F. C., Ponnaiya, B. W. X. & Crumpton, C. F. (1958). The Chemical Nature of Silica in Plants. *Plant Physiology* **33**, 339-343.

Lucas, P. W., Omar, R., Al-Fadhalah, K., Almusallam, A. S., Henry, A. G., Michael, S., Thai, L. A., Watzke, J., Strait, D. S. & Atkins, A. G. (2013). Mechanisms and causes of wear in tooth enamel: implications for hominin diets. *Journal of The Royal Society Interface* **10**.

Lucas, P. W., van Casteren, A., Al-Fadhalah, K., Almusallam, A. S., Henry, A. G., Michael, S., Watzke, J., Reed, D. A., Diekwisch, T. G. H. & Strait, D. S. (2014). The role of dust, grit and phytoliths in tooth wear. *Annales Zoologici Fennici* **51**, 143-152.

Luciani, T. J. (2009). RSvgDevice: An R SVG Graphics Device. <http://www.darkridge.com/wjake/RSvg/> (letzter Zugriff 01.06.10).

Ma, J., Nishimura, K. & Takahashi, E. (1989). Effect of Silicon on the Growth of Rice Plant at Different Growth Stages. *Soil Science and Plant Nutrition* **35**, 347-356.

Ma, J.-F. & Takahashi, E. (2002). *Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan*, Elsevier, Amsterdam.

Ma, J. F. (2004). Role of Silicon in Enhancing the Resistance of Plants to Biotic and Abiotic Stresses *Soil Science and Plant Nutrition* **50**, 11-18.

Ma, J. F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y. & Yano, M. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature* **440**, 688-691.

Ma, J. F. & Yamaji, N. (2006). Silicon uptake and accumulation in higher plants. *TRENDS in Plant Science* **11**, 392-397.

Madella, M., Jones, M. K., Echlin, P., Powers-Jones, A. & Moore, M. (2009). Plant water availability and analytical microscopy of phytoliths: Implications for ancient irrigation in arid zones. *Quaternary International* **193**, 32-40.

Massey, F. P., Ennos, A. R. & Hartley, S. E. (2006). Silica in grasses as a defence against insect herbivores: contrasting effects on folivores and a phloem feeder *Journal of Ecology* **75**, 595-603.

Massey, F. P. & Hartley, S. E. (2006). Experimental demonstration of the antiherbivore effects of silica in grasses: impacts on foliage digestibility and vole growth rates *Proceedings of the Royal Society, Series B* **273**, 2299-2304.

Massey, F. P., Massey, K., Roland Ennos, A. & Hartley, S. E. (2009). Impacts of silica-based defences in grasses on the feeding preferences of sheep. *Basic and Applied Ecology* **10**, 622-630.

Mau, M., Müller, C., Langbein, J., Rehfeldt, C., Hildebrandt, J.-P. & Kaiser, T. M. (2006). Adhesion of bovine and goat salivary proteins to dental enamel and silicate. *Archiv für Tierzucht* **49**, 439-446.

McNaughton, S. J., Tarrants, J. L., McNaughton, M. M. & Davis, R. D. (1985). Silica as a Defense against Herbivory and a Growth Promotor in African Grasses. *Ecology* **66**, 528-535.

Merceron, G., Viriot, L. & Blondel, C. (2004). Tooth microwear pattern in roe deer (*Capreolus capreolus* L.) from Chizé (Western France) and relation to food composition. *Small Ruminant Research* **53**, 125-138.

Mouissie, A. M., Veen, G. F. & Van Diggelen, R. (2004). Seed dispersal by roe deer, red deer and fallow deer: a survey of pellet groups and the digestive tract of shot deer. In *Seed dispersal by large*

- herbivores. Implications for the restoration of plant biodiversity. Proefschrift* (Mouissie, A. M., Hrsg.), pp. 53-62. Van Denderen b.v., Groningen.
- Müller, J., Clauss, M., Codron, D., Schulz, E., Hummel, J., Fortelius, M., Kircher, P. & Hatt, J.-M. (2014a). Growth and wear of incisor and cheek teeth in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) fed diets of different abrasiveness. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **321**, 283-298.
- Müller, J., Clauss, M., Codron, D., Schulz, E., Hummel, J., Kircher, P. & Hatt, J.-M. (2014b). Tooth length and incisal wear and growth in guinea pigs (*Cavia porcellus*) fed diets of different abrasiveness. *Journal of animal physiology and animal nutrition*.
- Naumann, C. & Bassler, R. (1993). Die Bestimmung der Säure-Detergentien-Faser (ADF). In *Band 3: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln : 3. Ergänzungslieferung, Verb. Dt. Landwirtschaftl. Untersuchungs- u. Forschungsanst. VDLUFA-Verlag, Darmstadt*.
- Naumann, C. & Bassler, R. (1997). Methodennummer 3.1 Feuchtigkeit. In *Band 3: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln : 4. Ergänzungslieferung, Verb. Dt. Landwirtschaftl. Untersuchungs- u. Forschungsanst. VDLUFA-Verlag, Darmstadt*.
- Oliver, W. C. & Pharr, G. M. (1992). Improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research* **7**, 1564-1583.
- Owaga, M. L. (1975). The feeding ecology of wildebeest and zebra in Athi-Kaputei plains. *African Journal of Ecology* **13**, 375-383.
- Pereladova, O. B., Sempere, A. J., Soldatova, N. V., Dutov, V. U., Fisenko, G. & Flint, V. E. (1999). Przewalski's horse - adaptation to semi-wild life in desert conditions. *Oryx* **33**, 47-58.
- Petrak, M., Schwarz, R., Graumann, F. & Frielingsdorf, F. (1991). Nischenbreite und Nischenüberlappung bei der Nahrungswahl von Damhirsch (*Cervus dama* Linné, 1758) und Reh (*Capreolus capreolus capreolus* Linné, 1758). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* **37**, 1-12.
- Piperno, D. R. (2006). *Phytoliths. A Comprehensive Guide for Archaeologists and Paleoecologists*, Altamira Press. A Division of Rowman & Littlefield Publishers, Inc., Lanham.
- Pironon, J., Meunier, J. D., Alexandre, A., Mathieu, R., Mansuy, L., Grosjean, A. & Jarde, E. (2001). Individual characterization of phytoliths: Experimental approach and consequences on paleoenvironment understanding. In *Phytoliths: Applications in Earth Sciences and Human History* (Meunier, J. D. & Colin, F., Hrsg.), pp. 329-341. A.A. Balkema Publishers, Lisse.
- Richter, D. (1992). *Allgemeine Geologie*, de Gruyter, Berlin.
- Rivals, F. & Deniaux, B. (2005). Investigation of human hunting seasonality through dental microwear analysis of two Caprinae in late Pleistocene localities in Southern France. *Journal of Archaeological Science* **32**, 1603-1612.
- Rosen, A. M. & Weiner, S. (1994). Identifying Ancient Irrigation: a New Method Using Opaline Phytoliths from Emmer Wheat. *Journal of Archaeological Science* **21**, 125-132.
- Runge, F. (2000). *Opal-Phytolithe in den Tropen Afrikas und ihre Verwendung bei der Rekonstruktion paläoökologischer Umweltverhältnisse*, Books on Demand GmbH, Paderborn.

- Sangster, A. G. & Parry, D. W. (1981). Ultrastructure of Silica Deposits in Higher Plants. In *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems* (Simpson, T. L. & Volcani, B. E., Hrsg.), pp. 383-407. Springer-Verlag, New York.
- Sanson, G. D., Kerr, S. A. & Gross, K. A. (2007). Do silica phytoliths really wear mammalian teeth? *Journal of Archaeological Science* **34**, 526-531.
- Schaller, J., Brackhage, C., Gessner, M. O., Bäuker, E. & Dudel, E. G. (2012). Silicon supply modifies C:N:P stoichiometry and growth of *Phragmites australis*. *Plant Biology* **14**, 392-396.
- Schley, L. & Roper, T. J. (2003). Diet of wild boar *Sus scrofa* in Western Europe, with particular reference to consumption of agricultural crops. *Mammal Review* **33**, 43-56.
- Schmidt, M., Sommer, K., Kriebitzsch, W.-U., Ellenberg, H. & Oheimb, G. v. (2004). Dispersal of vascular plants by game in northern Germany. Part I: Roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boar (*Sus scrofa*). *European Journal of Forest Research* **123**, 167-176.
- Schulz, E., Calandra, I. & Kaiser, T. M. (2010). Applying tribology to teeth of hoofed mammals. *Scanning* **32**, 162-182.
- Schulz, E., Calandra, I. & Kaiser, T. M. (2013c). Feeding ecology and chewing mechanics in hoofed mammals: 3D tribology of enamel wear. *Wear* **300**, 169-179.
- Schulz, E., Fraas, S., Kaiser, T. M., Cunningham, P. L., Ismail, K. & Wronski, T. (2013b). Food preferences and tooth wear in the sand gazelle (*Gazella marica*). *Mammalian Biology* **78**, 55-62.
- Schulz, E., Piotrowski, V., Clauss, M., Mau, M., Merceron, G. & Kaiser, T. M. (2013a). Dietary abrasiveness is associated with variability of microwear and dental surface texture in rabbits. *PLoS ONE* **8**, e56167.
- Solounias, N. & Dawson-Saunders, B. (1988). Dietary adaptations and paleoecology of the late Miocene ruminants from Pikermi and Samos in Greece. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **65**, 149-172.
- Solounias, N. & Hayek, L.-A. C. (1993). New methods of tooth microwear analysis and application to dietary determination of two extinct antelopes. *Journal of Zoology* **229**, 421-445.
- Steuter, A. A., Steinauer, E. M., Hill, G. L., Bowers, P. A. & Tieszen, L. L. (1995). Distribution and Diet of Bison and Pocket Gophers in a Sandhills Prairie. *Ecological Applications* **5**, 756-766.
- Stevens, D. R. (1966). Range relationships of elk and livestock, Crow Creek Drainage, Montana. *The Journal of Wildlife Management* **30**, 349-363.
- Stewart, D. R. M. & Stewart, J. (1970). Food preference data by faecal analysis for African plains ungulates. *Zoologica Africana* **15**, 115-129.
- Suter, H.-P. (2010). xlsReadWrite: Natively Read and Write Excel Files. <http://CRAN.R-project.org/package=xlsReadWrite> (letzter Zugriff 01.06.10).
- Teaford, M. F. (1988). A review of dental microwear and diet in modern mammals. *Scanning Microscopy* **2**, 1149-1166.

Ungar, P. S., Brown, C. A., Bergstrom, T. S. & Walker, A. (2003). Quantification of Dental Microwear by Tandem Scanning Confocal Microscopy and Scale,ÄSensitive Fractal Analyses. *Scanning* **25**, 185-193.

Walker, A., Hoeck, H. N. & Perez, L. (1978). Microwear of mammalian teeth as an indicator of diet. *Science* **201**, 908-910.

Weißbach, W. (2007). *Werkstoffkunde*. 16. Auflage, Vieweg, Wiesbaden.

Wießmann, H. (1925). Hat Kieselsäure bei unzureichender Phosphorsäureernährung einen Einfluß auf den morphologischen und anatomischen Bau des Roggenhalmes? *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Düngung, A, Wissenschaftlicher Teil* **4**, 73-83.

Wilcox, R. R. (2003). *Applying Contemporary Statistical Techniques*, Academic Press, San Diego.

Wilcox, R. R. (2005). *Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing*, 2. Auflage, Elsevier Academic Press, Burlington.

Wilcox, R. R. & Schönbrodt, F. D. (2010). *The WRS Package for Robust Statistics in R*. <http://r-forge.r-project.org/projects/wrs/> (letzter Zugriff 27.04.11).

Wu, Y., Wang, C. & Hill, D. V. (2012). The transformation of phytolith morphology as the result of their exposure to high temperature. *Microscopy Research and Technique* **75**, 852-855.

Xu, W., Xia, C., Yang, W., Blank, D. A., Qiao, J. & Liu, W. (2012). Seasonal diet of Khulan (Equidae) in Northern Xinjiang, China. *Italian Journal of Zoology* **79**, 92-99.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADF	Säure-Detergenzien Faser (Acid Detergent Fiber)
BEP-Clade	Bambusoideae-Erhartoideae-Pooideae-Clade (Grass Phylogeny Working Group 2001)
cm	Zentimeter
g	Gramm
GPa	Gigapascal
h	Stunde
HK	Härte nach Knoop
HV	Härte nach Vickers
kV	Kilovolt
L	Liter
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
µm	Mikrometer
n	Anzahl
N	Newton
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
p	Signifikanzwert
PACCAD-Clade	Panicoideae-Arundinoideae-Chloridoideae- Centothecoideae-Aristidoideae-Danthonioideae-Clade (Grass Phylogeny Working Group 2001)
Population A	10 mg SiO ₂ /L
Population B	100 mg SiO ₂ /L
PP-Folie	Polypropylen-Folie
s	Sekunde

Si	Silizium
SiO ₂	Siliziumdioxid
SiO ₂ *nH ₂ O	Silikatgel, Opal
Si(OH) ₄	Kieselsäure
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
U	Umdrehungen
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
W	Watt
zit.	zitiert

Anhang

Tab. 2 Ergebnisse zu der in 1.4.7 beschriebenen statistischen Auswertung mit „R“ zur Abb. 3 (WuH: Wuchshöhe, BM: Biomasse, SiO₂: SiO₂-Gehalt, n: Anzahl, m: Mittelwert, s: Standardabweichung)

	SiO ₂ -Konzentration	WuH: n	WuH: m	WuH: s	BM: n	BM: m	BM: s	SiO ₂ : n	SiO ₂ : m	SiO ₂ : s
<i>Aegilops cylindrica</i>	0	10	55.6500	7.2899	10	13.1950	0.5955	3	0.4774	0.2235
	10	10	58.7500	6.3943	10	12.7790	0.4705	3	1.4542	0.2350
	100	10	61.8100	4.0948	10	13.5903	0.4007	3	3.3494	0.2056
<i>Festuca pratensis</i>	0	10	56.9100	6.8296	10	13.5721	0.8032	3	0.5808	0.0312
	10	10	55.6400	5.2918	10	13.3701	0.4946	3	0.9145	0.1229
	100	10	60.2800	6.3349	9	13.3385	0.4482	3	3.1656	0.1919
<i>Hordeum vulgare</i>	0	10	79.2800	6.3913	10	9.8934	0.2895	3	0.8639	0.3028
	10	10	75.7400	6.1205	10	9.7416	0.4021	3	1.0083	0.1511
	100	10	80.5900	6.3750	10	9.1993	0.4912	3	2.8622	1.2453
<i>Lolium perenne</i>	0	10	49.3400	3.4014	10	12.0552	0.9076	3	0.7077	0.0328
	10	10	49.2200	4.0854	10	11.5609	0.9944	4	0.8974	0.1864
	100	10	48.6400	4.6715	10	11.4206	0.6843	3	2.8088	0.2879
<i>Poa annua</i>	0	10	39.1900	3.3851	10	11.9074	0.7502	3	0.7314	0.1274
	10	10	43.6200	2.7247	10	11.7748	0.4516	4	0.8473	0.0882
	100	10	38.1000	1.6411	10	11.4212	0.5183	2	1.3346	0.1621
<i>Phragmites australis</i>	0	-	-	-	10	27.0857	1.7379	4	0.6394	0.3130
	10	-	-	-	10	27.2604	2.8179	4	0.9682	0.1228
	100	-	-	-	10	25.3915	1.1296	4	2.4954	0.3540
<i>Cynodon dactylon</i>	0	10	41.6400	2.6078	10	19.3008	1.4048	3	0.4592	0.0355
	10	10	45.8100	4.1453	10	23.8279	2.2455	4	0.5740	0.0845
	100	10	46.1300	6.2170	10	21.4420	2.3259	4	1.6734	0.2189
<i>Panicum virgatum</i>	0	10	70.0600	5.0425	10	20.5273	1.4449	4	0.6800	0.6623
	10	10	68.6000	5.0365	10	21.5259	1.6704	3	0.5916	0.2486
	100	10	65.1300	3.9421	9	20.2635	1.6770	3	2.4758	0.0738
<i>Themeda triandra</i>	0	10	45.1900	4.9190	10	23.6337	1.3559	3	0.7825	0.5484
	10	10	52.8600	5.8532	10	23.5973	1.6802	3	1.8664	1.0083
	100	10	55.8200	4.9960	10	24.3042	1.5501	2	2.9811	0.1713
<i>Erysimum diffusum</i>	0	10	14.0800	1.2090	10	11.3127	0.8888	3	0.3005	0.1217
	10	10	18.1300	1.4499	10	11.0282	0.5498	3	0.3896	0.2686
	100	10	18.7600	1.7564	10	9.7215	3.4849	3	1.0433	0.3232
<i>Trifolium repens</i>	0	5	17.5200	2.4438	5	11.2543	0.7661	1	0.9600	-
	10	10	25.9500	3.9475	10	11.8400	1.1273	3	0.7154	0.6578
	100	10	27.4600	3.9945	10	12.1783	1.0151	3	0.6579	0.6587
<i>Chenopodium album</i>	0	10	15.1100	1.3237	10	9.9789	1.1647	2	0.0496	0.0147
	10	10	17.0400	0.5892	10	11.1204	0.5813	2	-0.2358	0.5574
	100	10	19.8400	1.2456	10	11.1861	0.5250	3	0.4435	0.2955

Tab. 3 Ergebnisse zu der in 1.4.7 beschriebenen statistischen Auswertung mit „R“ zur Abb. 3 (WuH: Wuchshöhe, BM: Biomasse, FG: Freiheitsgrade, p: Signifikanzniveau)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Test Wert WuH	p	FG	Test Wert BM	p	FG	Test Wert SiO ₂ -Gehalt	p	FG
<i>Aegilops cylindrica</i>	0	10	1.0109	0.32566339	17.6993	1.7332	0.1011	17.0854	5.2171	0.0065	3.9899
	0	100	2.3298	0.03510510	14.1652	1.7416	0.1010	15.7623	16.3800	0.0001	3.9727
	10	100	1.2744	0.22151756	15.3190	4.1514	0.0006	17.5545	10.5107	0.0005	3.9307
<i>Festuca pratensis</i>	0	10	0.4648	0.64796598	16.9434	0.6771	0.5087	14.9669	4.5578	0.0357	2.2561
	0	100	1.1440	0.26768292	17.8992	0.7927	0.4409	14.3707	23.0275	0.0014	2.1054
	10	100	1.7776	0.09290138	17.4472	0.1461	0.8855	16.9970	17.1082	0.0002	3.4048
<i>Hordeum vulgare</i>	0	10	1.2650	0.22202617	17.9664	0.9688	0.3468	16.3542	0.7390	0.5145	2.9385
	0	100	0.4589	0.65179704	17.9999	3.8499	0.0017	14.5797	2.7008	0.1013	2.2356
	10	100	1.7355	0.09977701	17.9702	2.7017	0.0149	17.3245	2.5598	0.1212	2.0589
<i>Lolium perenne</i>	0	10	0.0714	0.94390568	17.4277	1.1610	0.2609	17.8520	1.9944	0.1331	3.2449
	0	100	0.3831	0.70657400	16.4491	1.7655	0.0957	16.7335	12.5596	0.0057	2.0520
	10	100	0.2955	0.77101995	17.6860	0.3676	0.7180	15.9632	10.0307	0.0015	3.2416
<i>Poa annua</i>	0	10	3.2238	0.00492279	17.2141	0.4791	0.6389	14.7648	1.3515	0.2593	3.4050
	0	100	0.9163	0.37620620	13.0093	1.6861	0.1112	15.9965	-	-	-
	10	100	5.4879	0.00006599	14.7707	1.6264	0.1216	17.6690	-	-	-
<i>Phragmites australis</i>	0	10	-	-	-	0.1669	0.8697	14.9813	1.9558	0.1239	3.9025
	0	100	-	-	-	2.5848	0.0204	15.4529	7.8549	0.0002	5.9113
	10	100	-	-	-	1.9467	0.0757	11.8198	8.1507	0.0017	3.7119
<i>Cynodon dactylon</i>	0	10	0.4648	0.64796598	16.9434	5.4049	0.0001	15.1088	2.4444	0.0675	4.2251
	0	100	1.1440	0.26768292	17.8992	2.4919	0.0251	14.7949	10.9053	0.0012	3.2079
	10	100	1.7776	0.09290138	17.4472	2.3338	0.0314	17.9778	9.3716	0.0008	3.8749
<i>Panicum virgatum</i>	0	10	0.6478	0.52528545	18.0000	1.4297	0.1703	17.6343	0.2448	0.8186	4.0204
	0	100	2.4357	0.02615476	17.0093	0.3655	0.7196	15.9372	5.3787	0.0116	3.0988
	10	100	1.7157	0.10437161	17.0180	1.6414	0.1193	16.7758	12.5838	0.0033	2.3495
<i>Themeda triandra</i>	0	10	3.1723	0.00542165	17.4819	0.0532	0.9582	17.2309	1.6357	0.1978	3.0881
	0	100	4.7945	0.00014522	17.9957	1.0296	0.3171	17.6866	-	-	-
	10	100	1.2163	0.23994452	17.5667	0.9778	0.3412	17.8843	-	-	-
<i>Erysimum diffusum</i>	0	10	6.7839	0.00000279	17.4368	0.8610	0.4028	15.0072	0.5228	0.6398	2.7883
	0	100	6.9406	0.00000336	15.9654	1.3991	0.1915	10.1660	3.7247	0.0441	2.5561
	10	100	0.8747	0.39365180	17.3765	1.1712	0.2702	9.4477	2.6942	0.0564	3.8703
<i>Trifolium repens</i>	0	10	5.0810	0.00026361	12.0955	1.1846	0.2603	11.4068	-	-	-
	0	100	5.9509	0.00006323	12.1716	1.9682	0.0760	10.5062	-	-	-
	10	100	0.8503	0.40634745	17.9975	0.7052	0.4898	17.8056	0.1071	0.9199	4.0000
<i>Chenopodium album</i>	0	10	4.2124	0.00111725	12.4313	2.7730	0.0156	13.2225	-	-	-
	0	100	8.2293	0.00000017	17.9339	2.9882	0.0109	12.5119	-	-	-
	10	100	6.4259	0.00002389	12.8350	0.2654	0.7937	17.8159	-	-	-

Tab. 4 Ergebnisse zu der in 1.4.7 beschriebenen statistischen Auswertung mit „R“ zur Abb. 8 (n: Anzahl, m: Mittelwert, s: Standardabweichung)

	Härte: n	Härte: m	Härte: s
Phytolithe aus Veraschung (P_A)	24	1.897	0.826
Phytolithe aus Extraktion (P_WSA)	17	1.504	0.494
Epoxid-Harz (Ep)	19	0.219	0.070

Tab. 5 Ergebnisse zu der in 1.4.7 beschriebenen statistischen Auswertung mit „R“ zur Abb. 8 (FG: Freiheitsgrade, p: Signifikanzniveau)

Gruppe 1	Gruppe 2	Test Wert	FG	p
Epoxid-Harz (Ep)	Phytolithe Veraschung (P_A)	9.9115	23.4126	0.000000001
Epoxid-Harz (Ep)	Phytolithe Extraktion (P_WSA)	10.6356	16.5689	0.000000008
Phytolithe Veraschung (P_A)	Phytolithe Extraktio (P_WSA)	1.8965	38.1261	0.065489516

Tab. 6 Ergebnisse zu der in 1.4.7 beschriebenen statistischen Auswertung mit „R“ zur Abb. 11 (n: Anzahl, m: Mittelwert, s: Standardabweichung)

	Härte: n	Härte: m	Härte: s
Population A (P_10)	23	2.0313	0.9104
Population B (P_100)	29	2.5042	0.8766

Tab. 7 Ergebnisse zu der in 1.4.7 beschriebenen statistischen Auswertung mit „R“ zur Abb. 11 (FG: Freiheitsgrade, p: Signifikanzniveau)

Gruppe 1	Gruppe 2	Test Wert	FG	p
Population A (P_10)	Population B (P_100)	1.8911	46.4979	0.0649

Tab. 8 Eindringtiefen der Phytolithe zur Abb. 11

	Phytolith- nummer	Eindringtiefe (nm)	Indent (n)
P_10	6A_2	50-200	3
	6A_3	50-400	4
	6A_4	50-200	4
	6A_5_2	50-150	2
	6A_6	250-500	2
	6A_7	100-300	2
	6A_8	50-150	2
	6A_9	50-200	2
	6A_10	50-200	2
Summe	9		23
P_100	6B_1	100-250	2
	6B_2	100-300	3
	6B_3	100-200	2
	6B_4	50-150	3
	6B_5	50-150	3
	6B_6	100-200	2
	6B_7	100-250	3
	6B_8	150-300	2
	6B_9_1	50-100	2
	6B_9_2	50-100	3
	6B_9_3	50-100	2
6B_10	450-600	2	
Summe	12		29

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung über das selbstständige Verfassen der vorliegenden Dissertation:

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Texten entnommen sind, wurden unter Angabe der Quellen (einschließlich des World Wide Web) und nach den üblichen Regeln des wissenschaftlichen Zitierens nachgewiesen. Dies gilt auch für bildliche Darstellungen und dergleichen. Mir ist bewusst, dass wahrheitswidrige Angaben als Täuschungsversuch behandelt werden und dass bei einem Täuschungsverdacht sämtliche Verfahren der Plagiatserkennung angewandt werden können.

Hamburg, den 27.01.2015

(Ort, Datum Unterschrift)

