

Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz

Untersuchungen zur Wirkung metallischer Nanopartikel auf Pflanzen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften

(Dr. agr.)

der Landwirtschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von

Sebastian Fellmann

aus

Bad Dürkheim

Bonn 2019

Referent: *Professor Dr. Thomas Eichert*

Korreferent: *Professor Dr. Gabriel Schaaf*

Tag der mündlichen Prüfung: 12.08.19

Angefertigt mit Genehmigung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	VI
II.	Abbildungsverzeichnis	VII
III.	Tabellenverzeichnis	X
IV.	Zusammenfassung	XI
V.	Abstract	XII
1	Einleitung	1
1.1	Risikobewertung von Nanomaterialien	1
1.2	Einsatzmöglichkeiten von Nanomaterialien in der Pflanzenproduktion	2
1.3	Zielsetzungen und Hypothesen der Arbeit	6
2	Allgemeine Methoden	7
2.1	Verwendete Np-Suspensionen und Chemikalien	7
2.2	Untersuchungen der Stabilität der Ag-Np	8
2.3	Bestimmung der in der Ag-Np-Suspension enthaltenen Konzentration von Ag ⁺ -Ionen	8
2.4	Verwendete Pflanzenarten	8
2.5	Pflanzenanzucht und Wachstumsbedingungen	9
2.6	Tropfen- und Sprühapplikationen der Behandlungspräparate	10
2.7	Bestimmung der Konzentrationen verschiedener Elemente in der Pflanze	10
2.8	Gaswechsellmessungen	11
2.9	Trockenmassen-, Wurzellängen, Chlorophyllbestimmung	11
2.10	Bildaufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM)	12
2.11	Statistische Analysen und grafische Darstellungen	12
3	Einfluss von synthetisch hergestellten metallischen Np (Ag, TiO ₂ , ZnO) auf die Entwicklung von Pflanzen	13
3.1	Wirkung metallischer Np (Ag, TiO ₂ , ZnO), in Abhängigkeit der Dosis, auf die Keimfähigkeit und Sprossentwicklung von <i>Z. mays</i> im Vergleich zu den entsprechenden Bulk-Substanzen	13
3.1.1	Einleitung	13
3.1.2	Material & Methoden	13

3.1.3	Ergebnisse	14
3.1.4	Diskussion	18
3.2	Untersuchungen der Wirkung von Ag-Np auf das Wachstum von <i>Z. mays</i> in einer Nährlösung	21
3.2.1	Einleitung	21
3.2.2	Material & Methoden	21
3.2.3	Ergebnisse	21
3.2.4	Diskussion	23
3.3	Untersuchungen der Wirkung verschiedener Ag ⁺ -Ionen-Konzentrationen (AgNO ₃) auf das Wachstum und die Assimilations- und Transpirationsrate von <i>Z. mays</i>	24
3.3.1	Einleitung	24
3.3.2	Material & Methoden	24
3.3.3	Ergebnisse	24
3.3.4	Diskussion	25
3.4	Differenzierung zwischen ionischen (Ag ⁺) und „Ag-Np-Effekten“ auf das Wachstum und die Assimilations- und Transpirationsrate von <i>Z. mays</i> und <i>B. napus</i> unter Berücksichtigung der Expositionsdauer.	26
3.4.1	Einleitung	26
3.4.2	Material & Methoden	27
3.4.3	Ergebnisse	29
3.4.4	Diskussion	41
3.4.5	Zusammenfassende Diskussion - mögliche Ursachen der Effekte und Beurteilung der Silberaufnahme und -verlagerung in den Spross bei <i>B. napus</i> und <i>Z. mays</i>	44
3.5	Schlussfolgerung	47
4	Untersuchungen des Verhaltens von Kupfer- und Eisennanopartikeln auf Blattoberflächen	47
4.1	Untersuchungen des Einsatzes von metallischen Np zur Behebung von Nährstoffmängeln und zum protektiven Pflanzenschutz gegen echten Mehltau	47
4.1.1	Einleitung	47
4.1.2	Material & Methoden	48

4.1.3	Ergebnisse	52
4.1.4	Diskussion	69
4.2	Untersuchung der Ionenfreisetzung verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparate sowie der Kupferaufnahmemengen in das Blatt (<i>S. telephium</i>)	76
4.2.1	Einleitung	76
4.2.2	Material & Methoden	77
4.2.3	Ergebnisse	81
4.2.4	Diskussion	85
4.3	Zusammenfassende Diskussion.....	90
4.4	Schlussfolgerung	91
5	Fazit und Ausblick	92
5.1	Potentielle Wirkungen und Risiken von Nanomaterialien in Bezug auf Pflanzen.....	92
5.2	Zielgerichtete Einsatzmöglichkeiten von Nanomaterialien in der Pflanzenproduktion	93
6	Literaturverzeichnis.....	95
7	Danksagung.....	107

I. Abkürzungsverzeichnis

Np	Nanopartikel
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Uv-vis	Ultraviolettes und sichtbares Licht
R ²	Bestimmtheitsmaß
PPFD	Photosynthetic photon flux density (Photosynthetisch aktive Photonenflussdichte)
REM	Rasterelektronenmikroskop
GFS	Portable gas-exchange fluorescence system (Tragbares Gaswechsel Fluoreszenzsystem)
LED	Leuchdiode
ppm	(Parts per million) ein Millionstel
SPAD	Soil and Plant Analysis Department
p	Nominelles Signifikanzniveau
α	Signifikanzniveau
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Tab.	Tabelle
n	Anzahl der Wiederholungen
g	Schwerebeschleunigung (9,81 m/s ²)
deion.	Deionisiert
Da	Dalton

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einfluss von Ag-Np und Ag-Bulk (20-2000 mg l ⁻¹) auf die Keimrate (A) sowie das Wurzel- und Sprosswachstum (B) von <i>Z. mays</i> in Abhängigkeit von der Zeit (24-72 Stunden).....	15
Abbildung 2: Einfluss von TiO ₂ -Np und TiO ₂ -Bulk (20-2000 mg l ⁻¹) auf die Keimrate (A) sowie das Wurzel- und Sprosswachstum (B) von <i>Z. mays</i> in Abhängigkeit von der Zeit (22-72 Stunden).....	16
Abbildung 3: Einfluss von ZnO-Np (20-2000 mg l ⁻¹) und ZnO-Bulk (50-2000 mg l ⁻¹) auf die Keimrate (A+C) und auf das Wurzel- und Sprosswachstum (B+D) von <i>Z. mays</i> in Abhängigkeit von der Zeit (24-72 Stunden).	17
Abbildung 4: Einfluss der in den verschiedenen Np-Suspensionen enthaltenen stabilisierenden Hilfsstoffe auf das Wurzel- und Sprosswachstum von <i>Z. mays</i> in Petrischalen nach 24 und 48 Stunden.	18
Abbildung 5: <i>Z. mays</i> 24 Stunden nach Einstellung verschiedener Ag-Np-Konzentrationen in den Nährlösungen.	22
Abbildung 6: Einfluss von Ag-Np auf das Wurzelwachstum (A) von <i>Z. mays</i> nach 48 Stunden und auf die Trockenmasse (B) nach 5 Tagen.	23
Abbildung 7: Experiment 1 (A-C): Einfluss verschiedener Ag ⁺ -Ionen-Konzentrationen (0-1000 µg l ⁻¹) auf die Transpirations- und Assimilationsrate (2-6 Tage nach Applikation) sowie die Trockenmasse (9 Tage nach der Applikation) von <i>Z. mays</i>	25
Abbildung 8: Menge an gelösten Ag ⁺ -Ionen in Abhängigkeit von der Ag-Np-Konzentration (A). Absorptionsspektrum einer vollständigen Nährlösung (enthält zusätzlich 1 mM CaCl ₂) nach der Einstellung verschiedener Ag-Np-Konzentrationen (0, 2, 6, 10 mg l ⁻¹) ohne Pflanzen über einen Zeitraum von 24 Stunden.	27
Abbildung 9: Transpirations-, Assimilationsrate (A+B) und Trockenmasse (C) von <i>Z. mays</i> 24 Stunden (Transpirations- und Assimilationsrate) und 72 Stunden (Trockenmasse) nach Zugabe von Ag-Np (6 mg l ⁻¹) und AgNO ₃ (0,42 mg l ⁻¹ Ag ⁺ -Ionen) mit oder ohne CaCl ₂ (1 mM) in die Nährlösung.	31
Abbildung 10: Ag-Konzentrationen (A) und -Entzüge (B) des Sprosses von <i>Z. mays</i> (Entwicklungsstadium: 5 Wochen) 72 Stunden nach der Zugabe von Ag-Np (6.0 mg l ⁻¹) und AgNO ₃ (0,42 mg l ⁻¹ Ag ⁺ -Ionen) mit oder ohne CaCl ₂ (1 mM) in die Nährlösung.	32
Abbildung 11: Wurzellängen (A) und Trockenmassen (B) von <i>Z. mays</i> (Entwicklungsstadium: 3 Wochen), 8 Tage nach der Zugabe von Ag-Np (6.0 mg l ⁻¹) und AgNO ₃ (0.42 mg l ⁻¹ Ag ⁺ -Ionen) mit oder ohne CaCl ₂ (1 mM) in die Nährlösung.	33

Abbildung 12: Ag-Konzentrationen und Entzüge des Sprosses (A+B) und der Wurzel (C+D) von <i>Z. mays</i> (Entwicklungsstadium: 3 Wochen) 8 Tage nach der Zugabe von Ag-Np (6.0 mg l ⁻¹) und AgNO ₃ (0,42 mg l ⁻¹ Ag ⁺ -Ionen) mit oder ohne CaCl ₂ (1 mM) in die Nährlösung.....	34
Abbildung 13: A: Vergleich der oberirdischen Pflanzenteile von <i>Z. mays</i> 8 Tage nach Zugabe verschiedener Präparate (in der Reihenfolge von links beginnend): „Kontrolle+CaCl ₂ “, „Ag-Np“, „Ag-Np+CaCl ₂ “, „AgNO ₃ “und „AgNO ₃ +CaCl ₂ “ in die Nährlösung.	35
Abbildung 14: P-Konzentrationen und -Entzüge des Sprosses (A und B) und der Wurzel (C und D) von <i>Z. mays</i> (Entwicklungsstadium: 3 Wochen) 8 Tage nach der Zugabe von Ag-Np (6.0 mg l ⁻¹) und AgNO ₃ (0,42 mg l ⁻¹ Ag ⁺ -Ionen) mit oder ohne CaCl ₂ (1mM) in der Nährlösung.	36
Abbildung 15: Fe-Konzentrationen und -Entzüge des Sprosses (A und B) und der Wurzel (C und D) von <i>Z. mays</i> (Entwicklungsstadium: 3 Wochen) 8 Tage nach der Zugabe von Ag-Np (6.0 mg l ⁻¹) und AgNO ₃ (0,42 mg l ⁻¹ Ag ⁺ -Ionen) mit oder ohne CaCl ₂ (1 mM) in die Nährlösung.....	37
Abbildung 16: Transpirations-, Assimilationsrate (A+B) und Trockenmasse (C) von <i>B. napus</i> 3-96 Stunden (Transpirations- und Assimilationsrate) und 7 Tage (Trockenmasse) nach Zugabe von Ag-Np (6.0 mg l ⁻¹) und AgNO ₃ (0,42 mg l ⁻¹ Ag ⁺ -Ionen) mit oder ohne CaCl ₂ (1 mM) in die Nährlösung.	39
Abbildung 17: Vergleich einzelner Blätter (<i>B. napus</i>) 7 Tage nach Zugabe der verschiedenen Präparate: Kontrolle+CaCl ₂ (A), „Ag-Np“(B), „Ag-Np+CaCl ₂ “ (C), „AgNO ₃ “(D), „AgNO ₃ +CaCl ₂ “ (E) in die Nährlösung.	40
Abbildung 18: Ag-Konzentrationen (A) und Entzüge (B) des Sprosses von <i>B. napus</i> (Entwicklungsstadium: 3 Wochen) 7 Tage nach der Zugabe von Ag-Np (6.0 mg l ⁻¹) und AgNO ₃ (0,42 mg l ⁻¹ Ag ⁺ -Ionen) mit oder ohne CaCl ₂ (1 mM) in die Nährlösung.....	41
Abbildung 19: Trockenmasse (A+B), Kupferkonzentration (C+D) in der Wurzel 14 Tage und SPAD-Werte (E) 12 Tage nach Sprühapplikation verschiedener kupferhaltiger (20 oder 40 mg l ⁻¹) Präparate („Cu-Np“, „CuCl ₂ “) bei <i>C. sativus</i>	53
Abbildung 20: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (<i>C. sativus</i>) nach einer Tropfenapplikation (15 µl) und anschließendem Eintrocknen der Cu-Np-Suspension (40 mg l ⁻¹) bei verschiedenen Vergrößerungen.....	54
Abbildung 21: <i>C. sativus</i> 14 Tage nach Sprühapplikation verschiedener kupferhaltiger (40 (A) und 20 (B) mg l ⁻¹) Präparate („Cu-Np“, „CuCl ₂ “) auf die Blätter.....	55
Abbildung 22: Trockenmasse von <i>A. sativa</i> 9 (A) und 18 (B) Tage und nach Sprühapplikation verschiedener kupferhaltiger (20-80 mg l ⁻¹) Präparate („Cu-Np“, „CuCl ₂ “) auf die Blätter.....	56

Abbildung 23: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (<i>A. sativa</i>) nach einer Tropfenapplikation (15 µl) und anschließendem Eintrocknen der Cu-Np-Suspension (40 mg l ⁻¹) bei verschiedenen Vergrößerungen.	57
Abbildung 24: <i>A. sativa</i> 18 Tage nach Sprühapplikation verschiedener kupferhaltiger (40 (A) und 80 (B) mg l ⁻¹) Präparate („Cu-Np“, „CuCl ₂ “) auf die Blätter.....	58
Abbildung 25: SPAD-Werte (A) der Blätter von <i>B. napus</i> vor und nach, sowie deren Pigmentkonzentrationen von Chl a, Chl b und Carotinoiden (B) nach, zwei Sprühapplikationen verschiedener eisenhaltiger (enthalten jeweils 100-1000 mg l ⁻¹ Fe) Präparate (Fe-Np, „Fe-EDTA“)...	59
Abbildung 26: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (<i>V. faba</i>) nach Tropfenapplikation (15 µl) und anschließendem Eintrocknen der Fe-Np-Suspension (150 mg l ⁻¹ Fe) bei verschiedenen Vergrößerungen.	60
Abbildung 27: SPAD-Werte der Blätter (A) und Trockenmassen (B) von <i>C. sativus</i> nach Sprühapplikation verschiedener kupferhaltiger (40 mg l ⁻¹) Präparate („Cu-EDTA“, „CuCl ₂ “, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“)..	61
Abbildung 28: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (<i>V. faba</i>) nach einer Tropfenapplikation (15 µl) und anschließendem Eintrocknen der Cu-EDTA-Lösung (40 mg l ⁻¹ Cu) bei verschiedenen Vergrößerungen.....	62
Abbildung 29: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (<i>V. faba</i>) nach einer Tropfenapplikation (15 µl) und anschließendem Eintrocknen der Kupferoxychlorid-Suspension (40 mg l ⁻¹ Cu) bei verschiedenen Vergrößerungen.....	63
Abbildung 30: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (<i>V. faba</i>) nach einer Tropfenapplikation (15 µl) und anschließendem Eintrocknen der Cu-Np-Suspension (40 mg l ⁻¹ Cu) bei verschiedenen Vergrößerungen.....	64
Abbildung 31: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (<i>V. faba</i>) nach einer Tropfenapplikation (15 µl) und anschließendem Eintrocknen der Cu-Np-Überstand-Suspension (40 mg l ⁻¹ Cu) bei verschiedenen Vergrößerungen.....	65
Abbildung 32: Blattoberflächen 48 Stunden nach Beginn der Behandlung.....	66
Abbildung 33: Cu-Konzentration (A), im Blatt und prozentuale Cu-Aufnahme (B) in das Blatt 24 und 48 Stunden nach der Tropfenapplikation verschiedener Kupferpräparate („Cu-EDTA“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) auf die Blattoberfläche von <i>G. max</i> und anschließendem Abwaschen der Rückstände.....	67
Abbildung 34: Prozentual befallene Blattflächen von <i>C. sativus</i> nach Inokulation mit echtem Mehltau.	68

Abbildung 35: Agar-Blöcke mit aufliegender Membran nach der Tropfen-Applikation der Präparate.	78
Abbildung 36: Abziehen der Epidermis von <i>S. telephium</i> (A, B, D).	79
Abbildung 37: Cu-Konzentration (A) und prozentuale Cu-Aufnahme (B) in den Agar 24 und 48 Stunden nach der Tropfenapplikation verschiedener Kupferpräparate („CuCl ₂ “, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) auf eine auf dem Agar aufliegende Dialysemembran (MWCO 500-100).	82
Abbildung 38: Cu-Konzentration (A) und prozentuale Cu-Aufnahme (B) im Blatt (<i>S. telephium</i>) 48 Stunden nach der Tropfenapplikation (5x16 µl) von „Cu-EDTA“ (80 mg l ⁻¹) auf die Blattoberfläche.	83
Abbildung 39 Cu-Konzentration (A) und prozentuale Cu-Aufnahme (B) im Blatt (<i>S. telephium</i>), 48 Stunden nach der Tropfenapplikation (7x12µl) von „Cu-EDTA“ (200 mg l ⁻¹) auf die Blattoberfläche.	83
Abbildung 40: Cu-Konzentration (A) und prozentuale Cu-Aufnahme (B) im Blatt (<i>S. telephium</i>), 24 und 48 Stunden nach der Tropfenapplikation verschiedener Kupferpräparate („Cu-EDTA“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) auf die Blattoberfläche und anschließender Entfernung der Epidermis.	85

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: pH-Werte der verschiedenen Np-Behandlungssuspensionen bei verschiedenen Konzentrationen vor und nach der Zugabe eines Puffers (MES).....	14
Tabelle 2: Verträgliche und unverträgliche Konzentrationen (10, 50, 80, 100, 200 mg l ⁻¹) verschiedener Kupferpräparate nach dem Aufbringen von fünf Tropfen zu je 15 µl auf die Blattoberfläche von <i>S. telephium</i>	84

IV. Zusammenfassung

Die zunehmende Verwendung von Nanopartikeln (Np) in Konsumgütern und industriellen Anwendungen löst im Hinblick auf deren mögliche Freisetzung in der Umwelt und die damit verbundenen Auswirkungen auf Ökosysteme und Organismen gegenwärtig verstärkte Bedenken aus. Trotz dieser möglichen Risiken wird dem gezielten Einsatz von Nanomaterialien im Bereich der Pflanzenproduktion ein großes Potenzial zugesprochen. Jedoch ist über die Wirkungen von Np auf Pflanzen nur relativ wenig bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war daher, die Wirkung verschiedener Np auf das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen sowie mögliche Anwendungen bei der Blattdüngung und beim Pflanzenschutz zu untersuchen. Zunächst wurde die Wirkung metallischer Np (ZnO- (30-40 nm), TiO₂- (5-15 nm), Ag-Np (15 nm)) auf die Keimung und Entwicklung von Pflanzen im Vergleich zu den jeweiligen Bulkmaterialien beurteilt. Im Fall einer negativen Wirkung der Np wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob direkte Wechselwirkungen der Np mit den Pflanzen („Np-Effekte“) oder von den Np freigesetzten Ionen („ionische Effekte“) für diese Wirkung verantwortlich waren. Daneben wurden mögliche Vorteile gezielter Anwendungen ausgewählter Np im Bereich der Blattdüngung (Cu-Np, Fe-Np) oder des Pflanzenschutzes (Cu-Np) durch eine mögliche effektivere Wirkung oder bessere Verträglichkeit im Vergleich zu einem gelösten und einem weiteren partikulären Cu-Präparat (Kupferoxychlorid) untersucht. Np wirkten sich im Vergleich zu den Bulkmaterialien positiv (ZnO-Np) oder auch negativ (Ag-Np) auf die Keimung und Entwicklung von Pflanzen aus. TiO₂-Np beeinträchtigten die Entwicklung der Pflanzen ähnlich wie TiO₂-Bulk. Ag-Np zeigten starke negative „ionische Effekte“ auf die Transpirations- und Assimilationsrate von *Zea mays* und *Brassica napus*. In Abhängigkeit von der Expositionsdauer und der Pflanzenart traten zusätzliche negative „Ag-Np-Effekte“ bei *Z. mays* (auf das Wurzelwachstum) und *B. napus* (auf die Transpirations-, Assimilationsrate und Trockenmasse) auf, was wahrscheinlich auf die beobachtete Akkumulation grauer Aggregate an der Wurzeloberfläche zurückzuführen war. Eine gezielte Anwendung von Fe-Np führte zu keiner Düngewirkung, vermutlich wegen der Bildung nicht wasserlöslicher Eisenoxidverbindungen. Verglichen mit gelösten Präparaten (Cu-EDTA, CuCl₂) hatten die Cu-Np meistens eine ähnliche oder geringere Düngewirkung und eine geringere Pflanzenschutzwirkung. Im Verhältnis zu Kupferoxychlorid war die Düngewirkung der Cu-Np besser, während die Pflanzenschutzwirkung ähnlich war. Die Pflanzenverträglichkeit der Cu-Np war gegenüber CuCl₂ besser und im Vergleich zu Cu-EDTA sowie Kupferoxychlorid schlechter. Bei der Kupferaufnahme in das Blatt erzielten die Cu-Np ein ähnlich hohes Niveau wie Cu-EDTA, welches sich jedoch erst mit zunehmender Wirkdauer einstellte. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern detaillierte Erkenntnisse über die Wirkung von Np auf Pflanzen und sind in Bezug auf die Risikobewertung und möglichen Anwendungsgebiete von Np in der Pflanzenproduktion von Bedeutung.

V. Abstract

The increasing use of nanoparticles (np) in consumer products and industrial applications raises concerns about their potential release into the environment and possible related impacts on ecosystems and organisms. Despite these potential risks, the targeted application of np in plant production systems may offer promising benefits. However, there is only little known about the influence of np on plants. Therefore, the aim of this study was to analyze the effects of metallic np on the growth and development of plants and to test their suitability as foliar fertilizers and plant protection agents. Initially, the effects of metallic np (ZnO (30-40 nm), TiO₂ (5-15 nm), Ag (15 nm)) on the germination and development of plants were evaluated in comparison to their corresponding bulk counterparts. In case of negative impacts of the np on plants compared to bulk material, further experiments should reveal whether this was caused by direct interactions between the np and plants (“np-effects”) or by free ions released from the np (“ionic effects”). Furthermore, the potential benefits of targeted applications of np in the fields of foliar fertilization (Cu-np, Fe-np) or plant protection (Cu-np) were studied in terms of effectiveness and plant compatibility as compared to dissolved or particulate (Cu-oxychloride) Cu compounds. In general, effects of np on the germination and development of plants compared to bulk materials were positive (ZnO-np) or negative (Ag-np). TiO₂-np impaired the plant development in a similar way as TiO₂-bulk material. Further investigations with Ag-np showed strong negative “ionic effects” on the transpiration rate and assimilation rate of *Zea mays* und *Brassica napus*. Depending on the duration of exposure and plant species, additional “Ag-np-effects” occurred for *Z. mays* (on the root growth) and *B. napus* (on the transpiration rate, assimilation rate and dry matter), which was possibly caused by the observed accumulation of grey aggregates on the root surface. In the investigations on the targeted application of np Fe np did not yield any fertilizing effects, which was probably due to the formation of water insoluble Fe-oxide compounds. Compared to dissolved Cu-compounds (Cu-EDTA, CuCl₂), Cu-np had mostly similar or lower fertilizing and plant protecting effects. In comparison with Cu- oxychloride, fertilizer efficiency of cu np was higher and the plant protection performance was similar. With regard to the tolerable dose, the plant compatibility of Cu-np was higher than CuCl₂ but lower than Cu-EDTA and Cu-oxychloride. As compared to the dissolved compound (Cu-EDTA) Cu-np reached a similar final level of Cu uptake into the leaf, although initial uptake rates were lower. The results of this work provide detailed information about effects of np on plants and contribute significantly to the assessment of risks and benefits of np applications in plant production.

1 Einleitung

1.1 Risikobewertung von Nanomaterialien

Aufgrund der zügigen Fortschritte auf dem Gebiet der Nanotechnologie und der damit verbundenen vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von synthetisch hergestellten Nanopartikeln (Np) auf industrieller Ebene und in Produkten für den Endverbrauchermarkt, entstehen zunehmend Bedenken im Hinblick auf damit möglicherweise einhergehende Risiken für die Umwelt (Lowry et al. 2010; Gottschalk et al. 2013; Judy 2013). Entsprechend einer Empfehlung der EU Kommission (2011) werden Nanomaterialien wie folgt definiert: „Ein Nanomaterial ist ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50% der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben“. Innerhalb dieser Größenverteilung, befinden sich Stoffe in der Übergangszone zwischen Atomen oder Molekülen und den entsprechenden Bulk-Materialien und können daher veränderte chemische und physikalische Eigenschaften aufweisen. In diesem Zusammenhang bezeichnet der Begriff „Bulk“ Substanzen, deren partikuläre Bestandteile größer sind als 100 nm und damit die spezifischen Nanoeigenschaften nicht besitzen (Poole und Owens 2003; Khanna 2016). Mit dem abnehmenden Durchmesser eines sphärischen Partikels steigt das Verhältnis der Oberfläche zu seinem Volumen, was z.B. zu einer gesteigerten Reaktivität und modifizierten elektronischen, magnetischen oder optischen Eigenschaften führen kann (Poole und Owens 2003; Roduner 2006). Auf Grund dieser einzigartigen Eigenschaften von Nanosubstanzen existiert bereits ein weites Feld möglicher Anwendungen in den Bereichen der Medizintechnik (Savery et al. 2017), Pharmazie (Sheth et al. 2012), Agrarwirtschaft (Tripathi et al. 2016, 2017), Elektrotechnik, Kosmetik, Energie, Textilindustrie und Umwelttechnik (Hu und Cui 2012; Mangematin und Walsh 2012; Mhraryan et al. 2012). Trotz dieses breiten Anwendungsfeldes existieren keine genauen Angaben über derzeitige Produktionskennzahlen von Np. Schätzungen variieren in Abhängigkeit vom jeweiligen Stoff zwischen 10 und 100000 Tonnen pro Jahr (Piccinno et al. 2012). Daher ist auf Grund der Entsorgung von Stoffen, die Np enthalten, von einer zunehmenden Freisetzung und Anreicherung von Nanomaterialien in der Umwelt und in der Folge von einer Np-Exposition biologischer Systeme auszugehen (Nowack und Bucheli 2007; Keller und Lazareva 2014; Lowry et al. 2010; Gottschalk et al. 2013; Judy 2013). Blaser et al. (2008) sagten z. B. für das Jahr 2010 voraus, dass Silber-Np, welche als biozide Wirkstoffe in Produkten (Plastik, Textilien) verwendet werden, 15% der gesamten in die Umwelt freigesetzten Menge Silber in der EU ausmachen werden. In der Studie wurde davon ausgegangen, dass sich ein Großteil des freigesetzten Silbers in Klärschlamm anreichert, welcher auf landwirtschaftlichen Produktionsflächen zur Düngung ausgebracht werden könnte. Bisher jedoch existieren im Hinblick auf das zu beurteilende Risiko von Nanomaterialien gegenüber biologische Systemen erst wenige Erkenntnisse (Maynard et al. 2006; Stensberg et al. 2011). Daher stieg die Zahl

entsprechender Studien über die Wechselwirkungen zwischen Np und bestimmten Organismen in den letzten Jahren deutlich an. Es gibt Hinweise auf die toxische Wirkung von Np gegenüber Bakterien, Algen und auch höheren Organismen (Shvedova et al. 2005; Federici et al. 2007; Gagne et al. 2012). Bisher ist jedoch nur sehr wenig bekannt über die Wirkung von Np auf das Wachstum von Kulturpflanzen und über die möglichen Ursachen bereits gezeigter toxischer (Lin und Xing 2008; Dimkpa et al. 2013; Yin et al. 2011; Cox et al. 2016) oder fördernder Effekte (Larue et al. 2012). Es wurde vielfach beobachtet, dass Np die Entwicklung (Lin und Xing 2008; Dimkpa et al. 2013; Clement et al. 2013), die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Jiang et al. 2014; Oukarroum et al. 2013) und Malondialdehyd (Shaw und Hossain 2013; Ghosh et al. 2010), die DNA-Struktur (Ghosh et al. 2010; Lee et al. 2013) und die Nährstoffgehalte (Burke et al. 2015) von Pflanzen beeinflussen können. Häufig werden die Beeinträchtigungen auf die außergewöhnlichen chemischen und physikalischen Oberflächeneigenschaften und erhöhte Reaktivität der Np zurückgeführt, wodurch direkte Schäden in biologischen Systemen entstehen können (Nel et al. 2006). Dem gegenüber wäre es möglich, dass auch die relativ große Oberfläche der Np zu einer gesteigerten Freisetzung von Ionen führt, auch wenn die Löslichkeit des entsprechenden Bulk-Materials gering ist. Eine der großen Herausforderungen auf diesem Forschungsgebiet ist es daher, zwischen den Effekten, welche durch die direkte Interaktion der Np mit dem Zielorganismus („Np-Effekte“) und den indirekten Effekten, welche durch von den Np freigesetzte-Ionen („ionische Effekte“) hervorgerufen werden, zu unterscheiden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Wirkung von Np im Vergleich zu den entsprechenden Bulkmaterialien auf die Entwicklung von Pflanzen beurteilt. Waren die Effekte der Np im Vergleich zum Bulkmaterial negativ, wurden weiterführend die Ursachen („Np-Effekt“ oder „ionischer Effekt“) der Wirkung im Detail untersucht.

1.2 Einsatzmöglichkeiten von Nanomaterialien in der Pflanzenproduktion

Die zunehmenden Fortschritte in der Nanotechnologie bestärken nicht nur Bedenken möglicher Risiken für die Umwelt, sondern auch das Interesse an dem Potenzial möglicher Anwendungsgebiete in der Landwirtschaft (Nair et al. 2010; Sekhon 2014; Liu und Lal 2015; Prasad et al. 2017). In gegenwärtigen Forschungsprojekten wird der Fokus bei den Untersuchungen vor allem auf den Gebieten des Pflanzenschutzes und der Pflanzenernährung gelegt (Nair et al. 2010; Ghormade et al. 2011; Sekhon 2014). Dabei wird vor allem immer wieder auf sogenannte „controlled-“ oder „slow-release-Eigenschaften“ der Nanomaterialien hingewiesen (Nair et al. 2010; Sekhon 2014). In Bezug auf systemische Pflanzenschutzwirkstoffe wird dabei auf die Strategie gesetzt, Nanokapseln als sogenannte „carrier“ mit Wirkstoffen auszustatten, welche von den Pflanzen aufgenommen werden. Nach der Aufnahme findet eine Freisetzung der Wirkstoffe statt, wodurch effektivere Wirkungen erzeugt und Aufwandmengen eingespart werden könnten (Ali et al. 2014). Nicht nur systemische Pflanzenschutzmittelwirkstoffe in Nano-Form versprechen ein großes Potenzial, auch ein effektiverer Pflanzenschutz gegenüber Pilzkrankungen durch z. B. eine länger anhaltende protektive oder eine

systemische Wirkung, im Vergleich zu gelösten oder größeren partikulären Kupferpräparaten, wäre möglich. Bei Nano-Pflanzennährstoffen wird vorwiegend auf den Vorteil einer langsamen und stetigen Freisetzung von Nährstoffen oder auf die Aufnahme ganzer Partikel hingewiesen, wodurch eine gesteigerte Effektivität erzielt werden könnte (Lal 2008; Shekon 2014; Liu und Lal 2015). Große Anteile der enthaltenen Nährstoffe werden bei derzeit verwendeten konventionellen Düngemitteln aus dem Boden ausgewaschen oder dort festgesetzt, sodass sie den Pflanzen nicht mehr zur Verfügung stehen. Bei herkömmlichem Stickstoffdünger werden z. B. 50-70% des Stickstoffes ausgewaschen oder verflüchtigen sich in Form von Ammoniak- oder Stickoxiden (DeRosa et al. 2010). Bei Nanodüngern sind Anwendungsformen denkbar, bei denen die Pflanzennährstoffe (Stickstoff, Phosphate, Eisen, Kupfer etc.) selbst als Nanomaterial vorliegen (Rui et al. 2016) oder aber in Np z.B. aus Chitosan (natürlich vorkommendes Polyaminosaccharid) enthalten sind (Corradini et al. 2010). Durch eine langsame und stetige Freisetzung von Ionen aus diesen Materialien könnten gegebenenfalls Aufwandmengen eingespart sowie Verluste und Umweltbelastungen reduziert werden (Liu und Lal 2015; Prasad et al 2017). Wenn man von einer stetigen Freisetzung der Nährstoffe von den Nanostoffen ausgeht, sind sowohl Anwendungsszenarien vorstellbar, bei denen Nanomaterialien in den Boden eingearbeitet oder aber auf die Pflanzenoberfläche auftragen werden. Weitere Forschungsergebnisse belegen auch positive Wirkungen von Np auf die Entwicklung von Pflanzen, ohne dass dabei eine gezielte Anwendung unter den Gesichtspunkten der Pflanzenernährung oder des Pflanzenschutzes durchgeführt wurde. So wurden z. B. bereits bei TiO₂-Np (Feizi et al. 2012; Larue et al. 2012), Ag-Np (Parveen und Rao 2015) und ZnO-Np (Lopez-Moreno et al. 2010; Mahajan et al. 2011) positive Wirkungen auf die Pflanzenentwicklung festgestellt. Auch auf diesem Gebiet der nicht zielgerichteten Anwendung von Np besteht Potenzial und weiterer Forschungsbedarf. Jedoch sollten im Zusammenhang mit der Anwendung von Np in der Landwirtschaft auch mögliche Risiken beurteilt werden. Wie zuvor gezeigt, können toxische Wirkungen von Nanopartikeln gegenüber Pflanzen ein Problem darstellen (Stampoulis et al. 2009; Ruffini Castiglione et al. 2011; Clement et al. 2013). Weitere Risiken bestehen darin, dass Nanopartikel von Pflanzen über die Wurzel oder die Pflanzenoberfläche aufgenommen werden, wodurch eine Anreicherung von Nanomaterialien in der Nahrungskette vorstellbar wäre. Die mögliche Aufnahme von Np in Pflanzen über das Blatt (Eichert et al. 2008; Larue et al. 2014,) und in die Wurzel (Lin und Xing 2008; Zhu et al. 2008; Koo et al. 2015; Deng et al. 2017) wurde bereits bestätigt. Dennoch wird die Entwicklung und entsprechende Beurteilung der Wirkung neuer Produkte mit Nanoeigenschaften dringend empfohlen (DaRosa et al. 2010). Bisherige Analysen versprechen ein großes Potenzial und fordern Entwicklungen möglicher Anwendungen von Nanomaterialien sowie die Beurteilung der Risiken von Np in landwirtschaftlichen Produktionssystemen (Nair et al. 2010; Ghormade et al. 2011; Khot et al. 2012; Liu und Lal 2015; Prasad et al. 2017). Direkte und anwendungsnahe Untersuchungen von Nanomaterialien gibt es bisher jedoch kaum (Liu und Lal 2015). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit das Verhalten ausgewählter metallischer Nanomaterialien auf der Blattoberfläche, mit Bezug auf ihre Pflanzenschutz- (Cu-Np) und

Düngewirkung (Cu-Np und Fe-Np), untersucht und beschrieben. Bereits 1885 wurde von Alexis Millardet das erste Mal über die Wirksamkeit der sogenannten Bordeauxbrühe, einem kupferhaltigen Präparat ($\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$), gegenüber falschem Mehltau bei Weinreben berichtet (Ayres 2004). Bis heute ist die Behandlung von Pflanzen mit kupferhaltigen Präparaten zum protektiven Schutz gegenüber Pilzkrankheiten eine gängige Praxis, die sowohl in konventionellen als auch ökologischen Anbausystemen angewendet wird (Martins et al. 2016). Kupfer gehört darüber hinaus zu den Mikronährelementen, die für Pflanzen essentiell sind. Es ist ein wichtiger Bestandteil von Redoxsystemen und an vielen physiologischen Prozessen in Pflanzen beteiligt. Zusätzlich ist Kupfer ein Strukturelement von regulatorischen Proteinen und bei der Elektronentransportkette der Photosynthese, Atmung der Mitochondrien, Reaktion auf oxidativen Stress sowie im Zellwandmetabolismus und beim „Hormon-signaling“ involviert (Marschner, 1995). Für Kupfermangel anfällige Kulturarten sind z.B. Getreidearten, wie *Avena sativa* L. und *Triticum aestivum* L., *Cucumis sativus* L. und *Glycine max* (L.) MERR. Situationen unzureichender Kupferversorgung für Pflanzen treten vor allem auf organischen Böden (Franzen et al. 2008) bei einem hohem pH-Wert, aber auch auf grobtexturierten Mineralböden auf, jedoch in der Regel nicht flächendeckend. So wird z. B. für den Westen Kanadas geschätzt, dass auf ca. 1,5 Millionen Hektar der genutzten Anbauflächen Kupfermangelsituationen herrschen (Karamanos und Goh 2005). In Polen gehen Schätzungen davon aus, dass 40% der Böden zu geringe Kupfergehalte für eine optimale Ertragsniveau aufweisen (Sienkiewicz-Cholewa und Kieloch 2016). Nicht nur das Auftreten von Mangelerscheinungen bei Pflanzen ist ein Problem, sondern auch der geringe Kupfergehalt in den Ernteprodukten, was in einigen Teilen der Welt zur Unterversorgung der Menschen mit Kupfer führt (Korzeniowska und Glubiak 2011). Um eine ausreichende Kupferversorgung der Pflanzen zu gewährleisten, sind Anwendungen geeignet, bei denen der Boden durch kupferhaltige Lösungen oder Granulate angereichert wird. Während der Vegetationsperiode sind Anwendungen durchführbar, bei denen die Pflanzenoberfläche mit kupferhaltigen Präparaten besprüht wird und somit eine Kupferaufnahme über das Blatt ermöglicht (Malhi und Karamanos et al. 2014). So zeigten Karamanos et al. (2003) Ertragssteigerungen bei *T. aestivum* durch Boden- und Blattdüngung mit Kupfer. Eine Blattdüngung kann vor allem dann einen Vorteil haben, wenn zwar ausreichend Kupfer im Boden vorhanden ist, die Aufnahme von Kupfer über die Wurzeln jedoch durch die Anwesenheit hoher Konzentrationen von P, Zn, Fe, Mn und Al beschränkt ist. Auch hohe N-Gehalte können den Transport in die Pflanzen verzögern (Mahli und Karamanos 2014). Kupfersulfatpentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) und Kupferoxid (CuO) sind häufig verwendete Kupferpräparate, die sowohl bei der Bodenausbringung, als auch bei Blattapplikation verwendet werden. Nachteile dieser beiden Formen für eine Blattapplikation sind entweder zu hohe Anteile freier Cu^{2+} -Ionen ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), welche toxisch wirken, oder zu geringe Anteile freier Cu^{2+} -Ionen (CuO), sodass der Nährstoffmangel nicht behoben wird (Li et al. 2014). Deshalb wurde im Folgenden zusätzlich der mögliche Einsatz der Cu-Np, als kupferhaltiger Blattdünger getestet.

Auch Eisen (Fe) gehört zu den essentiellen Mikronährstoffen. Es besitzt eine Schlüsselfunktion bei Redoxsystemen in Zellen sowie Enzymen und ist darüber hinaus beteiligt an den Prozessen der Photosynthese und Atmung (Marschner, 1995). Eisen kann in Abhängigkeit von verschiedenen Aufnahmestrategien von Pflanzen über die Wurzeln aufgenommen werden. Obwohl Eisen in Böden häufig vorkommt, liegt es meist in einer für Pflanzen nicht verfügbaren Form (z.B. Eisenhydroxid) vor. Dabei können Strategie I-Pflanzen durch Versauerung oder Abgabe von Reduktionsmitteln und Chelatoren (Fernández und Ebert 2005) Eisen lösen und in eine verfügbare Form bringen. Strategie II-Pflanzen sind in der Lage, Phytosiderophore zu bilden und somit die Eisenaufnahme zu steigern. Trotz dieser Strategien ist Eisen bei hohem Boden pH-Wert, meist auf kalkhaltigen Böden, für Pflanzen schlecht verfügbar (Chen und Barak 1982; Hansen et al. 2004; Fernández und Ebert 2005; Álvarez-Fernández et al. 2006; Rombolà und Tagliavini 2006). Eine Unterversorgung von Kulturpflanzen mit Eisen kann zu erheblichen Ertrags- und Qualitätseinbußen führen (Álvarez-Fernández 2004, 2006) und ist vor allem in Obstbaum-Kulturarten (Álvarez-Fernández et al. 2006; Rombolà und Tagliavini 2006), aber auch bei ackerbaulichen Kulturen wie z. B. *G. max*, *Phaseolus vulgaris* L., oder *Sorghum bicolor* L. (Hansen et al. 2006) ein Problem. Konventionelle Eisendünger können sowohl in einer Boden- als auch einer Blattapplikation ausgebracht werden (Abadía et al. 2011). Anorganische gut lösliche Eisensalze wie z. B. FeSO_4 sind als Bodenapplikationen ineffektiv, vor allem bei hohen pH-Werten des Bodens, da sich rasch nach der Ausbringung für Pflanzen nicht verfügbare Fe-Verbindungen (Eisenoxidhydroxide) bilden (Hansen et al. 2006). Chelatisierte Fe-Verbindungen, wie z. B. Fe-EDDHA, erzielen eine gute Wirkung nach einer Bodenausbringung, sind jedoch sehr kostspielig (Abadía et al. 2011). In diesen Situationen bieten Blattapplikationen eisenhaltiger Präparate eine deutlich effektivere Wirkung und können wirtschaftlicher sein. Als Blattapplikation können sowohl geöste Salze (FeSO_4) als auch chelatisierte Eisenverbindungen (wie z. B. Fe-EDTA oder Fe-EDDHA) verwendet werden (Anderson 1982; Pestana et al. 2001). Die Verträglichkeit ist jedoch bei einer ganzen Menge der verfügbaren Präparate zur Blattdüngung relativ gering, sodass Blattverbrennungen durch Salzstress oder hohe Elementkonzentrationen auf der Blattoberfläche nach einer Anwendung entstehen können (Alexander und Schroeder 1987). Da Pflanzen die Nährstoffe nur in gelöster Form (also als Ion) verwerten können und auch nur die gelösten Formen osmotische oder direkte toxische Wirkungen haben, bedeutet die Applikation als Np (z.B. Fe-Np oder Cu-Np), dass die Nährstoffe in dieser Form zunächst in nicht unmittelbar pflanzenverfügbarer Form auf der Blattoberfläche vorliegen und dass daher auch bei höheren Dosen keine Schäden zu erwarten sind. In dieser Form wäre es vorstellbar, dass eine Art Depot auf der Pflanzenoberfläche aufgebracht werden könnte, welches im Idealfall über einen längerfristigen Zeitraum eine Nährstoffaufnahme (Ionen) bewirkt. Dadurch könnte man den Problemen Applikationsschäden durch anfänglich hohe Anteile gelöster Ionen an den Pflanzen vorbeugen. Auch eine effektivere Düngewirkung von Np im Vergleich zu einem gelösten oder anderen partikulären Düngemittel, durch z. B. besondere Nanoeigenschaften oder durch die Aufnahme ganzer Np, wodurch möglicherweise Aufwandmengen eingespart werden könnten, wäre denkbar. Diese beiden Aspekte

wurden im Rahmen der durchgeführten Experimente dieser Arbeit mit Cu- und Fe-Np untersucht. Zusätzlich wurde die Effektivität der Pflanzenschutzwirkung von Cu-Np, durch z. B. eine länger anhaltende oder systemische Wirkung, gegenüber einer Pilzerkrankung, verglichen mit einem anderen partikulären oder gelösten Präparat, beurteilt.

1.3 Zielsetzungen und Hypothesen der Arbeit

Gegenstand des ersten Teils dieser Arbeit (Abschnitt 3) waren die Untersuchung von Effekten verschiedener metallischer Np (ZnO, TiO₂, Ag) auf die landwirtschaftlich bedeutsamen Pflanzenarten *Zea mays* L. und *Brassica napus* L. (Hypothese 1) und der zu Grunde liegenden Wirkursachen (Hypothese 2). Im zweiten Teil (Abschnitt 4) dieser Arbeit wurden mögliche Anwendungsgebiete von Nanomaterialien in der Pflanzenproduktion getestet (Hypothesen 3 und 4). Als mögliche Anwendungsszenarien wurde der Einsatz von Np als Blattdünger (Cu-Np, Fe-Np) und zum Pflanzenschutz (Cu-Np) gegenüber Echtem Mehltau an verschiedenen Pflanzarten (*C. sativus*, *A. sativa*, *G. max* bzw. *B. napus*) untersucht.

Folgende Hypothesen wurden getestet:

Hypothese 1

Np haben im Vergleich zu den jeweiligen Bulk-Materialien eine andere Wirkung auf die Entwicklung der Pflanzen (Abschnitt 3.1 und 3.5).

Hypothese 2

Die andere Wirkung von Np beruht nicht nur indirekt auf der hohen Freisetzungsrate von Metallionen („ionischer Effekt“), die aus der hohen spezifischen Oberfläche resultiert, sondern auch auf direkten Wechselwirkungen der Np mit den Pflanzen („Np-Effekt“) (Abschnitt 3.2-3.5.).

Hypothese 3

Metallische Np haben nach einer Blattapplikation im Vergleich zu gelösten Präparaten oder zu einem größeren partikulären (μm) Präparat bei gleicher Aufwandmenge eine effektivere Düngewirkung (Fe-Np und Cu-Np) oder Pflanzenschutzwirkung (Cu) (Abschnitt 4.1, 4.3 und 4.4-4.4).

Hypothese 4

Cu-Np sind im Vergleich zu gelösten Kupferpräparaten als Blattapplikation in höheren Aufwandmengen verträglich und bewirken eine stetige, langanhaltende Nährstoffaufnahme (Abschnitt 4.2-4.4).

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen wichtigen Beitrag zur Identifikation der Mechanismen der Np-Toxizität und beleuchten wichtige Aspekte, welche für die zukünftige Beurteilung der Risiken von Nanomaterialien gegenüber Pflanzen von Bedeutung sind. Außerdem wurden wichtige Erkenntnisse zu den möglichen Einsatzgebieten von Np zu landwirtschaftlichen Zwecken gewonnen, welche für weiterführende Studien zur Bewertung und Entwicklung von Np-Anwendungen auf diesem Gebiet eine wichtige Rolle spielen.

2 Allgemeine Methoden

2.1 Verwendete Np-Suspensionen und Chemikalien

Die verwendeten Np-Suspensionen sind alle kommerziell erhältlich. Die Silber-Np (Ag-Np) wurden von der RAS AG (Regensburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Gemäß der Produktinformationen hatten die Ag-Np eine durchschnittliche Größe von 15 nm, wobei 99% der Np eine Größe unterhalb von 20 nm hatten. Die wässrige Suspension enthielt neben den Ag-Np (10%) 4% Glycerol-Trioleat (Tagat) und 4% Polyoxyethylen (20)-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20) als stabilisierende Substanzen. Die Stammsuspensionen der Titandioxid-Np (TiO_2 -Np, 15%, Anatas, Partikelgröße: 5-15 nm) und Zinkoxid-Np (ZnO-Np, 20.7%, Partikelgröße: 30-40 nm) wurden von Nanoshel LLC (Wilmington, USA) bezogen. In der TiO_2 -Np Stammsuspension war 1% der Oberflächenbehandlungskomponente Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) enthalten. Die ZnO-Stammsuspension enthielt 1% Ethylenglykol als Verdünnungsmittel und 1% Triton X-100 als Dispergiermittel. Als Referenzstoffe wurden sogenannte Bulk-Chemikalien verwendet. Dabei handelt es sich jeweils um die gleichen chemischen Stoffe mit dem Unterschied, dass diese vom Hersteller nicht als Np deklariert werden. Diese Chemikalien wurden bei Sigma Aldrich (Schnelldorf, Germany) gekauft. Der Hersteller, der die Cu- und Fe-Np Suspensionen kostenlos bereitgestellt hat, möchte nicht namentlich genannt werden. Laut Herstellerangaben waren 90% der enthaltenen Cu-Np (metallisches Kupfer) kleiner als 10 nm. Die übrigen 10% der Partikel können eine Größe bis in den μm -Bereich haben. Die Eisen-Np-Suspension enthielt 20% Eisen, ursprünglich als nullwertige Eisennanopartikel, wovon nach Herstellerangaben durch interne Reaktionen 1-10% als Magnetit (Fe_3O_4) vorliegen können. Der Durchmesser der Fe-Np wird vom Hersteller mit <50 nm angegeben. Die verwendete Düngemittelsuspension Cu-Lebosol 350 SC enthielt Kupfer als Kupferoxychlorid-Partikel ($\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$) und wurde von der Lebosol Dünger GmbH (Elmstein, Deutschland) gekauft. Die in den Stammsuspensionen zusätzlich enthaltenen Stabilisatoren, Dispergier- und Verdünnungsmittel der Np-Suspensionen (Ag, TiO_2 , ZnO) wurden zusätzlich separat bei Sigma Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) gekauft oder im Fall von „Tagat“ von Evonik Industries AG (Dortmund, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das in manchen Experimenten verwendete Benetzungsmittel „Break Thru“ wurde ebenfalls von Evonik Industries AG (Dortmund, Deutschland) bereitgestellt. Die für die Nährlösungskulturen verwendeten Chemikalien (KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , MnCl_2 , ZnSO_4 , „ CuCl_2 “, H_3BO_3 , Na_2MoO_4 , NaFe-EDTA) wurden bei Karl Roth GmbH Co.

KG (Karlsruhe) oder Sigma Aldrich (Schnelldorf, Germany) gekauft. Außer bei Fe-EDTA (98%) lag der Reinheitsgehalt bei allen Chemikalien bei mindestens 99%. Vor der Verwendung eines Stoffes, der als partikuläre Suspension vorlag, wurden die Präparate für 5-10 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben, um potentiell gebildete Aggregate in den Suspensionen aufzubrechen und zu suspendieren. Zusätzlich wurden die Suspensionen vor jeder Anwendung ausgiebig geschüttelt.

2.2 Untersuchungen der Stabilität der Ag-Np

Mit Hilfe des Uv-vis Spektrums wurde die Konzentration, die Stabilität und das Aggregations- und Sedimentationsverhalten der Ag-Np beurteilt. Das durch die in dieser Arbeit verwendete Ag-Np-Suspension hervorgerufene Absorptionsmaximum liegt bei 411 nm, wobei die Höhe des Peaks von der Konzentration der Ag-Np abhängig ist. Durch eine Verschiebung des Peaks zu einer höheren Wellenlänge kann auf ein zunehmende Größe der Partikel und damit auf deren Aggregation geschlossen werden (Paramelle et al. 2014). Die Breite auf der halben Höhe des Absorptionspeaks lässt auf die Größenverteilung der Partikel schließen. Eine Verbreiterung an dieser Stelle weist auf eine stärkere Streuung in der Größenverteilung der Partikel hin (Agnihotri et al. 2014). Da die Höhe des Absorptionsmaximums bei 411 nm im Zusammenhang mit der Ag-Np-Konzentration steht, kann die Konzentration der Ag-Np aus der Extinktion berechnet werden. Folgende Beziehung wurde bestimmt: $y = 10,082x - 0,3663$ ($R^2 = 0,9919$, y: Konzentration in mg l^{-1} , x: Extinktion). Eine Abnahme der Ag-Np-Konzentration kann somit einen Hinweis auf die Sedimentation oder die Auflösung der Ag-Np sein.

2.3 Bestimmung der in der Ag-Np-Suspension enthaltenen Konzentration von Ag^+ -Ionen

Um die Menge freier Ag^+ -Ionen in der Ag-Np-Suspension zu bestimmen, wurden drei verschiedene Konzentrationen der Ag-Np-Suspension hergestellt (4; 20; 40 mg l^{-1}). Von jeder Konzentration wurden drei Wiederholungen angesetzt, welche bei 440000 g für zweieinhalb Stunden zentrifugiert wurden. Danach wurde jeweils im obersten Teil des klaren Überstandes eine geringe Mengen (1 ml) entnommen, welche auf den Silbergehalt (ICP-OES, Horiba Ultima 2) analysiert wurden. Um sicher zu gehen, dass keine Ag-Np in der entnommenen Menge enthalten waren, wurde ein Absorptionsscan (300-700 nm) der Proben durchgeführt. Wenn im Vergleich zu Wasser noch eine erhöhte Absorption festzustellen war, wurde der Anteil der Ag-Np mit Hilfe der oben beschriebenen Gleichung berechnet und von der gemessenen Konzentration abgezogen

2.4 Verwendete Pflanzenarten

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden die verschiedenen Pflanzenspezies entsprechend der Eignung für die verschiedenen Versuchsansätze und Fragestellungen ausgewählt. Für die Untersuchungen zu den Wirkungen verschiedener metallischer Np auf die Entwicklung von Pflanzen wurden die Pflanzenarten *Z. mays* und *B. napus* ausgewählt. Um mögliche unterschiedliche Reaktionen

verschiedener Arten zu berücksichtigen, wurde je eine mono- und dikotyle Art gewählt. Bei den experimentellen Ansätzen zu dem Verhalten metallischer Np auf der Blattoberfläche wurden Pflanzarten gewählt, deren Oberflächen sich zum Auftragen von Flüssigkeiten eigneten wie z.B. *C. sativus*, *Vicia faba* L. und *G. max*. Andere Kriterien wie die Anfälligkeit gegenüber Mängeln bei bestimmten Mikronährstoffen oder pilzlichen Erregern wurden ebenfalls bei der Auswahl der Pflanzenarten berücksichtigt. Die Pflanzenarten *C. sativus*, *A. sativa*. und *G. max* sind bekannt dafür, dass sie sensitiv auf eine ausbleibende Kupferernährung reagieren. Gleiches gilt für *A. sativa* bei einer Unterversorgung mit Eisen. *C. sativus* zeigt neben den Eigenschaften der guten Benetzbarkeit zusätzlich eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Echtem Mehltau, wodurch sich diese Art für einen der gewählten Versuchsansätze besonders eignete. Die bisher genannten Pflanzenarten sind agronomisch häufig genutzte Arten, denen weltweit eine große wirtschaftliche Bedeutung zukommt. In einem Telexperiment wurde außerdem die Pflanzenart *Sedum telephium* L. verwendet, die Blätter besitzt, deren Epidermis sich leicht ablösen lässt, wodurch sich eine der Fragestellungen über die Aufnahme bestimmter Präparate gezielter beantworten ließ.

2.5 Pflanzenanzucht und Wachstumsbedingungen

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden die verwendeten Pflanzen zu einem großen Teil in Nährlösungskulturen gehalten. Die vollständige Nährlösung enthielt alle essentiellen Pflanzennährstoffe in ausreichendem Umfang: 5,0 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1,0 mM KH_2PO_4 , 1,0 mM MgSO_4 , 11,8 μM MnCl_2 , 1,53 μM ZnSO_4 , 0,79 μM CuCl_2 , 46,2 μM H_3BO_3 , 0,52 μM Na_2MoO_4 , 90,0 μM NaFe-EDTA. Bei Bedarf konnte auf bestimmte Nährstoffe verzichtet werden, falls eine Unterversorgung der Pflanzen erwünscht war, um gezielt einen Nährstoffmangel zu erzeugen. Die Nährlösung hatte in der beschriebenen Komposition zu Beginn einen pH-Wert von 5,4-5,5. Nach mindestens 7-10 Tagen wurden die Nährlösungen regelmäßig ausgetauscht, sodass ein pH-Wert von 6,5 nicht überschritten wurde. Die Nährlösungen wurden stetig und gleichmäßig durch ein Belüftungssystem mit Sauerstoff angereichert. Vor der Überführung in die Nährlösung wurde mindestens die doppelte Menge an benötigten Pflanzen in Sand oder auf Papier angezogen. Bei der Anzucht auf Papier war auf eine ausreichend befeuchteten Untergrund zu achten. Um zu Beginn der Keimung die Situation im Boden zu simulieren, wurde der Lichteinfall durch das Abdecken der Keimschalen verhindert. Das Vorziehen der Pflanzen garantierte, dass für den eigentlichen Versuch eine große Anzahl gleichmäßig gewachsener Pflanzen zur Verfügung stand. Das Anziehen auf Papier ging etwas schneller als im Sand, sodass die Pflanzen je nach Pflanzenart eine Entwicklungsdauer von 3-6 Tagen hatten, bevor sie in die Nährlösungen gesetzt wurden. Bei längerer Dauer bestand die Gefahr, dass die Wurzeln der Pflanzen austrockneten, da sie häufig keinen Kontakt zur feuchten Oberfläche des Papiers mehr hatten. Wenn die Pflanzen im Sand angezogen wurden, wurden sie in der Regel etwas später (nach 6-14 Tagen) in die Nährlösung gesetzt. Die Experimente wurden, je nach freien Stellflächen, im Gewächshaus oder in der Klimakammer durchgeführt. Die Versuche, die in der Klimakammer (Convicon A1000; Winnipeg,

Kanada) stattfanden, wurden lediglich mit *Z. mays* durchgeführt. Diese Pflanzen wuchsen einzeln in Gefäßen mit einem Volumen von einem Liter. Jedes der Gefäße hatte eine eigene Abdeckung, um den Lichteinfall in die Nährlösung so gering wie möglich zu halten, sodass Algenwuchs unterbunden wurde. Die Pflanzen wurden von wasserabweisenden Schaumstoffzylindern am Stängel umhüllt und damit in dafür vorgesehen Aussparung im Deckel eingelassen, sodass die Wurzeln vollständig in der Nährlösung eingetaucht waren. Es wurden für Mais optimale Bedingungen in der Klimakammer eingestellt: Tagesbedingungen (14 Stunden): 28 °C; 40% relative Luftfeuchte, PPFD (photosynthetic photon flux density) auf Pflanzenhöhe: 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Nachtbedingungen (10 Stunden): 22 °C; 60% relative Luftfeuchte. Im Gewächshaus wuchsen die Pflanzen bei einer durchschnittlichen Tagestemperatur von 25 °C und einer Nachttemperatur von 18 °C. Je nach Jahreszeit konnte die Durchschnittstemperatur ein wenig Schwanken (1-3 °C). Sobald die natürliche Lichtintensität im Gewächshaus geringer war als 50 Kilolux (PPFD: 925 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), wurde zusätzlich künstliches Licht (Natriumdampfhochdrucklampen 400 Watt, PPFD auf Pflanzenhöhe: 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, DH Licht GmbH, Wülfrath, Deutschland) angestellt. Für Nährlösungsversuche wurden entweder Kick-Brauckmann-Gefäße mit einem Volumen von 8 Litern (Fassungsvermögen zwei bis fünf Pflanzen) oder Plastikgefäße mit einem Volumen von 5,2 Litern (Fassungsvermögen: zwei Pflanzen) verwendet. Die Pflanzen waren, wie bereits zuvor beschrieben, in den Deckel der Gefäße eingelassen. In einem Versuch wuchsen die Pflanzen in Boden (Profi Substrat Typ VM, Einheitserde, Sinntal-Altengronau, Deutschland) in 1,5 Liter Töpfen. Im Gewächshaus waren die Pflanzgefäße auf Tischen aufgestellt.

2.6 Tropfen- und Sprühapplikationen der Behandlungspräparate

In einem Teil der Experimente wurde das Verhalten verschiedener Präparate auf der Blattoberfläche untersucht. Dazu wurden die verschiedenen Substanzen entweder durch Tropfen- oder Sprühapplikation auf die zu untersuchenden Oberflächen aufgetragen. Bei den Sprühapplikationen (Apothekerflaschen mit Sprühkopf, 50 ml Füllvolumen) wurde immer das gleiche Volumen auf die gleiche Menge Pflanzen je Variante verteilt. Dabei wurden die Deckel der Nährlösungsgefäße großzügig mit Papiertüchern abgedeckt, sodass ein Abtropfen der aufgetragenen Präparate in die Nährlösung verhindert wurde. Im Falle der Tropfenapplikation war eine exaktere Vorgehensweise möglich, bei der im Gegensatz zur Sprühapplikation die applizierte Dosis bekannt war. Die verschiedenen Suspensionen und Lösungen wurden immer in der gleichen Konzentration, dem gleichen Tropfenvolumen und der gleichen Anzahl an Tropfen mit einer Multipette (M4, Eppendorf, Wesseling, Deutschland) aufgetragen, sodass die aufgetragene Menge des jeweiligen Stoffes exakt bekannt war.

2.7 Bestimmung der Konzentrationen verschiedener Elemente in der Pflanze

Für die Nährstoffgehaltsanalysen des Pflanzenmaterials wurde dieses mindestens 48 Stunden bei 60 °C getrocknet. Anschließend wurden die Trockenmassen bestimmt. War die Masse höher als 0,5 g wurden die Pflanzen gemahlen und eine Teilprobe (ca. 0,5 g) entnommen. Bei geringeren Gewichten wurde das

Probenmaterial mit den Händen zerkleinert, wobei Gummihandschuhe getragen wurden. Anschließend wurde das Probenmaterial im Säuredruckaufschluss aufgelöst, sodass die entsprechende Elementkonzentration in der Lösung bestimmt werden konnte. Durch das zuvor bestimmte Gewicht konnte die Elementkonzentration in der Trockenmasse berechnet werden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Elementaranalysen wurden verschiedene Geräte verwendet. Silber wurde entweder mit dem ICP OES (Horiba, Modell Ultima 2, Oberursel, Deutschland) oder mit Graphitrohr-AAS (Perkin Elmer, Modell AAnalyst 700, Waltham, USA) gemessen. Die Elemente Kupfer und Eisen wurden mit einem Flammen-AAS (Perkin Elmer, Modell 1100 B, Waltham, USA) bestimmt. Phosphat wurde mit Hilfe des Molybdänblau-Verfahren bestimmt. Bei diesem Verfahren werden Orthophosphate mit Ammoniummolybdat im sauren Medium zu Phosphormolybdänsäure umgesetzt. Unter Zuhilfenahme von Reduktionsmitteln ergibt sich Phosphormolybdänblau. Die Intensität des Farbstoffes hängt von der vorhandenen Phosphatmenge ab und kann bei 578 nm photometrisch (Eppendorf, Modell ECOM 6122, Wesseling, Deutschland) bestimmt werden.

2.8 Gaswechselfmessungen

Die Transpirations- und Assimilationsrate wurde mit Hilfe des Gerätes GFS 3000 (portable gas-exchange fluorescence system, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) bestimmt. Das Gerät war mit den folgenden Komponenten ausgestattet: "Control Unit 3100-C, Standard Measuring Head 3010-S", LED Light Source 3040-L und AC Power Supply 3020-N. Für die Messung wurde das Blatt in die Küvette des Standard Measuring Head 3010-S eingespannt. Dabei war darauf zu achten, dass die Küvette dicht verschlossen war, sodass die Umgebungsluft die Messung nicht störte, gleichzeitig jedoch das Blatt nicht beschädigt wurde. Für die Messung wurde eine CO₂ Konzentration von 400 ppm (etwa normale Konzentration in der Außenluft) und eine H₂O-Konzentration von 17000 ppm im Luftstrom (750 µmol/s), der durch die Küvette geführt wurde, eingestellt. Das Prinzip der Messung basiert auf der Bestimmung der Veränderung der CO₂- und H₂O-Konzentrationen in dem Luftstrom (Infrarot-Gasanalysator), der durch die Kuvette geleitet wird. Mit Hilfe dieser Daten werden Rückschlüsse auf die Transpirations- und Assimilationsrate des in der Küvette eingespannten Blattes gezogen. Um einheitliche Untersuchungsbedingungen zu schaffen, können folgende Parameter eingestellt und für die Dauer der Messung konstant gehalten werden: Luftstromgeschwindigkeit und -zusammensetzung (CO₂-Konzentration, H₂O-Konzentration), Temperatur und Licht.

2.9 Trockenmassen-, Wurzellängen, Chlorophyllbestimmung

In vielen Versuchen zählte die Trockenmasse zu den grundlegenden Parametern zur Beurteilung der verschiedenen Wirkungen der unterschiedlichen Behandlungen der Pflanzen. Um die Trockenmasse zu bestimmen, wurden in der Regel der Spross und die Wurzeln der Pflanzen separat voneinander geerntet und für mindestens 48 Stunden im Trockenschrank bei 60 °C gelagert. Anschließend wurde das Gewicht der jeweiligen getrockneten Pflanzenteile mit einer Waage (Satorius Entris, Satorius Lab Instruments

GmbH, Göttingen, Deutschland) bestimmt. Die Länge der Wurzeln in einem frühen Entwicklungsstadium, in dem noch keine Seitenwurzeln und Verzweigungen gebildet waren, wurde mit Hilfe eines Lineals ausgemessen. Wurzeln, die sich in einem späteren Entwicklungsstadium befanden, wurden mit Hilfe eines Wurzelscanners digital abgebildet. Dazu wurden die Pflanzen in einem eigens dafür konzipierten Wasserbehälter auf den Scanner gelegt, sodass die Wurzeln möglichst gleichmäßig im Wasser verteilt waren und nach Möglichkeit nicht übereinander lagen. Nach dem Scannen aller Pflanzen einer Behandlung wurde das Wasser stets gewechselt, um Kontaminationen von anderen Behandlungen durch an den Wurzeln haftendes Wasser zu vermeiden. Nachdem die Bilder aller Pflanzenwurzeln aufgenommen waren, wurden diese mittels einer Software (WinRhizo, Instruments Regent Inc, Québec, Kanada) im Hinblick auf die Länge ausgewertet. Der Chlorophyllgehalt einzelner Blätter wurde entweder mit einem SPAD-Meter (Minolta SPAD-502 Plus, Konica Minolta, Tokio, Japan) oder nach Extraktion des Chlorophylls mit 80%igem Aceton photometrisch bestimmt (Lichtenthaler und Wellburn 1983).

2.10 Bildaufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM)

Zur Beurteilung des Erscheinungsbildes und der partikulären Größenverteilung der auf Blättern aufgetragenen Präparate wurden die Blattoberflächen mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Dazu wurden Tropfen (15 µl) auf die Blattoberfläche verschiedener Pflanzenarten (*C. sativus*, *A. sativa*, *V. faba*) aufgetragen. Nachdem die Tropfen eingetrocknet waren, wurden die behandelten Stellen mit einem Lochstanzer ausgeschnitten und auf Objektträgern für das REM gelegt und getrocknet. Die Proben wurden zunächst durch einen Sputter mit Gold (400 nm Schichtdicke) beschichtet. Anschließend wurden die Aufnahmen mit REM (Thermo Fisher Scientific, Phenom pure, Eindhoven, Niederlande) bei verschiedenen Vergrößerungen gemacht.

2.11 Statistische Analysen und grafische Darstellungen

Die Daten wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA) mit IBM SPSS Statistics 22 (IBM, New York, USA) ausgewertet ($p < 0.05$). Die statistischen Unterschiede zwischen einzelnen Behandlungen wurden mit dem Duncan-Test identifiziert ($\alpha=0.05$). Falls nicht anders im Text erwähnt, werden die Ergebnisse als Mittelwert dargestellt (+Standardfehler). Die Diagramme wurden mit Excel (Office 2010, Microsoft, Washington, USA) erstellt.

3 Einfluss von synthetisch hergestellten metallischen Np (Ag, TiO₂, ZnO) auf die Entwicklung von Pflanzen

3.1 Wirkung metallischer Np (Ag, TiO₂, ZnO), in Abhängigkeit der Dosis, auf die Keimfähigkeit und Sprossentwicklung von *Z. mays* im Vergleich zu den entsprechenden Bulk-Substanzen

3.1.1 Einleitung

Das Ziel dieser Untersuchungen bestand darin, potentielle Wirkungen metallischer Np (Ag, TiO₂, ZnO) auf das Wachstum von Pflanzen im Vergleich zu den jeweiligen Bulk-Stoffen zu beurteilen, vor allem im Hinblick auf eine mögliche gesteigerte Toxizität der Np. Dazu wurde die Keimfähigkeit sowie das Wurzelwachstum von *Z. mays* nach Zugabe verschiedener Np-Suspensionen (ZnO, TiO₂, Ag) in verschiedenen Konzentrationen (20; 200; 2000 mg l⁻¹) im Vergleich zu den jeweiligen Bulk-Stoffen untersucht. Außerdem sollten potentielle Beeinträchtigungen durch in den Np-Suspensionen enthaltenen Stabilisatoren geprüft werden.

3.1.2 Material & Methoden

3.1.2.1 Bestimmung des pH-Wertes in den Np-Suspensionen

Um Nebeneffekte durch unterschiedliche pH-Werte auszuschließen, wurden diese in den verschiedenen Np- und Bulk-Suspensionen und -Konzentrationen (20; 200; 2000 mg l⁻¹) gemessen (WTW, pH 340i; Weilheim, Deutschland).

3.1.2.2 Behandlung des Saatgutes mit den verschiedenen Np-Suspensionen

Für die Versuche mit TiO₂- und Ag-Np wurden die gleichen Konzentrationen der Bulk-Stoffe gleichzeitig in einem Versuch getestet. Für den Versuch, in dem die Wirkung von ZnO-Np mit ZnO-Bulk verglichen wurde, wurden die Konzentrationen der ZnO-Bulk-Behandlung kleiner als 2000 mg l⁻¹ in einem separaten Experiment untersucht. In den TiO₂- und Ag-Suspensionen wurde ein konzentrationsabhängiger pH-Wert festgestellt (Tab. 1). Um eine Auswirkung der verschiedenen pH-Werte auf die Effekte auszuschließen, wurde den Np-Suspensionen ein MES-Puffer (2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure) zugegeben (TiO₂: 1 mM MES, Ag: 12 mM MES). Dadurch hatten die verschiedenen Np- und Bulk-Behandlungssuspensionen einen gleichmäßigen pH-Wert zwischen 6,0-6,1. Der pH-Wert der ZnO Suspensionen (Bulk und Np) war annähernd gleich (7,1-7,5), sodass kein Puffer beigelegt wurde. Das Saatgut (120 Körner) wurde in Hypochloritlösung (1%) für 10 Minuten oberflächensterilisiert und anschließend gründlich mit deion. Wasser gespült. Danach wurden die Saatkörner in den entsprechenden Suspensionen und Konzentrationen für 20-24 Stunden vorgequollen. Im Anschluss daran wurden die Saatkörner ausgewählt, bei denen der Embryo bereits angeschwollen und die Samenschale aufgeplatzt war. Diese Saatkörner wurden dann zur weiteren Keimung in

Petrischalen (100 mm*15 mm) gegeben. Sieben Saatkörner je Schale und drei Schalen je Behandlungskonzentration wurden verwendet. Bei gleichbleibender Np-Konzentration wurde ein Volumen von 25 ml appliziert, sodass die Saatkörner nicht vollständig bedeckt waren. Anstelle von Filterpapier als Saatbett wurde ein Kunststoffnetz verwendet, um zu verhindern, dass sich die Np im Filterpapier festsetzen. Der Deckel wurde so aufgelegt, dass eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet war. Der Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung in den Petrischalen wurde nach 1,5 Tagen ausgeglichen. Die Keimrate, Wurzellänge und in manchen Fällen auch Sprosslänge wurde nach 1-3 Tagen gemessen. Sobald 2 mm der Wurzel sichtbar waren, wurde das Saatkorn als gekeimt bewertet.

3.1.2.3 Einfluss der additiven Stoffe welche als Stabilisatoren in den Np-Suspensionen enthalten sind

Um auszuschließen, dass die zusätzlich in den Np-Suspensionen enthaltenen stabilisierenden Additive die Wirkung der Np beeinflussen, wurde anschließend deren Einfluss auf die Keimfähigkeit und das Wachstum in einem separaten Versuch untersucht. Folgende Substanzen und Konzentrationen wurden für die Behandlung gewählt: Ein Gemisch aus Glycerintrioléat und Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat (jeweils 800 mg l⁻¹) (Ag), CTAB (133 mg l⁻¹) (TiO₂) und ein Gemisch aus Triton X-100 und Ethylenglycol (jeweils 97 mg l⁻¹) (ZnO). Die verwendeten Konzentrationen der Stabilisatoren im Versuch entsprachen dem Gehalt einer Np-Suspension mit einer Np-Konzentration von 2000 mg l⁻¹. Das Saatgut (120 Körner) wurde in Hypochloritlösung (1%) für 10 Minuten sterilisiert und anschließend gründlich mit deion. Wasser gespült.

3.1.3 Ergebnisse

3.1.3.1 pH-Werte der Np-Suspensionen

Der pH-Wert der verschiedenen Stammsuspensionen variierte in Abhängigkeit von der verwendeten Np Konzentrationen (Tab. 1). Da sowohl bei den Ag-Np als auch bei den TiO₂-Np die Unterschiede relativ hoch waren, wurde durch Zugabe eines Puffers (MES) ein einheitlicher pH-Wert von 6,0-6,1 eingestellt.

Tabelle 1: pH-Werte der verschiedenen Np-Behandlungssuspensionen bei verschiedenen Konzentrationen vor und nach der Zugabe eines Puffers (MES). Der ZnO-Np-Suspension wurde kein Puffer zugegeben.

	Ag-Np			TiO ₂ -Np			ZnO-Np		
Np-Konzentration (mg l ⁻¹)	20	200	2000	20	200	2000	20	200	2000
pH-Wert (vorher)	6,5	7,4	7,6	5,9	4,8	3,7	7,1	7,2	7,5
Zugabe MES (mM)	12	12	12	1	1	1			
pH-Wert (nachher)	6,1	6,1	6,1	6,0	6,0	6,0			

3.1.3.2 Einfluss der Behandlungen des Saatgutes mit den verschiedenen Np-Suspensionen und der additiven Stabilisatoren

Die Keimfähigkeit (Abb. 1, A) wurde durch die Behandlung mit Ag-Np in der höchsten Konzentration negativ beeinflusst. Die geringeren Konzentrationen (20 und 200 mg l⁻¹) hatten dagegen keine Wirkung auf die Keimfähigkeit. Die Behandlungen mit Ag-Bulk hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Keimfähigkeit der Pflanzen. Eine Behandlung mit Ag-Np hatte im Vergleich zur Kontrolle einen deutlichen negativen Einfluss auf das Wurzel- (W) und Sprosswachstum (S) (Abb. 1, B) in Abhängigkeit von der Höhe der applizierten Dosis. Die Exposition der Pflanzen mit Ag-Bulk zeigte keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum.

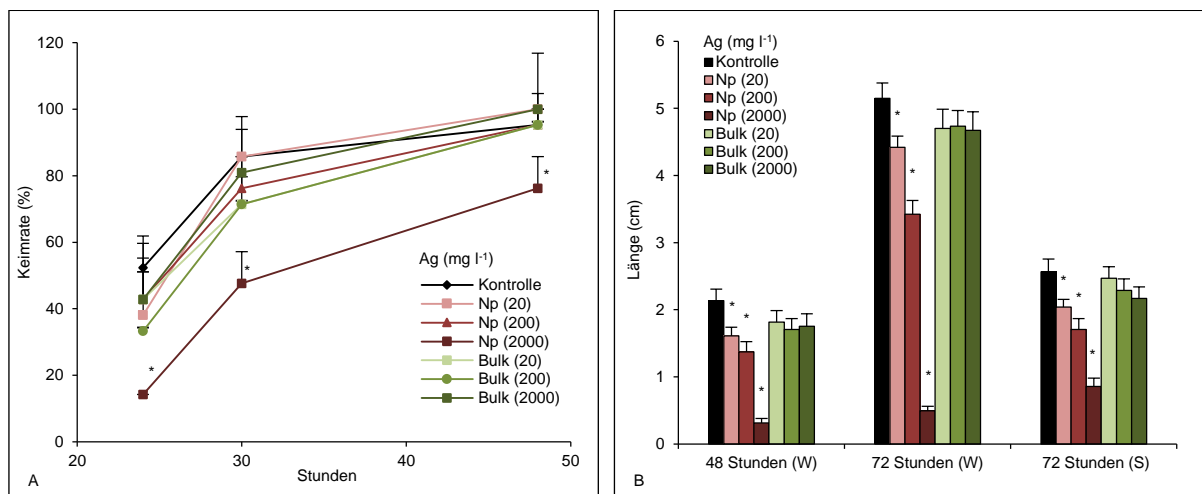


Abbildung 1: Einfluss von Ag-Np und Ag-Bulk (20-2000 mg l⁻¹) auf die Keimrate (A) sowie das Wurzel- und Sprosswachstum (B) von *Z. mays* in Abhängigkeit von der Zeit (24-72 Stunden). Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+ Standardfehler) aus drei Wiederholungen mit jeweils sieben Saatkörnern. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit einem *-Symbol gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Die Applikation von TiO₂-Np in der höchsten Konzentration verursachte eine Reduktion der Keimrate in den ersten 24 Stunden (Abb. 2, A). Die Behandlung mit Bulk-TiO₂ bei einer Konzentration von 0,2 g l⁻¹ reduzierte die Keimrate innerhalb der ersten 48 Stunden. Die übrigen Behandlungen hatten keinen Einfluss die Keimfähigkeit. Die TiO₂-Np wirkten sich bei den Konzentrationen von 200 und 2000 mg l⁻¹ negativ auf das Wurzelwachstum aus (Abb. 2, B). Die hohe Konzentration (2000 mg l⁻¹) beeinflusste auch das Sprosswachstum nach 72 Stunden negativ. Die TiO₂-Bulk-Behandlungen verursachten ebenfalls negative Effekte auf das Wurzelwachstum nach 48 Stunden bei den Konzentrationen 200 und 2000 mg l⁻¹. Die mittlere Konzentration von 200 mg l⁻¹ reduzierte zusätzlich das Sprosslängenwachstum. Es war zu beobachten, dass die TiO₂-Np durch Agglomeration größere Partikel bildeten und sich auf der Bodenoberfläche der Petrischalen festsetzten (nicht dargestellt).

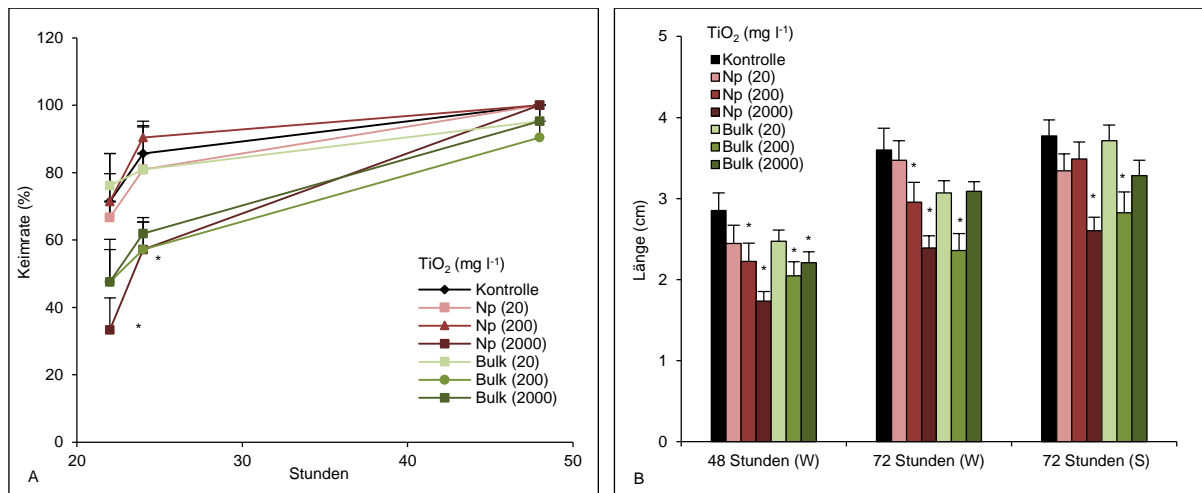


Abbildung 2: Einfluss von TiO₂-Np und TiO₂-Bulk (20-2000 mg l⁻¹) auf die Keimrate (A) sowie das Wurzel- und Sprosswachstum (B) von *Z. mays* in Abhängigkeit von der Zeit (22-72 Stunden). Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+ Standardfehler) aus drei Wiederholungen mit jeweils sieben Saatkörnern. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit einem *-Symbol gekennzeichnet (p<0,05).

Die Behandlung mit ZnO-Np reduzierte die Keimrate bei einer Konzentration von 20 mg l⁻¹ nach 24 Stunden (Abb. 3, A). Die Bulk-Behandlung wirkte sich bei einer Konzentration von 2000 mg l⁻¹ ebenfalls negativ auf die Keimung aus. Bei den übrigen Konzentrationen und an den später untersuchten Zeitpunkten der Keimrate wurden keine Unterschiede mehr festgestellt. Es war zu beobachten, dass die ZnO-Np durch Agglomeration größere Partikel bildeten und sich auf der Bodenoberfläche der Petrischalen festsetzten (nicht dargestellt). Nach 48 und 72 Stunden war das Wurzelwachstum lediglich durch die Behandlung mit ZnO-Bulk (2000 mg l⁻¹) negativ beeinträchtigt (Abb. 3, B). Die Behandlungen der Pflanzen in den geringen Konzentrationen mit ZnO-Np (20; 200 mg l⁻¹) führten zu einer Verbesserung des Wurzelwachstums. Die Keimfähigkeit der Pflanzen wurde bis zu einer Konzentration von 1000 mg l⁻¹ durch eine ZnO-Bulk-Behandlung nicht beeinflusst (Abb. 3, C). Die Wurzellänge der gekeimten Pflanzen war nach 48 Stunden durch die Behandlungen mit ZnO-Bulk bei den Konzentrationen von 100 und 1000 mg l⁻¹ reduziert (Abb. 3, D).

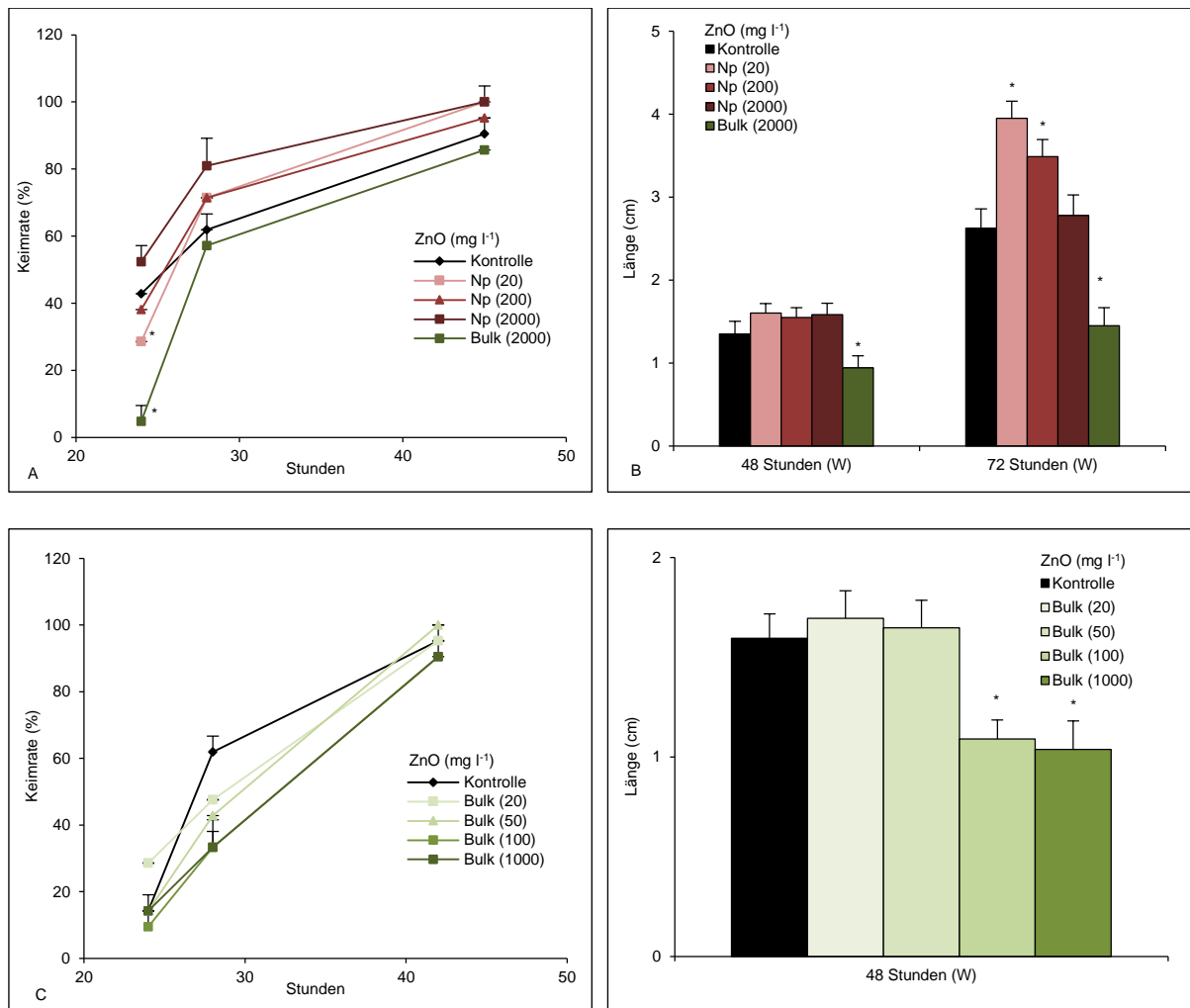


Abbildung 3: Einfluss von ZnO-Np (20-2000 mg l⁻¹) und ZnO-Bulk (50-2000 mg l⁻¹) auf die Keimrate (A+C) und auf das Wurzel- und Sprosswachstum (B+D) von *Z. mays* in Abhängigkeit von der Zeit (24-72 Stunden). Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+Standardfehler) aus drei Wiederholungen mit jeweils sieben Saatkörnern. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit einem *-Symbol gekennzeichnet (p<0,05).

Im Folgenden werden die Effekte der in den Np-Suspensionen zusätzlich enthaltenen Stabilisatoren beschrieben (Abb. 4). Bei den verwendeten Konzentrationen handelt es sich um die Menge an Stabilisatoren, die jeweils in der höchsten Konzentration der Np (2000 mg l⁻¹) enthalten waren. Die in den TiO₂- und ZnO-Suspensionen enthaltenen Stabilisatoren CTAB bzw. Triton X-100 + Ethylen Glykol bewirkten beide ein reduziertes Wurzelwachstum nach 24 Stunden und ein reduziertes Sprosswachstum nach 48 Stunden. CTAB beeinflusste zusätzlich das Wurzelwachstum nach 48 Stunden negativ. Die in der Ag-Np-Suspension enthaltenen Substanzen hatten dagegen in der getesteten Konzentration keine Auswirkungen auf das Wachstum

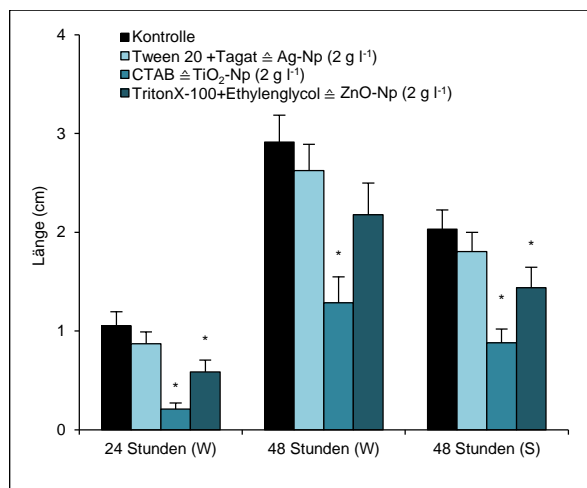


Abbildung 4: Einfluss der in den verschiedenen Np-Suspensionen enthaltenen stabilisierenden Hilfsstoffe auf das Wurzel- und Sprosswachstum von *Z. mays* in Petrischalen nach 24 und 48 Stunden. Getestet wurden jeweils die in den Suspensionen enthaltenen Hilfsstoffe ohne die jeweiligen Np. Für Ag-Np-Suspensionen: ein Gemisch aus Glycerol-Trioleat (Tagat) und 4% Polyoxxyethylen (20)-Sorbitan-Monolaurat, jeweils 800,0 mg l⁻¹, für TiO₂-Np-Suspensionen: CTAB; 133 mg l⁻¹ und für ZnO-Np: ein Gemisch aus Triton X-100 und Ethylenglycol, jeweils 97,0 mg l⁻¹. Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+ Standardfehler) aus drei Wiederholungen mit jeweils sieben Saatkörnern. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit einem *-Symbol gekennzeichnet (p<0,05).

3.1.4 Diskussion

Es wurde der Einfluss verschiedener Np- und Bulk-Suspensionen (Ag, TiO₂, ZnO) auf das Wachstum von *Z. mays* untersucht, um potentiell verschiedene Wirkungen der Np im Vergleich zu den jeweiligen Bulk-Stoffen aufzudecken. Direkte Vergleiche mit anderen Ergebnissen ähnlicher veröffentlichter Studien sind nur bedingt möglich, da festgestellte Wirkungen von Np auf Pflanzen durch die jeweiligen experimentellen Methoden beeinflusst werden können. Häufige Unterschiede bestehen z.B. bei: Art (Partikelstruktur) und Größe der Np, Np-Konzentration und Expositionsdauer, Wachstumsgrundlage (Boden, Sand, Wasserkultur, Agar), Pflanzenart und der Verwendung von stabilisierenden Hilfsstoffen in den Np-Suspensionen, die die Wirkung beeinflussen können. Diese Aspekte könnten Ursachen für widersprüchliche Wirkungen im Vergleich zu anderen veröffentlichten Ergebnissen sein.

Die Ag-Np hatten einen extremen Einfluss auf die Pflanzenentwicklung in Abhängigkeit von der applizierten Konzentration. Je höher die verwendete Dosis, umso stärker waren die negativen Effekte auf die Keimung sowie das Wurzel- und Sprosswachstum (Abb. 1). Auf Grund der gezeigten Ergebnisse können Nebeneffekte durch die in den Ag-Np-Suspensionen enthaltenen Stabilisatoren ausgeschlossen werden, da die Menge an Stabilisatoren, die in der höchsten getesteten Ag-Np-Konzentration (2000 mg l⁻¹) enthalten ist, keine Wirkung auf die Pflanzenentwicklung hatte (Abb. 4). Bereits veröffentlichte Studien zeigten ebenfalls konzentrationsabhängige negative Effekte von Ag-Np auf die Biomasseentwicklung (Stampoulis et al. 2009; Yin et al. 2011; Dimkpa et al. 2013; Musante und White 2012), das Wurzel- und Sprosswachstum (Yin et al. 2011; Dimkpa et al. 2013; Parveen und Rao 2015),

die Ausbildung von Wurzelhaaren (García-Sánchez et al. 2015) und die Transpiration der Pflanzen (Stampoulis et al. 2009; Musante und White 2012). Die Applikation von Ag-Np in geringer Konzentration (2 mg l^{-1}) war für die Biomasseentwicklung von *G. max* unter Staunässe förderlich (Mustafa et al. 2015). Parveen und Rao (2015) konnten ebenfalls eine verbesserte Keimung von *Pennisetum glaucum* L. durch eine Behandlung mit Ag-Np (50 mg l^{-1}) feststellen.

Die gezeigten Effekte einer Behandlung mit TiO_2 -Np waren abhängig von der verwendeten Konzentration (Abb. 2). Ab einer Konzentration von 200 mg l^{-1} traten negative Wirkungen auf die Pflanzenentwicklung auf. Die Ergebnisse weisen jedoch auch darauf hin, dass der in der TiO_2 -Np-Suspension enthaltende Stabilisator (CTAB) die Pflanzenentwicklung sehr stark hemmte (Abb. 4), was ebenfalls die Ursache der gezeigten Effekte durch eine TiO_2 -Np-Behandlung gewesen sein könnte. Darüber hinaus trat ein gehemmtes Wachstum durch eine Behandlung mit TiO_2 -Bulk auf, jedoch nur bei der mittleren Konzentration (200 mg l^{-1}). Dies könnte darauf hinweisen, dass der Stoff TiO_2 selbst eine toxische Wirkung erzeugen kann, unabhängig davon, in welcher Form er vorliegt (Np oder Bulk). Effekte durch unterschiedliche pH-Werte können ausgeschlossen werden, da ein Puffer verwendet wurde. Ein möglicher Einfluss gelöster Ti-Ionen ist auf Grund der geringen Löslichkeit von TiO_2 (Finnegan et al. 2007; Schmidt und Vogelsberger 2009) unwahrscheinlich. Bisherige veröffentlichte Ergebnisse zur Wirkung von TiO_2 -Np sind sehr widersprüchlich. Einflüsse, die sich negativ auf die Keimung (Ruffini Castiglione et al. 2011; Clement et al. 2013; Andersen et al. 2016), auf das Biomassewachstum (Clement et al. 2013) und das Wurzelwachstum (Ghosh et al. 2010; Ruffini Castiglione et al. 2011; Clement et al. 2013) auswirkten, wie in den hier dargestellten Ergebnissen, wurden bereits zuvor beschrieben. In den meisten Fällen wurde eine konzentrationsabhängige negative Wirkung beschrieben. Es wurden ebenfalls bereits negative Effekte durch eine TiO_2 -Bulk-Behandlung auf die Biomasse (Clement et al. 2013), das Sprosswachstum (Feizi et al. 2012), die Keimung und das Wurzelwachstum (Feizi et al. 2012; Clement et al. 2013) beschrieben. Feizi et al. (2012) konnten teilweise negative und positive, in den meisten Fällen jedoch keine Wirkungen durch eine TiO_2 -Np-Applikation auf das Wachstum von Weizen (*T. aestivum*) feststellen. Ein Zusammenhang zwischen den Effekten und der verwendeten Konzentration war in dieser Studie nicht erkennbar (Feizi et al. 2012). Foltete et al. (2011) und Klancnik et al. (2011) konnten keinerlei Auswirkungen einer TiO_2 -Np-Applikation auf das Wurzelwachstum und die Frischmasse von Pflanzen beobachten. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass TiO_2 -Np das Wurzelwachstum von Pflanzen fördern können (Larue et al. 2012). Diese Autoren berichten von einer Begünstigung des Wurzelwachstums von Weizen bei Konzentrationen von 50 oder 100 mg l^{-1} und einer Np-Größe von 14-36 nm. Als Ursache für das geförderte Wachstum wurde eine verbesserte Wasseraufnahme in das Wurzelgewebe vermutet. Geringere Konzentrationen (10 mg l^{-1}) und größere Np (140-655 nm) beeinflussten in der genannten Studie die Keimung, das Wurzelwachstum und die Trockenmasse nicht.

Obwohl die in den ZnO-Np-Suspensionen zusätzlich enthaltenen Hilfsstoffe (Triton X-100 und Ethylenglykol) zur Stabilisierung der Np bei der gleichen Konzentration, die in einer 2000 mg l⁻¹ ZnO-Suspension enthalten sind, einen negativen Einfluss auf das Wurzelwachstum hatten (Abb. 4), konnte bei der 2000 mg l⁻¹ Behandlung mit ZnO-Np keine Beeinträchtigung des Wachstums beobachtet werden (Abb. 3). Die Ergebnisse zeigen auch, dass bei geringeren Konzentrationen (20 und 200 mg l⁻¹ ZnO-Np) das Wurzelwachstum größtenteils gefördert wurde. Die Verwendung von ZnO-Bulk zeigte ab einer Konzentration von 100 mg l⁻¹ und darüber eine hemmende Wirkung auf die Keimung und das Wurzelwachstum. Eine mögliche Ursache für die gezeigten Effekte könnte die Freisetzung von Zn²⁺-Ionen aus den ZnO-Np oder auch aus ZnO-Bulk sein, welche eine fördernde oder hemmende Wirkung auf das Wachstum haben könnten. Eine weitere mögliche Begründung für die Effekte könnte darin liegen, dass die Kontrollpflanzen in deion. Wasser heranwuchsen und somit höherem osmotischem Stress ausgesetzt waren als die behandelten Pflanzen, bei denen der osmotische Stress durch freigesetzte Zn²⁺-Ionen geringer war. Der pH-Wert der verschiedenen Konzentrationen lag zwischen 7,1 und 7,5. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass solch geringe Unterschiede im pH-Wert eine Erklärung für die gezeigten Effekte sein könnten. In der Literatur gibt es ebenfalls Studien, in denen positive Wirkungen von ZnO-Np auf das Wurzel und Sprosswachstum von *Vigna radiata* L. und *Cicer arietinum* L. (Mahajan et al. 2011) sowie auf die Keimung und das Wurzelwachstum von *G. max* (Lopez-Moreno et al. 2010) gezeigt wurden, bei gleichen oder geringeren Konzentrationen als in der vorliegenden Arbeit. In beiden Studien konnte jedoch eine Beeinträchtigung des Wachstums bei allen Pflanzenspezies ab einer Konzentration von 2000 mg l⁻¹ festgestellt werden, was gegensätzlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit ist. Beide Studien untersuchten die Wirkung von ZnO-Bulk-Behandlungen nicht. Studien, die Wirkungen von ZnO-Bulk untersuchten, zeigten ein gehemmtes Wachstum (Dimkpa et al. 2012; Stampoulis et al. 2009), was den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entspricht. Die Ergebnisse von García-Gómez et al. (2015) ergaben ein gehemmtes Sprosswachstum bei *Vicia sativa* L. bei einer ZnO-Konzentration 1000 mg kg⁻¹ Boden. Die meisten anderen Studien zeigten in Abhängigkeit von der Dosis negative Effekte von ZnO-Np auf Biomasseentwicklung (Lin und Xing 2008; Stampoulis et al. 2009), Keimung (Lin und Xing 2007) und Wurzelwachstum (Lin und Xing 2007; Dimkpa et al. 2012; Shaymurat et al. 2012; Yang et al. 2015). Einige Studien untersuchten den Einfluss der von den ZnO-Np freigesetzten Zn²⁺-Ionen und kamen zu dem Schluss, dass das gehemmte Wachstum der Pflanzen nicht auf die Zn²⁺-Ionen zurückzuführen ist (Lin und Xing 2007, 2008; Shaymurat et al. 2012).

Zusammenfassend kann man basierend auf den vorliegenden Ergebnissen schließen, dass Np in Abhängigkeit von der Dosis sowohl negative als auch positive Wirkungen auf das Wachstum von *Z. mays* haben können. Die entsprechenden Bulk-Stoffe hatten im Vergleich dazu ähnliche (TiO₂), gegensätzliche (ZnO) oder keine (Ag) Wirkung. Diese Tatsachen unterstreichen die Bedeutung einer gesonderten Beurteilung der Wirkung von Np im Vergleich zu den Bulk-Stoffen auf höhere Organismen. Außerdem geht aus den Ergebnissen hervor, dass die Wirkung zusätzlich durch die

beigefügten Stabilisatoren in den Suspensionen beeinflusst werden kann. Andere Studien zeigten bereits, dass die An- bzw. Abwesenheit von Stabilisatoren die Toxizität von Np beeinflussen können (Barrena et al. 2009; Stampoulis 2009; Cvjetko 2017), jedoch wurde dieser Aspekt in manchen Studien auch vernachlässigt (z.B. Yin et al. 2011; Yin et al 2012).

3.2 Untersuchungen der Wirkung von Ag-Np auf das Wachstum von *Z. mays* in einer Nährlösung

3.2.1 Einleitung

Für eine nähere Beurteilung der zugrundeliegenden Ursachen der zuvor festgestellten Effekte wurden in den folgenden Experimenten nur noch Ag-Np verwendet, da hier: (i) im Vergleich zu Ag-Bulk eine klare negative Wirkung und eine Dosis-Wirkungsbeziehung erkennbar war, (ii) die Ag-Np nicht erkennbar größere Agglomerate bildeten und (iii) durch die zusätzlich enthaltenen Hilfsstoffe in der Ag-Np-Suspension keine toxische Wirkungen hervorgerufen wurden. Die verwendeten ZnO- und TiO₂-Np eigneten sich für diese Art der Versuche weniger, da die enthaltenen Hilfsstoffe (Triton X-100 und Ethylen Glykol (ZnO) und CTAB (TiO₂)) bereits negative Wirkungen verursachten und potentielle Effekte dadurch überlagert werden können. Zunächst wurde untersucht, wie sich die Wirkungen der Ag-Np bei *Z. mays* in einem späteren Entwicklungsstadium, d.h. nach der Keimung, in einer Nährlösung äußerten. Zusätzlich wurde geprüft, ob eine Tropfen-Applikation von Ag-Np auf die Blattoberfläche ebenfalls eine Beeinträchtigung verursacht.

3.2.2 Material & Methoden

Das Experiment wurde im Klimaschrank durchgeführt. Die Pflanzen wurden, wie bereits in Abschnitt 2.5 beschrieben, zunächst auf Papier für drei Tage angezogen und im Anschluss in die Nährlösung überführt. Nach insgesamt 5 Tagen Wachstum wurde in der Nährlösung eine Ag-Np-Konzentration von 2 und 10 mg l⁻¹ eingestellt. Zusätzlich wurde die Wirkung einer Blattapplikation von Ag-Np untersucht. Dazu wurden elf Tropfen mit je einem Volumen von 10 µl und einer Konzentration von 20 mg l⁻¹ auf die Blattoberfläche des ältesten Blattes aufgetragen. Auf die Behandlung mit Ag-Bulk wurde in diesem Versuchsansatz verzichtet, da in den Keimfähigkeitsuntersuchungen zuvor keine Effekte festzustellen waren. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die keine Zugabe von Ag-Np in die Nährlösung erhielten. Je beschriebener Variante wurden vier Pflanzen behandelt. 2 Tage nach der Applikation der Ag-Np wurde die Gesamtwurzellänge gemessen und weitere 5 Tage später wurden die Trockenmasse der Pflanzen bestimmt (vgl. Abschnitt 2.9).

3.2.3 Ergebnisse

Bereits nach 24 Stunden konnte bei beiden verwendeten Ag-Np-Konzentrationen ein starkes Einrollen der Blätter (Abb. 5, B und C), eine Akkumulation grauer Aggregate an der Wurzeloberfläche

(Abb. 5, D und E) sowie eine Beeinträchtigung des Wachstums festgestellt werden. Die Blattapplikation der Ag-Np verursachte keinerlei Auffälligkeiten im Vergleich zu den Kontrollpflanzen.

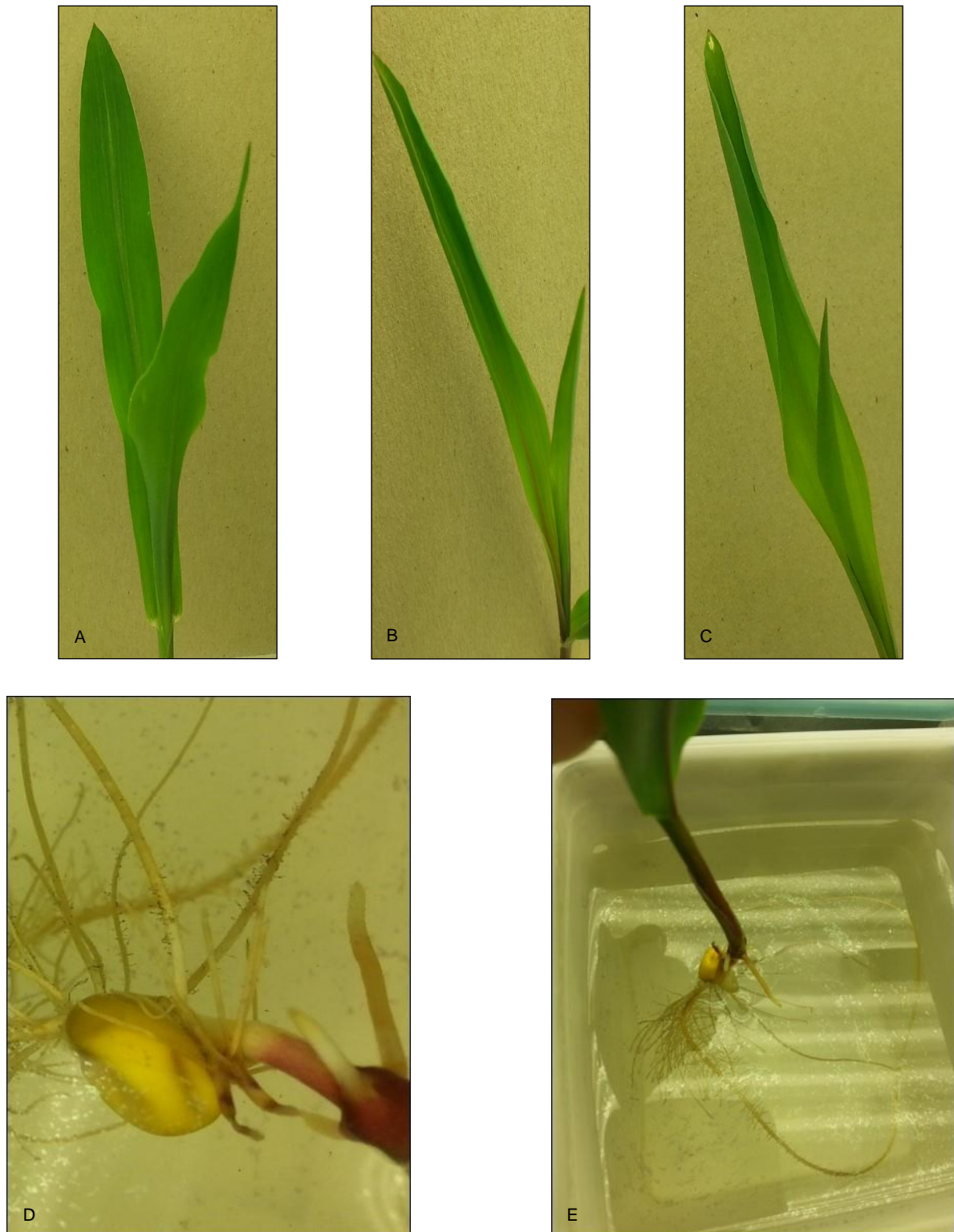


Abbildung 5: *Z. mays* 24 Stunden nach Einstellung verschiedener Ag-Np-Konzentrationen in den Nährlösungen. Die Konzentrationen betragen 2 mg l⁻¹ (B) oder 10 mg l⁻¹ (C). Im Vergleich dazu zeigt (A) eine Kontrollpflanze, die keine Ag-Np erhielt. (D) und (E) zeigen Aufnahmen der Nährlösung mit den darin enthaltenen Wurzeln 24 Stunden nach Zugabe der Ag-Np (10 mg l⁻¹).

Die Analyse der Wurzellänge und der Trockenmasse 2 Tage nach der Zugabe der Ag-Np zur Nährlösung zeigte eine starke Reduktion des Wachstums bei beiden Konzentrationen (2 und 10 mg l⁻¹). Die Pflanzen, die eine Blattapplikation der Ag-Np (20 mg l⁻¹) erhielten, wiesen kein gehemmtes Wachstum auf (Abb. 6).

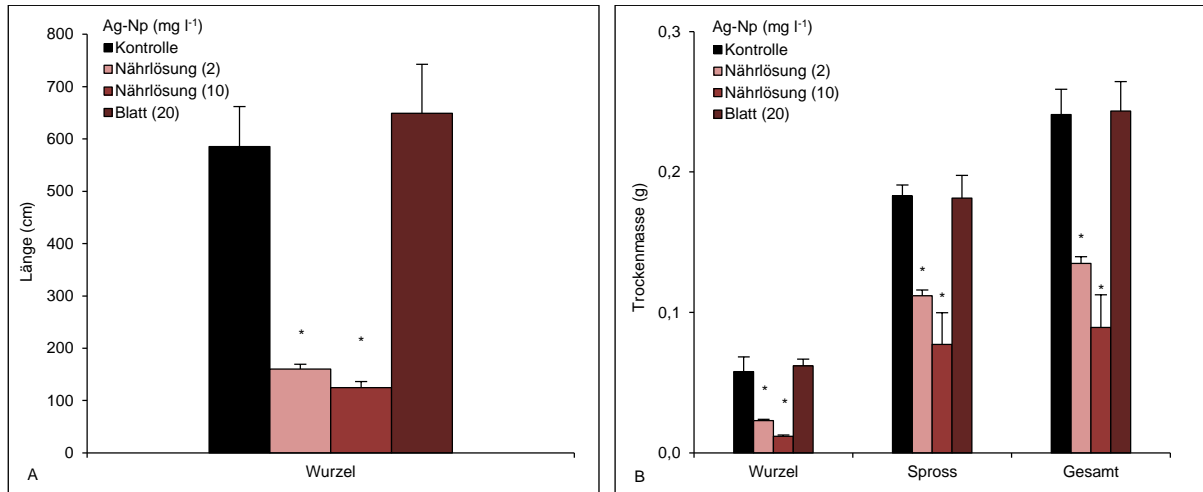


Abbildung 6: Einfluss von Ag-Np auf das Wurzelwachstum (A) von *Z. mays* nach 48 Stunden und auf die Trockenmasse (B) nach 5 Tagen. Ag-NP wurden entweder zur Nährlösung gegeben (2 und 10 mg l⁻¹) oder auf Blätter appliziert (20 mg l⁻¹). Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+Standardfehler), n = 4. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit einem *-Symbol gekennzeichnet (p<0,05).

3.2.4 Diskussion

Wie bereits zuvor in den Untersuchungen zur Keimfähigkeit und der Entfaltung der Wurzel und des Sprosses zeigte sich auch im weiteren Verlauf der Jungpflanzenentwicklung in einer Hydrokultur eine starke Beeinträchtigung des Wachstums (*Z. mays*) durch eine Ag-Np-Exposition der Wurzeln (Abb. 6 A und B). Zusätzlich wurde dabei ein sehr starkes Einrollen der Blätter beobachtet, was darauf schließen lässt, dass trotz des Wachstums in einer Nährlösung die Wasserversorgung gestört war. Diese Tatsache könnte ein Hinweis auf einen möglichen Einfluss freigesetzter Ag⁺-Ionen sein, welche als Aquaporin-Hemmer bekannt sind (Niemi et al. 2002). In der genannten Studie wurde gezeigt, dass die Permeabilität von Wasser durch die Plasmamembran der Wurzeln nach Zugabe von AgNO₃ gehemmt war. Eine weitere mögliche Ursache für die beobachteten Phänomene könnte die Beeinträchtigung der Wasser- und Nährstoffaufnahme durch die Akkumulation der grauen Aggregate an der Wurzeloberfläche sein (Abb. 5, D und E). Die Akkumulation von Ag-Np an der Wurzeloberfläche von *Arabidopsis thaliana* L. (Wang et al. 2013) und *Lolium multiflorum* Lam. (Yin et al. 2011) wurde bereits beschrieben, jedoch nicht unmittelbar in den Zusammenhang mit den gezeigten negativen Effekten gebracht. Die im Experiment durchgeführte Blattapplikation der Ag-Np verursachte keinen Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen (Abb. 6 A und B). Larue et al. (2014) untersuchten die Toxizität bei *Lacuta sativa* L. nach einer Blattapplikation von Ag-Np bei deutlich geringeren Konzentrationen (10-100 µg l⁻¹) als in der vorliegenden Arbeit und stellten dabei keine negativen Auswirkungen auf die

Biomassebildung fest. Zusammenfassend kann man daraus schließen, dass auch in einem späteren Entwicklungsstadium das Wachstum durch eine Zugabe von Ag-Np in die Nährlösung deutlich beeinträchtigt war. Basierend auf diesen Beobachtungen ist eine Beeinträchtigung des Wachstums durch freigesetzte Ag⁺-Ionen zu vermuten. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass die Ag-Np selbst an der Wirkung beteiligt sind.

3.3 Untersuchungen der Wirkung verschiedener Ag⁺-Ionen-Konzentrationen (AgNO₃) auf das Wachstum und die Assimilations- und Transpirationsrate von *Z. mays*

3.3.1 Einleitung

Um den Einfluss freier Ag⁺-Ionen auf das Pflanzenwachstum zu bestätigen, wurden zwei Experimente durchgeführt, in denen eine konzentrationsabhängige Wirkung freier Ag⁺-Ionen (AgNO₃) untersucht wurde. Auf Grund des Verdachtes, dass die Anwesenheit von Ag⁺-Ionen den Wasserhaushalt der Pflanzen stört, wurde im ersten Versuch neben der Trockenmasse zusätzlich der Gaswechsel der Pflanzen gemessen. In einem zweiten Experiment wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Ag⁺-Ionen auf die Gesamtwurzellänge beurteilt.

3.3.2 Material & Methoden

Beim ersten Versuch im Gewächshaus wurden die Pflanzen (*Z. mays*) 10 Tage in Sand angezogen und im Anschluss in eine Hydrokultur mit vollständiger Nährlösung überführt. Je Behandlung gab es zwei Nährlösungsgefäße mit je vier Pflanzen. Nach insgesamt 38 Tagen wurden in den Nährlösungen verschiedene Konzentrationen (1, 10, 100, 1000 µg l⁻¹) von Ag⁺-Ionen (appliziert als AgNO₃) eingestellt. Der Gaswechsel der Pflanzen wurde 2, 3 und 6 Tagen nach der Zugabe von AgNO₃ gemessen. Neun Tage nach der Behandlung wurden die Pflanzen geerntet und die Trockenmassen bestimmt. Der zweite Versuch fand in einer Klimakammer statt, wobei die Pflanzen zuvor auf Filterpapier angezogen wurden (vgl. Abschnitt 2.5). Dabei wurde der Einfluss der gleichen Ag⁺-Ionen-Konzentrationen wie zuvor 5 Tage nach Zugabe zur Nährlösung auf die Wurzellänge untersucht

3.3.3 Ergebnisse

Die Transpirations- und Assimilationsrate sowie die Trockenmasse der Pflanzen im ersten Versuch wurde nur bei der höchsten Ag⁺-Konzentration von 1000 µg l⁻¹ negativ beeinträchtigt (Abb. 7 A-C). Eine Silberkonzentration von 100 µg l⁻¹ hatte eine positive Wirkung auf die Assimilationsleistung 3 Tage nach der Applikation der Ag⁺-Ionen. Die übrigen Ag⁺-Konzentration verursachten keine Effekte auf die Trockenmasse und den Gaswechsel der Pflanzen (Abb. 7, A-C). Im zweiten Experiment wurde bei den Ag⁺-Ionen-Konzentrationen 100 und 1000 mg l⁻¹ über den gesamten Zeitverlauf eine geringere Wurzellänge festgestellt (Abb. 7, D).

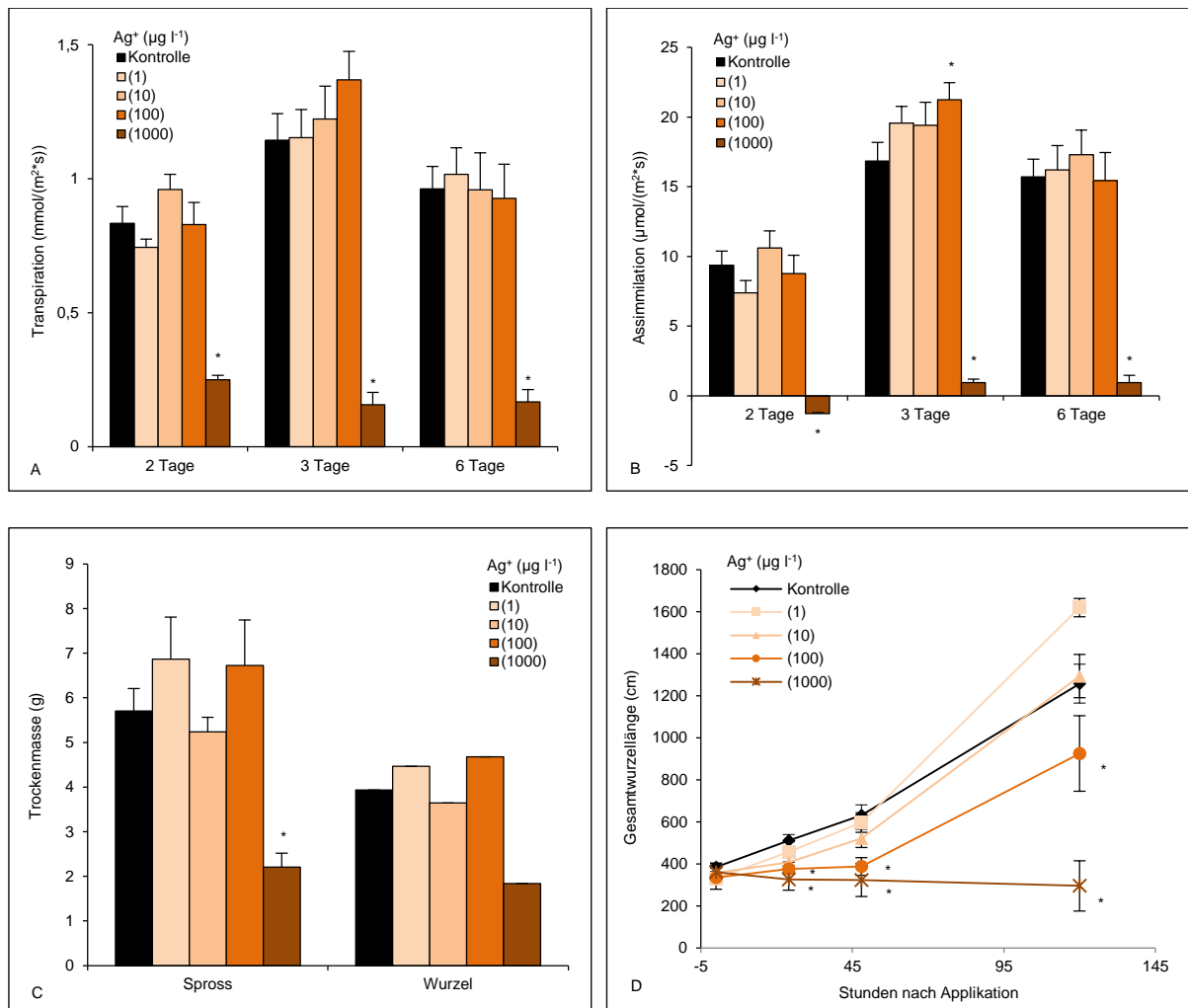


Abbildung 7: Experiment 1 (A-C): Einfluss verschiedener Ag⁺-Ionen-Konzentrationen (0-1000 µg l⁻¹) auf die Transpirations- und Assimilationsrate (2-6 Tage nach Applikation) sowie die Trockenmasse (9 Tage nach der Applikation) von *Z. mays*. Experiment (D): Einfluss verschiedener Ag⁺-Ionen-Konzentrationen (0-1000 µg l⁻¹) auf die Gesamtwurzellänge von *Z. mays*. Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (acht Pflanzen (Experiment 1) bzw. vier Pflanzen (Experiment 2)). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle werden durch ein *-Symbol gekennzeichnet (p < 0.05).

3.3.4 Diskussion

Die Ergebnisse bestätigen eine deutliche Beeinträchtigung der Biomassebildung sowie der Transpirations- und Assimilationsrate ab einer Ag⁺-Ionen-Konzentration von 1000 µg l⁻¹ in der Nährlösung. Der negative Wert bei der Assimilationsrate 2 Tage nach der Applikation hängt vermutlich damit zusammen, dass die Pflanzen keine Photosynthese betreiben und eine Nettoabgabe von CO₂ durch Atmung stattfindet. Die geringer gewählten Konzentrationen beeinflussten die Transpirationsrate nicht (Abb. 7, A-C). Das Wurzelwachstum reagierte sensibler als die Trockenmasse auf die Ag⁺-Ionen, denn hier war bereits eine deutliche Beeinträchtigung bei einer Konzentration von 100 µg l⁻¹ zu erkennen (Abb. 7, D). Daraus kann geschlossen werden, dass die Toxizitätsschwelle je nach gemessenem Parameter zwischen einer Ag⁺-Konzentration von 100 und 1000 µg l⁻¹ liegt. Die Beeinträchtigungen könnten dadurch erklärt werden, dass Ag⁺-Ionen in Konkurrenz mit anderen positiv geladenen Teilchen

stehen und deren Plätze in Zellwänden, -membranen und DNA-Molekülen einnehmen, wodurch durch Fehlfunktionen verursacht werden könnten (Spadaro und Becker 1976). Außerdem sind Ag^+ -Ionen bekannt dafür, dass sie die Ethylen-Aktivität in Pflanzen hemmen (Beyer 1979; Zhao et al. 2002; Strader et al. 2009), was ebenfalls eine Ursache für die gezeigten Beeinträchtigungen sein kann. Im Hinblick auf die Assimilationsrate konnte bei einer mittleren Konzentration von $100 \mu\text{g l}^{-1}$ sogar eine positive Wirkung erzielt werden. Stimulierende Wirkungen auf das Wachstum von Pflanzen bei geringen Ag^+ -Ionen-Konzentrationen wurden zuvor bereits beschrieben (Strader et al. 2009; Wang et al. 2013). Wang et al. (2013) vermuten, dass die Ursache der positiven Wirkungen auf den Effekt der Hormesis zurückzuführen sein könnte. Dabei fördern geringfügige Mengen toxischer Stoffe die Abwehrsysteme von Organismen, was letzten Endes zu einer gesteigerten Leistung führt (Stebbing 1982; Calabrese und Baldwin 2002; Calabrese und Mattson 2017). Die im Experiment zuvor diskutierte Vermutung, dass freie Ag^+ -Ionen an den gezeigten Effekten nach einer Ag-Np-Behandlung, einen großen Anteil haben, wird durch diese Ergebnisse unterstützt

3.4 Differenzierung zwischen ionischen (Ag^+) und „Ag-Np-Effekten“ auf das Wachstum und die Assimilations- und Transpirationsrate von *Z. mays* und *B. napus* unter Berücksichtigung der Expositionsdauer.

3.4.1 Einleitung

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die Ursachen der festgestellten Effekte aus den vorangegangenen Versuchen, welche durch die Anwesenheit von Ag-Np hervorgerufen wurden, näher untersucht. Da zuvor vermutet wurde, dass ein Großteil der beschriebenen Effekte durch aus den Np freigesetzte Ag^+ -Ionen verursacht wurden, wurde zwischen der Wirkung der zu Beginn in der Ag-Np-Suspension vorhandenen Menge freier Ag^+ -Ionen („ionische Effekte“) und der möglichen Wirkung der Ag-Np selbst (Np-Effekte) differenziert. Dazu wurden Behandlungsvarianten ergänzt, welche dieselbe effektive Menge freier Ag^+ -Ionen (AgNO_3) enthielten wie die Ag-Np-Variante. Zusätzlich wurden Ag-Behandlungen beigefügt, die Chlorid (CaCl_2) enthielten („Ag-Np+ CaCl_2 “ und „ AgNO_3 + CaCl_2 “), um die freien Ag^+ -Ionen aus der Suspension (Ag-Np) bzw. Lösung (AgNO_3) als AgCl auszufällen. Bei Untersuchungen zur Toxizität von Ag-Np auf Bakterien (*Escherichia coli*) in Abhängigkeit von der Menge freier Ag^+ -Ionen und der zugebenen Menge Chlorid (NaCl) wurde diese Vorgehensweise bereits angewendet (Levard et al. 2013). Oukarroum et al. (2013) zeigten ebenfalls, dass die Toxizität freier Ag^+ -Ionen auf *Lemna gibba* L. durch die Zugabe von Chlorid (CaCl_2) aufgehoben werden konnte. Bei Beurteilung der toxischen Wirkung von Ag-Np bei höheren Pflanzen wurde diese Methodik bisher in keiner mir bekannten veröffentlichten Studie angewendet.

3.4.2 Material & Methoden

3.4.2.1 Vorversuch zur Untersuchungen der freigesetzten Menge Ag⁺-Ionen der Ag-Np in Wasser und Stabilität der Ag-Np in einer Nährlösung

Um zwischen ionischen und Np-Effekten unterscheiden zu können, wurde zunächst die Menge freier Ag⁺-Ionen, die zusätzlich zu den Ag-Np in der Suspension enthalten sind, bestimmt (vgl. Abschnitt 2.3). Damit während des Versuches eine Exposition der Pflanzen zu den Ag-Np gewährleistet war, wurde auch die Stabilität der Ag-Np in einer Nährlösung, jedoch ohne darin wachsenden Pflanzen untersucht (vgl. Abschnitt 2.2).

3.4.2.2 Ergebnisse des Vorversuches zur Beurteilung der freigesetzten Menge Ag⁺-Ionen der Ag-Np in Wasser und Stabilität der Ag-Np in einer Nährlösung

Die Menge an gelösten freien Ag⁺-Ionen steht im linearen Zusammenhang mit der Menge der enthaltenen Ag-Np in der Dispersion. Im Mittel lagen 6-7 % der Menge der Ag-Np, entsprechend der Steigung der linearen Funktion, in gelöster Form als Ag⁺-Ionen vor (Abb. 8, A). Die Höhe des Absorptionsmaximums steht wie bereits beschrieben (vgl. Abschnitt 2.2) im Zusammenhang mit der Ag-Np-Konzentration. Die Höhe des Peaks nahm im Verlauf eines Tages bei allen untersuchten Konzentrationen (2 bis 10 mg l⁻¹) leicht ab, wenn die Ag-Np in einer Nährlösung (zusätzlich enthalten sind 1 mM CaCl₂) dispergiert waren. Dies weist auf eine geringfügige Abnahme der Ag-Np-Konzentration hin. Über einen Zeitraum von 24 Stunden kam es bei keiner der verschiedenen Konzentrationen es zu einer Verschiebung der Absorptionsmaxima auf horizontaler Ebene, was ein Hinweis darauf ist, dass die Größe der Ag-Np sich nicht veränderte (Abb. 8, B).

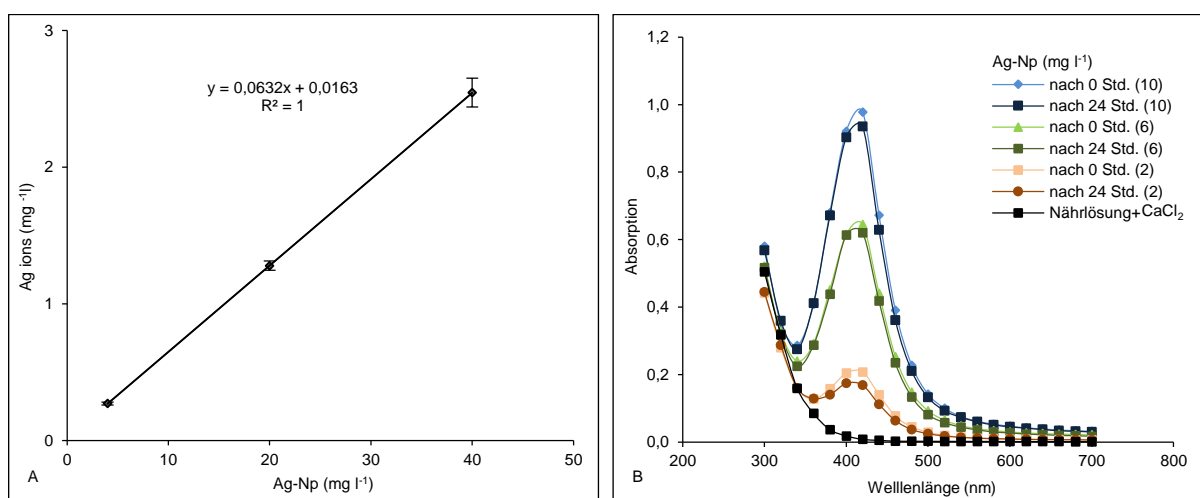


Abbildung 8: Menge an gelösten Ag⁺-Ionen in Abhängigkeit von der Ag-Np-Konzentration (A). Absorptionsspektrum einer vollständigen Nährlösung (enthält zusätzlich 1 mM CaCl₂) nach der Einstellung verschiedener Ag-Np-Konzentrationen (0, 2, 6, 10 mg l⁻¹) ohne Pflanzen über einen Zeitraum von 24 Stunden. Alle 20 nm ist ein Datenpunkt dargestellt (B). Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+Standardfehler) dreifacher Wiederholungen.

3.4.2.3 Differenzierung zwischen ionischen (Ag^+) und „Ag-Np-Effekten“ - Pflanzenversuche

Es wurden zwei unterschiedliche Pflanzenspezies (*Z. mays* und *B. napus*) für diese Untersuchung verwendet. Die Pflanzen wuchsen in einer Wasserkultur (vgl. Abschnitt 2.5) und die Applikation der Np fand, im Vergleich zu vorherigen Versuchen, zu einem späteren Entwicklungsstadium (Mais: nach 2 und 5 Wochen; Raps: nach 3,5 Wochen) der Pflanzen statt. Eine Konzentration von $6,0 \text{ mg l}^{-1}$ Ag-Np wurde für beide Pflanzenarten verwendet. Als Referenz wurde die gleiche effektive Menge an freien Ag^+ -Ionen ($7\% = 0,42 \text{ mg l}^{-1}$, vgl. Abschnitt 3.4.2.2), in Form von AgNO_3 , appliziert. Mit Hilfe einer Ag^+ -Ionen-selektiven Elektrode (Thermo Fisher Scientific, Orion 9616 BNWP, Eindhoven, Niederlande) wurde verifiziert, dass die Konzentrationen freier Ag^+ -Ionen bei den miteinander zu vergleichenden Behandlungen gleich waren. Um zwischen ionischen und „Np-Effekten“ unterscheiden zu können, wurden zwei weitere Ag-Behandlungen hinzugefügt, bei denen die freien Ag^+ -Ionen mit CaCl_2 (1 mM) als AgCl ausgefällt wurden („Ag-Np+ CaCl_2 “ und „ AgNO_3 + CaCl_2 “) und somit nicht mehr für die Pflanzen verfügbar waren. Jedoch verblieb entsprechend des Löslichkeitsproduktes auch nach Zugabe von CaCl_2 rechnerisch eine Restkonzentration von $8,6 \mu\text{g l}^{-1}$ Ag^+ -Ionen in den Lösungen. Den vorangegangenen Versuchen zufolge (vgl. Abschnitt 3.3) hat eine solch niedrige Konzentration jedoch höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf das Wachstum und die Gaswechselleistung der Pflanzen. Als Kontrolle wuchsen die Pflanzen in einer vollständigen Nährlösung, jeweils mit oder ohne CaCl_2 . Auf die Behandlung mit Ag-Bulk wurde auch in diesem Versuchsansatz verzichtet, da in den Keimfähigkeitsuntersuchungen zuvor keine Effekte festzustellen waren. Die Np-Konzentration wurde in den Nährlösungen, die Ag-Np enthielten, zum Teil während des Experimentes untersucht. Um die Prozesse an der Wurzeloberfläche genauer beurteilen zu können, wurden, in einem unabhängigen Experiment im Klimaschrank mit den gleichen Behandlungen Detailaufnahmen (Leica, Leica MZ 125; Wetzlar, Deutschland) der Wurzeln bei *Z. mays* (10 Tage) und bei *B. napus* (14 Tage) 24 Stunden nach der Ag-Np Applikation mit einem Binokular gemacht.

3.4.2.3.1 Differenzierung zwischen ionischen (Ag^+) und „Ag-Np-Effekten“ bei *Z. mays*

Das erste Experiment fand im Gewächshaus statt und es gab je Behandlung vier Behälter mit jeweils zwei Pflanzen ($n=8$). Bis zum drei-Blattstadium wuchsen die Pflanzen (*Z. mays*) in Sand, bevor sie in eine vollständige Nährlösung (5,2 Liter je Behälter) gesetzt wurden (vgl. Abschnitt 2.5). Insgesamt fünf Wochen nach der Keimung wurden die verschiedenen Konzentrationen der Behandlungen („Kontrolle+ CaCl_2 “; „Ag-Np“; „Ag-Np+ CaCl_2 “; „ AgNO_3 “; „ AgNO_3 + CaCl_2 “) in der Nährlösung eingestellt. 24 Stunden nach der Behandlung wurden Gaswechselfmessungen (vgl. Abschnitt 2.8) durchgeführt. Nach einer Exposition der Pflanzen von insgesamt 72 Stunden wurden diese geerntet und die Trockenmasse (Wurzel und Spross) sowie die Ag^+ -Konzentration im Spross bestimmt (vgl. Abschnitt 2.7 und 2.9). Während des Versuchs wurden die Konzentration und die Veränderung der Größe der Ag-Np gemessen (nach 2, 24, 48 Stunden), um festzustellen wie lange Np in der Nährlösung

vorhanden waren (vgl. Abschnitt 2.2). In einem zweiten, anschließenden Experiment wurde zusätzlich noch der Einfluss einer längeren Expositionsdauer (8 Tage) berücksichtigt. In diesem Fall fand der Versuch im Klimaschrank (vgl. Abschnitt 2.5) statt und die Pflanzen waren zum Behandlungszeitpunkt erst 2 Wochen alt. Wegen der limitierten Stellfläche im Klimaschrank wurde auf die Kontrollvariante, die kein CaCl_2 enthielt, verzichtet. Die übrigen Behandlungen wurden beibehalten wie zuvor beschrieben. Je Behandlungsvariante gab es fünf Pflanzen. Auf Grund der geringeren Blattfläche der Pflanzen war die Messung der Transpirations- und Assimilationsrate nicht möglich. Als Analyseparameter dienten daher nur die Trockenmasse, Wurzellänge (vgl. Abschnitt 2.9) sowie die Silberkonzentration des Sprosses und der Wurzel (vgl. Abschnitt 2.7). Auf Grund auffälliger Verfärbungen der oberirdischen Pflanzenteile wurden zusätzlich Nährstoffgehaltsanalysen (Eisen und Phosphor) des Sprosses und der Wurzel durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.7). Hier muss darauf hingewiesen werden, dass die Wurzeln vor dem Trocknen und der Analyse des Ag-, P-, und Fe-Gehaltes nicht abgewaschen wurden, sodass die gemessenen Konzentrationen durch mögliches äußerlich anhaftendes Material beeinflusst sein konnten.

3.4.2.3.2 Differenzierung zwischen ionischen (Ag^+) und „Ag-Np-Effekten“ bei *B. napus*

Der dritte Versuch fand im Gewächshaus statt. Die Pflanzen (*B. napus*) wurden ebenfalls in Sand angezogen, jedoch schon nach 4 Tagen in die Hydrokultur (5,2 Liter je Behälter) mit vollständiger Nährlösung überführt (vgl. Abschnitt 2.5). Die Zugabe der verschiedenen Behandlungssubstanzen (wie bereits im Versuch mit *Z. mays* erwähnt) fand bereits nach insgesamt 3,5 Wochen Wachstum statt. Die Gaswechsellmessungen wurden mehrmals und an verschiedenen Zeitpunkten (3, 26, 96 Stunden) nach der Applikation durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.8). Sieben Tage nach der Applikation wurden die Pflanzen geerntet und die Trockenmasse bestimmt (vgl. Abschnitt 2.9). Durch die entsprechend gewählten Analysezeitpunkte konnte somit der Einfluss nach kürzerer und längerer Expositionsdauer beurteilt werden. Darüber hinaus wurde ebenfalls die Ag-Konzentration im Spross untersucht. Auch hier wurden während des Versuches die Konzentration und die Veränderung der Größe der Partikel gemessen (nach 22, 48 und 96 Stunden), um festzustellen wie lange Ag-Np in der Nährlösung vorhanden waren (vgl. Abschnitt 2.2).

3.4.3 Ergebnisse

3.4.3.1 Differenzierung zwischen ionischen (Ag^+) und „Ag-Np-Effekten“ bei *Z. mays* - kurze Expositionsdauer (3 Tage)

Die Zugabe von Ag-Np und AgNO_3 reduzierte die Transpirations- und Assimilationsleistung 24 Stunden nach der Applikation deutlich (Abb. 9, A und B). Wie bereits zuvor beschrieben, war bei beiden Varianten ein starkes Einrollen der Blätter zu beobachten. Bei den Varianten, die zusätzlich CaCl_2 enthielten, war keine Beeinträchtigung der Transpirations- und Assimilationsrate festzustellen und auch

kein Einrollen der Blätter zu erkennen. Die Behandlung, welche lediglich CaCl_2 enthielt, wies ebenfalls keine negative Beeinflussung des Gaswechsels der Pflanzen auf. Die festgestellten Trockenmassen 72 Stunden nach Beginn der Behandlung, wiesen auf eine deutliche negative Beeinflussung der Biomassebildung durch eine Applikation von Ag-Np und AgNO_3 , hin (Abb. 9, C). Durch die Zugabe von CaCl_2 konnten die Effekte bei der Spross- und Gesamttrockenmasse nur etwas abgeschwächt werden. Diese Effekte waren jedoch nicht signifikant verschieden zu den Varianten „Ag-Np“ und „ AgNO_3 “. Die Kontrollvarianten (ohne Ag) mit oder ohne CaCl_2 unterschieden sich nicht in der Trockenmasse. Wie in Abb. 9 (D) zu erkennen ist, nahm die Höhe des Absorptionspeaks und damit die Konzentration der Ag-Np kurz nach der Applikation der Ag-Np mit und ohne Zugabe von CaCl_2 ab. Entsprechend der linearen Funktion (2.2) nahm die Ag-Np-Konzentration in den ersten beiden Stunden um 23% („Ag-Np“) und 34% („Ag-Np+ CaCl_2 “) ab. Bereits nach 24 Stunden sind bei beiden Ag-Np-Behandlungen nur noch 10-12% der ursprünglichen eingestellten Ag-Np-Menge nachweisbar. Außerdem wurde eine starke Akkumulation grauer Aggregate an der Wurzeloberfläche (Abb. 10 C und D) sowie auf dem Boden und an den Wänden der Nährlösungsgefäße beobachtet. Nach 48 Stunden waren nur noch 4% der ursprünglichen eingestellten Ag-Np-Konzentration messbar. Die Position des Peaks (411 nm) verschob sich horizontal über den gesamten Zeitraum nicht, was anzeigt, dass sich die Größe der noch vorhandenen Ag-Np, zum Zeitpunkt der Messung, nicht veränderte.

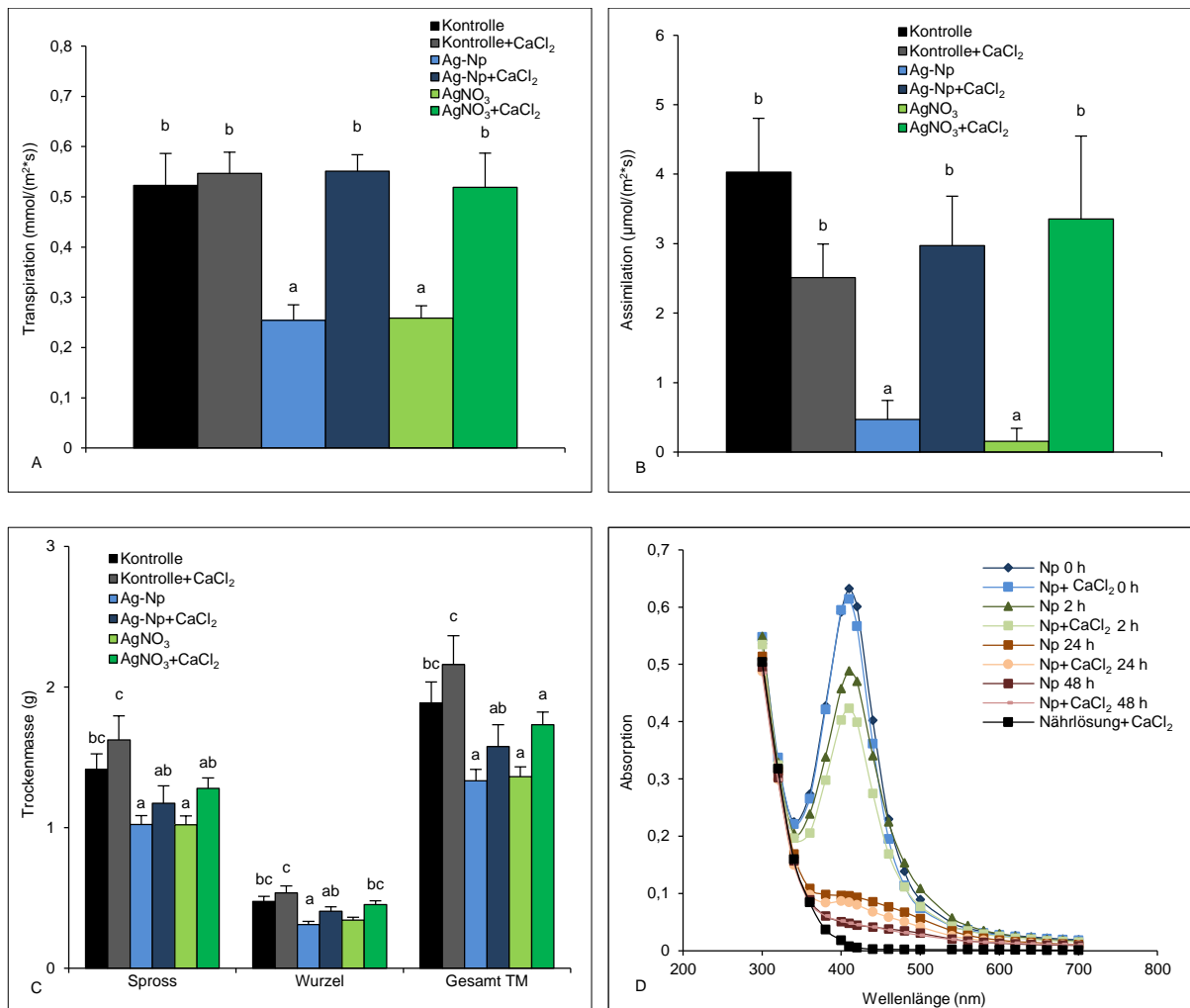


Abbildung 9: Transpirations-, Assimilationsrate (A+B) und Trockenmasse (C) von *Z. mays* 24 Stunden (Transpirations- und Assimilationsrate) und 72 Stunden (Trockenmasse) nach Zugabe von Ag-Np (6 mg l^{-1}) und AgNO₃ ($0,42 \text{ mg l}^{-1} \text{ Ag}^+$ -Ionen) mit oder ohne CaCl₂ (1 mM) in die Nährlösung. Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je acht Pflanzen). Signifikante Unterschiede zueinander werden durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet (Duncan Test, $\alpha < 0.05$). D: Mittelwerte des Absorptionsspektrums der Nährlösungen (n=4), welche Ag-Np enthielten, über einen Zeitraum von 48 Stunden.

Sowohl die Ag-Konzentrationen als auch die aufgenommenen Gesamtmenge (Abb. 10, A und B) im Spross wiesen nach einer Zugabe von „Ag-Np“ deutlich höhere Werte auf als bei den übrigen Behandlungen, welche sich nicht in diesen beiden Parametern unterschieden. Es scheint als würden in beiden Fällen („Ag-Np“ und „Ag-Np+CaCl₂“) die Aggregate vor allem an den Feinwurzeln akkumulieren. Bei „Ag-Np“ (Abb. 10, C) erweckt es jedoch den Eindruck, dass die Feinwurzeln nicht mehr intakt sind und der Besatz mit Aggregaten nicht so dicht ist wie „Ag-Np+CaCl₂“ (Abb. 10, D).

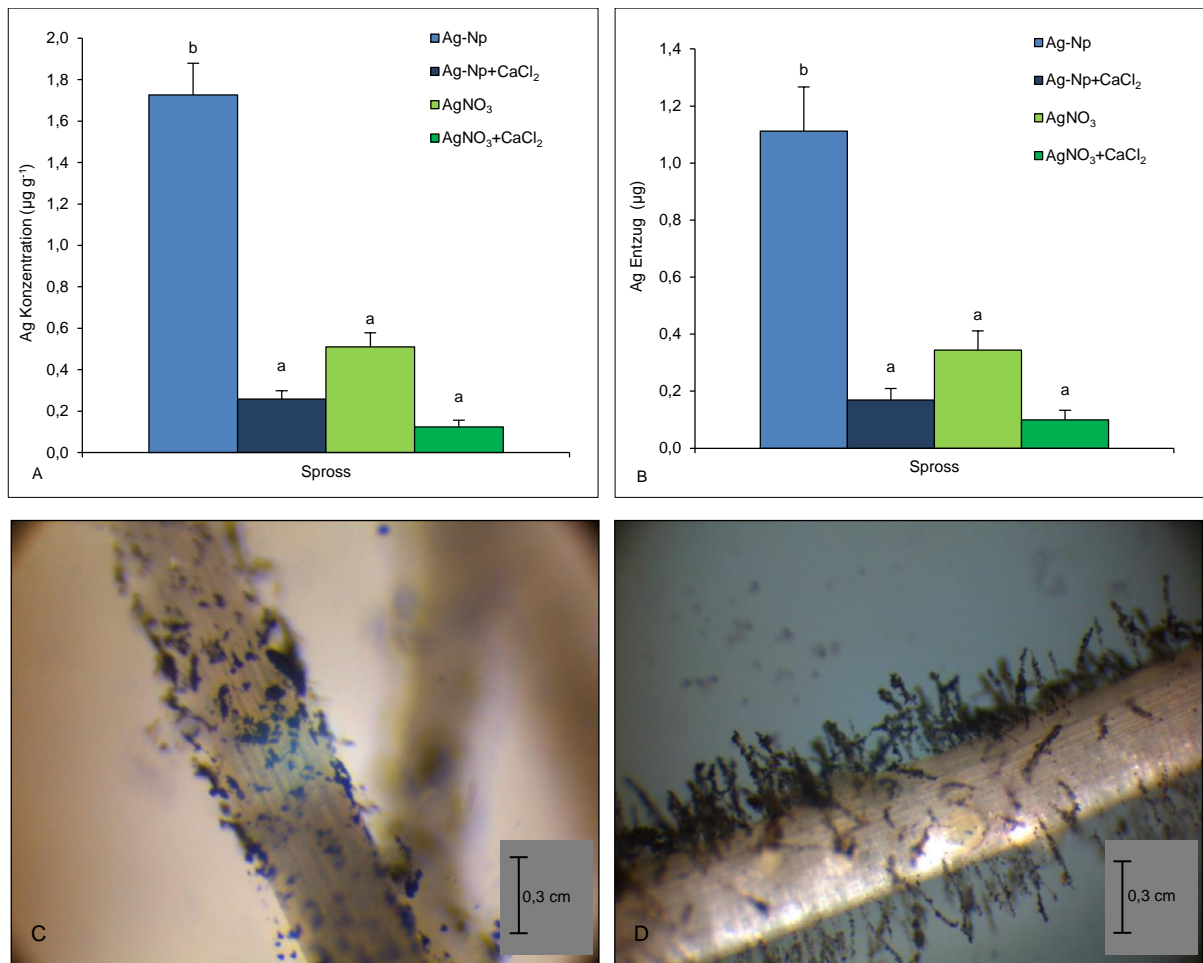


Abbildung 10: Ag-Konzentrationen (A) und -Entzüge (B) des Sprosses von *Z. mays* (Entwicklungsstadium: 5 Wochen) 72 Stunden nach der Zugabe von Ag-Np (6,0 mg l⁻¹) und AgNO₃ (0,42 mg l⁻¹ Ag⁺-Ionen) mit oder ohne CaCl₂ (1 mM) in die Nährlösung. Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (n = 8). Signifikante Unterschiede zueinander werden durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet (Duncan Test, $\alpha < 0,05$). C und D: Vergleich der Wurzeln 10 Tage alter Pflanzen (*Z. mays*) 24 Stunden nach der Applikation von „Ag-Np“ (C) und „Ag-Np+CaCl₂“ (D).

3.4.3.2 Differenzierung zwischen ionischen (Ag⁺) und „Ag-Np-Effekten“ bei *Z. mays* - lange Expositionsdauer (8 Tage)

Die Wurzellänge und die getrocknete Biomasse der Pflanzen (Abb. 11, A und B) 8 Tage nach einer Behandlung mit „Ag-Np“ und „AgNO₃“ waren in gleicher Weise beeinträchtigt wie auch schon im vorangegangenen Experiment gezeigt wurde. Im Vergleich dazu führte die Zugabe von CaCl₂ in beiden Fällen zu einem verbesserten Wachstum der Wurzellänge und Biomasse, jedoch war das Wachstum weiterhin schlechter als bei der Kontrolle. Zusätzlich ist zu sehen, dass die Variante „AgNO₃+CaCl₂“ ein höheres Wurzelwachstum hatte als die Behandlung mit „Ag-Np+CaCl₂“. Bei den Trockenmasseparametern ist kein Unterschied zwischen den Behandlungen „Ag-Np+CaCl₂“ und „AgNO₃+CaCl₂“ zu erkennen.

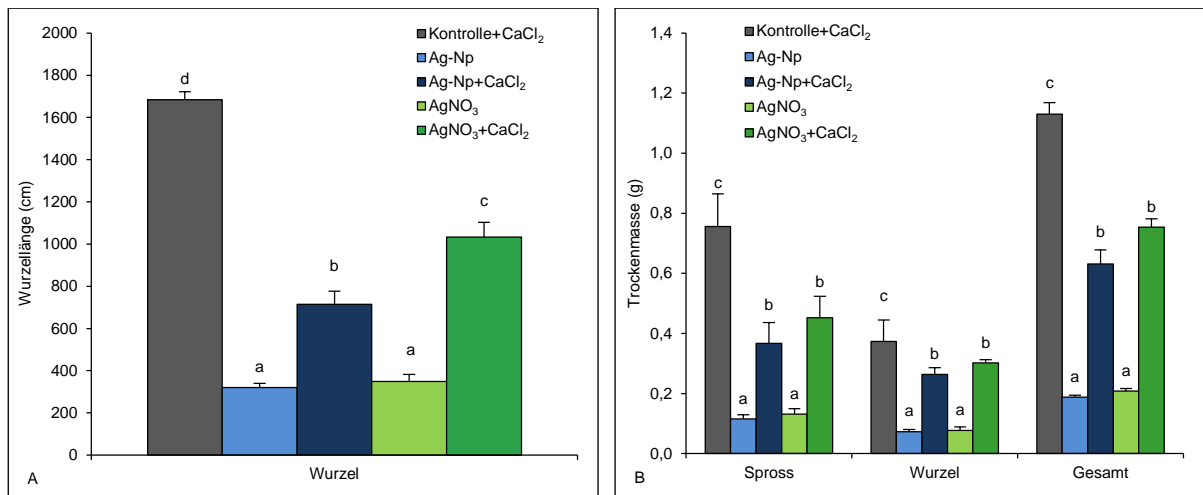


Abbildung 11: Wurzellängen (A) und Trockenmassen (B) von *Z. mays* (Entwicklungsstadium: 3 Wochen), 8 Tage nach der Zugabe von Ag-Np (6.0 mg l^{-1}) und AgNO₃ ($0.42 \text{ mg l}^{-1} \text{ Ag}^+$ -Ionen) mit oder ohne CaCl₂ (1 mM) in die Nährlösung. Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je fünf Pflanzen). Signifikante Unterschiede zueinander werden durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet (Duncan Test, $\alpha < 0.05$).

Die Zugabe von CaCl₂ zur Nährlösung reduzierte in beiden Varianten („Ag-Np“ und „AgNO₃“) die Ag-Konzentrationen im Spross (Abb. 12, A). Die gesamte in den Spross aufgenommene Ag-Menge (Abb. 12, B) war bei der Variante „Ag-Np+CaCl₂“ geringer als bei den anderen Varianten. Die Ag-Konzentrationen in der Wurzel waren bei den Varianten, welche CaCl₂ enthielten, deutlich geringer als bei den anderen Varianten. In den Wurzeln der Pflanzen, die mit „Ag-Np“ behandelt wurden, konnten deutlich höhere Ag-Konzentrationen gemessen werden als bei den Pflanzen, deren Nährlösung nur „AgNO₃“ enthielt (Abb. 12, C). Bei der gesamten, in die Wurzel, aufgenommenen Ag-Menge (Abb. 12, D) zeigten sich ähnliche Unterschiede. Anders war jedoch, dass die Pflanzen der Behandlung „AgNO₃“ sich nicht von den Werten der Behandlungen, die jeweils CaCl₂ enthielten, unterscheiden haben.

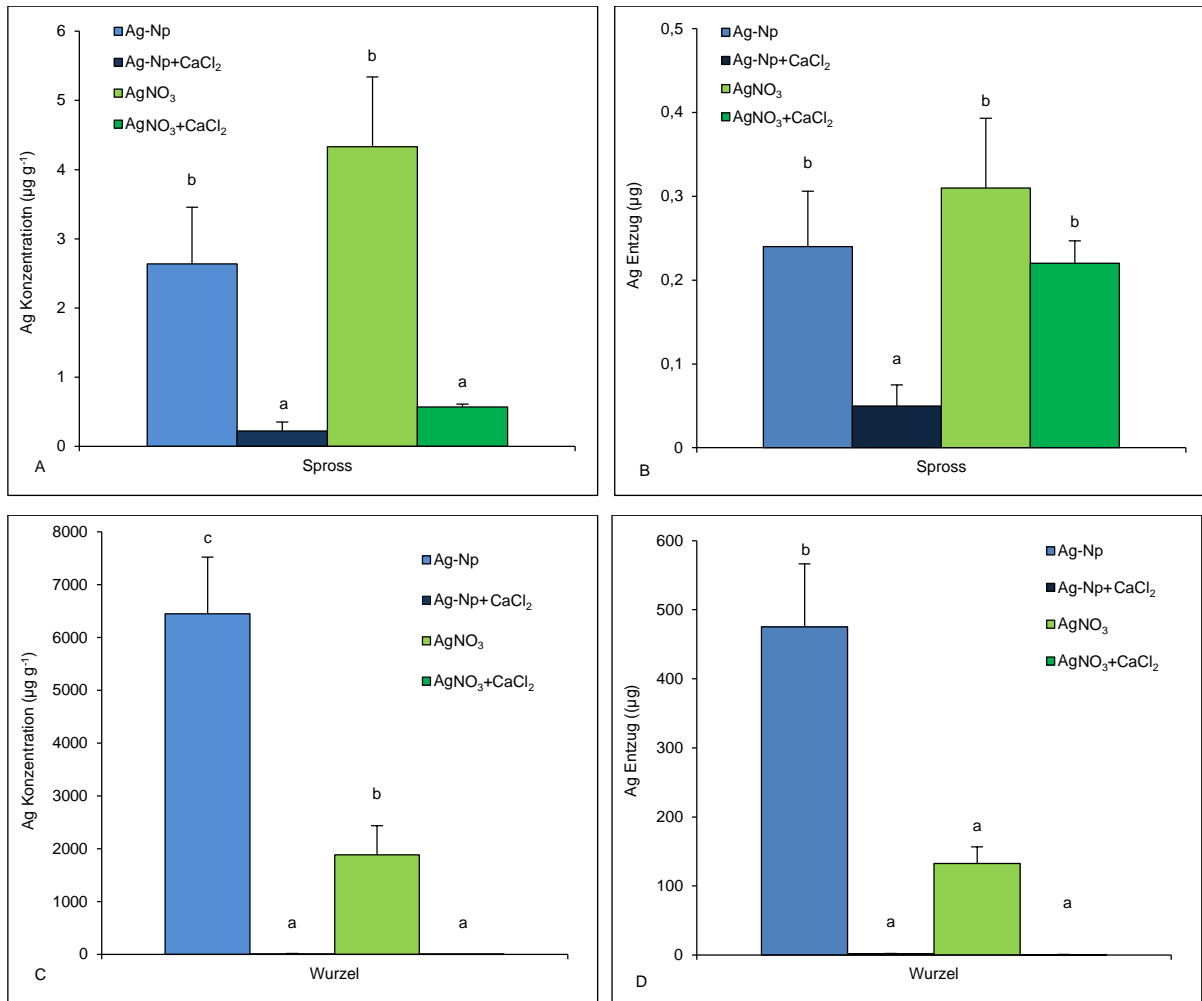


Abbildung 12: Ag-Konzentrationen und Entzüge des Sprosses (A+B) und der Wurzel (C+D) von *Z. mays* (Entwicklungsstadium: 3 Wochen) 8 Tage nach der Zugabe von Ag-Np (6,0 mg l⁻¹) und AgNO₃ (0,42 mg l⁻¹ Ag⁺-Ionen) mit oder ohne CaCl₂ (1 mM) in die Nährlösung. Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+ Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je fünf Pflanzen). Signifikante Unterschiede zueinander werden durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet (Duncan Test, $\alpha < 0.05$).

Wie in Abb. 13 (A) zu erkennen ist, war der Aufwuchs bei der Variante „Ag-Np“ und „AgNO₃“ stark beeinträchtigt. Auffallend war zusätzlich, dass die Behandlungen „AgNp+CaCl₂“ sowie „AgNO₃+CaCl₂“ Aufhellungen im Blattgewebe zeigten. Bei der Variante „Ag-Np+CaCl₂“ war zusätzlich eine leichte violette Färbung der Blattunterseite zu erkennen (Abb. 13, A-C).



Abbildung 13: A: Vergleich der oberirdischen Pflanzenteile von *Z. mays* 8 Tage nach Zugabe verschiedener Präparate (in der Reihenfolge von links beginnend): „Kontrolle+CaCl₂“, „Ag-Np“, „Ag-Np+CaCl₂“, „AgNO₃“ und „AgNO₃+CaCl₂“ in die Nährlösung. In den Abbildungen B (Blattunterseite) und C (Blattoberseite) ist jeweils ein Blatt folgender Behandlungen dargestellt (in der Reihenfolge von links beginnend): „Ag-Np+CaCl₂“, „AgNO₃+CaCl₂“, „Kontrolle+CaCl₂“.

Die P-Konzentrationen im Spross der Pflanzen der Behandlungen „Ag-Np+CaCl₂“, „AgNO₃“, „AgNO₃+CaCl₂“ unterschieden sich nicht von denen der Pflanzen der „Kontrolle“ (Abb. 14, A). Lediglich die Behandlung mit „Ag-Np“ führte zu einer höheren Konzentration im Spross der Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle. Außerdem wies die Variante „AgNO₃+CaCl₂“ eine höhere P-Konzentration auf als die Variante „AgNO₃“. Der gesamte P-Entzug des Sprosses (Abb. 14, B) war bei der Kontrolle am höchsten und bei den übrigen Varianten deutlich geringer. Dabei wiesen die Pflanzen der Behandlungen mit „Ag-Np“ und „AgNO₃“ die geringsten P-Mengen im Spross auf. Durch die Zugabe von CaCl₂ stieg die P-Aufnahme in beiden Fällen an, bei der Variante „Ag-Np+CaCl₂“ jedoch geringer als bei der Behandlung „AgNO₃+CaCl₂“. Bei der P-Konzentration in der Wurzel (Abb. 14, C) wies die Behandlung „Ag-Np+CaCl₂“ geringere Werte auf als „AgNO₃+CaCl₂“, „AgNO₃“ und die Kontrolle, unterschied sich jedoch nicht von „Ag-Np“. Die P-Konzentrationen bei „Ag-Np“, „AgNO₃+CaCl₂“ und „AgNO₃“ waren nicht unterschiedlich zueinander, jedoch deutlich geringer als bei Kontrolle+CaCl₂. Die absolute durch die Wurzeln entzogene P-Menge (Abb. 14, D) war bei „Ag-Np“ und „AgNO₃“ am geringsten, die Werte waren jedoch nicht verschieden von „Ag-Np+CaCl₂“. Der P-Entzug bei „AgNO₃“ und „Ag-Np+CaCl₂“ unterschied sich nicht, war jedoch deutlich geringer als bei der Kontrolle.

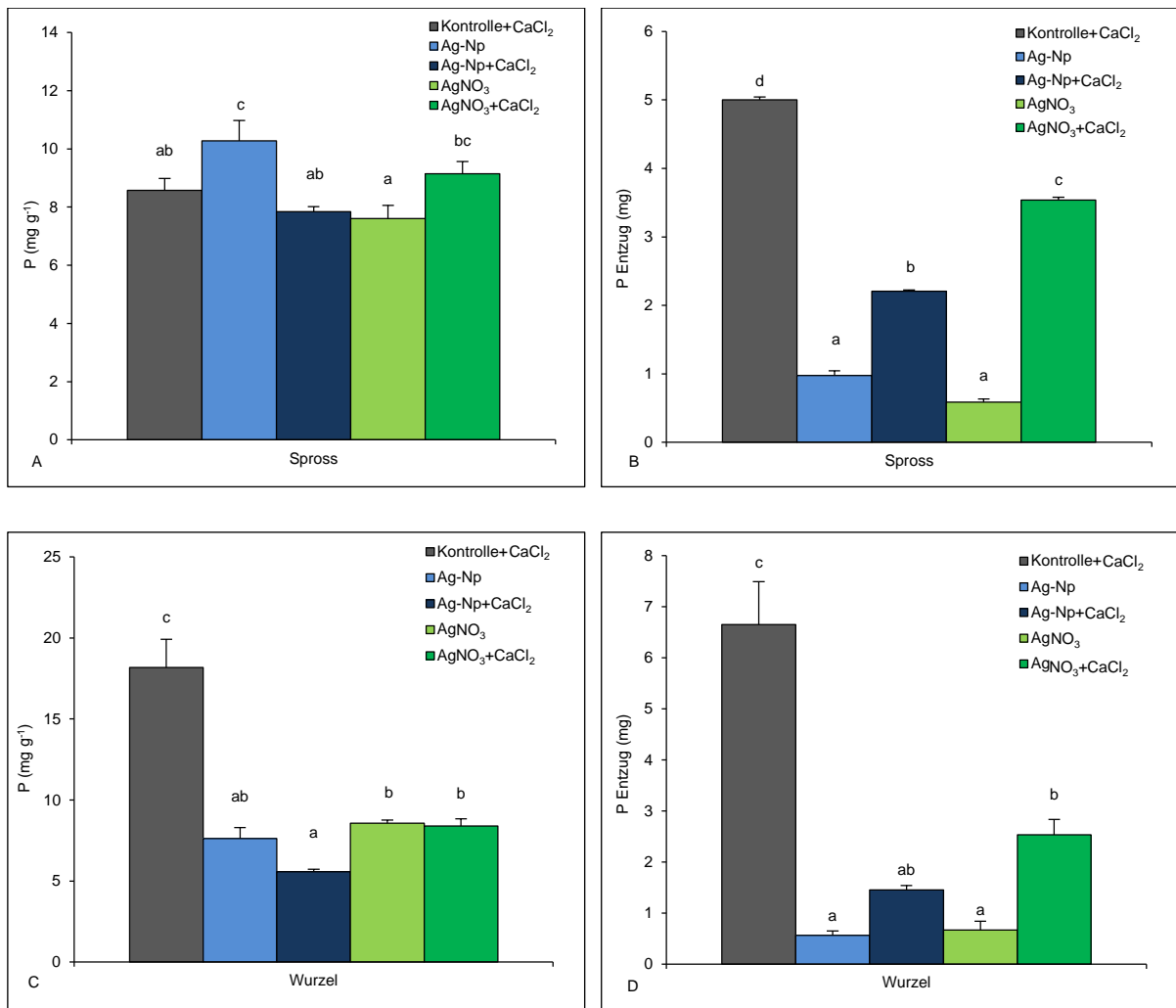


Abbildung 14: P-Konzentrationen und -Entzüge des Sprosses (A und B) und der Wurzel (C und D) von *Z. mays* (Entwicklungsstadium: 3 Wochen) 8 Tage nach der Zugabe von Ag-Np (6.0 mg l⁻¹) und AgNO₃ (0,42 mg l⁻¹ Ag⁺-Ionen) mit oder ohne CaCl₂ (1mM) in der Nährlösung. Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+ Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (n= 5). Signifikante Unterschiede zueinander werden durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet (Duncan Test, $\alpha < 0.05$).

Die Fe-Konzentration im Spross (Abb. 15, A) war nach einer Behandlung mit „Ag-Np+CaCl₂“ deutlich höher als bei den Pflanzen der Kontrolle. Die übrigen Varianten unterschieden sich nicht zu der Kontrolle. Die Pflanzen der Behandlungen mit „Ag-Np“ und „AgNO₃“ nahmen die geringsten Mengen Fe in den Spross auf (Abb. 15, B). Durch die Zugabe von CaCl₂ stieg die gesamte Aufnahmemenge an Eisen, bei „AgNO₃+CaCl₂“ jedoch stärker als bei „Ag-Np+CaCl₂“. Die Variante „AgNO₃+CaCl₂“ unterschied sich dadurch nicht von der Kontrolle. Die beiden Varianten, die kein CaCl₂ erhielten, wiesen deutlich höhere Eisenkonzentrationen in der Wurzel (Abb. 15, C) auf als die übrigen Varianten, welche sich nicht voneinander unterschieden. Die gesamten in die Wurzel aufgenommenen Fe-Mengen unterschieden sich bei den verschiedenen Behandlungen nicht (Abb. 15, D).

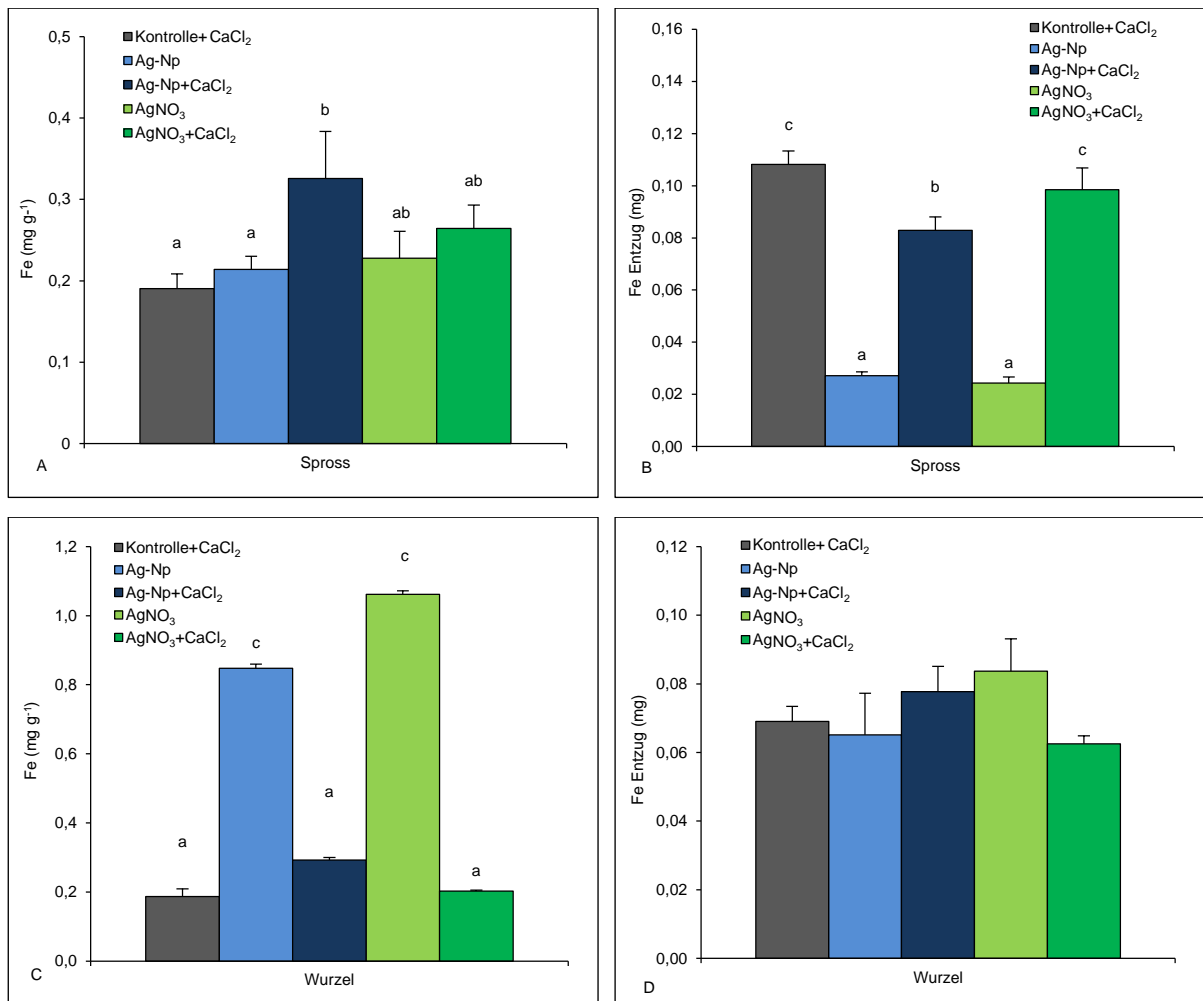


Abbildung 15: Fe-Konzentrationen und -Entzüge des Sprosses (A und B) und der Wurzel (C und D) von *Z. mays* (Entwicklungsstadium: 3 Wochen) 8 Tage nach der Zugabe von Ag-Np ($6,0 \text{ mg l}^{-1}$) und AgNO₃ ($0,42 \text{ mg l}^{-1} \text{ Ag}^+$ -Ionen) mit oder ohne CaCl₂ (1 mM) in die Nährlösung. Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+ Standardfehler) der jeweiligen Behandlung ($n = 5$). Signifikante Unterschiede zueinander werden durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet (Duncan Test, $\alpha < 0,05$).

3.4.3.3 Differenzierung zwischen ionischen (Ag⁺) und „Ag-Np-Effekten“ bei *B. napus*

Die Zugabe von „Ag-Np“ und „AgNO₃“ reduzierte die Transpirations- und Assimilationsleistung (Abb. 16, A+B) bereits drei Stunden nach der Applikation deutlich. Wie bereits zuvor bei *Z. mays* beobachtet, trat auch bei *B. napus* nach einer Behandlung mit „Ag-Np“ oder „AgNO₃“ ein welker Zustand bei den Pflanzen auf. Bei den übrigen Behandlungen waren zu diesem Zeitpunkt (3 Stunden nach der Applikation) weder eine geringere Transpirations- und Assimilationsrate als bei der Kontrolle festzustellen, noch wurden anderweitige Beeinträchtigungen beobachtet. Nach 24 Stunden führte die Behandlung „Ag-Np+CaCl₂“ jedoch ebenfalls zu einer reduzierten Transpirations- und Assimilationsleistung der Pflanzen. Die Behandlung „AgNO₃+CaCl₂“ unterschied sich nach wie vor nicht von der Kontrolle. Nach 96 Stunden wurden die gleichen Unterschiede bei der Transpirations- und Assimilationsrate wie bereits nach 24 Stunden beobachtet. Die Trockenmassen (Abb. 16, C) bei

„Ag-Np“, „Ag-Np+CaCl₂“ und „AgNO₃“ 7 Tage nach Beginn der Behandlung zeigten ebenfalls deutlich geringere Werte im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Die Pflanzen der Behandlung „AgNO₃+CaCl₂“ zeigten keinen Unterschied bei der Trockenmasse im Vergleich zur Kontrolle. Wie in Abb. 16 (D) zu erkennen ist, nahm die Höhe des Absorptionspeaks und damit die Ag-Np-Konzentration in der Nährlösung im Verlauf des Versuches mit und ohne Zugabe von CaCl₂ ab. Entsprechend der o.g. linearen Funktion (vgl. Abschnitt 2.2) hatte die Ag-Np-Konzentration nach 22 Stunden bereits um 22% („Ag-Np“) und 35% („Ag-Np+CaCl₂“) der ursprünglichen Konzentration abgenommen. Nach 48 Stunden waren bei beiden Ag-Np-Behandlungen noch 21-23% der ursprünglichen eingestellten Ag-Np Menge nachweisbar. Außerdem wurde eine starke Akkumulation grauer Aggregate an der Wurzeloberfläche sowie auf dem Boden und an den Wänden des Nährlösungsgefäßes beobachtet. Nach 96 Stunden waren noch 9-12% der zu Beginn eingestellten Ag-Np-Konzentration messbar. Die Position des Peaks (411 nm) verschob sich auf horizontaler Ebene über den gesamten Zeitraum nicht. Dies zeigt an, dass sich die Größe der noch vorhandenen Ag-Np zum Zeitpunkt der Messung nicht veränderte.

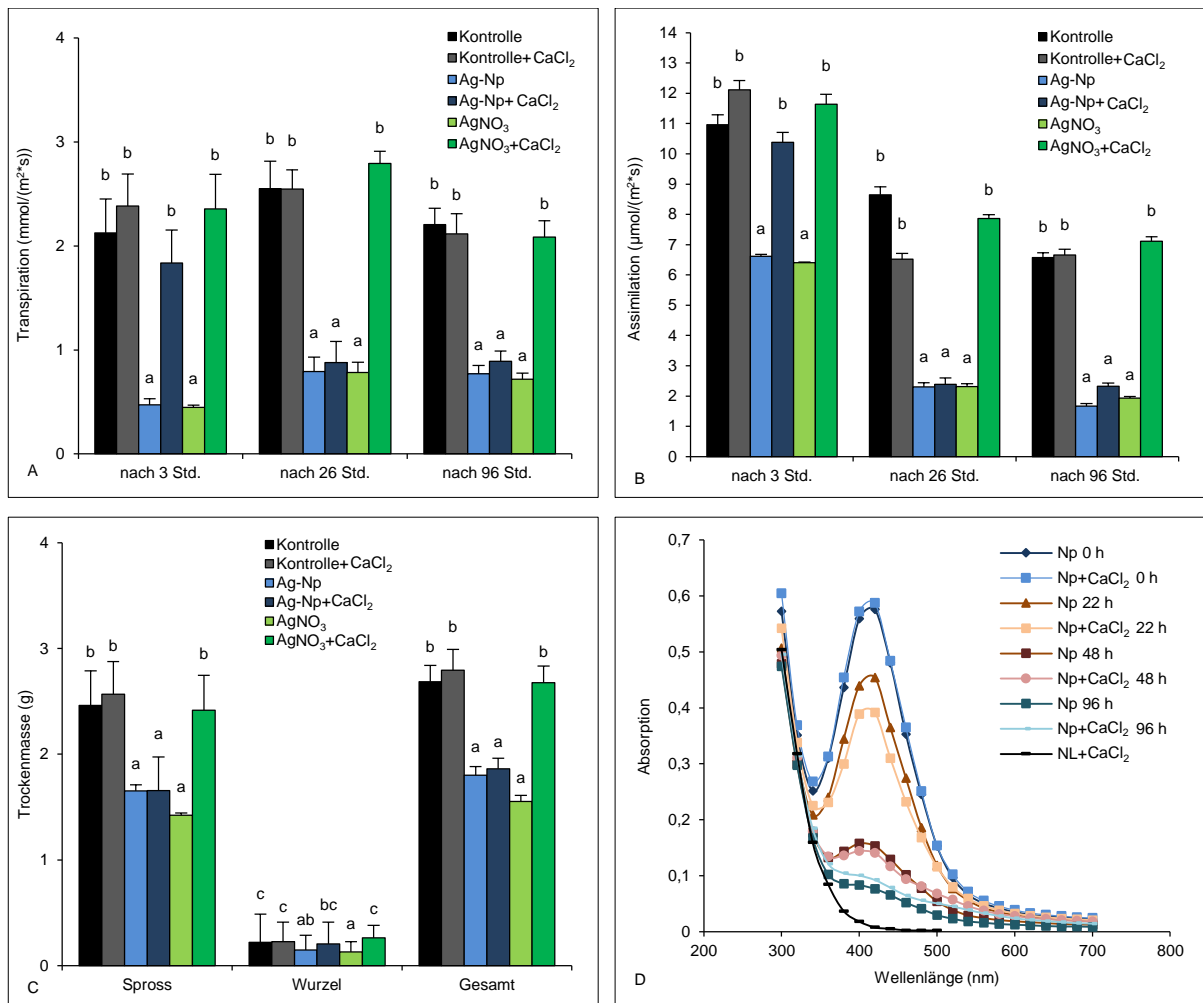


Abbildung 16: Transpirations-, Assimilationsrate (A+B) und Trockenmasse (C) von *B. napus* 3-96 Stunden (Transpirations- und Assimilationsrate) und 7 Tage (Trockenmasse) nach Zugabe von Ag-Np (6.0 mg l⁻¹) und AgNO₃ (0.42 mg l⁻¹ Ag⁺-Ionen) mit oder ohne CaCl₂ (1 mM) in die Nährlösung. Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+ Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je 8 Pflanzen). Signifikante Unterschiede zueinander werden durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet (Duncan Test, $\alpha < 0.05$). D: Mittelwerte des Absorptionsspektrums der Nährlösungen (n=4), welche Ag-Np enthielten, über einen Zeitraum von 48 Stunden.

Die beiden Behandlungen, die kein CaCl₂ enthielten („Ag-Np“ und „AgNO₃“), wiesen im Vergleich zu den anderen Behandlungen deutliche Schäden in der Blattstruktur auf (Abb. 17, A-E). Besonders auffällig war, dass die Wurzeln der Pflanzen bei „Ag-Np+CaCl₂“ eine stärkere dunkle Verfärbung als die Wurzeln der Behandlung „Ag-Np“ aufwiesen (Abb. 17, F und G). In einem unabhängigen Experiment, in dem die Ag-Np zu einem deutlich früheren Entwicklungsstadium appliziert wurden, war das Erscheinungsbild der adsorbierten Aggregate an die Wurzeloberfläche bei den Behandlungen „Ag-Np“ (Abb. 17, H) und „Ag-Np+CaCl₂“ (Abb. 17, I) ähnlich. Es scheint als würden sich in beiden Fällen die Aggregate vor allem an den Feinwurzeln akkumulieren.

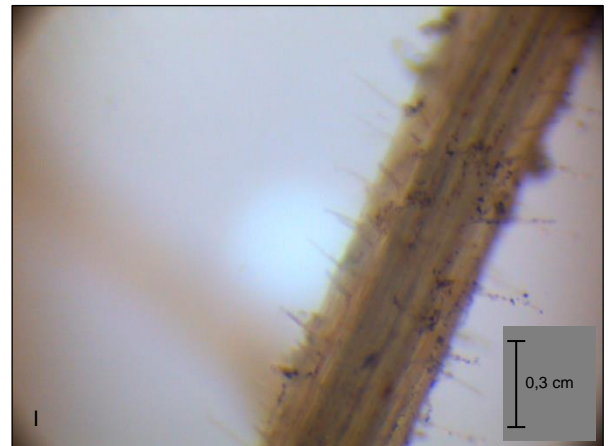
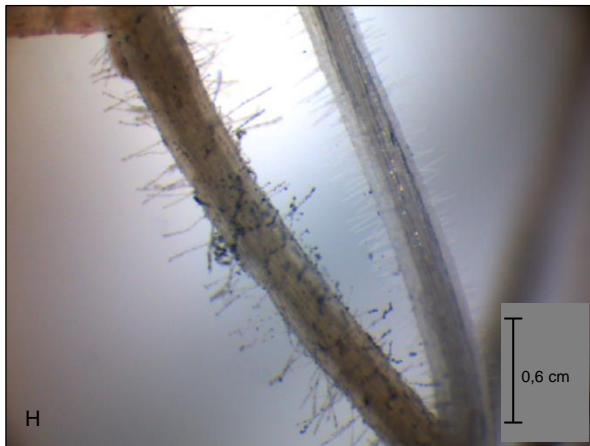
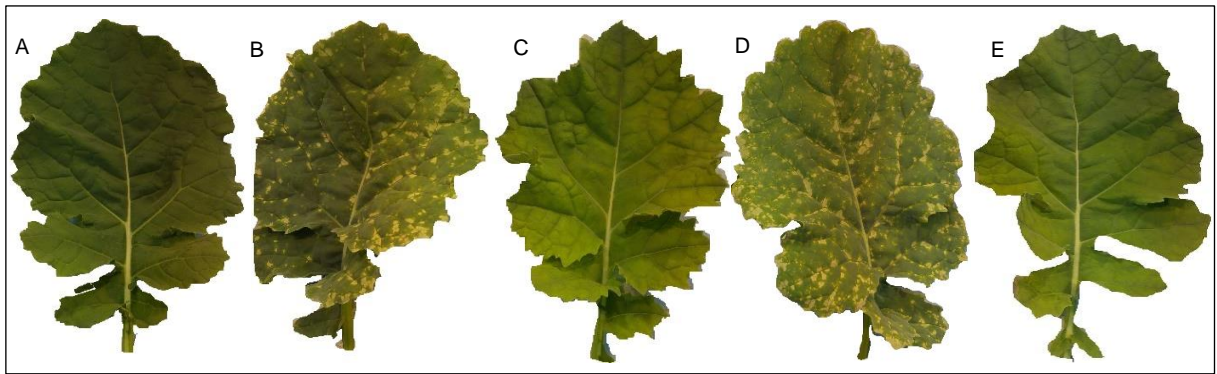


Abbildung 17: Vergleich einzelner Blätter (*B. napus*) 7 Tage nach Zugabe der verschiedenen Präparate: Kontrolle+CaCl₂ (A), „Ag-Np“ (B), „Ag-Np+CaCl₂“ (C), „AgNO₃“ (D), „AgNO₃+CaCl₂“ (E) in die Nährlösung. F und G: Vergleich der Wurzeln einzelner Pflanzen (*B. napus*) 7 Tage nach Zugabe der verschiedenen Präparate „Ag-Np“ (F) und „Ag-Np+CaCl₂“ (G) in die Nährlösung. H und I: Vergleich der Wurzeln 14 Tage alter Pflanzen (*B. napus*) 24 Stunden nach der Zugabe von „Ag-Np“ (H) und „Ag-Np+CaCl₂“ (I).

Die Ag-Konzentrationen (Abb. 18, A) sowie die insgesamt aufgenommenen Mengen Ag im Spross (Abb. 18, B) wiesen nach einer Zugabe von Ag-Np und AgNO₃ deutlich höhere Werte auf als die beiden anderen Varianten, bei denen zusätzlich CaCl₂ in der Nährlösung enthalten war.

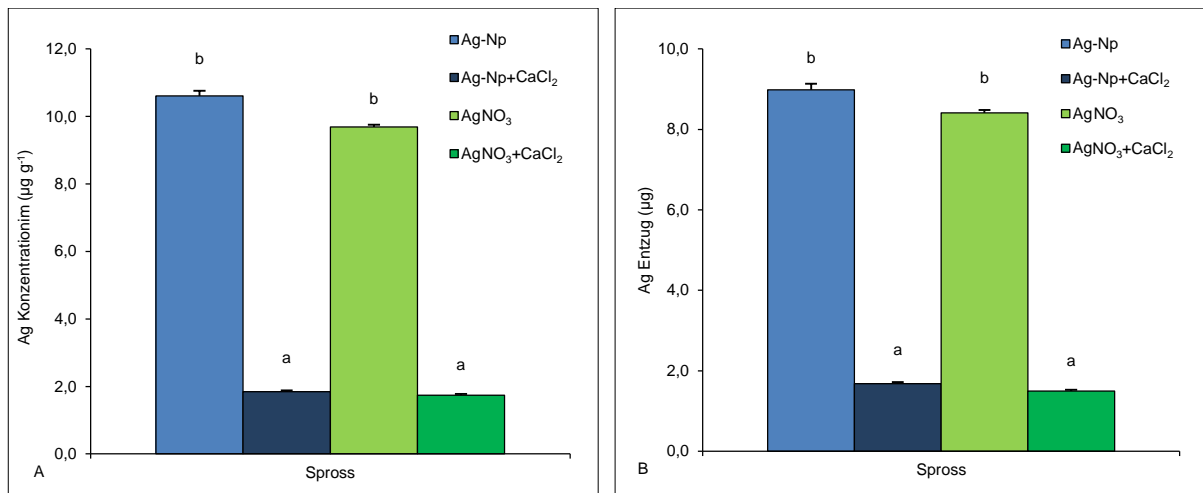


Abbildung 18: Ag-Konzentrationen (A) und Entzüge (B) des Sprosses von *B. napus* (Entwicklungsstadium: 3 Wochen) 7 Tage nach der Zugabe von Ag-Np ($6,0 \text{ mg l}^{-1}$) und AgNO_3 ($0,42 \text{ mg l}^{-1} \text{ Ag}^+$ -Ionen) mit oder ohne CaCl_2 (1 mM) in die Nährlösung. Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+ Standardabweichung) der jeweiligen Behandlung (je acht Pflanzen).

3.4.4 Diskussion

3.4.4.1 Vorversuch zur Beurteilung der freigesetzten Menge Ag^+ -Ionen der Ag-Np in Wasser und Stabilität der Ag-Np in einer Nährlösung

Die leicht reduzierte Höhe der Peaks (Abb. 8, B) nach 24 Stunden, die bei den Konzentrationen 2 bis 10 mg l^{-1} beobachtet wurde, weist auf eine leichte Abnahme der Ag-Np-Konzentration hin, was vermutlich auf eine geringfügige Agglomeration und anschließende Sedimentation der Ag-Np zurückzuführen ist. Für keine der verschiedenen Konzentrationen wurde eine Verschiebung des Peaks auf horizontaler Ebene beobachtet, was ein Hinweis darauf ist, dass keine Veränderung der Größe der Ag-Np stattfand. Demnach kann man annehmen, dass zumindest in den ersten 24 Stunden durch die Anwesenheit der Pflanzennährstoffe und CaCl_2 die Größenverteilung und die Stabilität der Ag-Np nicht oder nur geringfügig beeinflusst wird. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde für die weiteren Experimente mit Ag-Np eine Behandlungskonzentration von 6 mg l^{-1} gewählt. Die Ergebnisse belegen, dass in der Suspension ca. 6-7 % der Gesamtmenge Silber in gelöster Form als freie Ag^+ -Ionen vorlagen (Abb. 8, A). Diese Tatsache unterstützt die Vermutung, dass freigesetzte Ag^+ -Ionen entscheidend zu den festgestellten negativen Effekten der Ag-Np beitragen können, was im Folgenden näher diskutiert wurde.

3.4.4.2 Stabilität der Ag-Np während des Experimentes mit Pflanzen (*Z. mays* und *B. napus*)

Trotz des zuvor gezeigten relativ stabilen Verhaltens der Ag-Np über einen Zeitraum von 24 Stunden in einer Nährlösung (inklusive 1 mM CaCl_2), die keine Pflanzen enthielt (Abb. 8, B), nahm die mittlere Ag-Np-Konzentrationen in der Nährlösung während des Versuchs mit Pflanzen (*Z. mays* und *B. napus*) bei „Ag-Np“ und „Ag-Np+ CaCl_2 “ relativ schnell ab (Abb. 9 und 16, D). Auffällig war, dass sich die Ag-Np-Konzentration bei *B. napus* deutlich langsamer reduzierte als bei *Z. mays*. Dabei sank bei beiden Pflanzenarten die Konzentration bei „Ag-Np+ CaCl_2 “ etwas schneller als bei „Ag-Np“. Die Abnahme

der Ag-Np-Konzentration lässt darauf schließen, dass die Ag-Np sich entweder auflösten oder durch Agglomeration größere Aggregate entstanden, welche möglicherweise sedimentieren und nicht mehr durch das Absorptionsspektrum erfasst werden können. Die Beobachtung verstärkter Akkumulation grauer Aggregate an der Wurzeloberfläche (Abb. 10, C+D) sowie an den Behälterwänden und am Boden bestätigt eher letztere Vermutung.

3.4.4.3 Differenzierung zwischen ionischen (Ag^+) und „Ag-Np-Effekten“ bei *Z. mays*

Der Versuchsaufbau wurde so gewählt, dass Effekte aufgezeigt werden, die über den Einfluss der von Beginn in der Ag-Np-Suspension enthaltenen Menge freier Ag^+ -Ionen (6-7% der applizierten Ag-Np-Konzentration, Abb. 8; A) hinausgehen. Die gezeigten Beeinträchtigungen der Transpirations- und Assimilationsrate (Abb. 9, A und B) wurde nach kurzer Expositionsdauer (72 Stunden) bei *Z. mays* eindeutig durch die Anwesenheit der Ag^+ -Ionen hervorgerufen, da durch das Ausfällen der Ag^+ -Ionen in beiden Varianten („Ag-Np+ CaCl_2 “, „ AgNO_3 + CaCl_2 “) die negativen Einflüsse nicht auftraten. Die Trockenmasse bei *Z. mays* (Abb. 9, C) zeigte 72 Stunden nach der Applikation der Ag-Präparate durch das Ausfällen der Ag^+ -Ionen mit CaCl_2 („Ag-Np+ CaCl_2 “, „ AgNO_3 + CaCl_2 “) etwas höhere Werte als ohne, jedoch keine signifikante Aufhebung der negativen Einflüsse. Im Vergleich dazu erkennt man nach einer Expositionsdauer von 8 Tagen (*Z. mays*) eine deutlich höhere Trockenmasse (Abb. 11, B) durch das Ausfällen der freien Ag^+ -Ionen bei beiden Behandlungen („Ag-Np+ CaCl_2 “ und „ AgNO_3 + CaCl_2 “) im Vergleich zu „Ag-Np“ bzw. „ AgNO_3 “. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass vor allem „ionische Effekte“ durch eine „Ag-Np“-Behandlung zum Tragen kamen. Jedoch ließen sich durch die Zugabe von CaCl_2 die negativen Effekte bei der Trockenmasse bei beiden Varianten („Ag-Np+ CaCl_2 “ und „ AgNO_3 + CaCl_2 “) nicht vollständig aufheben, sodass die Werte geringer waren als bei den Kontrollpflanzen („Kontrolle+ CaCl_2 “). Eine wahrscheinliche Ursache dafür könnte sein, dass zu Beginn der Applikation noch nicht alle freien Ag^+ -Ionen als AgCl ausgefällt waren und daher zu Beginn eine höhere freie Ag^+ -Ionen-Konzentration vorherrschte als die Restmenge ($8,6 \mu\text{g l}^{-1}$), die über das Löslichkeitsprodukt berechnet wurde. Ein negativer Einfluss durch die Restmenge der Ag^+ -Ionen ($8,6 \mu\text{g l}^{-1}$) ist äußerst unwahrscheinlich, da vorangegangene Versuche (vgl. Abschnitt 3.3) mit *Z. mays* einen Einfluss auf die Wurzellänge erst ab einer Ag^+ -Ionenkonzentration (AgNO_3) von $100 \mu\text{g l}^{-1}$ und auf die Transpirations-, Assimilationsrate sowie Trockenmasse erst ab $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ gezeigt haben. Auch eine negative Wirkung von AgCl , welches sich nach der Zugabe von CaCl_2 gebildet hat, kann nicht ausgeschlossen werden, wird jedoch als unwahrscheinlich eingeschätzt. Nach längerer Expositionsdauer (8 Tage) trat jedoch bei *Z. mays* zusätzlich eine stärkere Hemmung des Wurzelwachstums (Abb. 11, A) durch die Behandlung mit „Ag-Np+ CaCl_2 “ auf als durch „ AgNO_3 + CaCl_2 “. Dies gibt einen Hinweis auf eine zusätzliche Beeinträchtigung durch die Ag-Np („Np-Effekt“), die über Effekte durch die zu Beginn vorhandenen Ag^+ -Ionen („ionische Effekte“) hinausgingen. Eine wahrscheinliche Ursache für diesen zusätzlichen Np-Effekt könnte die beobachtete Akkumulation grauer Aggregate an der Wurzeloberfläche sein (Abb 10, C+D).

Im Experiment mit längerer Expositionsdauer von 8 Tagen (*Z. mays*) waren außerdem bei „Ag-Np+CaCl₂“ und „AgNO₃+CaCl₂“ deutliche Aufhellungen des Sprosses und der Blätter zu beobachten (Abb. 13, A-C). Die Pflanzen der Behandlung „Ag-Np+CaCl₂“ wiesen zusätzlich noch eine leichte violette Färbung auf, vor allem an der Blattunterseite. Als Ursache wurde eine Unterversorgung mit den Nährstoffen Fe (Aufhellung) und P (violette Verfärbung) vermutet, weshalb die Stoffkonzentrationen dieser beiden Elemente P und Fe im Spross und in der Wurzel aller Pflanzen bestimmt wurden. Wang et al. (2013) zeigten bereits eine Anreicherung von Anthocyanen, welche für die violette Verfärbung verantwortlich sind, in *A. thaliana* nach einer Ag-Np oder Ag⁺-Ionen Exposition. Der vermutete P-Mangel bei „Ag-Np+CaCl₂“ konnte durch die Ergebnisse des P-Gehaltes im Spross (Abb. 14, A) nicht bestätigt werden, da sich die P-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle („Kontrolle+CaCl₂“) nicht unterschied. Lediglich die Variante „Ag-Np“ wies einen erhöhten Wert bei der P-Konzentration gegenüber der Kontrolle auf. Die anderen Behandlungen zeigten ebenfalls keinen Unterschied zur Kontrolle („Kontrolle+CaCl₂“). Bei der Beurteilung der gemessenen Konzentrationen in der Wurzel (Abb. 14, C) ließen sich Hinweise auf eine mögliche P-Unterversorgung der Behandlung „Ag-Np+CaCl₂“ finden, da die P-Konzentration hier geringer war als bei den Pflanzen der Kontrolle („Kontrolle+CaCl₂“), bei „AgNO₃“ und bei „AgNO₃+CaCl₂“, welche keine violette Verfärbung zeigten. Eine gehemmte P-Aufnahme durch „Ag-Np+CaCl₂“ könnte also möglich sein. Jedoch waren die P-Konzentrationen in der Wurzel bei den Behandlungen „Ag-Np“, „AgNO₃“ und „AgNO₃+CaCl₂“ ebenfalls geringer als bei „Kontrolle+CaCl₂“. Man könnte vermuten, dass auch bei den Behandlungen „Ag-Np+CaCl₂“ und „AgNO₃+CaCl₂“ zu Beginn, durch eine Verzögerung des Ausfällens, höhere Konzentrationen freier Ag⁺-Ionen vorhanden waren. In diesem Fall wäre auch ein Einfluss durch freie Ag⁺-Ionen möglich, die z.B. P vermehrt als Ag₃PO₄ aus der Nährlösung ausfällten. Basierend auf den Ergebnissen der P-Analyse lassen sich jedoch keine eindeutigen Hinweise ableiten, welche die violette Verfärbung der Pflanzen bei „Ag-Np+CaCl₂“ erklären würden. Auch die Bestimmung der Eisenkonzentrationen im Spross (Abb. 15, A) gab keinen Hinweis darauf, dass die Aufhellungen der Pflanzen bei „Ag-Np+CaCl₂“ und „AgNO₃+CaCl₂“ mit einer mangelnden Eisenversorgung zusammenhängen. Entgegen der Vermutung führte die Behandlung „Ag-Np+CaCl₂“ sogar zu einer deutlich höheren Eisenkonzentration im Spross im Vergleich zur Kontrolle („Kontrolle+CaCl₂“). Bei der Fe-Konzentration in der Wurzel (Abb. 15, C) waren auch keine Unterschiede der Behandlungen „Ag-Np+CaCl₂“ und „AgNO₃+CaCl₂“ zu „Kontrolle+CaCl₂“ festzustellen. Auffällig war, dass die beiden Behandlungen „Ag-Np“ und „AgNO₃“ sogar zu sehr viel höheren Eisenkonzentrationen in der Wurzel führten. Da die Wurzeln vor der Analyse beider Elemente (P und Fe) nicht abgewaschen wurden, ist es möglich, dass bei den gemessenen Elementkonzentrationen der Wurzeln durch äußerlich anhaftendes Material beeinträchtigt waren, sodass es sich nicht ausschließlich um die aufgenommene Menge des Elementes handelte. Insgesamt ließ sich kein direkter Zusammenhang zwischen den beobachteten Aufhellungen bei „Ag-Np+CaCl₂“ und „AgNO₃+CaCl₂“ und der Eisenkonzentration erkennen. Eine Erklärung für die Verfärbungen lässt sich dementsprechend aus den vorhandenen

Ergebnissen nicht ableiten. Literaturstellen, die einen Zusammenhang zwischen der P- und Fe-Konzentration in Pflanzen und der Exposition zu Ag-Np untersuchten, sind mir nicht bekannt.

3.4.4.4 Differenzierung zwischen ionischen (Ag^+) und „Ag-Np-Effekten“ bei *B. napus*

Die Analyse der Transpirations- und Assimilationsrate (Abb. 16, A und B) bei *B. napus* zeigte 3 Stunden nach der Applikation ebenfalls eine deutliche Beeinträchtigung bei „Ag-Np“ und „ AgNO_3 “ im Vergleich zu den Behandlungen, bei denen die Ag^+ -Ionen ausgefällt wurden („Ag-Np+ CaCl_2 “ und „ AgNO_3 + CaCl_2 “). Dies ist ebenfalls ein deutlicher Hinweis auf „ionische Effekte“ zu Beginn. Die in Abb. 17 (A-E) gezeigten Schäden der Blätter belegen den Einfluss freier Ag^+ -Ionen deutlich, da die Schäden bei „Ag-Np+ CaCl_2 “ und „ AgNO_3 + CaCl_2 “ nicht auftraten. Jedoch war bei *B. napus* bereits nach 24 Std bei der Transpirations- und der Assimilationsrate ein zusätzlicher „Np-Effekt“ zu erkennen: Trotz des Ausfällens der freien Ag^+ -Ionen verursachte die Behandlung „Ag-Np+ CaCl_2 “ einen negativen Einfluss auf die Transpiration und Assimilation 24 Stunden nach der Applikation, während dies bei „ AgNO_3 + CaCl_2 “ nicht der Fall war. Gleiches war bei der Trockenmasse (Abb. 16, C) 7 Tage nach Beginn der Behandlung zu sehen. Eine Verfärbung der Pflanzen war in diesem Experiment nicht zu erkennen.

3.4.5 Zusammenfassende Diskussion - mögliche Ursachen der Effekte und Beurteilung der Silberaufnahme und -verlagerung in den Spross bei *B. napus* und *Z. mays*

Die zusätzliche Beeinträchtigung durch Ag-Np („Np-Effekt“) wurde zuvor bereits beschrieben (Navarro et al. 2008; Yin et al. 2011; Stampoulis et al. 2009; Dimkpa et al. 2013). Navarro et al. (2008) schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die reduzierte Photosynthese von Algen (*Chlamydomonas reinhardtii*) zum Großteil durch den Anteil freier Ag^+ -Ionen induziert wird. Dennoch wird erwähnt, dass die Behandlung Ag-Np bei gleicher Konzentration an freien Ag^+ -Ionen im Vergleich zu AgNO_3 zu stärkeren negativen Effekten führte. Es wurde vermutet, dass durch die Interaktion der Algen mit den Ag-Np zusätzliche Ag^+ -Ionen freigesetzt wurden, welche für die stärkeren Effekte verantwortlich waren. In einer weiteren Studie (Stampoulis et al. 2009) wurde festgestellt, dass eine Behandlung mit dem Überstand einer Ag-Np-Suspension (1000 mg l^{-1}) nach Zentrifugation den Biomassezuwachs von *Cucurbita pepo* L. signifikant weniger beeinträchtigte als die Behandlung mit Ag-Np (1000 mg l^{-1}), worauf hin auf eine zusätzliche Wirkung der Ag-Np geschlossen wurde. Die Möglichkeit, dass eine zusätzliche Wirkung der Ag-Np durch eine zusätzliche Ag^+ -Ionenfreisetzung aus den Ag-Np hervorgerufen werden könnte, wurde dabei jedoch außer Acht gelassen. Yin et al. (2011) zeigten, dass eine Behandlung mit Ag-Np (40 mg l^{-1}) das Wachstum von *L. multiflorum* hemmte, während der Überstand der Ag-Suspension nach Zentrifugation ($1,2 \text{ mg l}^{-1}$ freie Ag^+ -Ionen) zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums führte. Zusätzlich konnten die negativen Effekte einer Ag-Np-Behandlung durch die Zugabe eines Ag^+ -Ionenbinders (Cystein) nicht gemindert werden. Es wurde vermutet, dass die toxische Wirkung durch die Ag-Np selbst oder durch zusätzlich freigesetzte Ag^+ -Ionen hervorgerufen wurden.

Dimkpa et al. (2013) zeigten ein gestörtes Wachstum von *T. aestivum* in Sand nach Zugabe von Ag-Np in Abhängigkeit von der applizierten Konzentration. Bei der äquivalenten Menge freier Ag^+ -Ionen in der Sandmatrix hatte AgNO_3 im Vergleich zu den Ag-Np keine negativen Folgen für das Wachstum, was auf einen zusätzlichen Effekt durch die Ag-Np schließen lässt. Demnach sind als Ursache für einen zusätzlichen „Np-Effekt“ drei Szenarien möglich, die bereits zum Teil in der Literatur erwähnt werden: Eine stärkere Hemmung des Wachstums durch die (i) von den Ag-Np zusätzlich stetig freigesetzten Ag^+ -Ionen (Navarro et al. 2008 und Yin et al. 2011), (ii) Ag-Np selbst (Stampoulis et al. 2009 und Yin et al. 2011) oder (iii) veränderten Ag-Np-Eigenschaften, verursacht durch die Zugabe von CaCl_2 . Bei den Szenarien (ii) und (iii) könnte die zusätzliche Beeinträchtigung durch die nach einer Behandlung mit „Ag-Np“ und „Ag-Np+ CaCl_2 “, beobachtete Akkumulation grauer Aggregate an der Wurzeloberfläche verursacht worden sein. Dies könnte z.B. zu mechanischen Schäden oder einer gehemmten Nährstoff- und Wasseraufnahme geführt haben. Die nach kurzer Expositionsdauer (3 Tage) bei *Z. mays* deutlich höhere Ag-Konzentration im Spross (Abb. 10, A) bei der Behandlung „Ag-Np“ im Vergleich zu „ AgNO_3 “ lässt die Vermutung einer stetigen Ag^+ -Ionenfreisetzung oder aber die Aufnahme ganzer Ag-Np zu. Jedoch sollte dann auch die Konzentration im Spross bei „Ag-Np+ CaCl_2 “ höher sein als bei „ AgNO_3 + CaCl_2 “, da man hier ebenfalls eine stetige Ag^+ -Ionenfreisetzung erwarten würde, was aber nicht bestätigt wurde. Möglich wäre, dass eine äußerliche Kontamination des Sprosses mit Ag bei der Behandlung „Ag-Np“ zu den erhöhten Werten geführt haben könnte. Die Experimente mit *Z. mays* (Expositionsdauer: 8 Tage) und *B. napus* zeigten dahingegen nach Behandlungen mit „Ag-Np“ und „ AgNO_3 “, anders als bei *Z. mays*, nach kurzer Expositionsdauer (3 Tage) keine Unterschiede bei der gemessenen Ag-Konzentration im Spross (Abb. 12, A und B bzw. Abb. 18, A und B). Dies spricht eher dafür, dass nur ein Teil der von Beginn an vorhandenen Menge freier Ag^+ -Ionen aufgenommen wurde, was somit die Vermutung einer stetigen Freisetzung oder einer Aufnahme ganzer Ag-Np eher nicht zulässt. Auch die geringen Ag-Gehalte im Spross bei „Ag-Np+ CaCl_2 “ im Versuch mit *B. napus* und *Z. mays* (Expositionsdauer: 8 Tage) sprechen nicht für eine Aufnahme von Partikeln oder eine zusätzliche Freisetzung von Ag^+ -Ionen, da diese sonst höher sein müssten als bei „ AgNO_3 + CaCl_2 “. Da die Wurzeln bei dem Versuch mit *Z. mays* (Expositionsdauer: 8 Tage) vor der Analyse nicht abgewaschen wurden, sind die extrem hohen Werte der Ag-Konzentration der Wurzeln (Abb. 12, C) bei der Behandlung „Ag-Np“ vermutlich durch äußerlich anhaftende Ag-Np und durch die beobachtete Ansammlung grauer Aggregate an der Wurzeloberfläche zu erklären. Die Akkumulation grauer Aggregate war auch bei der Behandlung „Ag-Np+ CaCl_2 “ zu beobachten, sodass man auch ähnliche Konzentrationen bei der Wurzel erwartet hätte, was sich in den Ergebnissen jedoch nicht widerspiegelte. Diese Tatsache spricht dafür, dass es sich im Fall von „Ag-Np+ CaCl_2 “ bei den an der Wurzeloberfläche akkumulierten Aggregaten nicht vorwiegend um Ag handelt. Jedoch sind diese Vermutungen sehr spekulativ, da die Wurzeln nicht abgewaschen wurden und auch der Prozess des Trocknens in Papiertüten zu einem ungleichmäßigen Abrieb des äußerlich anhaftenden Materials geführt haben könnte. Auf Grund der gemessenen Ag-Konzentrationen im Spross bei allen Versuchen wird eine

zusätzliche Freisetzung weiterer Ag^+ -Ionen von den Ag-Np für beide Pflanzenspezies, und damit Szenario (i), eher als unwahrscheinlich eingeschätzt, lässt sich jedoch durch die Ergebnisse nicht eindeutig widerlegen. Auch eine Aufnahme und Verlagerung ganzer Ag-Np in den Spross wird basierend auf den gemessenen Ag-Konzentrationen eher ausgeschlossen. Im Gegensatz zu diesem Verdacht gibt es durchaus Studien, die eine Aufnahme und Verlagerung von Ag-Np oder von zusätzlich freigesetzten Ag^+ -Ionen von der Wurzel in den Spross vermuten (Ma et al. 2010; Geisler-Lee et al. 2013; Dimkpa et al. 2013; Wang et al. 2013). Dimkpa et al. (2013) konnten partikuläre Ag-Strukturen im Blattgewebe nach Ag-Np- und AgNO_3 -Exposition feststellen. Ma et al. (2010) stellten dies nach Ag-Np Applikation ebenfalls fest, gaben dabei jedoch den Hinweis, dass Pflanzen in der Lage sind, Metallionen zu reduzieren, wodurch sich elementares Silber im Pflanzengewebe bilden kann (Harris und Bali 2008). Dies würde bedeuten, dass detektierte partikuläre Ag-Strukturen im Pflanzengewebe auch ionischem Ursprungs sein könnten. Yin et al. (2011) weisen ebenfalls darauf hin, dass sowohl eine Aufnahme von Partikeln als auch die von Ag^+ -Ionen möglich sein kann. In einer weiteren Studie wird auch vermutet, dass die Ag-Konzentration im Spross bei *Populus deltoides* Marsh. nach Ag-Np Wurzelexposition nicht nur durch freigesetzte Ag^+ -Ionen zu erklären sind und schließen darauf, dass eine partikuläre Aufnahme stattfand (Wang et al. 2013). Sollte eine Aufnahme von Ag-Np über die Wurzel möglich sein, so ist dies sicherlich abhängig von der gewählten Pflanzenart und der Größe der Ag-Np, wodurch unterschiedliche Beurteilungen zu Stande kommen können. Anhand der vorliegenden und in anderen Studien veröffentlichten Ergebnisse lässt sich die Aufnahme ganzer Ag-Np jedoch nicht eindeutig bestätigen oder widerlegen. Basierend auf den Erkenntnissen der durchgeführten Experimente erscheint Szenario (iii) am wahrscheinlichsten als Ursache für die gezeigten Np-Effekte. Unterstützt wird die Vermutung dadurch, dass bei der Behandlung „Ag-Np+ CaCl_2 “, im Versuch mit *B. napus*, eine deutlich stärkere Ansammlung grauer Aggregate an der Wurzeloberfläche zu erkennen war als bei „Ag-Np“ (Abb. 17, F+G). Die Bilder der Wurzel in Abb. (10, C und D) geben ebenfalls einen Hinweis darauf, dass die Behandlung „Ag-Np+ CaCl_2 “ bei *Z. mays* zu einer starken Akkumulation grauer Aggregate an der Wurzeloberfläche führte. Dies würde die Vermutung zulassen, dass die Zugabe von CaCl_2 zwar die toxische Wirkung von freien Ag^+ -Ionen unterbindet, gleichzeitig jedoch die Akkumulation der grauen Aggregate fördert, was letzten Endes zu den vermeintlichen zusätzlichen Np-Effekten geführt haben könnte. Dieses Beispiel würde belegen, dass potentielle Wirkungen von Ag-Np durch die Anwesenheit bestimmter Stoffe verändert oder unter Umständen sogar verstärkt werden können. Diesen Fall könnte man als einen „ CaCl_2 -Effekt“ oder aber als „Np-Effekt“ beschreiben, der durch die Zugabe von CaCl_2 gefördert wurde. Sollte die Zugabe von CaCl_2 eine Veränderung der Ag-Np-Eigenschaften hervorrufen oder z.B. die Aggregation der Ag-Np fördern, lässt sich ein zusätzlicher Np-Effekt nicht eindeutig belegen.

3.5 Schlussfolgerung

Im Hinblick auf die zu beurteilende Wirkung von Nanomaterialien auf die Entwicklung von Pflanzen kann man aus den Ergebnissen schließen, dass im Vergleich zu den jeweiligen Bulk-Stoffen die Wirkungen verschieden (ZnO und Ag) oder ähnlich (TiO₂) waren. Eine gesonderte Beurteilung der Wirkung von Nanomaterialien und der zu Grunde liegenden Ursachen der Effekte auf Pflanzen ist dementsprechend notwendig. Bei der näheren Betrachtung der Wirkung der Ag-Np stellte sich heraus, dass Effekte auf die Transpirations- und Assimilationsrate sowie das Wachstum von Pflanzen vorwiegend durch die Anwesenheit freier Ag⁺-Ionen hervorgerufen wurden. Jedoch wurde, nach Zugabe eines Ag⁺-Ionenbinders (Chlorid) in Abhängigkeit von der Expositionsdauer, bei *Z. mays* (nach 8 Tagen) und *B. napus* (nach 24 Stunden) ein zusätzlicher Effekt („Ag-Np-Effekt“ oder CaCl₂-Effekt“) festgestellt, wodurch die Eingangs formulierte Hypothese (2) bestätigt wurde. Es wurde zusätzlich festgestellt, dass der Zeitpunkt der Ausprägung eines „Np-Effektes“ von Expositionsdauer und der Pflanzenart abhängig sind.

4 Untersuchungen des Verhaltens von Kupfer- und Eisennanopräparaten auf Blattoberflächen

4.1 Untersuchungen des Einsatzes von metallischen Np zur Behebung von Nährstoffmängeln und zum protektiven Pflanzenschutz gegen echten Mehltau

4.1.1 Einleitung

Ein Vorteil einer Blattapplikation in Np-Form im Vergleich zu herkömmlichen Präparaten (gelöste oder partikuläre (µm) Formen) könnte darin bestehen, dass bei gleicher Aufwandsmengen eine effektivere Düngewirkung durch z. B. besondere Nanoeigenschaften oder durch die Aufnahme ganzer Np erzielt wird. Im Rahmen der Untersuchungen sollte zunächst festgestellt werden, ob sich Np-Präparate (Kupfer (Cu-Np), Eisen (Fe-Np)) als Düngemittel zur Blattapplikation eignen und im Vergleich zu gelösten und anderen partikulären Präparaten bei verschiedenen Konzentrationen eine Wirkung erzeugen. Dazu wurden Mangelversuche angesetzt, in denen die verwendeten Nährlösungen den jeweils zu untersuchenden Stoff nicht enthielten. Mit Hilfe der Trockenmasse und teilweise der Bestimmung der Chlorophyllgehalte (SPAD und Chlorophyllextraktion) wurde die Wirkung überprüft. Zusätzlich wurde in einigen Fällen durch Abwaschen der Rückstände auf der Blattoberfläche die Aufnahme in das Blattinnere in Abhängigkeit von den verschiedenen Präparaten untersucht. Außerdem wurde festgestellt, ob potentiell aufgenommene Stoffe über das Blatt in die Wurzel verlagert werden können. Als ein weiteres mögliches Anwendungsgebiet von Nanomaterialien wurde eine mögliche effektivere Pflanzenschutzwirkung von Np, durch z.B. eine länger anhaltende protektive oder systemische Wirkung, im Vergleich zu einem anderen partikulären und gelösten Kupferpräparat untersucht. Dazu

wurden Pflanzen mit den entsprechenden Präparaten behandelt und mit echtem Mehltau inokuliert. Anschließend wurde der Befall bonitiert und somit die Wirksamkeit bestimmt.

4.1.2 Material & Methoden

4.1.2.1 Untersuchungen der Düngewirkung von „Cu-Np“ und „Fe-Np“ im Vergleich zu gelösten Präparaten („CuCl₂“ bzw. „Fe-EDTA“) als Blattapplikation bei *C. sativus*, *A. sativa* bzw. *B. napus*

In Kupfer- und Eisenmangelversuchen wurde zunächst die Wirkung verschiedener Konzentrationen von „Cu-Np“ im Vergleich zu „CuCl₂“ (20-80 mg l⁻¹) und „Fe-Np“ im Vergleich zu „Fe-EDTA“ (100-1000 mg l⁻¹) nach einer Blattapplikation untersucht. Für die Experimente mit den Cu-Np wurden die Pflanzenarten *C. sativus* und *A. sativa* verwendet, da diese bekannt dafür sind, sensibel auf eine mangelnde Kupferversorgung zu reagieren. Die Wirkung der Fe-Np wurde an *B. napus* untersucht, da diese Pflanzenart deutliche Symptome bei einer Unterversorgung mit Eisen aufweist. Auf Grund der schlechten Benetzbarkeit der Blätter von *B. napus* wurde den Fe-Präparaten das Netzmittel „Break Thru“ (0,005%) zugefügt. Die Pflanzen wurden auf Filterpapier angezogen und mit deion. Wasser feucht gehalten, sodass von Beginn an der Eintrag von Kupfer bzw. Eisen so gering wie möglich war. Nach 7 (*C. sativus*) oder 5 Tagen (*A. sativa*, *B. napus*) wurden die Pflanzen in eine Hydrokultur überführt. Abgesehen vom Nährelement Kupfer (CuCl₂) bzw. Eisen (Fe-EDTA) wurden die Pflanzen vollständig mit Nährstoffen versorgt (vgl. Abschnitt 2.5). Die Pflanzen der Positivkontrolle („Kontrolle“) erhielten Kupfer (0,79 µM CuCl₂) bzw. Eisen (90,0 µM Fe-EDTA) von Beginn an über die Nährlösung. Bei den übrigen Pflanzen wurde bei den Kupfermangelversuchen vollständig auf eine Versorgung mit Kupfer über die Nährlösung verzichtet. Die Eisenmangelvarianten erhielten zunächst 20% der Menge Eisen einer vollständigen Nährlösung, damit die Mangelsymptome nicht zu früh auftraten. Nach einer Woche erhielten sie kein Eisen mehr über die Nährlösung. Die Wirkung der verschiedenen Konzentrationen der Cu-Np (20 und 40 mg l⁻¹ Cu) bei *C. sativus* wurde in zwei separaten Versuchen getestet. In beiden Versuchen mit *C. sativus* traten nach drei Wochen erste Cu-Mangelsymptome (Aufhellung der Blätter, gehemmtes Wachstum) auf, woraufhin die Präparate als Sprühapplikation aufgetragen wurden. Jedes Präparat wurde in zwei bis drei Gaben von insgesamt 50 ml auf drei Pflanzen gleichmäßig aufgesprüht. Bei den Kupfermangelversuchen mit *A. sativa* wurde die Wirkung der beiden Konzentrationen (20 und 40 mg l⁻¹) in einem Versuch getestet. Dabei wurden die Kupferpräparate, welche für eine bessere Benetzung der Pflanzen Tween enthielten (0,002%), ebenfalls nach Auftreten der Mangelsymptome aufgesprüht. In einem zweiten Experiment mit *A. sativa* wurde die Wirkung der Cu-Np in Konzentrationen von 40 und 80 mg l⁻¹ untersucht, jedoch wurden die Präparate bereits aufgetragen, bevor die Mangelsymptome deutlich wurden. Insgesamt wurden in beiden Versuchsansätzen mit *A. sativa* 40 ml der Kupferpräparate in zwei bis drei Gaben auf fünf Pflanzen verteilt. Im Eisenmangelversuch mit *B. napus* wurden, nach Sichtbarwerden der Mangelsymptome (Aufhellung der

Blätter), insgesamt 40 ml der Eisenpräparate in zwei Schritten auf fünf Pflanzen gesprüht. Nachdem die Präparate auf der Pflanzenoberfläche eingetrocknet waren, wurden die Pflanzen in fast jedem Versuch zwei bis drei Mal mit deion. Wasser durch eine Sprühapplikation gleichmäßig befeuchtet. Im Experiment mit *A. sativa*, in dem die Kupferpräparate vor dem Auftreten der Mangelsymptome appliziert wurden (14 Tage nach der Keimung), wurden die Pflanzen nicht befeuchtet. Bei allen Sprühaktivitäten wurden die Nährlösungsbehälter umfangreich mit Papiertüchern abgedeckt, sodass abtropfende Flüssigkeiten von der Pflanzenoberfläche keinen Kontakt zur Nährlösung haben konnten. Als Negativkontrollen dienten Pflanzen, bei denen bis zum Schluss auf die Versorgung mit Kupfer („-Cu“) bzw. Eisen („-Fe“) verzichtet wurde. In den Untersuchungen mit *C. sativus* wurde 14 Tage nach der ersten Cu-Applikation die Trockenmasse bestimmt. Um eine mögliche Verlagerung von Kupfer innerhalb der Pflanze zu untersuchen, wurde teilweise der Kupfergehalt der Wurzeln gemessen. Da die Wurzeln ineinander gewachsen waren, wurden für die Analyse der Kupferkonzentrationen in der Wurzel, drei Teilproben der gemahlene Gesamt wurzelmasse entnommen und auf ihren Kupfergehalt untersucht (vgl. Abschnitt 2.7). Die Trockenmasse in den Experimenten mit *A. sativa* wurde 9 Tage (Mangelsymptome waren zum Zeitpunkt der Applikation bereits vorhanden) und 18 Tage (Mangelsymptome waren zum Zeitpunkt der Applikation noch nicht vorhanden) nach Auftragen der Präparate untersucht. Um die Wirkung der Kupferpräparate, vor allem bei den geringeren Konzentrationen, besser beurteilen zu können, wurde teilweise zusätzlich der Chlorophyllgehalt (SPAD) bestimmt. Der Einfluss der Fe-Präparate wurde durch die Trockenmasse bei *B. napus* 12 Tage nach der ersten Applikation und den Chlorophyllgehalt (SPAD, Chlorophyllaufschluss) bewertet. Die SPAD-Messung wurde an behandelten Blättern gleichen Alters bei jeder Pflanze durchgeführt. Insgesamt wurde an jedem Blatt bei *B. napus* fünf und *C. sativus* sieben Messungen durchgeführt und automatisch der Mittelwert je Blatt gebildet. Zusätzlich wurden Aufnahmen (REM) der eingetrockneten Präparate auf der Blattoberfläche von *C. sativus*, *A. sativa* (jeweils Cu-Np) und *V. faba* (Fe-Np) gemacht (vgl. Abschnitt 2.10). Bei den Aufnahmen von *C. sativus* war im aufgetragenen Cu-Np-Präparat Tween (0,002%) enthalten. Im Falle der Fe-Np wurde *V. faba* gewählt, da zu diesem Zeitpunkt keine andere Pflanzenart zur Verfügung stand.

4.1.2.2 Vergleich der Düngewirkung (*C. sativus*) und des Kupferaufnahmeverhaltens (*G. max*) in das Blatt nach der Blattapplikation verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparate

In einem weiteren Experiment wurde die Wirkung der Cu-Np noch im Vergleich zu anderen partikulären Kupferpräparaten untersucht. Dabei wurde eine kommerziell erhältliche Blattdüngemittel-Suspension Lebosol®-Kupfer 350 SC („Kupferoxychlorid“), welche Kupferoxychlorid in partikulärer Form enthält, in den Vergleich miteinbezogen. Da aus Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche nach der Behandlung mit den Cu-Np hervorging, dass die Größe der Partikel nach dem Eintrocknen weitaus größer war als vom Hersteller angegeben, wurden die ursprünglichen Cu-Np, im Hinblick auf die durchschnittliche

Partikelgröße, modifiziert. Dazu wurden die Cu-Np (1 g l^{-1}) für 2 Stunden bei 48000 g zentrifugiert, um größere Aggregate zu sedimentieren, sodass sich im Überstand insgesamt durchschnittlich kleinere Partikel befanden als in der ursprünglichen Cu-Np-Suspension. Der Überstand dieser Suspension nach Zentrifugation wurde ebenfalls als Behandlung („Cu-Np-Überstand“) beigefügt, um zu untersuchen, ob die Größe der Partikel einen Einfluss auf die Wirkung hat. Da CuCl_2 in höheren Konzentrationen in Vorversuchen (nicht dargestellt) teilweise leichte Blattschäden verursachte, wurde „Cu-EDTA“ als weitere Behandlung ergänzt. Die verschiedenen Cu-Substanzen („Cu-EDTA“, „ CuCl_2 “, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) wurden im Hinblick auf zwei unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten zur Förderung des Pflanzenwachstums (*C. sativus*) bewertet. Zum einen wurde wie schon zuvor die Düngewirkung nach einer Sprühapplikation auf die Blätter getestet. Zum anderen wurde die Pflanzenschutzwirkung gegenüber echtem Mehltau nach einer Sprühapplikation auf die Pflanzenoberfläche beurteilt. Der Kupfermangelversuch fand wie schon zuvor beschrieben in einer Nährlösung statt. Die Pflanzen wurden wieder auf Filterpapier angezogen und nach 4 Tagen in eine Hydrokultur überführt. Abgesehen vom Nährelement Kupfer (CuCl_2) wurden die Pflanzen vollständig mit Nährstoffen versorgt (vgl. Abschnitt 2.5). Pflanzen für die Positiv- und Negativkontrolle wurden wie zuvor ergänzt. Nach drei Wochen (zwei- bis drei-Blattstadium) waren Ansätze von Mangelsymptomen (Aufhellung der Blätter, gehemmtes Wachstum) erkennbar und eine erste Sprühapplikation (15 ml je Behandlungsvariante auf drei Pflanzen verteilt) der verschiedenen Präparate wurde durchgeführt. Nachdem die aufgetragenen Präparate eingetrocknet waren, wurden die Pflanzen noch einmal mit deion. Wasser besprüht, um eine bessere Aufnahme zu gewährleisten. Sechs Tage nach der ersten Sprühapplikation wurde der Chlorophyllgehalt (SPAD) eines behandelten Blattes (2. Blatttage) und eines unbehandelten jüngeren Blattes (4. Blatttage) jeder Pflanze gemessen. Anschließend wurden die Präparate ein weiteres Mal auf die gesamte Pflanze aufgetragen (20 ml je Behandlungsvariante auf drei Pflanzen verteilt). Weitere 4 Tage später wurde der Chlorophyllgehalt (4. Blatttage) erneut gemessen. Insgesamt 10 Tage nach der ersten Behandlung wurde die Trockenmasse der Pflanzen bestimmt. Da die Wurzeln der Pflanzen in der Nährlösung bei allen Versuchen ineinander wuchsen, konnten nur die Gesamttrockenmassen je Behandlung bestimmt werden, wodurch die statistische Auswertung von Unterschieden nicht möglich war.

In einem zusätzlichen Experiment wurden die Kupferaufnahmemengen in das Blatt von *G. max* in Abhängigkeit von den verschiedenen Behandlungen („Cu-EDTA“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“) genauer untersucht. Die Pflanzen wuchsen wie bereits zuvor beschrieben in einer Nährlösung unter Kupfermangelbedingungen. Eine Kontrollvariante („Kontrolle“) wurde mit Kupfer über die Nährlösung versorgt. Insgesamt wurden je Behandlung sechs Blätter behandelt. Nach dem Auftragen wurden die auf der Blattoberfläche eingetrockneten Präparate zweimal per Sprühapplikation mit dem gleichen Volumen deion. Wasser gleichmäßig befeuchtet. Als Negativkontrolle (-Cu) diente jeweils ein unbehandeltes benachbartes Blatt. Nach 24 Stunden wurden bei jeder Behandlung drei Blätter abgeschnitten und gründlich mit deion. Wasser, bei leichtem Reiben zwischen den Finger,

abgewaschen. Gleiches geschah nach 48 Stunden. Anschließend wurden die Blätter getrocknet und aufgeschlossen, um die Kupferkonzentration in der entstandenen Aufschlusslösung zu messen (vgl. Abschnitt 2.7). In den Kontrollblättern (-Cu) wurde ebenfalls die Kupferkonzentration bestimmt, welche später von den Werten der behandelten Blätter abgezogen wurde. Es wurde die Pflanzenart *G. max* gewählt, da diese ebenfalls sensitiv auf einen Kupfermangel reagiert und kleine Blätter hat, wodurch sich die aufgetragenen Präparate von der Oberfläche leichter abwaschen lassen als z. B. bei den Blättern von *C. sativus*. So sollte gewährleistet werden, dass am Ende nur die Menge Kupfer bestimmt wird, die in das Blatt aufgenommen wurde, und nicht zusätzlich noch potentielle Rückstände der Präparate auf der Blattoberfläche. Zusätzlich wurden in diesem Zusammenhang Aufnahmen (REM) der eingetrockneten Präparate auf der Blattoberfläche gemacht (vgl. Abschnitt 2.10). In diesem Fall wurde *V. faba* gewählt, da zu diesem Zeitpunkt keine andere Pflanzenart zur Verfügung stand.

4.1.2.3 Vergleich der Wirkung verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparate zum Pflanzenschutz gegenüber echtem Mehltau bei *C. sativus*

Für die Untersuchungen der Wirkung gegenüber Echtem Mehltau (Kombination aus *Podosphaera xanthii* Schltdl. (syn. *Sphaerotheca fuliginea*, *S. fusca*) und *Golovinomyces orontii* Heluta (syn. *Erysiphe cichoracearum*)) wurden die Pflanzen zunächst im Sand angezogen und nach 7 Tagen in Pflanztöpfe (2,5 Liter) mit Kultursubstrat umgesetzt (vgl. Abschnitt 2.5). Um einen frühen Befall mit Echtem Mehltau vorzubeugen, wurden die Pflanzen zu Beginn einmal mit einem Fungizid (Amistar, Wirkstoff: Azoxystrobin, Syngenta, Basel, Schweiz) behandelt. Nach 5 Wochen (sechs bis sieben Blätter waren zu diesem Zeitpunkt entfaltet) wurden die Pflanzen mit den verschiedenen Kupferpräparaten (180 mg l^{-1}) behandelt. Insgesamt wurden 50 ml auf vier Pflanzen zu zwei Applikationszeitpunkten gleichmäßig aufgetragen. Eine Variante wurde mit einem weiteren Fungizid (Folicur, Wirkstoff: Tebuconazol, Bayer AG, Monheim, Deutschland) behandelt und eine weitere Variante erhielt keine Behandlung. Nach dem Eintrocknen der Präparate wurden die Pflanzen mit Echtem Mehltau inokuliert. Dazu wurden die Sporen von bereits befallenen Pflanzen gesammelt und gleichmäßig auf die behandelten Pflanzen gestreut, welche dann eine separate Pflanzenkammer (Nacht: ca. $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Tag: ca. $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) gestellt wurden, um Neuinfektionen zu vermeiden. Zwischen 6-14 Tagen nach der Inokulation wurde die prozentual befallene Blattfläche bonitiert. Es wurde sowohl die Blattoberseite als auch die -unterseite berücksichtigt. Die Beurteilung des Befalls erfolgte für jedes einzelne Blatt in der folgenden Einteilung: 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % befallene Blattfläche. Um eine mögliche systemische Wirkung der Präparate beurteilen zu können, fand 14 Tage nach der ersten eine zweite Inokulation statt. Dabei wurde der Befall der obersten fünf Blätter bonitiert, welche nicht mit den Kupferpräparaten behandelt wurden und zum Zeitpunkt der zweiten Inokulation auch noch keinen Befall aufwiesen. Um ein weiteres Längenwachstum ab diesem Zeitpunkt zu verhindern, wurde der Trieb der Pflanzen oberhalb des fünften unbehandelten Blattes abgeschnitten. Die Bonitur der neuinfizierten und unbehandelten Blätter fand nach der gleichen Vorgehensweise wie zuvor statt.

4.1.3 Ergebnisse

4.1.3.1 Untersuchungen der Düngewirkung von „Cu-Np“ im Vergleich zu „CuCl₂“ an *C. sativus* als Blattapplikation

Die Sprosstrockenmassen der Pflanzen (Abb. 19, A), die mit der höheren Konzentration der Kupferpräparate (40 mg l⁻¹) behandelt wurden, wiesen keine Unterschiede zu den Kontrollpflanzen auf, die mit Kupfer über die Nährlösung versorgt wurden. Die Sprosstrockenmassen bei „-Cu“ waren im Versuch mit der höheren Konzentration (40 mg l⁻¹) im Vergleich zu den anderen Behandlungen deutlich reduziert. Die Werte der Sprosstrockenmasse (Abb. 19, B) der Varianten „Cu-Np“ und „CuCl₂“ lagen, nach der Applikation geringerer Konzentrationen (20 mg l⁻¹), zwischen den Werten der Kontroll- und der „-Cu“-Variante und wiesen keine Unterschiede zu diesen beiden auf. Die Sprosstrockenmasse der Pflanzen, die kein Kupfer erhielten („-Cu“), war jedoch geringer als die der Kontrollvariante. Bei der Wurzeltrockenmasse waren die Unterschiede bei beiden Konzentrationen (20 und 40 mg l⁻¹) ähnlich wie bei der Trockenmasse, jedoch wurde dies wegen der ineinander gewachsenen Wurzel nicht auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. In beiden Versuchen waren die Kupferkonzentrationen (Abb. 19, C und D) in der Wurzel bei allen Behandlungen und der „-Cu“-Variante deutlich geringer als bei den Kontrollpflanzen. Die beiden Behandlungen („CuCl₂“ und „Cu-Np“, 40 mg l⁻¹) unterschieden sich nicht im Vergleich zu „-Cu“. Jedoch war die Kupferkonzentration bei „Cu-Np“ (40 mg l⁻¹) geringer als bei „CuCl₂“ (40 mg l⁻¹). Im Versuch mit der geringeren Behandlungsdosis (20 mg l⁻¹) bestand bei der Kupferkonzentration in der Wurzel kein Unterschied zwischen den Varianten „CuCl₂“, „Cu-Np“ und „-Cu“. Im Vergleich zur „Kontrolle“ waren die SPAD-Werte (Abb. 19, E) vor der Behandlung aller Varianten, die bis zu diesem Zeitpunkt kein Kupfer erhielten, geringer. Eine Woche nach der Behandlung („Cu-Np“ und „CuCl₂“, 20 mg l⁻¹) bestand kein Unterschied mehr zwischen der Kontroll- und „CuCl₂“-Variante. Die Werte der „Cu-Np“-Variante waren höher als die der „-Cu“-Variante, jedoch geringer als die der Kontrollvariante. „CuCl₂“ und „Cu-Np“ unterschieden sich bei den SPAD-Werten nicht.

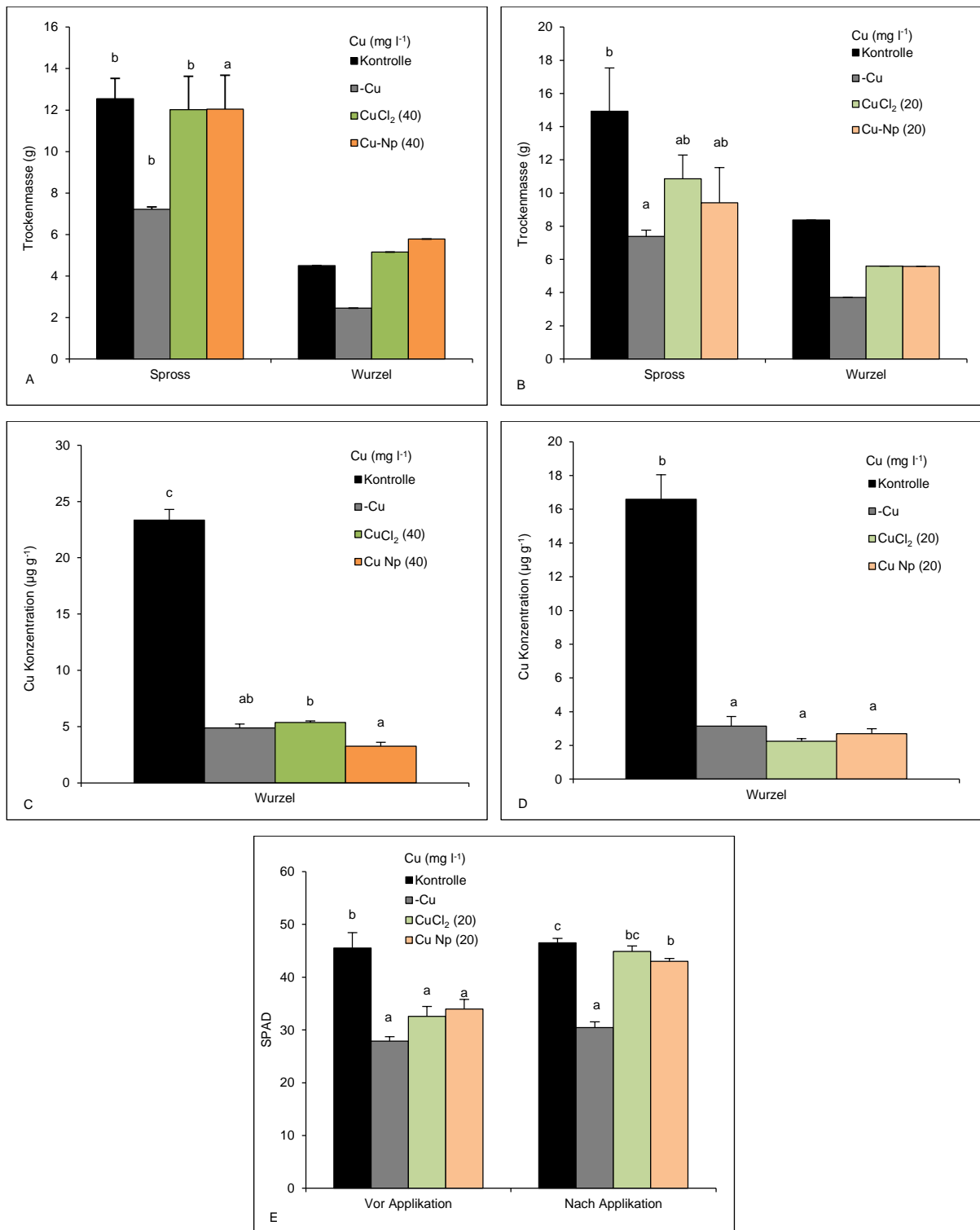


Abbildung 19: Trockenmasse (A+B), Kupferkonzentration (C+D) in der Wurzel 14 Tage und SPAD-Werte (E) 12 Tage nach Sprühapplikation verschiedener kupferhaltiger (20 oder 40 mg l⁻¹) Präparate („Cu-Np“, „CuCl₂“) bei *C. sativus*. Insgesamt wurde ein Volumen von 50 ml je Behandlung (jeweils drei Pflanzen) in zwei bis drei Gaben appliziert. Die Sprosstrockenmasse, SPAD-Werte und Cu-Konzentration in der Wurzel entsprechen den Mittelwerten (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je drei Pflanzen). Bei der Wurzeltrockenmasse wird nur die Gesamttrockenmasse (je Behandlung drei Pflanzen) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0.05) zueinander werden mit unterschiedlichen Buchstaben markiert (Duncan Test, $\alpha = 0.05$). Für die Wurzeln wurde nur die Gesamttrockenmasse bestimmt.

Die REM-Aufnahmen der Blattoberfläche belegen (Abb. 20, A-D), dass nach dem Eintrocknen des tropfenweise aufgetragenen „Cu-Np“-Präparates auf der Blattoberfläche Aggregate von mehreren Mikrometern entstanden sind. In den Aggregaten sind punktuelle Strukturen erkennbar, deren Größe sich schätzungsweise im Bereiche von ca. 500 bis 1000 nm bewegt. Bei den runden fleckigen Strukturen (vor allem in C zu sehen) handelt es sich vermutlich um eingetrocknete Rückstände des Netzmittels Tween.

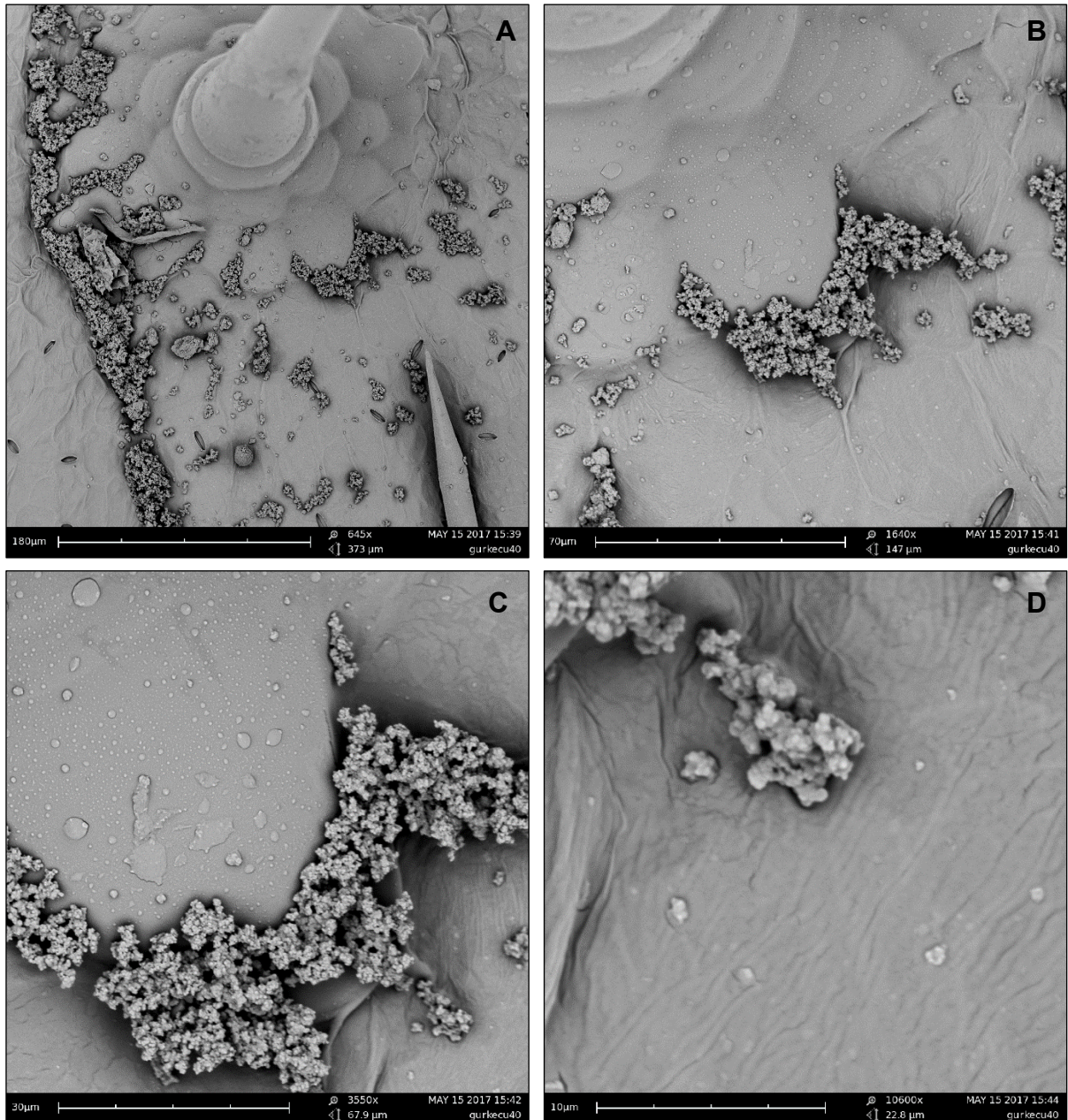


Abbildung 20: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (*C. sativus*) nach einer Tropfenapplikation (15 μl) und anschließendem Eintrocknen der Cu-Np-Suspension (40 mg l⁻¹) bei verschiedenen Vergrößerungen.

Wie in Abb. 21 (A und B) zu erkennen ist, entsprach das äußerliche Erscheinungsbild der Pflanzen den quantifizierten Parametern (Trockenmasse und Chlorophyllgehalt). Es ist deutlich zu sehen, dass die Varianten, die mit „Cu-Np“ oder „CuCl₂“ behandelt wurden, bei beiden Konzentrationen einen

Wachstumsvorteil und eine dunklere Färbung hatten als Pflanzen der Variante „-Cu“. Die Kontrollpflanzen, die Cu mit der Nährlösung erhalten hatten, zeigten das beste Wachstum.

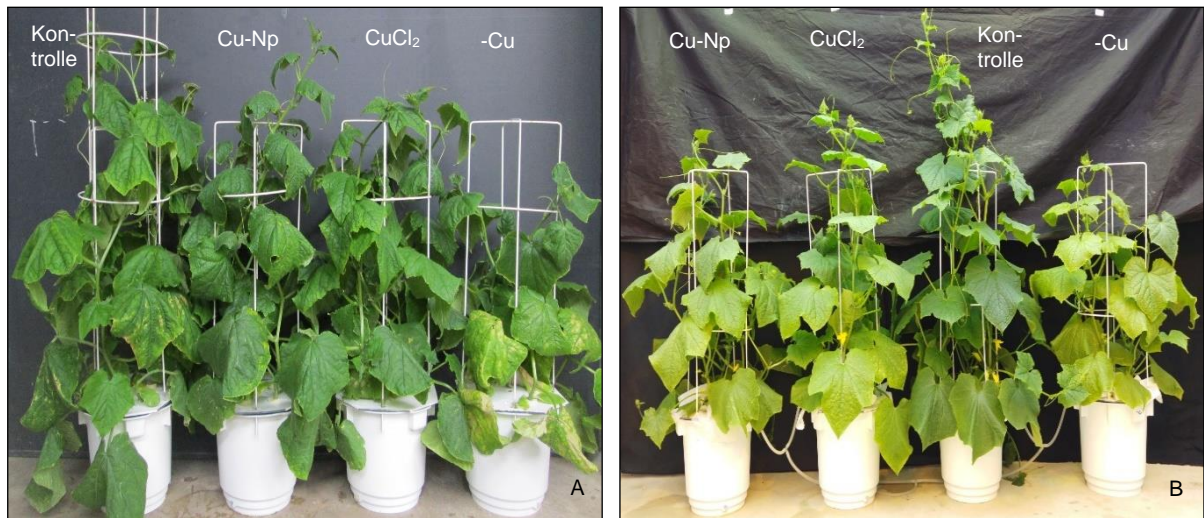


Abbildung 21: *C. sativus* 14 Tage nach Sprühapplikation verschiedener kupferhaltiger (40 (A) und 20 (B) mg l⁻¹) Präparate („Cu-Np“, „CuCl₂“) auf die Blätter. Die behandelten Pflanzen erhielten kein Kupfer über die Nährlösung.

4.1.3.2 Untersuchungen der Düngewirkung von „Cu-Np“ im Vergleich zu „CuCl₂“ bei *A. sativa* als Blattapplikation

Die Pflanzen der Behandlungen „Cu-Np“ (40 mg l⁻¹), „CuCl₂“ (20 mg l⁻¹) und „CuCl₂“ (40 mg l⁻¹) hatten gleiche Trockenmassegewichte (Abb. 22, A) des Sprosses im Vergleich zueinander und höhere Werte als die Pflanzen bei „-Cu“. Bei den Pflanzen, die eine geringe Konzentration (20 mg l⁻¹) des „Cu-Np“-Präparates erhielten, war kein höheres Massenwachstum festzustellen als bei der „-Cu“-Variante. Im zweiten Experiment bestand zwischen den verschiedenen Cu-Behandlungen („Cu-Np“ und „CuCl₂“) und unterschiedlichen Konzentrationen (40 und 80 mg l⁻¹) kein Unterschied bei der Sprosstrockenmasse (Abb. 22, B). Die Pflanzen der Behandlungen „Cu-Np“ (40 mg l⁻¹) und „CuCl₂“ (40 und 80 mg l⁻¹) wiesen keine höhere Masse des Sprosses auf als die Pflanzen bei „-Cu“. Lediglich die Behandlung „Cu-Np“ (80 mg l⁻¹) führte zu einer erhöhten Trockenmasse des Sprosses im Vergleich zu „-Cu“. Die Trockenmasse der Pflanzen die die eine vollständige Kupferversorgung über die Nährlösung erhielten, erzielten die höchsten Werte bei den Sprosstrockenmassen. Die Gesamtwurzelmasse stieg mit zunehmender Behandlungskonzentration des jeweiligen Kupferpräparates.

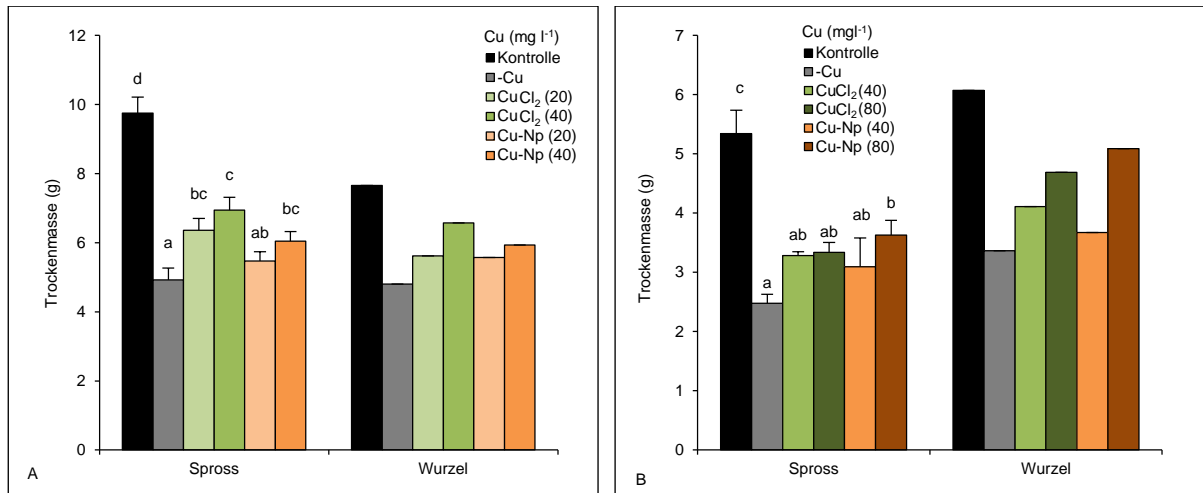


Abbildung 22: Trockenmasse von *A. sativa* 9 (A) und 18 (B) Tage und nach Sprühapplikation verschiedener kupferhaltiger (20-80 mg l⁻¹) Präparate („Cu-Np“, „CuCl₂“) auf die Blätter. Insgesamt wurde ein Volumen von 50 ml je Behandlung (jeweils 5 Pflanzen) in drei Gaben appliziert. Die Blätter wurden nach dem Eintrocknen der Präparate in einem Versuch (A) einmal mit Wasser befeuchtet, während im anderen Versuch darauf verzichtet wurde (B). Die Sprosstrockenmasse entspricht den Mittelwerten (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je 5 Pflanzen). Bei der Wurzeltrockenmasse wird die Gesamttrockenmasse (je Behandlung 5 Pflanzen) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zueinander werden mit unterschiedlichen Buchstaben markiert (Duncan Test, $\alpha = 0.05$).

Die Aufnahmen (REM) der Blattoberflächen von *A. sativa* zeigen, dass die in der „Cu-Np“-Suspension enthaltenen Partikel ähnlich wie bei *C. sativus* nach dem Eintrocknen größere Zusammenschlüsse (im Mikrometerbereich) gebildet haben (Abb. 23. A-D). Innerhalb der Zusammenschlüsse lassen sich erneut rundliche Strukturen erkennen, deren Durchmesser schätzungsweise zwischen 500 und 1000 nm liegen.

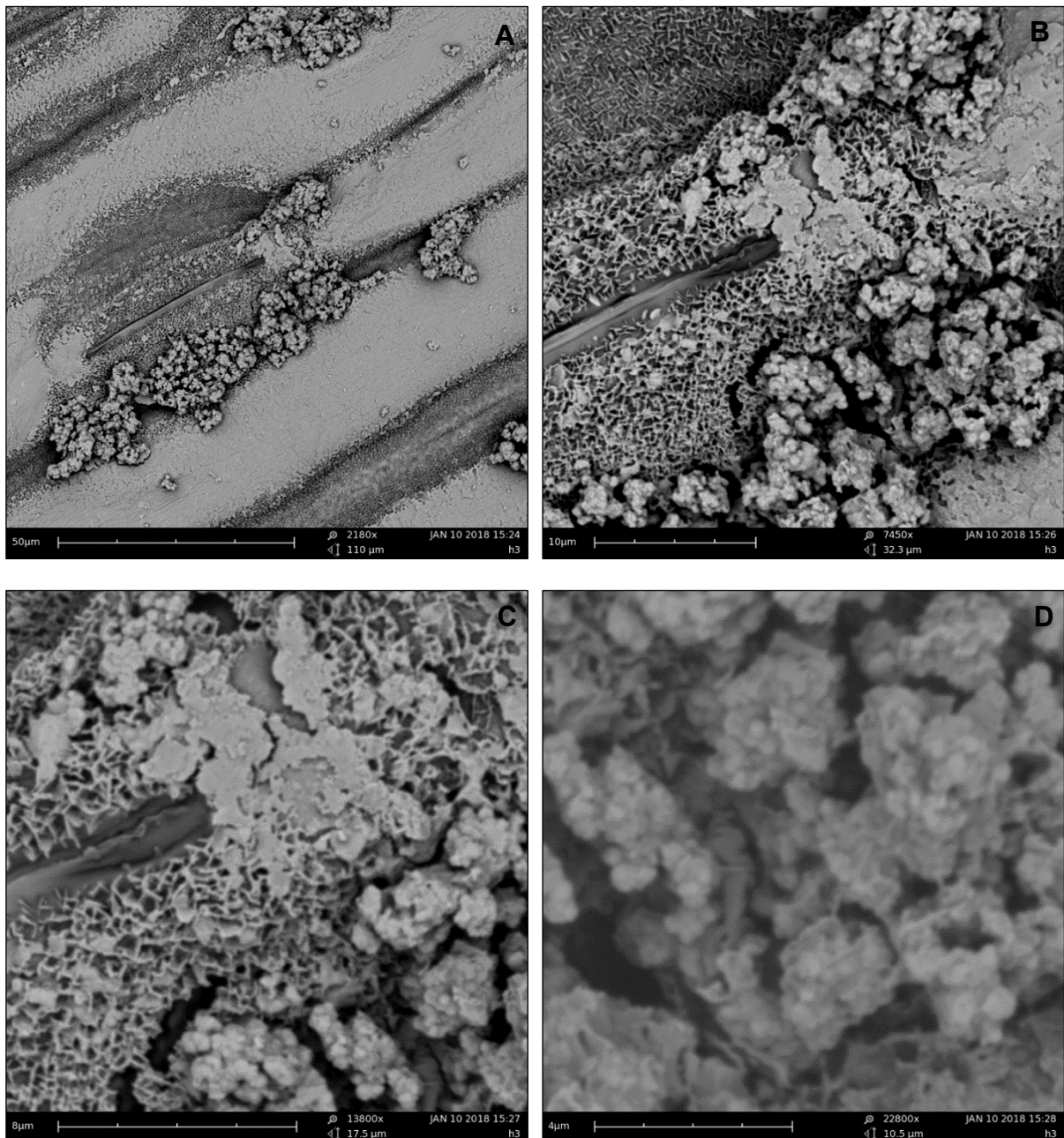


Abbildung 23: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (*A. sativa*) nach einer Tropfenapplikation (15 μ l) und anschließendem Eintrocknen der Cu-Np-Suspension (40 mg l⁻¹) bei verschiedenen Vergrößerungen.

Auch bei *A. sativa* war die Wirkung der verschiedenen Kupferpräparate und -Konzentrationen anhand der äußeren Erscheinung der Pflanzen zu erkennen (Abb. 24, A und B). Es ist deutlich zu sehen, dass die Varianten, die mit „Cu-Np“ oder „CuCl₂“ behandelt wurden, sowohl bei der hohen (B) als auch bei der niedrigen (A) Konzentration einen Wachstumsvorteil und weniger stark ausgeprägte Mangelsymptome hatten als die Pflanzen der Variante „-Cu“. Die Kontrollpflanzen zeigten das beste Wachstum.

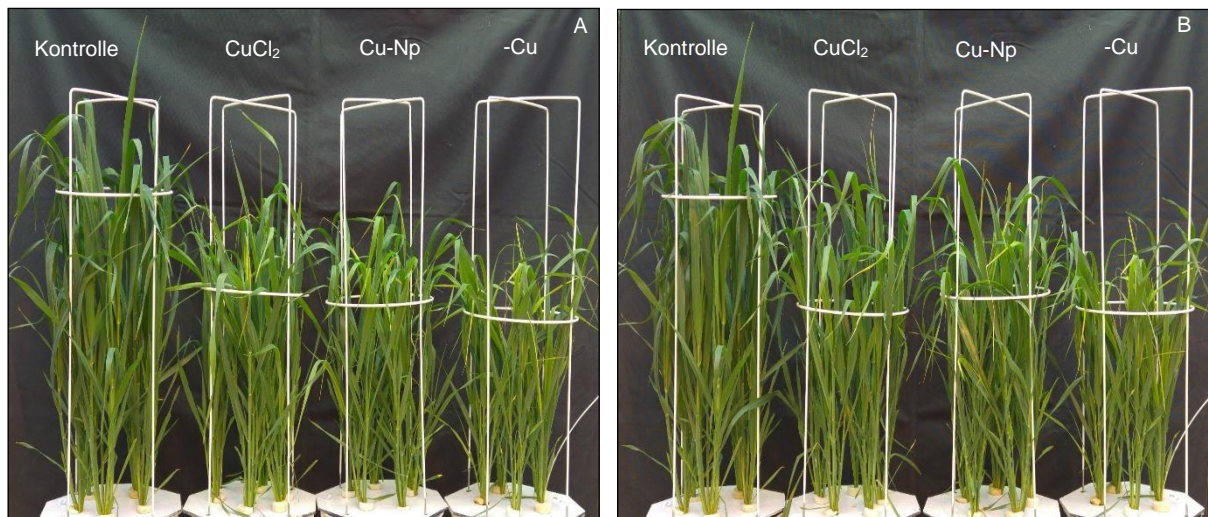


Abbildung 24: A. sativa 18 Tage nach Sprühapplikation verschiedener kupferhaltiger (40 (A) und 80 (B) mg l⁻¹) Präparate („Cu-Np“, „CuCl₂“) auf die Blätter. Die behandelten Pflanzen und „-Cu“ erhielten kein Kupfer über die Nährlösung.

4.1.3.3 Untersuchungen der Düngewirkung von „Fe-Np“ im Vergleich zu „Fe-EDTA“ an *B. napus* als Blattapplikation

Die SPAD-Werte (Abb. 25, A) aller Varianten, die bis zum Zeitpunkt der Messung kein Eisen erhielten, waren gleich und deutlich geringer im Vergleich zu den Kontrollpflanzen mit Eisen. 2 Tage nach der zweiten Applikation waren die SPAD-Werte aller Fe-Np-Behandlungen weiterhin so gering wie bei den Pflanzen, die keine Eisen erhielten („-Fe“). Lediglich die Behandlung mit „Fe-EDTA“ erzeugte höhere SPAD-Werte als die Eisenmangel-Pflanzen, jedoch geringere Werte als die Kontrollpflanzen mit ausreichender Eisenversorgung über die Nährlösung. Bei den Pflanzen, die mit „Fe-EDTA“ behandelt wurden, wurden Blattschäden an den Benetzungsstellen festgestellt. Die Werte der extrahierten Blattpigmente (Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoide, Abb. 25, B) entsprechen den Beobachtungen, die zuvor bei den SPAD-Werten gemacht wurden. Lediglich die höchste Konzentration der Fe-Np Behandlung führte zu einem Anstieg im Carotinoidgehalt im Vergleich zu „-Cu“. Die Pflanzen, die ausreichend mit Eisen über die Nährlösung versorgt wurden, zeigten ein höheres Massenwachstum (Abb. 25, C) als alle anderen Behandlungen. Die übrigen Varianten waren bei der Trockenmasse nicht verschieden zueinander.

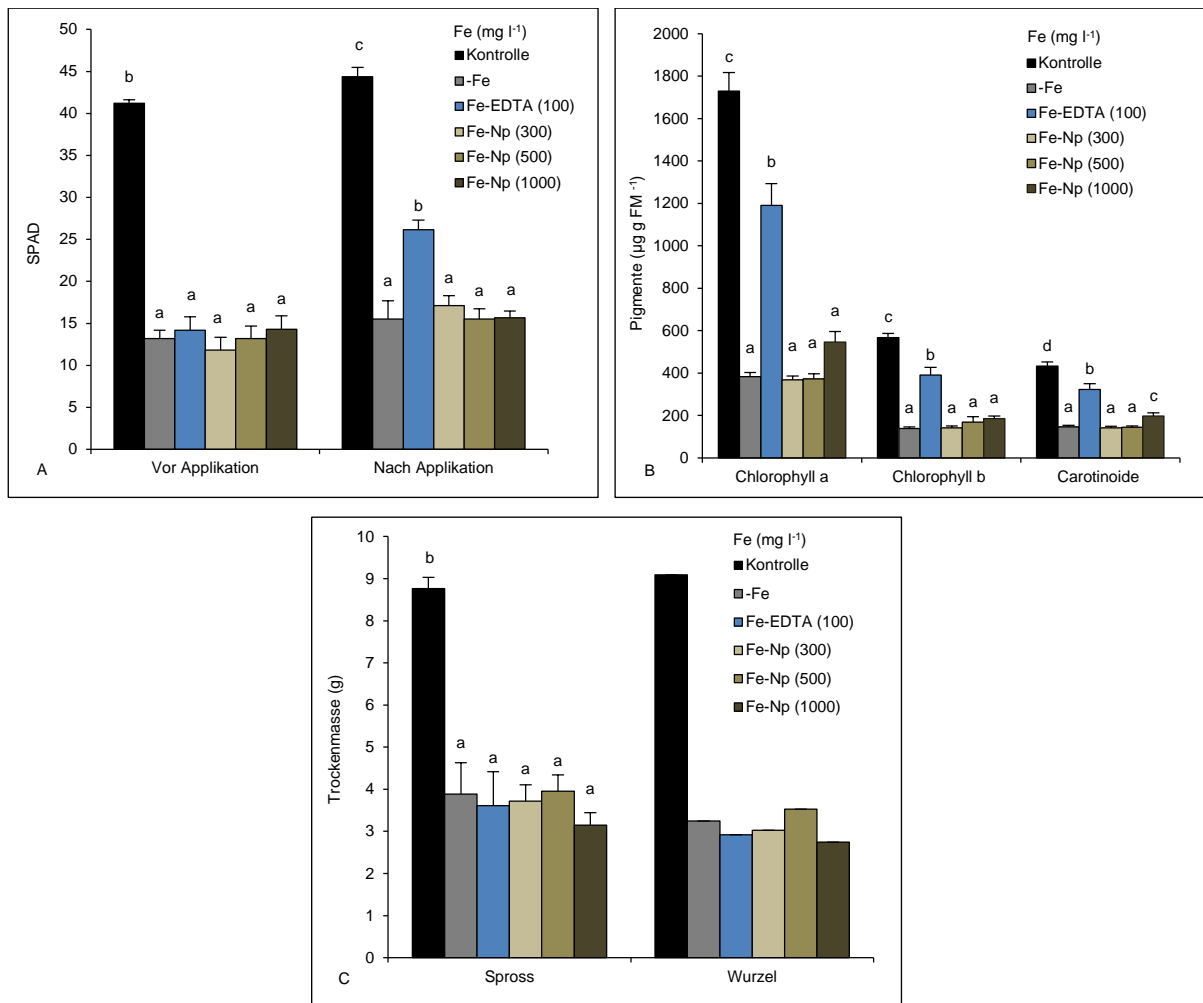


Abbildung 25: SPAD-Werte (A) der Blätter von *B. napus* vor und nach, sowie deren Pigmentkonzentrationen von Chl a, Chl b und Carotinoiden (B) nach, zwei Sprühapplikationen verschiedener eisenhaltiger (enthalten jeweils 100-1000 mg l⁻¹ Fe) Präparate (Fe-Np, „Fe-EDTA“). Die SPAD-Werte wurden vor und 6 Tage nach der zweiten Applikation jeweils am 5. Blatt gemessen (Durchschnitt aus fünf Messungen je Blatt). Chlorophyll-, Carotinoidgehalte (6. Blatt) und Trockenmassen (C) von *B. napus* wurden 10 Tage nach der zweiten Sprühapplikation gemessen. Bei den Wurzeln wird die Gesamttrockenmasse (je Behandlung fünf Pflanzen) dargestellt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je fünf Pflanzen). Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zueinander werden mit unterschiedlichen Buchstaben markiert (Duncan Test, $\alpha = 0.05$).

Das eingetrocknete „Fe-Np“ Präparat auf der Blattoberfläche von *B. napus* zeigt (Abb. 26, A-C), dass in den Rückständen Gebilde mit einer Größe von mehreren Mikrometern entstanden sind. Es ist jedoch auch erkennbar, dass diese Gebilde vermutlich aus kleineren Partikeln zusammengesetzt sind, die sich schätzungsweise im Nanometerbereich befinden könnten.

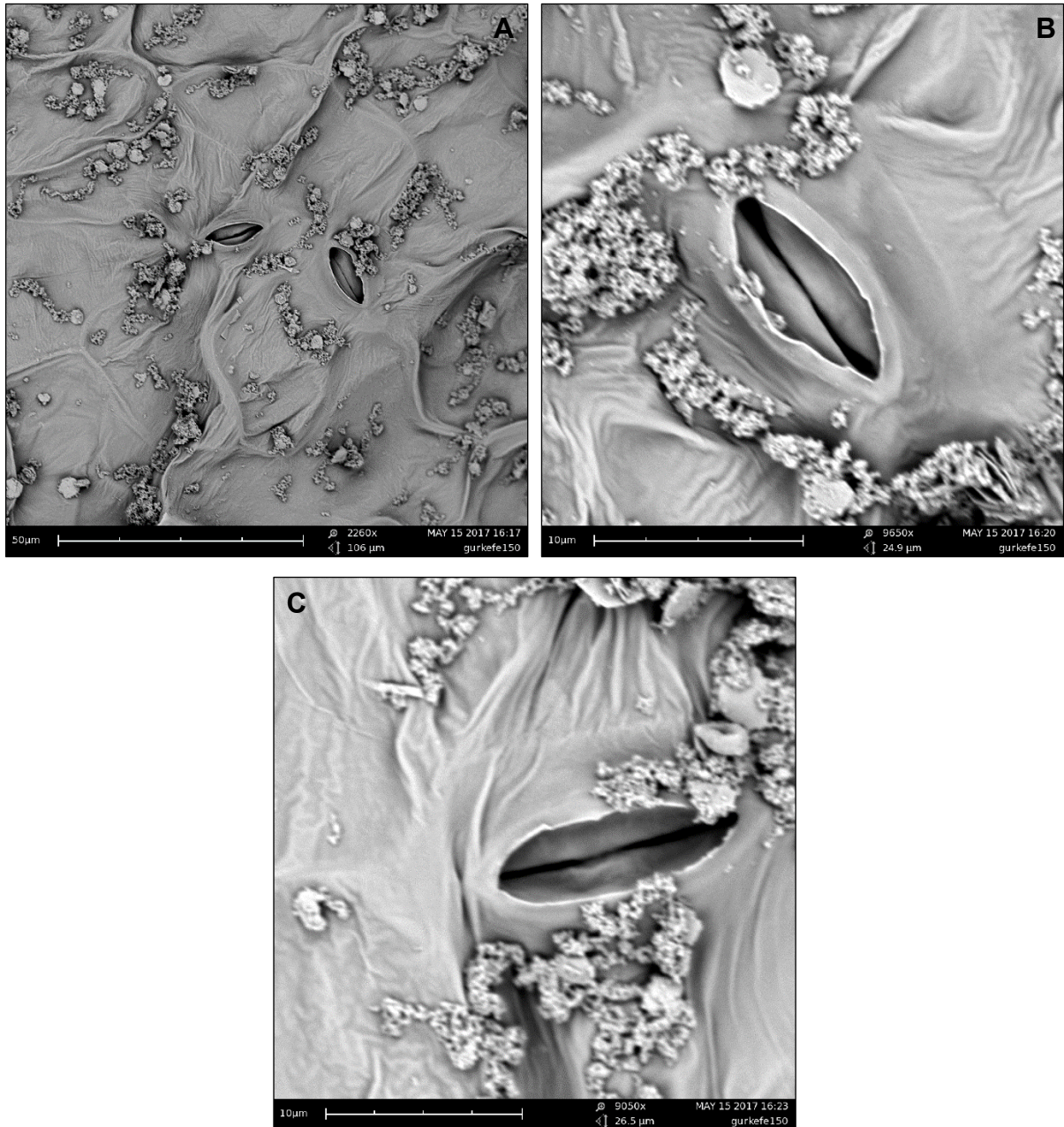


Abbildung 26: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (*V. faba*) nach Tropfenapplikation (15 µl) und anschließendem Eintrocknen der Fe-Np-Suspension (150 mg l⁻¹ Fe) bei verschiedenen Vergrößerungen.

4.1.3.4 Vergleich der Düngewirkung (*C. sativus*) und des Kupferaufnahmeverhaltens (*G. max*) in das Blatt nach der Blattapplikation verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparate

Die SPAD-Werte (Blatt 2) waren 6 Tage nach einer Behandlung mit den Präparaten „Cu-EDTA“, „CuCl₂“, „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ gleich wie bei der „Kontrolle“, die mit Kupfer über die Nährlösung versorgt wurde (Abb. 27, A). Die Behandlung „Kupferoxychlorid“ erzielte geringere SPAD-Werte als die „Kontrolle“ und unterschied sich von der Variante „-Cu“ nicht. Die unbehandelten Blätter (4. Blatt) jeder Variante zeigten zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede zueinander. Die zweite

Behandlung (4. Blatt) mit den verschiedenen Kupferpräparaten erzielte die gleichen Unterschiede wie zuvor die erste Behandlung. Die Trockenmasse der Pflanzen nach einer Behandlung mit „CuCl₂“ war statistisch nicht verschieden von der „Kontrolle“ (Abb. 27, B). Die Trockenmassen der Behandlungen „Cu-EDTA“, „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ waren alle geringer als bei der „Kontrolle“, jedoch höher als bei der Variante „-Cu“. Die Trockenmasse der Behandlung „Kupferoxychlorid“ unterschied sich von „-Cu“ nicht, war jedoch auch nicht verschieden zu den Behandlungen „Cu-EDTA“, „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“. Die Unterschiede bei der Wurzel trockenmassen waren annähernd der des Sprosses entsprechend. Die Sprühapplikation mit „CuCl₂“ und „Cu-Np-Überstand“ verursachte Schäden auf der Blattoberfläche, was jedoch nicht dargestellt wird.

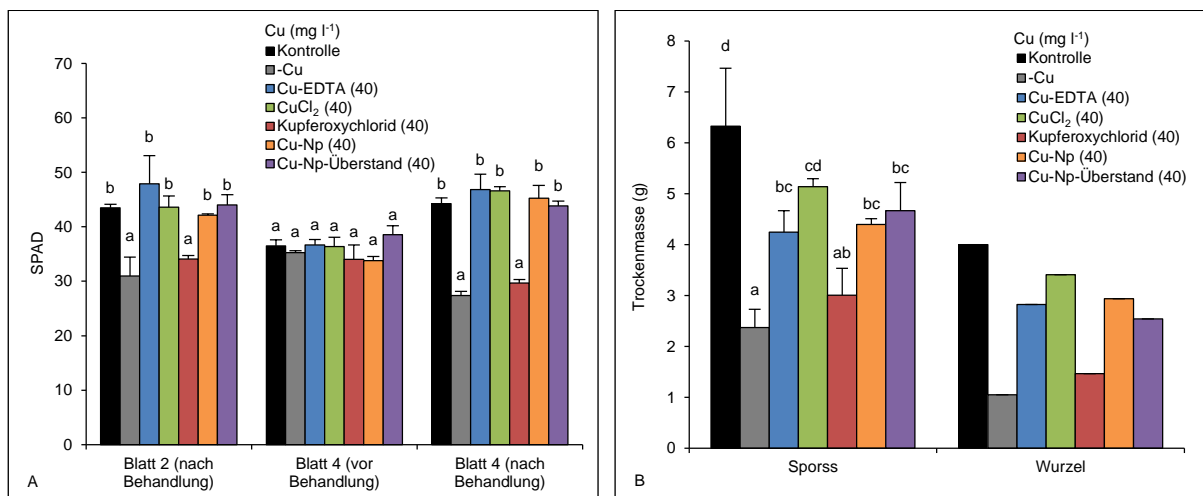


Abbildung 27: SPAD-Werte der Blätter (A) und Trockenmassen (B) von *C. sativus* nach Sprühapplikation verschiedener kupferhaltiger (40 mg l⁻¹) Präparate („Cu-EDTA“, „CuCl₂“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“). Die SPAD-Werte wurden 6 Tage nach der ersten Applikation jeweils am 2. Blatt (behandelt) sowie 4. Blatt (unbehandelt) gemessen. Anschließend wurden die Pflanzen ein zweites Mal besprüht. 4 Tage nach der zweiten Behandlung wurde der SPAD-Wert des 4. Blattes erneut gemessen. Bei der Wurzel trockenmasse wird die Gesamttrockenmasse (je Behandlung drei Pflanzen) dargestellt. Die übrigen Werte entsprechen dem Mittelwert (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je drei Pflanzen). Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zueinander werden mit unterschiedlichen Buchstaben markiert (Duncan Test, $\alpha = 0.05$).

Die Rückstände der auf die Blattoberfläche aufgetragenen Tropfen („Cu-EDTA“) bildeten nach dem Eintrocknen eine deutliche erkennbare Schicht (Abb. 28 A-D). Partikuläre Strukturen sind nicht zu erkennen.

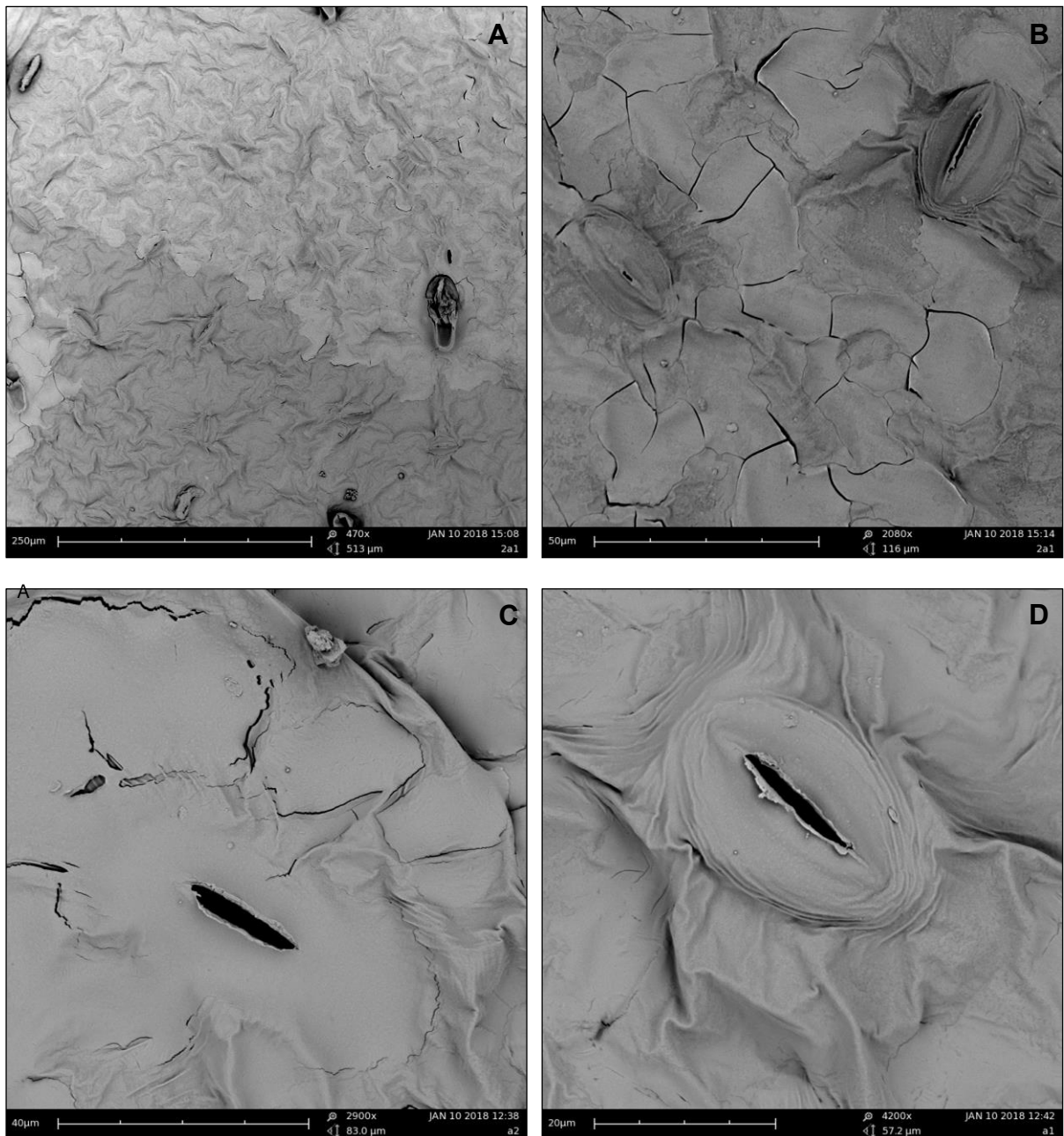


Abbildung 28: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (*V. faba*) nach einer Tropfenapplikation (15 μ l) und anschließendem Eintrocknen der Cu-EDTA-Lösung (40 mg l⁻¹ Cu) bei verschiedenen Vergrößerungen. D: Aufnahme einer unbehandelten Blattpartie.

Die Aufnahmen (REM) nach der Applikation des Präparates „Kupferoxychlorid“ zeigten partikuläre Objekte, die einen Durchmesser von mehreren Mikrometern hatten (Abb. 29, A-D). Die Partikel hatten ein eher längliches Erscheinungsbild mit scharfen Kanten. In diesem Fall wirkte es nicht so, als ob die Partikel aus einem Zusammenschluss kleinere Strukturen entstanden sind.

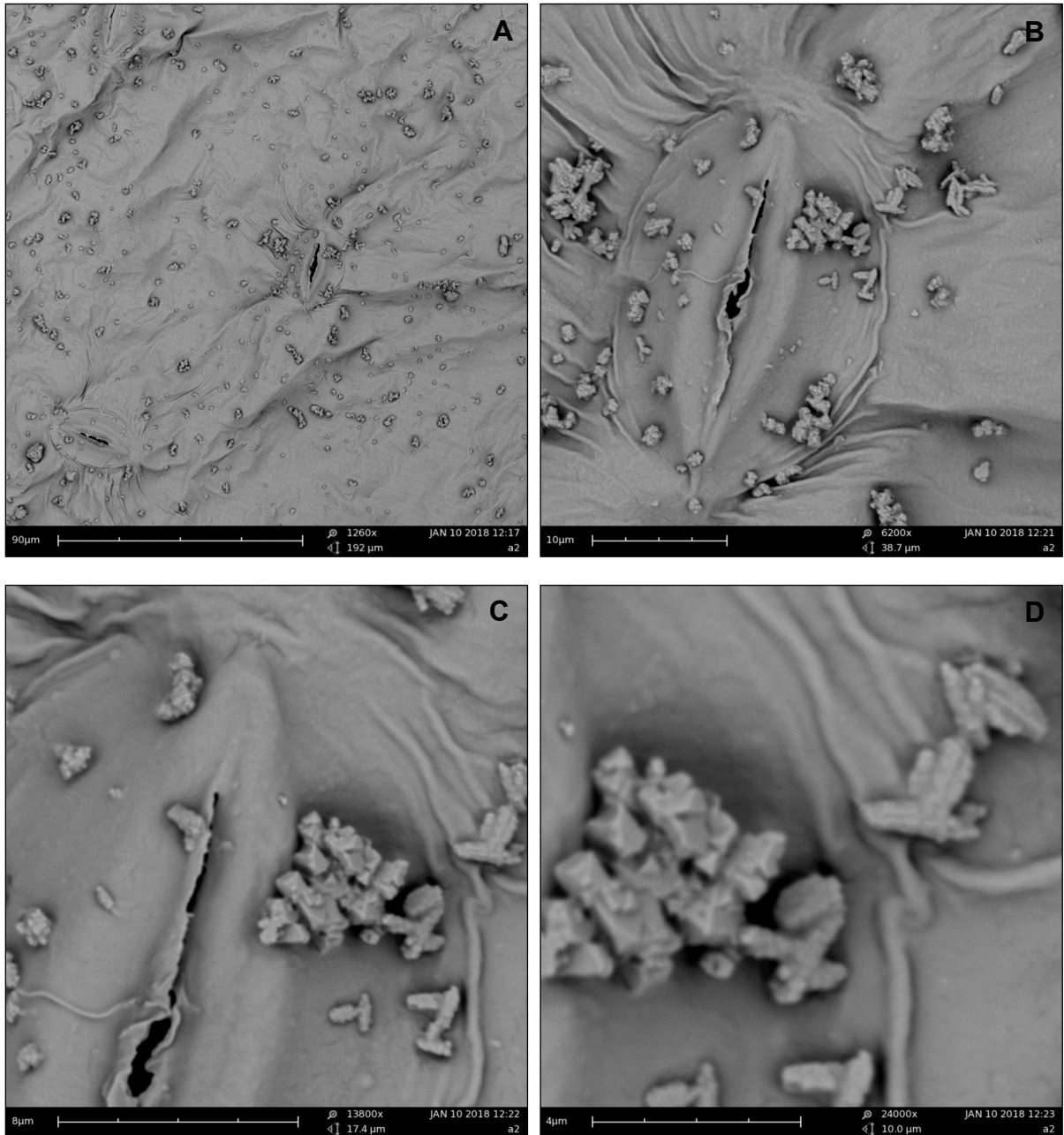


Abbildung 29: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (*V. faba*) nach einer Tropfenapplikation (15 µl) und anschließendem Eintrocknen der Kupferoxychlorid-Suspension (40 mg l⁻¹ Cu) bei verschiedenen Vergrößerungen.

Wie schon in den Abbildungen (20) und (23) aus den vorherigen Experimenten (vgl. Abschnitt 4.1.3.1 und 4.1.3.2) offensichtlich wurde, zeigten die eingetrockneten Rückstände, der „Cu-Np“-Tropfen wieder größere Aggregate im Mikrometerbereich, die aus rundlichen kleineren Partikeln (schätzungsweise 500-1000 nm) zusammengesetzt waren (Abb. 30, A-D).

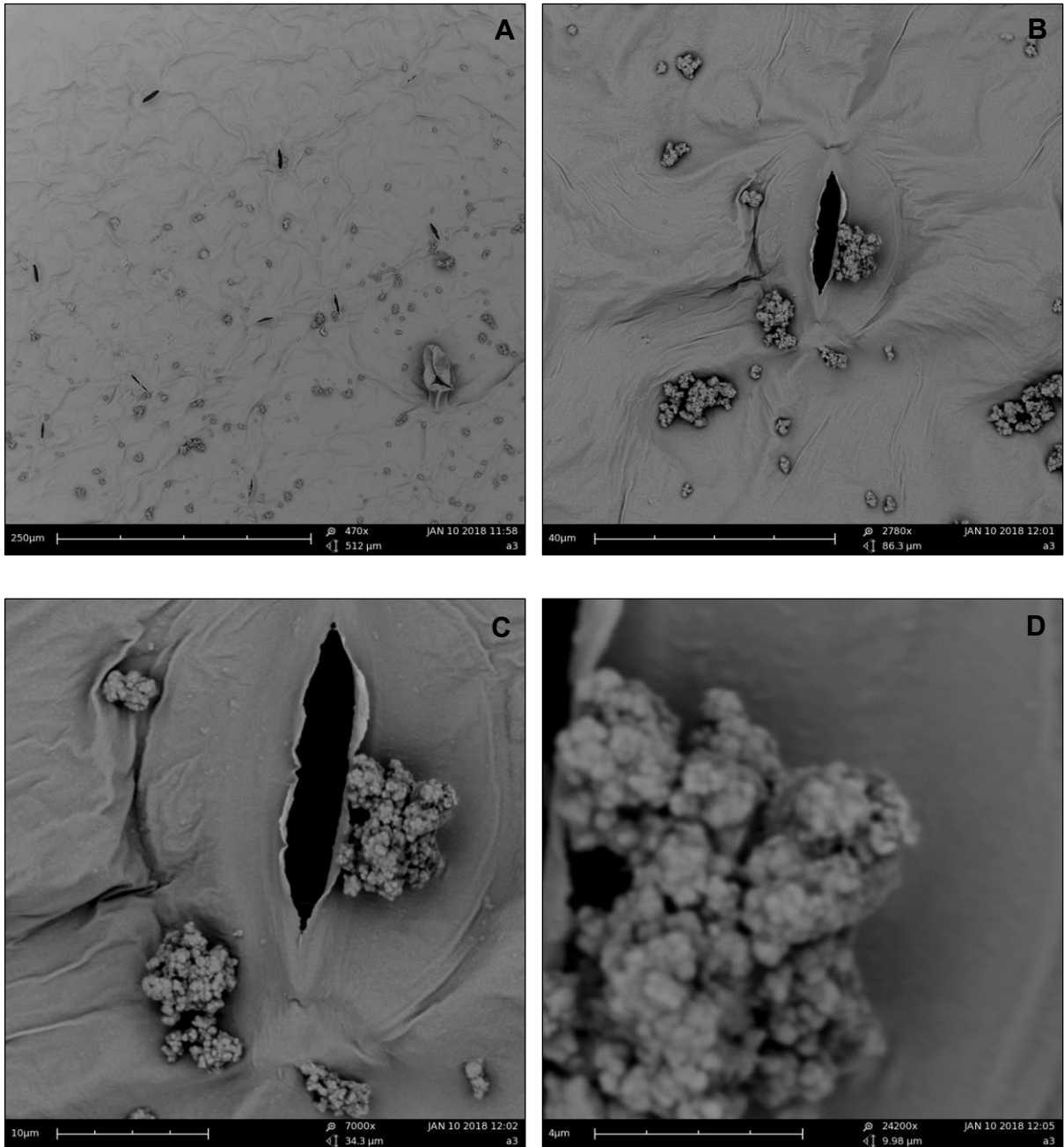


Abbildung 30: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (*V. faba*) nach einer Tropfenapplikation (15 μ l) und anschließendem Eintrocknen der Cu-Np-Suspension (40 mg l⁻¹ Cu) bei verschiedenen Vergrößerungen.

Bei dem Präparat „Cu-Np-Überstand“ ist nach dem Eintrocknen auf der Blattoberfläche zu erkennen, dass die partikulären Strukturen im Durchmesser eher kleiner (500-1000 nm) sind. Es haben sich deutlich weniger größere Aggregate von mehreren Mikrometern gebildet (Abb. 31, A-D).

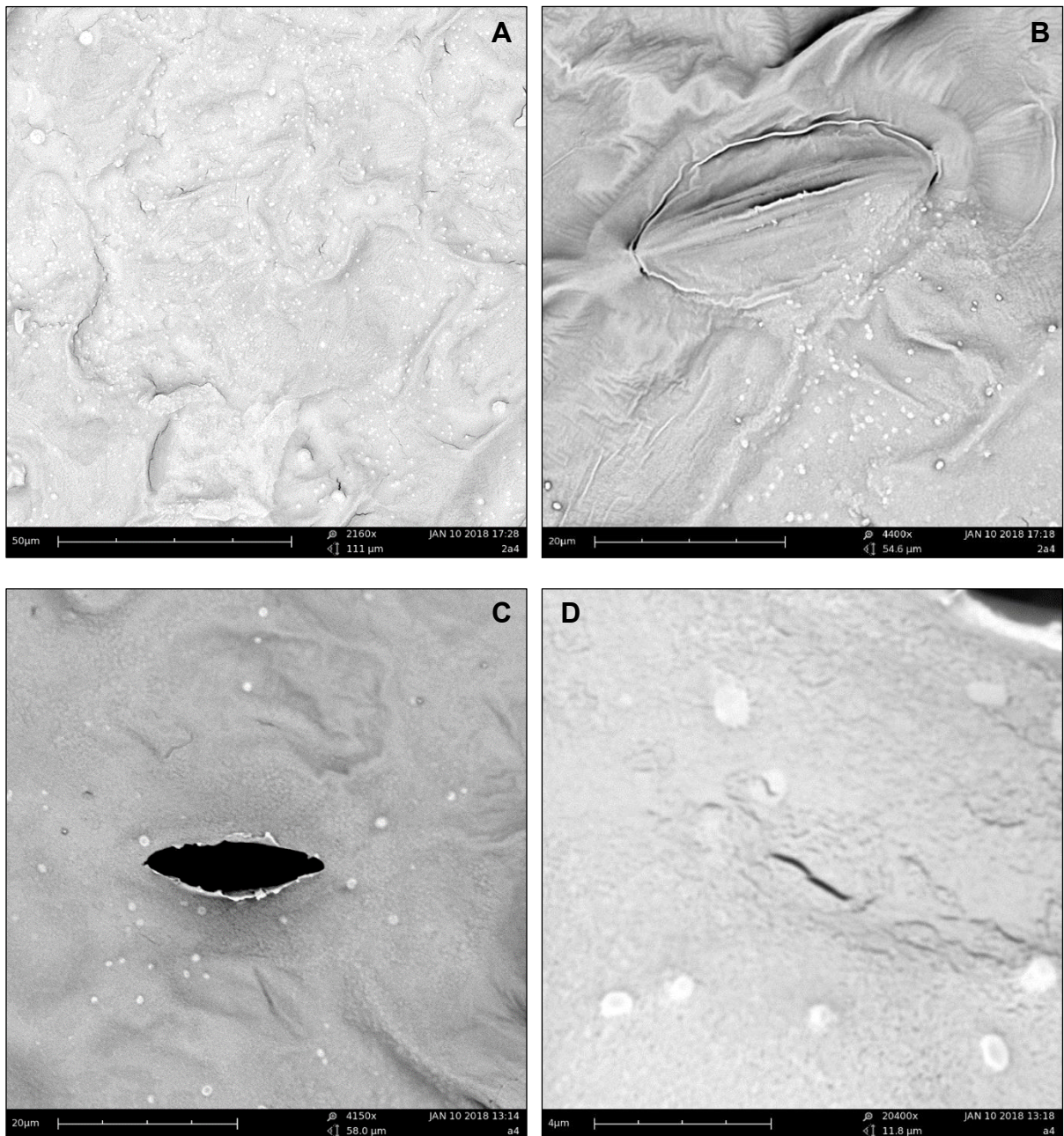


Abbildung 31: Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche (*V. faba*) nach einer Tropfenapplikation (15 µl) und anschließendem Eintrocknen der Cu-Np-Überstand-Suspension (40 mg l⁻¹ Cu) bei verschiedenen Vergrößerungen.

Nach 48 Stunden wurden bei den Präparaten „Cu-EDTA“, „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ deutliche Blattschäden an den Applikationsstellen beobachtet (Abb. 32, B, D und E), sodass Kupfergehalt und die prozentual aufgenommene Menge zu diesem Zeitpunkt nicht mehr beurteilt wurden.

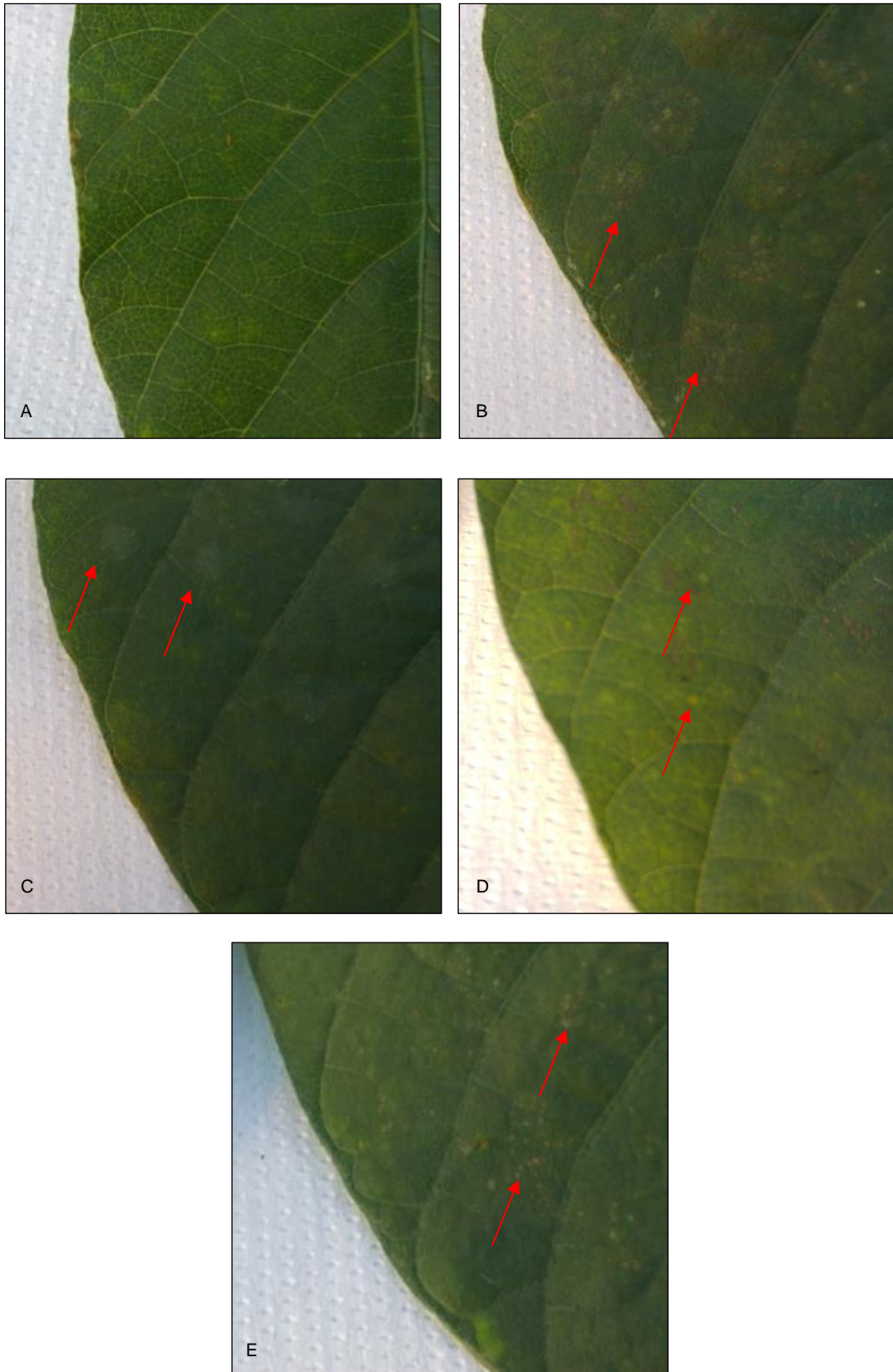


Abbildung 32: Blattoberflächen 48 Stunden nach Beginn der Behandlung. A: „Kontrolle“ die Kupfer über die Nährlösung erhielt. Je Präparat (A: „Kontrolle“, B: „Cu-EDTA“, C: „Kupferoxychlorid“, D: „Cu-Np“ E: „Cu-Np-Überstand“) wurden 28 Tropfen (12 μ l) mit einer Kupferkonzentration von 40 mg l⁻¹ aufgetragen. Die Pfeile markieren Rückstände oder geschädigte Blattpartien an den Tropfenauftragstellen

Nach dem Abwaschen der Rückstände der Präparate auf der Blattoberfläche war nach 24 Stunden bei „Kupferoxychlorid“ sowohl im Vergleich zu „Cu-EDTA“ als auch zu „-Cu“ und zur „Kontrolle“ eine höhere Kupferkonzentration im Blatt festzustellen (Abb. 33, A). Die Kupferkonzentrationen im Blatt der Behandlungen „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ waren gleich zueinander und nicht verschieden zu „Kupferoxychlorid“, „Cu-EDTA“ und zur „Kontrolle“. Im Vergleich zu „-Cu“ wurde bei „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ eine erhöhte Konzentration im Blatt gemessen. Die Pflanzen der „Kontrolle“, die Kupfer über die Nährlösung erhielten, wiesen zwar eine etwas höhere Konzentration im Blatt auf als die Pflanzen die kein Kupfer erhielten (-Cu), jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Die prozentual aufgenommene Menge (Abb. 33, B) zeigte nach 24 Stunden einen deutlich höheren Wert bei „Kupferoxychlorid“ im Vergleich zu „Cu-EDTA“ und „Cu-Überstand“, nicht jedoch zu „Cu-Np“. „Cu-EDTA“, „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ unterschieden sich nicht voneinander. Lediglich „Kupferoxychlorid“ verursachte keine Schäden nach 48 Stunden und zeigte in beiden Parametern (Kupferkonzentration und prozentual aufgenommener Menge Cu) gesteigerte Werte im Vergleich zum ersten Analysezeitpunkt. Auch nach 48 Stunden unterschieden sich die beiden Varianten „Kontrolle“ und „-Cu“ nicht. Die Pflanzen wiesen in diesem Experiment keine eindeutigen Mangelsymptome auf. Trotz der Verwendung von deion. Wasser für die Nährlösungen wurden Spuren von Kupfer im Wasser als Ursache ausbleibender Mangelercheinungen der Pflanzen vermutet.

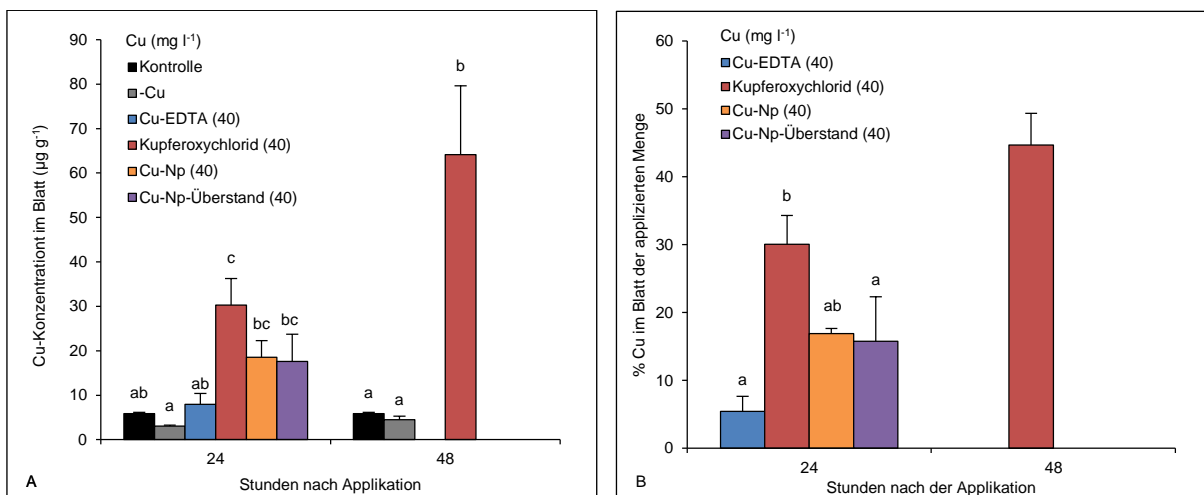


Abbildung 33: Cu-Konzentration (A), im Blatt und prozentuale Cu-Aufnahme (B) in das Blatt 24 und 48 Stunden nach der Tropfenapplikation verschiedener Kupferpräparate („Cu-EDTA“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) auf die Blattoberfläche von *G. max* und anschließendem Abwaschen der Rückstände. Wegen Blattschäden durch einen Teil der Behandlungspräparate wurden die Ergebnisse nach 48 Stunden nur teilweise dargestellt. Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je drei Blätter). Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zueinander werden mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet

4.1.3.5 Vergleich der Wirkung verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparate zum Pflanzenschutz gegenüber Echtem Mehltau bei *C. sativus*

Die Pflanzen der Behandlung „Cu-Np-Überstand“ waren 6 Tage nach der ersten Inokulation im Vergleich zu „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“ und den unbehandelten Pflanzen deutlich geringer befallen und statistisch nicht verschieden zu der Behandlung „Cu-EDTA“ (Abb. 34, A). Die Behandlungen „Kupferoxychlorid“ und „Cu-Np“ verzeichneten ebenfalls einen geringeren Befall als die unbehandelte „Kontrolle“. Neun Tage nach der Inokulation waren im Vergleich zu „Kupferoxychlorid“ und „Cu-Np“ die Behandlungen „Cu-Np-Überstand“ und „Cu-EDTA“ weniger stark befallen. Vierzehn Tage nach der ersten Inokulation unterschieden sich die Varianten „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“ nicht mehr von der unbehandelten „Kontrolle“. Lediglich „Cu-EDTA“ war noch weniger stark befallen als die unbehandelten Pflanzen. Die Variante mit Folicur-Behandlung wies über den gesamten Zeitraum nach der ersten Inokulation keinen Befall auf. Nach der zweiten Inokulation (Abb. 34, B) der unbehandelten Blätter zeigte die Behandlung mit Folicur weiterhin keinen Befall. Die übrigen Varianten zeigten mit über den Zeitraum (6-13 Tage nach der zweiten Inokulation) einen zunehmenden Befall und unterschieden sich nicht mehr voneinander.

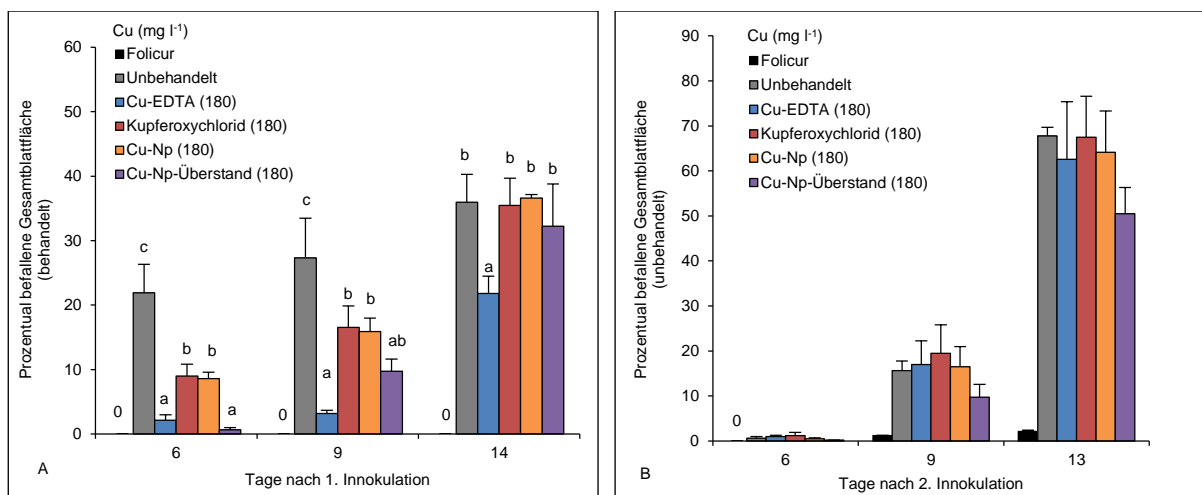


Abbildung 34: Prozentual befallene Blattflächen von *C. sativus* nach Inokulation mit echtem Mehltau. Vor der ersten Inokulation wurden die Pflanzen mit verschiedenen kupferhaltigen (180 mg l⁻¹) Präparaten („Cu-EDTA“, „CuCl₂“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) behandelt (50 ml auf vier Pflanzen). Bei der Beurteilung der befallenen Fläche nach der ersten Inokulation (A) wurden nur behandelte Blätter (sechs bis sieben je Pflanze) berücksichtigt. Nach der 2. Inokulation (B) fand die Beurteilung nur an den unbehandelten Blättern (5) statt. Wenn die Pflanzen nicht befallen waren, wurde an Stelle des Balkens eine „0“ eingefügt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je vier Pflanzen). Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zueinander werden mit unterschiedlichen Buchstaben markiert (Duncan Test, $\alpha = 0.05$).

4.1.4 Diskussion

4.1.4.1 Untersuchungen der Düngewirkung von „Cu-Np“ im Vergleich zu „CuCl₂“ an *C. sativus* und *A. sativa* als Blattapplikation

Für die „Cu-Np“ konnte eine positive Wirkung auf das Pflanzenwachstum von *C. sativus*, bei einer Konzentration von 40 mg l⁻¹, festgestellt werden (Abb. 19, A). Jedoch unterschied sich die Wirkung nicht von der Behandlung mit gelöstem Kupfer („CuCl₂“) derselben Konzentration. In geringerer Konzentration (20 mg l⁻¹) wurde durch die Behandlung mit beiden Präparaten („Cu-Np“ und „CuCl₂“) bei der Trockenmasse ein Wert erreicht, der sich weder zur Mangelvariante („-Cu“) noch zur Kontrollvariante unterschied, obwohl diese beiden verschieden („-Cu“ und „Kontrolle“) zu einander waren (Abb. 19, B). Im Hinblick auf den Chlorophyllgehalt (SPAD-Werte) in den Blättern ist ein Unterschied in der Wirkung bei geringer Konzentration (20 mg l⁻¹) deutlicher (Abb. 19, E). Beide Kupferpräparate („CuCl₂“ und „Cu-Np“) wirkten sich positiv auf den Chlorophyllgehalt aus, dieser war deutlich höher als die der Kupfermangelpflanzen („-Cu“). Im Hinblick auf den Chlorophyllgehalt erzielte die Behandlung mit „CuCl₂“ (20 mg l⁻¹) eine bessere Wirkung als die Cu-Np (20 mg l⁻¹). Bei der Behandlungen mit der höheren Konzentration (40 mg l⁻¹) wurde der Chlorophyllgehalt nicht bestimmt. Die niedrigen Kupfergehalte in den Wurzeln (Abb. 19, C und D) nach den Blattbehandlungen mit den Kupferpräparaten (20 und 40 mg l⁻¹) bestätigten eine Unterversorgung der Pflanzen mit Kupfer. Außerdem ist dadurch davon auszugehen, dass über das Blatt aufgenommene Kupfer in keiner der beiden Formen („CuCl₂“ und „Cu-Np“) über den Versuchszeitraum in die Wurzeln verlagert wurde. Im zusätzlichen Kupfermangelversuch mit *A. sativa* und den getesteten Konzentrationen von 20 und 40 mg l⁻¹ wurden diese Erkenntnisse tendenziell bestätigt (Abb. 22, A). Die höhere (40 mg l⁻¹) Konzentration des „Cu-Np“-Präparates erzeugte die gleiche positive Wirkung wie beide Konzentrationen (20 und 40 mg l⁻¹) der Behandlungen mit „CuCl₂“. Bei den geringen Konzentrationen (20 mg l⁻¹) hatte das „CuCl₂“-Präparat eine bessere Wirkung als die „Cu-Np“-Behandlung, weshalb die Wirkung der Cu-Np insgesamt weniger effektiv eingeschätzt wird. Die Gesamtwurzeltrockenmassen beider Pflanzenarten (*A. sativa* und *C. sativus*) unterstützten die getroffenen Aussagen, konnten jedoch wegen der ineinander gewachsenen Wurzeln nicht statistisch ausgewertet werden. In einem weiteren ergänzenden Versuch wurden die Kupferpräparate vor dem Auftreten von Mangelsymptomen aufgetragen (Abb. 19, B). Außerdem wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen (40 und 80 mg l⁻¹) der Kupferpräparate („CuCl₂“ und „Cu-Np“) ohne die Wiederbefeuchtung der Präparate nach dem Eintrocknen auf der Blattoberfläche untersucht. Im Hinblick auf die Trockenmasse konnte dabei nur durch die Behandlung „Cu-Np-Überstand“ (80 mg l⁻¹) eine Wirkung erzeugt werden. Die übrigen Behandlungen und Konzentrationen erzielten im Vergleich zu „-Cu“ keine Wirkung auf die Trockenmasse. Da „Cu-Np“ (80 mg l⁻¹) bei ausbleibender Wiederbefeuchtung als einzige Behandlung eine höhere Trockenmasse als „-Cu“ aufwies, kann unter diesen Bedingungen von einer effektiveren Wirkung der „Cu-Np“ im Vergleich zu „CuCl₂“ ausgegangen werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Tropfen der

Cu-Np durch ihre Eigenschaften länger feucht bleiben als die Tropfen bei „CuCl₂“, wodurch eine bessere Aufnahme zu erklären wäre. Nähere Untersuchungen zur Dauer des Eintrocknens der Präparate wurden jedoch nicht durchgeführt. Eine weitere mögliche Ursache für die bessere Wirkung der „Cu-Np“ wäre, dass Partikel aus dem „Cu-Np“-Präparat vollständig aufgenommen wurden, wodurch womöglich eine bessere Wirkung erzeugt wurde. Die insgesamt schwächere Wirkung aller Präparate, obwohl gleiche und auch höhere Konzentrationen (80 mg l⁻¹) verwendet wurden als zuvor, ist vermutlich durch das Ausbleiben der Wiederbefeuchtung zu erklären. Darüber hinaus wäre auch der frühe Applikationszeitpunkt vor Auftreten der Mangelsymptome eine mögliche Erklärung für die schwächere Wirkung der Präparate. Die kürzere Versuchsdauer im Vergleich zum ersten Versuch mit *A. sativa* könnte auch dazu geführt haben, dass mögliche später sichtbar werdende Vorteile unentdeckt geblieben sind. Untersuchungen zu einer zielgerichteten Blattapplikation von Cu-Np zur Behebung von Nährstoffmängeln sind mir bisher nicht bekannt. Bisherige Studien beurteilen vorwiegend Auswirkungen von Cu-Np bei Pflanzen unabhängig von einer gezielten Behandlung, wobei vorwiegend eine Wurzelexposition der Cu-Np stattfindet. Nekrasova et al. (2011) konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Cu-Np, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, bei geringen Dosen (0,025-0,25 mg l⁻¹) eine positive Wirkung auf die Photosyntheserate von *Elodea densa* Planch. hatte. Ab einer Konzentration von 1 mg l⁻¹ wurde bei Cu-Np ein negativer Einfluss auf die Photosyntheserate beobachtet. Der Chlorophyllgehalt wurde bei geringen Konzentrationen (0-0,25 mg l⁻¹) nicht beeinflusst, während darüber liegende Kupferkonzentrationen sich negativ auswirkten. Jedoch handelt es sich bei *E. densa* um eine Wasserpflanzenart, welche vollständig und über den gesamten Versuchszeitraum in einem mit Cu-Np angereichertem Medium wuchs, wodurch sich die Wirkungen der verwendeten Konzentrationen mit denen in der vorliegenden Arbeit, nach zielgerichtetem Aufsprühen, nur bedingt vergleichen lassen. In einer anderen Studie wurde ein verbessertes Wachstum bei *Lactuca sativa* L. nach einer Anreicherung des Bodens mit Cu-Np (130 und 600 mg kg⁻¹) festgestellt (Shah und Belozeroва 2009). Höhere Konzentration von Cu-Np in Agar 200-1000 mg l⁻¹ zeigten bei *T. aestivum* und *C. pepo* eine toxische Wirkung (Lee et al. 2008). In einer Nährlösung traten toxische Effekte durch Cu-Np bereits bei 100 mg l⁻¹ bei *C. pepo* auf (Musante und White 2012). Stampoulis et al. (2009) berichten ebenfalls von toxischen Effekten von Cu-Np auf *C. pepo* bei Konzentrationen von 1000 mg l⁻¹ in einer Nährlösung.

4.1.4.2 Untersuchungen der Düngewirkung von „Fe-Np“ im Vergleich zu „Fe-EDTA“ an *B. napus* als Blattapplikation

Bei der Untersuchung der Wirkung von Fe-Np im Vergleich zu „Fe-EDTA“ bei *B. napus* wurde der Chlorophyllgehalt und die Trockenmasse bestimmt (Abb. 25, A-C). Keine der bestimmten Parameter wies auf eine Wirkung der „Fe-Np“ hin. Lediglich die höchste Fe-Np-Konzentration (1000 mg l⁻¹) hatte einen Einfluss auf den Carotinoid-Gehalt. „Fe-EDTA“, welches als Referenzmaterial verwendet wurde, erzielte zumindest beim Chlorophyllgehalt eine Wirkung, nicht jedoch bei der Trockenmasse. Die „Fe-EDTA“-Behandlung hatte trotz besserer Wiederbegrünung keine Vorteile bei der Trockenmasse,

was eigentlich zu erwarten gewesen wäre. Die Ursache dafür könnten die durch eine Behandlung mit „Fe-EDTA“ verursachten Blattschäden sein. Die verwendeten Fe-Np wurden in deion. Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt und aufbewahrt. Auffällig war, dass sich innerhalb kurzer Zeit relative große Aggregate in der Suspension bildeten, welche rasch sedimentierten. Daher wird vermutet, dass nach kurzer Zeit keine Partikel in Nanogröße mehr in den Suspensionen enthalten waren. Die Aufnahmen der Blattoberfläche mit dem REM zeigten deutlich größere Aggregate nach dem Eintrocknen der Präparate auf der Blattoberfläche. Vermutlich lag das Eisen relativ schnell als nicht wasserlösliche Eisenoxidverbindung (Fe₃O₄) in der Suspension vor, entsprechend der Abfolge folgender Reaktionen:



Diese Reaktion findet vermutlich bereits bei der Lagerung der Fe-Suspension statt, höchstwahrscheinlich aber spätestens auf den Blattoberflächen nach Applikation. Daher können weder Partikel selbst noch freie pflanzenverfügbare Fe-Ionen von den Blättern aufgenommen werden. Die Elementaranalyse der getrockneten Fe-Np ergab lediglich einen 70-prozentigen Anteil an Eisen an der Gesamtmasse. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Partikel zumindest im getrockneten Zustand fast vollständig als Eisenoxid vorliegen. Um eine Wirkung zu erzielen, wäre es vermutlich erforderlich, dass der Fe-Nano-Suspension Substanzen zugegeben werden, die Eisen lösen (z. B. Citronensäure), jedoch würde dies einen eventuellen Vorteil der Applikation als Np zunichtemachen, nämlich die Möglichkeit, höhere Fe-Dosen pflanzenverträglich zu applizieren als dies mit Salzen oder Chelaten möglich ist. Möglicherweise könnte bei der Herstellung auch ein Trägermittel gewählt werden, welches als Reduktionsmittel die Bildung von Eisenoxiden verhindert. Die Gewährleistung der Stabilität der Nanopartikel, und damit der Erhalt vorteilhafter Eigenschaften der Np, ist ein ganz entscheidender Punkt, um eine Düngewirkung durch entweder freigesetzte Ionen oder die Aufnahme ganzer Partikel erzielen zu können. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten bereits positive Wirkungen durch eine Fe-Np Blattapplikation bei *T. aestivum* auf wichtige Ertragsparameter unter Feldbedingungen gezeigt werden (Bakhtiari et al. 2015). Delfani et al. (2014) zeigten ebenfalls, dass eine Blattapplikation von Fe-Np bei *Vigna unguiculata* L. eine signifikante Wirkung auf Ertragsparameter, Eisen- und Chlorophyllgehalte im Vergleich zu den unbehandelten Pflanzen hatten. Askary et al. (2016) konnten positive Wirkungen durch Fe-Np (Fe₂O₃) auf Wachstumsparameter, Chlorophyll- und Proteingehalt von *Catharanthus roseus* L. nach Zugabe zur Nährlösung zeigen. Auch Rui et al. (2016) stellten eine positive Wirkung von Eisen-Np (Fe₂O₃) auf das Wachstum und die SPAD-Werte von *Arachis hypogaea* L. fest. Ghafariyan et al. (2013) erzielten ebenfalls eine positive Wirkung durch supermagnetische Eisenoxid-Np auf den Chlorophyllgehalt von *G. max* nach Zugabe zur Nährlösung. Dabei unterschied sich die Wirkung im Vergleich zu „Fe-EDTA“ nicht. Jedoch wurden in diesen beiden letzten Beispielen die Fe-Np nicht auf die Pflanzenoberfläche, wie in der vorliegenden

Arbeit, sondern in das Kultursubstrat (Boden bzw. Nährlösung) gegeben, sodass ein Vergleich der Ergebnisse nur schwer möglich ist. Weitere zielgerichtete Untersuchungen des Einsatzes von Fe-Np zur Blattdüngung sind mir nicht bekannt. Da die Fe-Np keine Düngewirkung erzielten, wurden keine weiteren Untersuchungen mehr durchgeführt.

4.1.4.3 Beurteilung der Rückstände verschiedener partikulärer Präparate (Cu-Np und Fe-Np) nach Applikation und anschließendem Eintrocknen auf der Blattoberfläche

Aus den REM-Untersuchungen der Blattoberfläche geht hervor, dass die eingetrockneten „Cu-Np“- (Abb. 20 und 23, A-D) und „Fe-Np“-Präparate (Abb. 26, A-C) sehr große Aggregate (im Mikrometerbereich) gebildet haben. Die punktuellen Strukturen bei beiden Stoffen weisen darauf hin, dass die größeren Aggregate aus kleineren Partikeln (schätzungsweise 500-1000 nm) zusammengesetzt sind, sodass diese gegebenenfalls vor dem Eintrocknen noch nicht zu größeren Aggregaten zusammengeschlossen waren. Ob die durchschnittliche Größenverteilung der Partikel den Angaben (<10 nm (Cu-Np), <50 nm (Fe-Np) des Herstellers (vgl. Abschnitt 2.1) entspricht, lässt sich somit anhand der Bilder der eingetrockneten Rückstände nicht eindeutig beurteilen. Jedoch erscheint die direkte Aufnahme der gebildeten Aggregate, z.B. durch Stomata, auf Grund ihrer durchschnittlichen Größe eher unwahrscheinlich. Falls die Partikel vor dem Eintrocknen der Suspension in kleinerer (Nanometerbereich) Größe vorlagen, ist die Aufnahme wahrscheinlicher einzuschätzen. Jedoch wurde die Größe der suspendierten Partikel nicht bestimmt.

4.1.4.4 Vergleich der Düngewirkung (*C. sativus*) und des Kupferaufnahmeverhaltens (*G. max*) in das Blatt nach der Blattapplikation verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparate

Das Experiment zur Beurteilung der Wirkung verschiedener Cu-Np-Suspensionen („Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) im Vergleich zu Kupferlösungen („Cu-EDTA“ und „CuCl₂“) und zu einer bereits am Markt befindlichen partikulären Düngemittelsuspension („Kupferoxychlorid“) bei einer Blattapplikation bestätigt ebenfalls eine Wirkung kupferhaltiger Nanopräparate. Als geeignete Dosis für eine Sprühapplikation auf die Pflanzenoberfläche waren 40 mg l⁻¹ bei den Np-Formulierungen sowie bei den Kupfer-Lösungen ausreichend, um eine positive Wirkung bei der Trockenmasse und dem Chlorophyllgehalt bei *C. sativus* zu erzielen (vgl. Abschnitt 4.1.3.1), weshalb nur diese eine Konzentration verwendet wurde. Die Applikation der „CuCl₂“-Lösung verursachte, trotz positiver Wirkung, offensichtliche Schäden im Blattgewebe, was zuvor in den Versuchen bei *C. sativus* nicht beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 4.1.3.1). Auch die Behandlung „Cu-Np-Überstand“ führte ansatzweise zu leichten Schäden im Blattgewebe, jedoch nicht so stark wie bei „CuCl₂“. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass ein hoher Anteil gelöster Cu²⁺-Ionen in der „Cu-Np-Überstand“-Suspension enthalten war, der vermutlich die Schäden verursachte. Die anderen Cu-Formulierungen („Cu-EDTA“, „Cu-Np“, „Kupferoxychlorid“) wirkten sich nicht negativ aus. Die Kupferpräparate „Cu-Np“ und

„Cu-Np-Überstand“ erzeugten eine positive Düngewirkung auf die Trockenmasse sowie den Chlorophyllgehalt, wobei sie sich nicht in der Wirkung zu den Kupferlösungen („Cu-EDTA“, „CuCl₂“) unterschieden. Die Behandlung mit „Kupferoxychlorid“ führte bei keinem der Parameter zu einer Verbesserung im Vergleich zu „-Cu“. Die verwendete Konzentration von 40 mg l⁻¹ liegt jedoch deutlich unter der vom Hersteller empfohlenen mittleren Aufwandmenge (ca. 140 mg l⁻¹ für Getreide) für „Kupferoxychlorid“.

Im Widerspruch zu den gezeigten Ergebnissen des Einflusses der verschiedenen Kupferpräparate auf den Chlorophyllgehalt und das Wachstum der Pflanzen (*C. sativus*) unter Mangelbedingungen stehen die Untersuchungen zur Kupferaufnahme bei *G. max*. Die Ergebnisse zeigen, dass bei „Kupferoxychlorid“ die höchsten Kupferkonzentrationen im Blatt und prozentualen Aufnahmemengen des Blattes (Abb. 33, A und B) festzustellen waren, wobei die Wirkung auf das Wachstum und den Chlorophyllgehalt (Abb. 27, A und B) hier am geringsten waren. Die widersprüchlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die verwendete Methodik des Abwaschens zurückzuführen. So ließen sich vermutlich die Rückstände von „Kupferoxychlorid“ am schlechtesten abwaschen, wodurch vor allem noch auf der Blattoberfläche anhaftendes Material bei der Bestimmung der Kupferkonzentration im Blatt mit einbezogen wurde. Gleiches wurde bei „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ vermutet. Bei „Cu-EDTA“ wurde die geringste prozentual aufgenommene Menge festgestellt, obwohl im vorangegangenen Versuch eine der besten Düngewirkungen erzeugt wurde. Hier ist davon auszugehen, dass es sich bei der prozentual aufgenommenen Menge um die tatsächliche Menge handelt, die in das Blattinnere gelangte. Die Messung wurde vermutlich nicht von Rückständen auf der Blattoberfläche beeinflusst, da sich „Cu-EDTA“ wegen der guten Löslichkeit am besten von der Blattoberfläche abwaschen ließ. Außer bei „Cu-EDTA“ ist davon auszugehen, dass ein Teil der gemessenen Werte durch Rückstände auf der Blattoberfläche beeinflusst wurde. Daher kann man schlussfolgern, dass die Methodik des Abwaschens sich nicht eignet, die Aufnahme partikulärer Blattdünger zu beurteilen. Deshalb wurde später die Kupferaufnahme in das Blattinnere mit einer anderen Methodik erneut untersucht. Da „Cu-Np“ sowie „Cu-Np-Überstand“ ähnlich gute Wirkungen aufwiesen wie das Präparat, welches Kupfer in gelöster Form enthielt („Cu-EDTA“), wurde die Wirkung vermutlich durch freigesetzte Cu²⁺-Ionen hervorgerufen.

4.1.4.5 Beurteilung der Rückstände verschiedener partikulärer Präparate („Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) und einem gelösten Präparat („Cu-EDTA“) nach Applikation und anschließendem Eintrocknen auf der Blattoberfläche

Wie schon zuvor beschrieben (vgl. Abschnitt 4.1.3.1 und 4.1.3.2) geht aus den Aufnahmen (REM) der Blattoberfläche hervor, dass das eingetrocknete „Cu-Np“-Präparat deutlich größere Aggregate (im Mikrometerbereich) gebildet hat (Abb. 30, A-D). Jedoch setzten sich die Aggregate der Cu-Np aus

kleineren runden Strukturen zusammen, deren Durchmesser sich schätzungsweise im Bereich von 500 bis 1000 nm befand. Das Präparat „Kupferoxychlorid“ (Abb. 29, A-D) wies geschätzt eine ähnliche durchschnittliche Partikelgröße wie „Cu-Np“ auf. Allerdings hatten die Partikel eher ein längliches scharfkantiges Erscheinungsbild und waren nicht aus kleineren Strukturen zusammengesetzt. Das Zentrifugieren bei der Präparation von „Cu-Np-Überstand“ hat tatsächlich dazu geführt, dass die Menge der größeren Aggregate abnahm und vorwiegend punktuelle runde Partikel zu erkennen waren (Abb. 31, A-D). Diese hatten jedoch immer noch einen Durchmesser von ca. 500-1000 nm. Damit waren trotz des Zentrifugierens der Suspension die enthaltenen Partikel bei „Cu-Np-Überstand“ immer noch deutlich größer als vom Hersteller (vgl. Abschnitt 2.1) angegeben (<10 nm). Unklar bleibt, ob die Partikel in der suspendierten Form möglicherweise eine andere Größenverteilung hatten und womöglich der Prozess des Eintrocknens zu einer verstärkten Aggregation und damit zu größeren Partikeln führte. Die Rückstände von „Cu-EDTA“ bildeten eine deutliche Schicht auf der Blattoberfläche aus in der keine partikulären Strukturen zu erkennen waren.

4.1.4.6 Zusammenfassende Diskussion – Beurteilung der Düngewirkung (*C. sativus* und *A. sativa*) und des Kupferaufnahmeverhaltens (*G. max*) in das Blatt nach der Blattapplikation verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparate

Die eingangs formulierte Hypothese (3) über den Vorteil einer effektiveren Düngewirkung von „Cu-Np“ oder „Cu-Np-Überstand“ gegenüber gelösten Kupferpräparaten, z.B. durch besondere Nanoeigenschaften oder durch die Aufnahme ganzer Np, konnte in den meisten Fällen nicht bestätigt werden. Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aus den Abschnitten 4.1.4.1, 4.1.4.2 und 4.1.4.3 hatten die gelösten Präparate („Cu-EDTA“ bzw. „CuCl₂“) entweder ähnliche Wirkungen wie „Cu-Np“ bzw. „Cu-Np-Überstand“ oder, bei geringeren Konzentrationen (20 mg l⁻¹), bessere Wirkungen als „Cu-Np“. Lediglich wenn die Präparate auf der Blattoberfläche nach dem Eintrocknen nicht wiederbefeuchtet wurden, war im Vergleich zu „CuCl₂“ eine bessere Wirkung durch eine Behandlung mit „Cu-Np“ (80 mg l⁻¹) zu erkennen. Die Wirkung geringerer und höherer Konzentrationen als 40 mg l⁻¹ sowie das Ausbleiben der Wiederbefeuchtung wurde für „Cu-Np-Überstand“ nicht getestet. Im Vergleich zu einer kommerziell erhältlichen Düngemittelsuspension („Kupferoxychlorid“), mit vermeintlich größeren Partikeln, konnte eine effektivere Wirkung mit den Präparaten „Cu-Np“ bzw. „Cu-Np-Überstand“, bei einer Behandlungskonzentration von 40 mg l⁻¹, erzielt werden. Jedoch geht aus den Bildern der Rückstände auf der Blattoberfläche hervor, dass die durchschnittliche Größe der Partikel bei „Cu-Np“ und „Kupferoxychlorid“ ähnlich war (im Bereich mehrerer Mikrometer), lediglich bei Cu-Np-Überstand waren die Partikel im Durchschnitt mit 500-1000 nm offensichtlich kleiner (Abb. 29, 30 bzw. 31). Die Wirkung durch die Aufnahme ganzer Partikel bei „Cu-Np“ und „Kupferoxychlorid“ wurde wegen der relativ großen Aggregate (im Mikrometerbereich) eher als unwahrscheinlich eingeschätzt. Dennoch ist die Aufnahme ganzer Partikel bei „Cu-Np“ und „Kupferoxychlorid“ denkbar, da nicht bekannt ist in welcher Größe die Partikel in der Suspension vorlagen, bevor sie auf der

Blattoberfläche eintrockneten. Wegen der durchschnittlich kleineren Partikel bei „Cu-Np-Überstand“ ist die Aufnahme ganzer Partikel durch z.B. Stomata hier wahrscheinlicher. Bei allen Präparaten wurde dennoch vermutet, dass die Düngewirkung vorwiegend durch freigesetzte Cu^{2+} -Ionen verursacht wurde. Unklar bleibt, ob die Cu^{2+} -Ionen stetig aus den partikulären Materialien freigesetzt wurden oder ob lediglich der Anteil der von Beginn an vorhandenen freien Cu^{2+} -Ionen für die positive Wirkung der partikulären Präparate verantwortlich ist. Die Ergebnisse des Experimentes über die Kupferaufnahme in das Blatt mit *G. max* waren im Vergleich zu den Ergebnissen der Düngewirkung der verschiedenen Präparate widersprüchlich. Dabei wurde z.B. bei dem Präparat "Kupferoxychlorid", welches eine schwache Düngewirkung hatte eine hohe Kupferaufnahme in das Blatt festgestellt. Es wurde vermutet, dass Rückstände der Präparate auf der Blattoberfläche die gemessenen Kupferkonzentrationen in den Blättern beeinflussten, wodurch die Werte teilweise überschätzt wurden. Daher wurde die angewendete Methodik im Zusammenhang mit der Beurteilung der Kupferaufnahme als ungeeignet eingeschätzt (vgl. 4.1.4.4). Im nächsten Kapitel (4.2) wurden deshalb weitere Untersuchungen unternommen, um das Kupferaufnahmeverhalten in das Blatt und das Cu^{2+} -Ionenfreisetzungsvermögen der verschiedenen Präparate in einem anderen Ansatz besser zu verstehen. Andere Studien, welche die Düngewirkung in einer Blattapplikation von kupferhaltigen gelösten und partikulären Präparaten miteinander verglichen, sind nicht bekannt. Vergleiche mit anderen Studien, die den Einfluss von Cu-Np auf die Entwicklung von Pflanzen untersuchten, wurden bereits diskutiert (vgl. Abschnitt 4.1.4.1).

4.1.4.7 Vergleich der Wirkung verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparate zum Pflanzenschutz gegenüber Echtem Mehltau bei *C. sativus*

Das Experiment zur Untersuchung der Schutzwirkung der unterschiedlichen Cu-Suspensionen gegenüber Echtem Mehltau an *C. sativus* (Abb. 34, A) zeigte für jede der getesteten Behandlungen (Folicur, „Cu-EDTA“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) eine positive Wirkung im Vergleich zur unbehandelten „Kontrolle“. Die Varianten „Cu-Np-Überstand“ und „Cu-EDTA“ boten zu Beginn (6 Tage nach der Inokulation) den effektivsten Schutz, da sie die geringste befallene Fläche aufwiesen. Die Varianten „Cu-Np“ und „Kupferoxychlorid“ zeigten zu einem frühen Zeitpunkt (6-9 Tage nach der Inokulation) einen höheren Anteil befallener Blattfläche im Vergleich zu „Cu-EDTA“ und „Cu-Np-Überstand“. Vierzehn Tage nach der ersten Inokulation war kein Unterschied mehr zwischen Behandlungen und „Cu-Np“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np-Überstand“ und den unbehandelten Pflanzen zu erkennen. Die Behandlung mit „Cu-EDTA“ hatte jedoch noch leichte Vorteile gegenüber der „-Cu“-Variante. Die Behandlung mit Folicur zeigte über den gesamten Zeitraum keinen Befall, was zu erwarten war, da dieses Produkt über eine systemische Wirkung verfügt. Die Untersuchungen nach der zweiten Inokulation (Abb. 34, B) zeigten keine systemische Wirksamkeit der verschiedenen Kupferpräparate, da die unbehandelten Blätter aller Varianten („Cu-EDTA“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) in gleicher Weise und Geschwindigkeit befallen wurden wie bei den Pflanzen, die von Beginn an keine Behandlung erhielten. Lediglich Folicur wirkte

systemisch, wies jedoch zum Ende des Experimentes auch einen sehr geringen Befall der unbehandelten Blattfläche auf. Auch beim protektiven Schutz gegenüber Echtem Mehltau ist davon auszugehen, dass die Wirkung vorwiegend von freien Cu^{2+} -Ionen hervorgerufen wurden, da die Varianten „Cu-EDTA“ und „Cu-Np-Überstand“ (in dem ein hoher Anteil freier Cu^{2+} -Ionen vermutet wird) die effektivste Wirkung zeigten. Insgesamt ist die abnehmende Wirkung aller Kupferpräparate dadurch zu erklären, dass die Blätter nach der Applikation weiter wuchsen und sich somit die wirksamen Rückstände der aufgesprühten Präparate auf der Blattoberfläche verdünnten. Es wird darauf hingewiesen, dass Kupferpräparate in der Praxis vor allem zum Schutz gegenüber falschem Mehltau eingesetzt werden und seltener, wie in der vorliegenden Arbeit, gegenüber echtem Mehltau. Bereits zuvor wurde eine effektive Schutzwirkung durch Cu-Np gegenüber *Fusarium. Culmorum* Sacc., *Fusarium. Oxysporum* Schlechtend. und *Fusarium. equiseti* Sacc. *in vitro* gezeigt (Bramhanwade et al. 2016). Kanhed et al. (2014) zeigten in einem ähnliche Ansatz ebenfalls eine Wirkung von Cu-Np gegenüber *Phoma destructiva*, *Curvularia lunata*, *Alternaria alternata* und *Fusarium oxysporum*. Eine weitere Studie belegte eine effektive Wirkung von Cu-Np gegenüber *Saprolegnia* sp. ebenfalls *in vitro* (Kalatehjari et al. 2015). Ouda (2014) erzielte auch eine positive Wirkung von Cu-Np gegenüber *Alternaria alternata* und *Botrytis cinerea* *in vitro* und zeigte, dass Cu-Np die Hyphen der Pilze beschädigten. Ähnliche *in vivo*-Untersuchungen zum Schutz gegenüber Pflanzenpathogenen, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, sind mir nicht bekannt. Jedoch wurde bereits eine effektive Wirkung von Ag-Np in einem Pflanzenexperiment mit *C. sativus* und *C. pepo* gegenüber echtem Mehltau gezeigt (Lamsal et al. 2011). Im Hinblick auf den protektiven Schutz gegenüber echtem Mehltau konnte im Vergleich zu dem gelösten Präparat („Cu-EDTA“) keine effektivere Wirkung gezeigt werden. Die Wirkung ließ bei den partikulären Substanzen über die Zeit eher nach. „Kupferoxychlorid“ „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ verhielten sich in der Wirkung ähnlich. Auch eine systemische Wirkung der Np-Präparate war nicht festzustellen.

4.2 Untersuchung der Ionenfreisetzung verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparate sowie der Kupferaufnahmemengen in das Blatt (*S. telephium*).

4.2.1 Einleitung

Der erste Vorteil einer möglichen effektiveren Düngewirkung von Np gegenüber einem gelösten Präparat konnte meistens weder für die Cu-Np noch für die Fe-Np bestätigt werden. Lediglich im Vergleich zu einem herkömmlichen partikulären Düngemittel („Kupferoxychlorid“) war die Düngewirkung der Cu-Np besser. Der zweite Vorteil einer Np-Blattdüngung könnte möglicherweise darin bestehen, dass mineralische Nährstoffe in höheren Konzentrationen aufgetragen werden können als in gelöster Form, ohne dass dabei Blattschäden durch einen zu hohen Anteil anfänglich vorhandener gelöster Ionen hervorgerufen werden. Dadurch könnten Pflanzennährstoffe in partikulärer Form als Depot auf die Pflanzenoberfläche aufgetragen werden und möglicherweise, eine stetige

Nährstoffaufnahme in das Blatt, im Idealfall über einen längerfristigen Zeitraum, bewirken. Um die Wirkungsweise der verschiedenen partikulären Cu-Suspensionen (Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) näher zu untersuchen, wurden zwei Modellversuche durchgeführt. Dazu wurde das Cu²⁺-Ionenfreisetzungsverhalten der verschiedenen Präparate („CuCl₂“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) über einen Zeitraum von 48 Stunden in einem Modellversuch mit einer Dialysemembran untersucht. Außerdem wurde die Kupferaufnahme in das Blatt aus diesen verschiedenen Kupferpräparaten („Cu-EDTA“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) und deren Verträglichkeit erneut beurteilt. Um für die Bestimmung der Kupferaufnahme eine geeignetere Methode als das zuvor durchgeführte (vgl. Abschnitt 4.1.2.2) ausschließliche Abwaschen der Rückstände auf der Oberfläche zu entwickeln, wurden zunächst zwei Vorversuche durchgeführt. Das Prinzip bestand darin, neben dem Abwaschen der Blattoberfläche zusätzlich die Epidermis der Blätter zu entfernen, sodass bei der späteren Analyse tatsächlich nur die Kupferkonzentration im Blattinneren bestimmt wurde. Zur Untersuchung der Aufnahme in das Blatt wurde in diesem Versuchsansatz die Pflanzenart *S. telephium*. verwendet, da sich hier die Epidermis gleichmäßig und vollständig ablösen lässt. Es ist mir nicht bekannt, dass diese Methodik im Zusammenhang mit der Quantifizierung der Aufnahme von Nährstoffen schon einmal verwendet worden ist.

4.2.2 Material & Methoden

4.2.2.1 Untersuchung der Ionenfreisetzung verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparate

Der erste Modellversuch zum Cu²⁺-Ionenfreisetzungsvermögen wurde mit Hilfe einer Dialysemembran (Molecular weight cut-off (MWCO): 500-1000 Da) und Agar durchgeführt. Das Rückhaltevermögen der Dialysemembran wurde so gewählt, dass sie für partikuläre Stoffe, die größer als ca. 1 nm sind, nicht durchlässig war. Es wurden ca. 10 cm lange Stücke des Dialyseschlauches an beiden Seiten der Länge nach aufgeschnitten. Anschließend wurden rechteckige Blöcke (1 cm x 1,5 cm x 12 cm) aus Agar (1,5 %) hergestellt. Die zurechtgeschnittenen Stücke des Dialyseschlauches wurden auf die Agar-Blöcke gelegt, welche in einer Petrischale lagen. Danach wurden von verschiedenen Kupferpräparaten („CuCl₂“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) elf Tropfen mit definiertem Volumen (12 µl) mittig auf die Dialysemembran mit einer Multipette aufgetragen (Abb. 35). Es wurde darauf geachtet, dass die aufgetragenen Flüssigkeiten keinen direkten Kontakt zum Agar hatten. Die verschiedenen Präparate enthielten eine Kupferkonzentration von 0,1 mg l⁻¹. Je Behandlung gab es acht Wiederholungen. Nach dem Auftragen der Tropfen wurden die Petrischalen abgedeckt, sodass die Agar-Streifen und die Tropfen nicht austrockneten. Nach 24 und nach 48 Stunden wurden jeweils vier Streifen geerntet. Dazu wurden 2 Stunden vor der Ernte die Deckel der Petrischalen abgenommen, sodass die Tropfen auf der Dialysemembran nahezu eintrockneten. Dadurch wurde sichergestellt, dass beim Abnehmen der Dialysemembran von den Agarblöcken die Flüssigkeiten nicht versehentlich von der

Membran herunterlaufen konnten und wohlmöglich den Agar kontaminierten. Anschließend wurden die Agar-Blöcke und Dialysemembranen für 48 Stunden bei 60 °C getrocknet und anschließend aufgeschlossen (vgl. Abschnitt 2.7). Die Kupferkonzentration in der Aufschlusslösung wurde dann später am AAS analysiert. Das Prinzip basierte darauf, dass Cu-Partikel durch die Dialysemembran zurückgehalten wurden und nur gelöste Cu^{2+} -Ionen durch die Membran entlang eines Konzentrationsgradienten in den Agar diffundieren konnten. Durch die Bestimmung der Konzentration des Kupfers im Agar und auf der Membran, konnte somit eine Aussage über das Cu^{2+} -Ionenfreisetzungs- und Nachlieferungsvermögen der verschiedenen Substanzen getroffen werden.

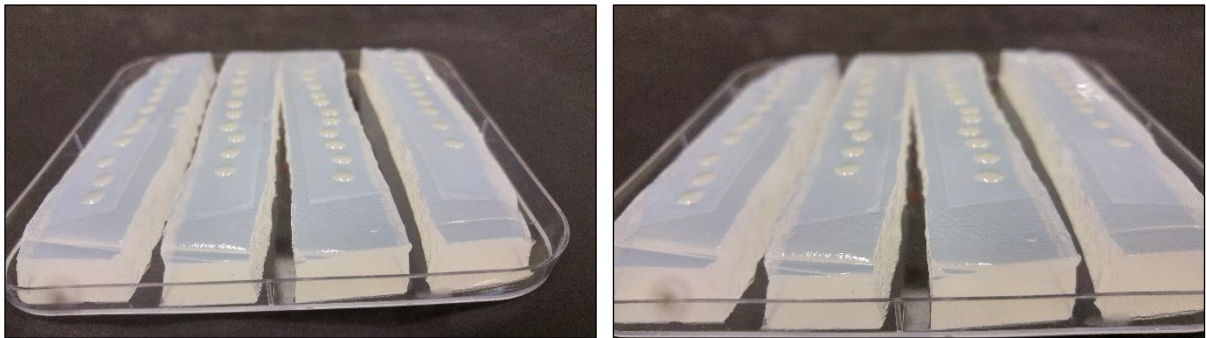


Abbildung 35: Agar-Blöcke mit aufliegender Membran nach der Tropfen-Applikation der Präparate.

4.2.2.2 Untersuchungen zur Kupferaufnahme in das Blatt (*S. telephium*) nach Applikation verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparaten

Die Versuche zur Kupferaufnahme in das Blatt bei *S. telephium* fanden in ähnlicher Weise statt. Zunächst wurden Blätter mit einer möglichst einheitlichen Größe am Trieb der Pflanzen abgeschnitten. Die Blattoberfläche wurde gründlich mit deion. Wasser abgespült. Danach wurden die Blätter mit einem Skalpell mittig entlang der Mittelachse durchgeschnitten. Die Schnittflächen wurden mit aufgewärmter flüssiger Vaseline, die sich beim Abkühlen rasch verfestigte, versiegelt, um ein Austrocknen der Blätter zu verhindern. Auf eine der beiden Blatthälften wurde eines der Präparate mit der Multipette mittig in Tropfen mit definiertem Volumen aufgetragen. Die andere Blatthälfte diente als „Kontrolle“ und wurde in gleicher Weise mit deion. Wasser behandelt. Nach verschiedenen Wirkzeiten wurden zunächst die aufgetragenen Präparate bei allen Blattproben abgewaschen. Danach wurden die noch feuchten Blatthälften mit Papiertüchern abgetrocknet und im Anschluss daran die Vaseline mit einem Spatel entfernt. Nun konnte die Epidermis bei den Blattproben entfernt werden. Dazu wurde das Blatt an der Basis geknickt, sodass das Blatt-Parenchym brach, die Epidermis an der Blattoberseite jedoch noch intakt war. Nun wurde die Epidermis der Blattoberseite vom unteren Ende zur Blattspitze hin in einem flachen Winkel abgezogen (Abb. 36, D). Gleiches geschah mit den Blatthälften der „Kontrolle“. Die Technik des Abziehens der Epidermis wurde im Zusammenhang mit der Untersuchung der Physiologie der Stomata zuvor gezeigt (Weyers und Travis 1981). Die jeweiligen Blattpräparate wurden für 48 Stunden im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet, aufgeschlossen und auf Kupfer untersucht (vgl.

Abschnitt 2.7). Dadurch konnte eine Aussage getroffen werden, wieviel Kupfer in Abhängigkeit von der Zeit aus den jeweiligen Kupferpräparaten in das Blattgewebe unterhalb der Epidermis gelangte. Die beiden unbehandelten Blatthälften festgestellten Werte wurden von den gemessenen Werten bei der Behandlung abgezogen.

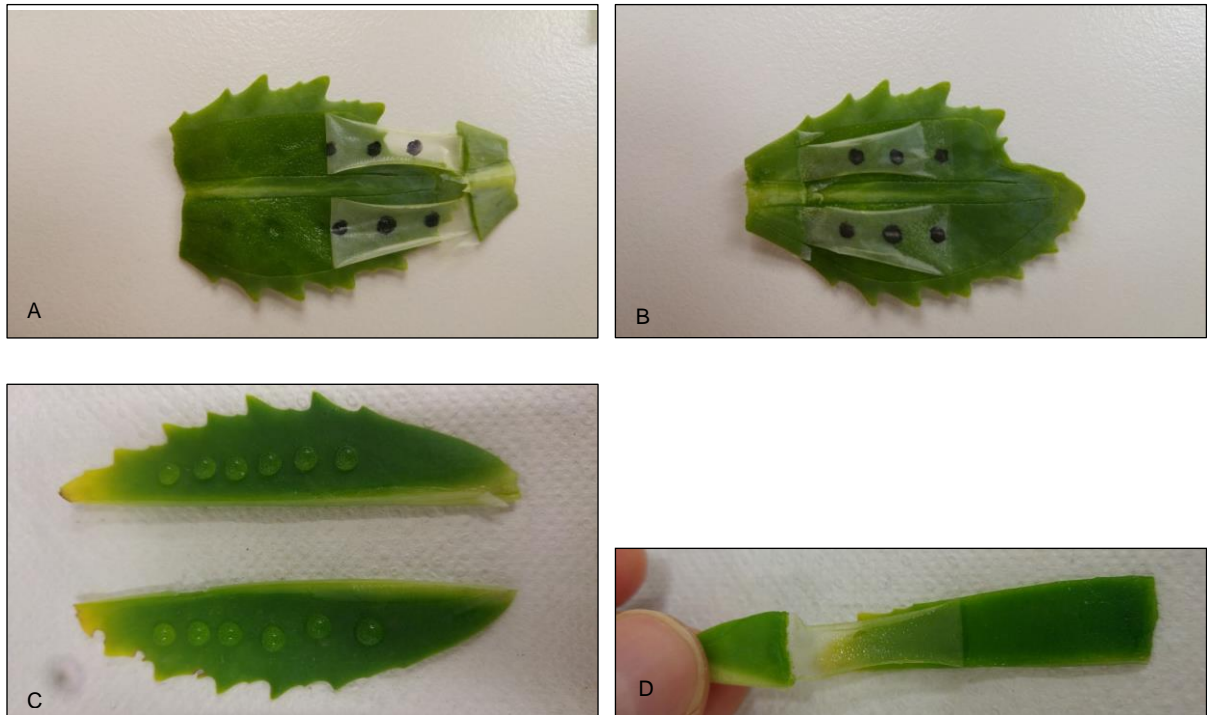


Abbildung 36: Abziehen der Epidermis von *S. telephium* (A, B, D). In A und B sind wurde die Epidermis mit einem Filzstift punktuell markiert, um die Möglichkeit des Ablösens zu verdeutlichen. Aufgetragene Tropfen (C) auf die Blatthälften (Cu-präparat und deion. Wasser („Kontrolle“)). Die Schnittstellen sind mit Vaseline versiegelt.

Der Vorteil der Methodik des Abwaschens der Blattoberfläche und dem zusätzlichem Abziehen der Epidermis („Abwaschen+Abziehen“) gegenüber des ausschließlichen Abwaschens der Blattoberfläche („Abwaschen“) wurde in einem Vorversuch geprüft. Dazu wurde auf sechs Blatthälften „Cu-EDTA“ (80 mg l⁻¹ Cu) in fünf Tropfen (je 16 µl Volumen) mittig mit einer Multipette aufgetragen. In diesem Experiment wurde „Cu-EDTA“ anstelle von „CuCl₂“ verwendet, da letzteres bereits in geringen Konzentrationen Nekrosen auf der Blattoberfläche verursachte. Nach dem Auftragen der Tropfen wurden alle Proben auf feuchten Papiertüchern in einer Petrischale bei geschlossenem Deckel aufbewahrt. Dadurch war in der Petrischale annähernd eine Luftfeuchte von 100 % eingestellt, sodass die Tropfen nicht eintrockneten. Nach dem Abwaschen der Rückstände auf der Blattoberfläche wurde in diesem Versuch nur bei der Hälfte der sechs Blattproben die Epidermis entfernt („Abwaschen+Abziehen“). Bei der anderen Hälfte wurde die Epidermis nicht entfernt („Abwaschen“), sodass die Aufnahme in Abhängigkeit von den verschiedenen Methoden beurteilt werden konnte. Die jeweiligen Blatthälften, die zur „Kontrolle“ dienten, wurden gleicherweise behandelt.

Zusätzlich wurde in einem zweiten Vorversuch der Effekt des ansatzweisen Eintrocknens („Eintrocknen“) gegenüber dem Feuchtbleiben („Feucht“) der aufgetragenen Tropfen auf die Kupferaufnahme in das Blattinnere beurteilt. In der Theorie hat das Eintrocknen bzw. die Abnahme des Volumens des Tropfens zur Folge, dass die Kupferkonzentration im Tropfen steigt. Dadurch wird der Konzentrationsgradient (Cu) in das Blattinnere erhöht und die Diffusion in das Blatt gefördert, was in diesem Versuch bestätigt werden sollte. Die Präparation der Blätter fand wie zuvor beschrieben statt. Danach wurden jeweils 7 x 12 µl „Cu-EDTA“ mit einer Kupferkonzentration von 200 mg l⁻¹ als Tropfen auf die Blattoberfläche aufgetragen. Es wurde eine höhere Konzentration gewählt, um höhere Aufnahmen zu erzielen als im ersten Vorversuch. Bei der einen Variante wurden die Blatthälften nach dem Applizieren der Tropfen zunächst für 2 Stunden an der freien Luft im Labor stehen gelassen, sodass ein Teil des Tropfenvolumens nach dieser Zeit verdunstet war und dementsprechend die Kupferkonzentration im Tropfen erhöht wurde. Alle Tropfen waren zu diesem Zeitpunkt jedoch noch feucht („Eintrocknen“). Danach wurden die Blatthälften auf feuchten Papiertüchern in einer geschlossenen Petrischale bei annähernd 100 % Luftfeuchte über den gesamten Versuchszeitraum aufbewahrt, sodass die Tropfen nie vollständig eintrockneten. Im Vergleich dazu wurde bei der anderen Variante von Beginn an 100% Luftfeuchtigkeit in der Petrischale eingestellt, sodass das Tropfenvolumen über den Versuchszeitraum auf der Blattoberfläche nicht oder nur sehr geringfügig abnahm („Feucht“). Zur Vereinfachung wurden in beiden Nebenversuche nur Behandlungen mit „Cu-EDTA“ durchgeführt. Der Versuchszeitraum betrug in beiden Fällen 48 Stunden, und je Variante gab es drei Wiederholungen. Da die Rohdaten zunächst nicht normalverteilt waren, wurden sie für die statistische Auswertung logarithmisch transformiert.

Nach den beiden Vorversuchen wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die Kupferaufnahme aus den verschiedenen partikulären und gelösten Kupferpräparaten bei *S. telephium* getestet wurde. Zunächst wurde in einem Nebenversuch die Verträglichkeit der verschiedenen Präparate („CuCl₂“, „Cu-EDTA“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“) in den verschiedenen Konzentrationen (10, 50, 80, 100 und 200 mg l⁻¹) bei *S. telephium* untersucht. Dazu wurden fünf Tropfen mit je einem Volumen von 16 µl des jeweiligen Präparates bei den genannten Kupferkonzentrationen auf die Blattoberfläche aufgetragen. Die Präparate trockneten auf der Blattoberfläche ein und nach 48 Stunden wurde festgestellt, bei welcher Konzentration durch das jeweilige Präparat offensichtliche Schäden an der Kontaktstelle verursacht worden waren. Im eigentlichen Experiment zur Aufnahme wurden verschiedenen Kupferpräparate (Cu-EDTA, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) in Tropfen (5 x 16 µl) mit einer Kupferkonzentration von 80 mg l⁻¹, welche bei allen Präparaten verträglich war, mittig mit einer Multipette aufgetragen. Die Konzentration wurde etwas geringer gewählt als im Versuch mit der Dialysemembran, da höhere Konzentrationen bei einigen Varianten („Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) Schäden auf der Blattoberfläche verursacht hatten. Je Behandlung wurden acht Blatthälften behandelt. Die Blatthälften wurden auf Papiertücher in offene Petrischalen gelegt. Alle

Präparate blieben zunächst (2 Stunden) an der freien Laborluft, sodass ein Teil des Tropfenvolumens verdunstete. Das Ziel dabei war wie zuvor beschrieben, die Kupferkonzentration im Tropfen zu erhöhen und die Kupferaufnahme zu fördern. Anschließend wurde das Filterpapier befeuchtet und die Petrischale abgedeckt. Dadurch war eine Luftfeuchtigkeit von annähernd 100 % in der Petrischale eingestellt, sodass die Tropfen nicht vollständig eintrockneten. Nach 24 und 48 Stunden wurden je Behandlung vier Blatthälften und die entsprechende „Kontrolle“ geerntet. Der Kupfergehalt im Blatt wurde anschließend, wie bereits beschrieben, festgestellt.

4.2.3 Ergebnisse

4.2.3.1 Untersuchung der Ionenfreisetzung verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparate

Die Kupferkonzentration im Agar (Abb. 37, A) war bei der Behandlung „CuCl₂“ 24 Stunden nach der Applikation höher (8,1 µg g⁻¹) als bei „Kupferoxychlorid“ (1,7 µg g⁻¹) und bei „Cu-Np-Überstand“ (4,5 µg g⁻¹). „Cu-Np“ (6,0 µg g⁻¹) und „CuCl₂“ unterschieden sich zu dem Zeitpunkt nicht signifikant. Außerdem war „Cu-Np“ nicht verschieden zu „Cu-Np-Überstand“. Die Behandlung „Kupferoxychlorid“ hatte signifikant geringere Werte als alle anderen Behandlungen. Nach 48 Stunden erreichten die Behandlungen „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ das gleiche Niveau wie „CuCl₂“. Die Werte der Behandlung mit „Kupferoxychlorid“ waren auch nach 48 Stunden deutlich geringer als die aller anderen Behandlungen. Bei der prozentual aufgenommenen Menge der Cu²⁺-Ionen nach 24 Stunden (Abb. 37, B), wurde bei „CuCl₂“ der höchste Wert festgestellt (22,9 %), welcher zu allen anderen verschieden war. „Cu-Np“ (14,1 %) und „Cu-Np-Überstand“ (15,4 %) unterschieden sich nicht, waren jedoch höher als bei „Cu-Lebsosol“ (4,5 %). Nach 48 Stunden erreichten „Cu-Np“ (27,6 %) und „Cu-Np-Überstand“ (28,9 %) das gleiche Niveau wie „CuCl₂“ (32 %), während der Wert bei „Kupferoxychlorid“ im Vergleich zu der Messung nach 24 Stunden sogar etwas geringer war (4%).

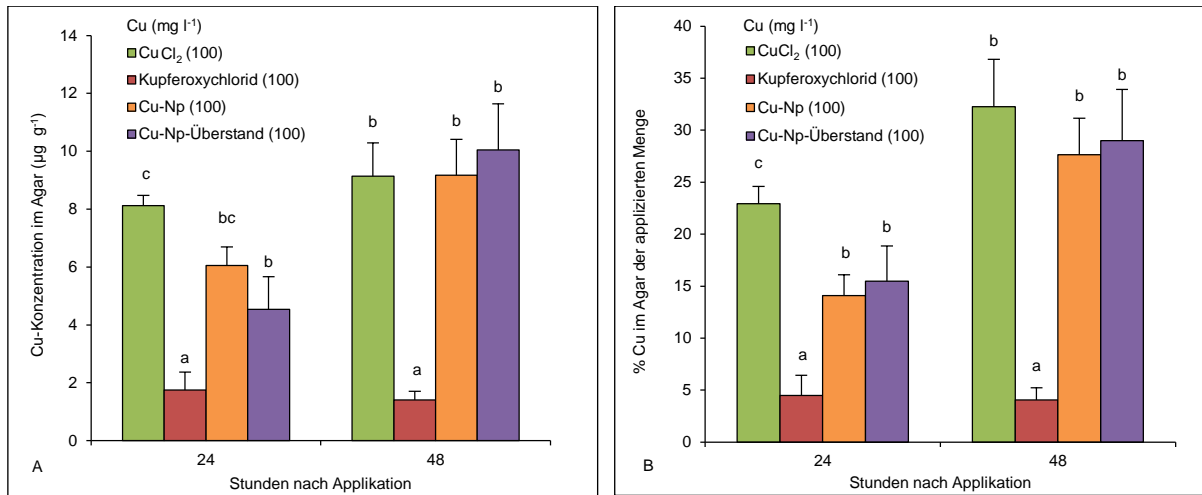


Abbildung 37: Cu-Konzentration (A) und prozentuale Cu-Aufnahme (B) in den Agar 24 und 48 Stunden nach der Tropfenapplikation verschiedener Kupferpräparate („CuCl₂“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) auf eine auf dem Agar aufliegende Dialysemembran (MWCO 500-100). Die Agar-Blöcke hatten eine Umgebungsfeuchte von 100%, sodass der Agar und die Tropfen nicht austrockneten. Die Werte entsprechen den Mittelwerten (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je vier Agarblöcke). Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zueinander werden mit unterschiedlichen Buchstaben markiert (Duncan Test, $\alpha = 0.05$).

4.2.3.2 Untersuchungen zur Kupferaufnahme in das Blatt (*S. telephium*) nach Applikation verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparaten

Der Vorversuch zum Vergleich zwischen den Methoden „Abwaschen“ und zunächst Abwaschen und anschließendem Abziehen („Abwaschen+Abziehen“) der Epidermis zeigte deutliche Unterschiede, sowohl bei der gemessenen Kupferkonzentration im Blatt als auch bei den Anteilen des Kupfers, die prozentual bezogen auf die applizierte Gesamtmenge im Blatt wiedergefunden wurden (Abb. 38, A und B). In beiden Fällen waren die Werte bei der Variante „Abwaschen“ deutlich höher.

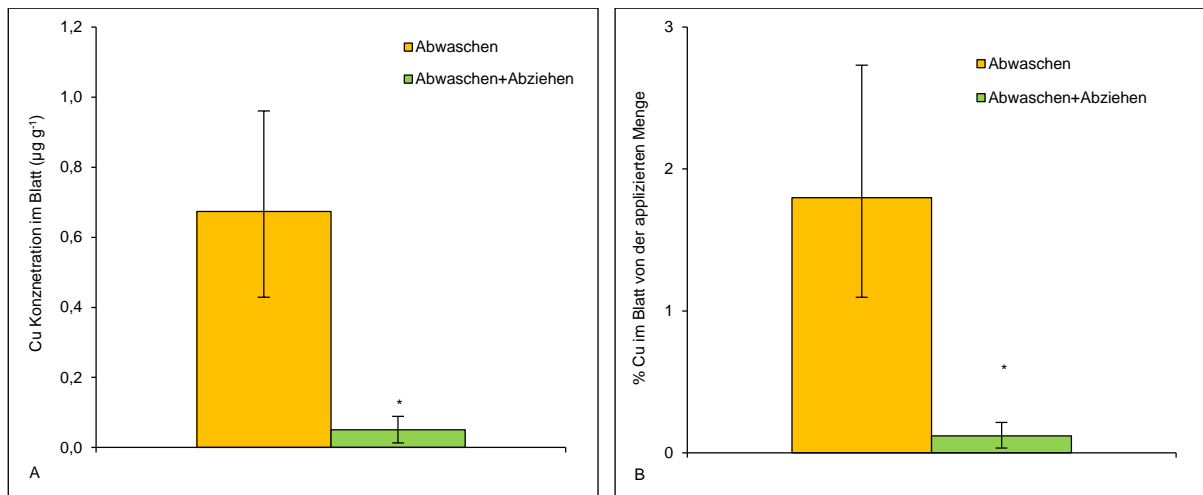


Abbildung 38: Cu-Konzentration (A) und prozentuale Cu-Aufnahme (B) im Blatt (*S. telephium*) 48 Stunden nach der Tropfenapplikation (5x16 µl) von „Cu-EDTA“ (80 mg l⁻¹) auf die Blattoberfläche. Es werden die Werte nach dem Abwaschen der Blattoberfläche mit den Werten nach Abwaschen der Oberfläche und zusätzlichem Abziehen der Epidermis miteinander verglichen. Die Proben wurden über den gesamten Versuchszeitraum bei 100% relativer Luftfeuchte gehalten, sodass nur geringfügige Teile des anfänglichen Tropfenvolumens verloren gingen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je fünf Blättern). Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test, logarithmierte Daten, p < 0.05) werden mit *-Symbol gekennzeichnet.

Im Vorversuch zum Einfluss des ansatzweisen Eintrocknens des Präparates (Cu-EDTA) auf die Kupferaufnahme waren die Werte der Kupferkonzentration sowie der prozentual aufgenommenen Menge Kupfer bei der Variante „Eintrocknen“ deutlich höher als bei der Variante „Feucht“, bei der die aufgetragenen Tropfen keine oder nur geringfügige Teile des Tropfenvolumens durch Verdunstung verloren hatten (Abb. 39, A und B).

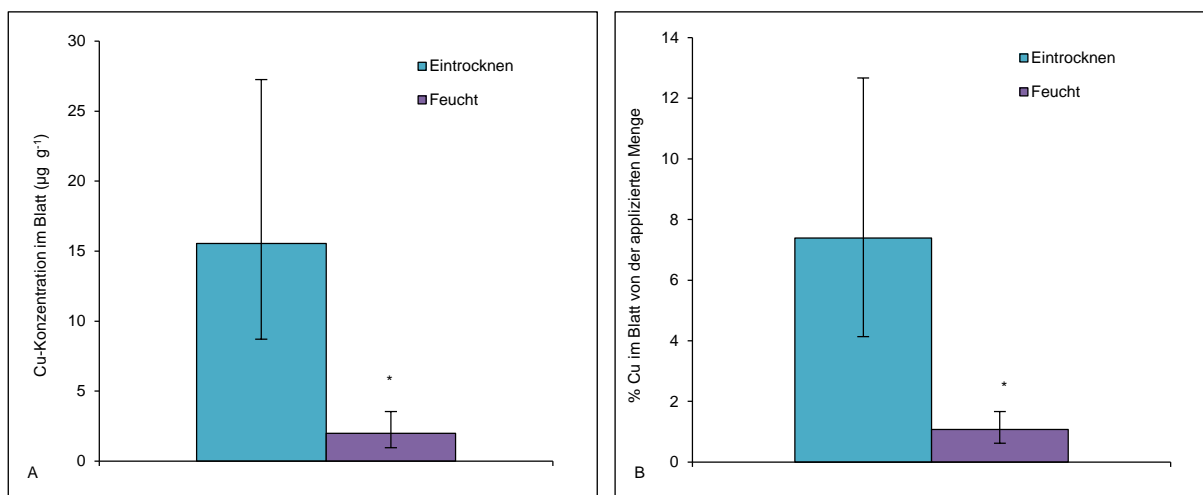


Abbildung 39 Cu-Konzentration (A) und prozentuale Cu-Aufnahme (B) im Blatt (*S. telephium*), 48 Stunden nach der Tropfenapplikation (7x12µl) von „Cu-EDTA“ (200 mg l⁻¹) auf die Blattoberfläche. Vergleich der Werte nach annäherndem Eintrocknen („Eintrocknen“) und nicht Eintrocknen („Feucht“) des Tropfens. Die Werte entsprechen dem Mittelwert (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je fünf Blättern). Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test, logarithmierte Daten, p < 0.05) werden mit *-Symbol gekennzeichnet.

Die verwendeten Präparate zeigten eine unterschiedliche Verträglichkeit auf der Blattoberfläche (*S. telephium*) in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration (Tab. 2). Die Behandlung „CuCl₂“ führte bereits bei einer Konzentration von 50 mg l⁻¹ zu Schäden an den Auflagestellen der Tropfen. Eine Konzentration von 10 mg l⁻¹ zeigte bei „CuCl₂“ noch keine Schäden. Bei „Cu-Np-Überstand“ trat eine Unverträglichkeit bei einer Konzentration von 100 mg l⁻¹ auf, während eine Konzentration von 80 mg l⁻¹ noch keine Schäden verursachte. „Cu-Np“ zeigte Schäden bei einer Konzentration von 200 mg l⁻¹, während 100 mg l⁻¹ noch verträglich waren. „Kupferoxychlorid“ und „Cu-EDTA“ zeigten keine Schäden im getesteten Bereich der Kupferkonzentrationen (10-200 mg l⁻¹).

Tabelle 2: Verträgliche und unverträgliche Konzentrationen (10, 50, 80, 100, 200 mg l⁻¹) verschiedener Kupferpräparate nach dem Aufbringen von fünf Tropfen zu je 15 µl auf die Blattoberfläche von *S. telephium*. Wenn keine der verwendeten Konzentrationen einen Schaden verursachte, wurde ein „-“ eingefügt.

	„CuCl ₂ “	„Cu-EDTA“	„Kupferoxychlorid“	„Cu-Np“	„Cu-Np-Überstand“
Appliziertes Tropfenvolumen	5x15 µl	5x15 µl	5x15 µl	5x15 µl	5x15 µl
Verträgliche Konzentrationen (mg l ⁻¹)	10	10-200	10-200	10-100	10-80
Unverträgliche Konzentrationen (mg l ⁻¹)	50-200	-	-	200	100-200

Im Experiment zur Kupferaufnahme (Abb. 40, A und B) aus den verschiedenen Präparaten in das Blattinnere (*S. telephium*) zeigte sich bei „Cu-EDTA“ nach 24 Stunden eine höhere Kupferkonzentration (9,8 µg g⁻¹) als bei den übrigen Behandlungen (2,5-3,0 µg g⁻¹). Die anderen Behandlungen („Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) unterschieden sich nicht voneinander. Nach 48 Stunden waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Behandlungen bei der Kupferkonzentration erkennbar. Bei der prozentual aufgenommenen Menge Kupfer zeigten sich ähnliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungen wie bei der Kupferkonzentration im Blatt. Verschieden war, dass nach 48 Stunden die Werte von „Cu-EDTA“ höher waren (13,5 %) als die von „Kupferoxychlorid“ (2,3 %). Die Behandlungen „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ (6,7 bzw. 4,4 %) unterschieden sich weder zu „Cu-EDTA“ noch zu „Kupferoxychlorid“. Die Werte der unbehandelten Blatthälfte wurden von den Werten der Behandlungen in beiden Diagrammen (Abb. 40, A und B) bereits abgezogen.

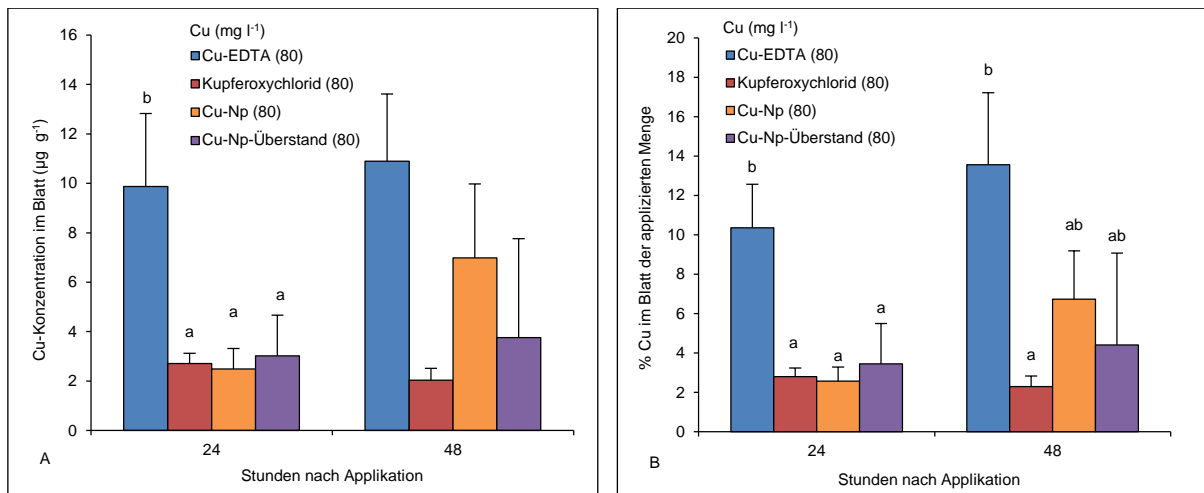


Abbildung 40: Cu-Konzentration (A) und prozentuale Cu-Aufnahme (B) im Blatt (*S. telephium*), 24 und 48 Stunden nach der Tropfenapplikation verschiedener Kupferpräparate („Cu-EDTA“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) auf die Blattoberfläche und anschließender Entfernung der Epidermis. Nach 2 Stunden wurde eine Luftfeuchte von annähernd 100% eingestellt, sodass die Tropfen nicht vollständig eintrockneten, jedoch nicht mehr das anfängliche Volumen hatten. Die Werte entsprechen dem Mittelwert (+Standardfehler) der jeweiligen Behandlung (je fünf Blättern). Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) werden mit unterschiedlichen Buchstaben markiert (Duncan Test, $\alpha = 0.05$).

4.2.4 Diskussion

4.2.4.1 Untersuchung der Ionenfreisetzung verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparate

Im Experiment mit der Dialysemembran wurde deutlich, dass die Cu^{2+} -Ionenfreisetzung je nach Kupferpräparat verschieden war (Abb. 37). In diesem Versuch wurde „ CuCl_2 “ als Vergleichsvariante verwendet, da „Cu-EDTA“ offenbar ein zu großer Komplex ist, um durch die Membran zu diffundieren. Vorversuche (nicht dargestellt) zeigten nur äußerst geringe Freisetzungen von Kupfer bei der Verwendung von „Cu-EDTA“. Dies belegt auch, dass nur gelöste Cu^{2+} -Ionen die Membran passieren können, sodass auch ein Durchtritt ganzer Cu-Np ausgeschlossen werden kann. Sowohl bei der festgestellten Kupferkonzentration im Agar als auch bei der prozentual aufgenommenen Menge der Cu^{2+} -Ionen in den Agar erzielten die Np-Präparate („Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“) nach 48 Stunden das gleiche Niveau wie „ CuCl_2 “. Nach 24 Stunden waren die Werte dieser beiden Parameter bei „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ größtenteils (außer die Kupferkonzentration im Agar bei „Cu-Np“) noch signifikant geringer als bei „ CuCl_2 “. Dies weist daraufhin, dass bei beiden Varianten („Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“) über eine Dauer von 48 Stunden eine stetige Freisetzung von Cu^{2+} -Ionen stattfand. Bei dem anderen partikulären Präparat („Kupferoxychlorid“) war dies nicht zu beobachten. Hier wurden nach 48 Stunden ähnliche Werte festgestellt wie bereits nach 24 Stunden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass bei „Kupferoxychlorid“ unter den Bedingungen dieses Experiments nur die zu Beginn bereits in der Suspension vorhandene Menge Cu^{2+} -Ionen vom Agar aufgenommen wurde und keine weitere Cu^{2+} -Ionenfreisetzung von den Partikeln stattfand. Andere Studien untersuchten die

Freisetzung von Cu^{2+} -Ionen vorwiegend im Zusammenhang mit der Toxizität der Cu-Np. Dabei wurden sowohl verschiedene Größen und Formen von Cu-Np als auch eine ganze Reihe verschiedener Methoden zur Bestimmung der Menge gelöster Cu^{2+} -Ionen gewählt, sodass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nur bedingt möglich ist. So nutzten Mortimer et al. (2010) Cu^{2+} -sensorische, lumineszierende Bakterien (*E. coli* MC1061), um die Konzentration freier Cu^{2+} -Ionen nach Zugabe von Cu-Np (CuO, 30 nm) in einem Nährmedium zu bestimmen. Im Vergleich zu Cu-Bulk (0,12 % der Gesamtmenge Cu) hatten dabei die Cu-Np (2,0 % der Gesamtmenge Cu) eine deutlich gesteigerte Löslichkeit. In einer anderen Studie wurde eine Löslichkeit der Cu-Np (25 nm) von 1,2 % (nach 5 Minuten) und 2,1 % (nach 2 Stunden) im Überstand einer künstlichen Magenflüssigkeit gemessen (Lei et al. 2008). Studer et al. (2010) zeigten bei Analysen des Überstandes einer Cu-Np (20 nm) Suspension nach Zentrifugation, dass mit sinkendem pH-Wert (7,4; 7,0; 5,5) eine zunehmende Löslichkeit (0,1 %; 0,3%; 95%) in Wasser festzustellen war. Gunawan et al. (2011) stellten ebenfalls mit Hilfe eines Membranfilters eine hohe Löslichkeit (80-95 %) von CuO-Np (14 nm) im Vergleich zu CuO-Bulk (1-8 %) in verschiedenen Kulturmedien für Bakterien fest. Baek und An (2011) verwendeten einen Membranfilter, um die Löslichkeit der Cu-Np (20-30 nm) zu bestimmen. Dabei wurde mit zunehmender CuO-Np-Konzentration (25-125 mg l^{-1}) eine abnehmende relative Löslichkeit (5-2 %) festgestellt. Eine weitere Studie zeigte mit Hilfe eines Dialyseschlauches bei kugelförmigen CuO-Np (7 nm) eine Löslichkeit von 3,5 % und bei stäbchenförmigen CuO-Np (7-40 nm) nur eine Löslichkeit von 1 % (Misra et al. 2012). Miao et al. (2015) verwendeten einen Membranfilter, um die Partikel von den gelösten Anteilen zu trennen und bestimmten die Menge der Cu^{2+} -Ionen in Anwesenheit verschiedener natürlicher organischer Materialien (NOM). Dabei stieg die Löslichkeit mit zunehmender Konzentration der NOM. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass eine abnehmende Partikelgröße bei Cu-Np zu einer höheren Löslichkeitsrate führt (Misra et al. 2012). Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und anderer Studien zur Folge scheint die Löslichkeit bzw. das Freisetzungsvermögen von Cu-Np von verschiedenen Parametern wie z.B. Partikelgröße, -form, Medium und pH-Wert abhängig zu sein.

4.2.4.2 Untersuchungen zur Kupferaufnahme in das Blatt (*S. telephium*) nach Applikation verschiedener partikulärer und gelöster Kupferpräparaten

Auf Grund des Widerspruchs der gezeigten Wirkung bei *C. sativus* und der festgestellten Aufnahme in das Blatt der verschiedenen Präparate bei *G. max* aus dem vorherigen Abschnitt (4.1.4.4) wurde eine neue Methodik entwickelt. Dabei konnte ein Einfluss auf die Messung der Kupferaufnahme durch verbleibende Rückstände auf der Blattoberfläche nach dem Abwaschen ausgeschlossen werden. Der erste Vorversuch (Abb. 38) zeigt deutlich, dass die gemessenen Kupferkonzentrationen, nachdem die Blattoberfläche nur abgewaschen worden war („Abwaschen“), deutlich höher waren als bei der Variante, bei der nach dem Abwaschen der Präparate zusätzlich die Epidermis entfernt wurde („Abwaschen+Abziehen“). Dies zeigt, dass entweder Rückstände auf der Blattoberfläche oder möglicherweise auch bereits in die Epidermis aufgenommenes Kupfer Einfluss auf die Messung hatte.

Durch das Abziehen der Epidermis konnte jedoch sichergestellt werden, dass nur bereits in das Blattinnere aufgenommenes Kupfer berücksichtigt wurde und somit eine eindeutige Beurteilung der Aufnahme garantiert war. Durch das Abziehen der Epidermis wird die Aufnahme jedoch eher unterschätzt, da die Cu-Mengen, die bereits in die Zellen der Epidermis, also ins Blattinnere aufgenommen worden waren, nicht mit einbezogen wurden. Die Ergebnisse bestätigen den Vorteil dieser Methodik. Jedoch waren im Vorversuch die festgestellten Kupferkonzentrationen und prozentual aufgenommen Cu-Mengen bei „Abwaschen+Abziehen“ ($0,05 \mu\text{g g}^{-1}$; 0,12%) und „Abwaschen“ ($0,67 \mu\text{g g}^{-1}$; 1,8%) relativ gering. In diesem Experiment, wurde von Beginn an eine annähernd 100-prozentige Luftfeuchtigkeit eingestellt, sodass die aufgetragenen Tropfen über den gesamten Versuchszeitraum kaum an Volumen verloren haben. Dadurch war der Konzentrationsgradient in das Blatt relativ gering, wodurch die geringe Kupferaufnahme zu erklären ist. Eichert et al. (1998) stellten bereits fest, dass die Aufnahmeraten anionischer Stoffe in das Blatt durch den Prozess des Eintrocknens maximiert wurden. Daher wurde in einem weiteren Vorversuch (Abb. 39) der Einfluss des Eintrocknens der Tropfen auf der Blattoberfläche auf die Aufnahme in das Blatt untersucht. Der Prozess des annähernden Eintrocknens und damit der Anstieg der Kupferkonzentration im Tropfen zeigten einen deutlichen Einfluss auf die Aufnahme. So war die Kupferkonzentration nach dem Eintrocknen im Blatt deutlich höher ($15,5 \mu\text{g g}^{-1}$) als bei der Variante, bei der die Tropfen nicht eintrockneten ($2,0 \mu\text{g g}^{-1}$). Gleiches gilt für die prozentual aufgenommene Menge Kupfer, wobei Werte von 7,4 % („Eintrocknen“) und 1,0 % („Feucht“) gemessen wurden. Basierend auf den Erkenntnissen der Vorversuche war die entwickelte Methodik für die Beurteilung der Kupferaufnahme aus den jeweiligen Kupferpräparaten geeignet, unter der Voraussetzung, dass die aufgetragenen Tropfen auf der Blattoberfläche ansatzweise, jedoch nicht vollständig, eintrockneten. Zuvor wurde noch die Verträglichkeit der verschiedenen Präparate in verschiedenen Konzentrationen bei *S. telephium* getestet (Tab. 2). „Cu-EDTA“ und „Kupferoxychlorid“ zeigten bei den verwendeten Kupferkonzentrationen (10, 50, 80, 100, 200 mg l^{-1}) keine Schäden. Die unverträgliche Dosis bei „CuCl₂“ lag zwischen 10 und 50 mg l^{-1} und war damit die geringste, die einen Schaden verursachte. Die unverträglichen Kupferkonzentrationen lagen bei „Cu-Np“ zwischen 100 und 200 mg l^{-1} und bei „Cu-Np-Überstand“ zwischen 80 und 100 mg l^{-1} . Bei der Beurteilung der Verträglichkeit ist darauf hinzuweisen, dass verschiedene Pflanzenarten unterschiedliche Verträglichkeitsschwellen haben können. Außerdem kann die Empfindlichkeit gegenüber den Präparaten auch durch Umweltbedingungen wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Lichtintensität sowie Tropfenvolumen und Wirkdauer beeinflusst werden. So zeigten im vorangegangenen Versuch *G. max* die Blätter bei der Behandlung mit „Cu-EDTA“, „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ nach 48 Stunden bereits Schäden bei einer Konzentration von 40 mg l^{-1} (Abb. 32, B, D und E). Demgegenüber verursachten Sprühapplikationen (80 mg l^{-1}) bei *A. sativa* keine offensichtlichen Schäden (vgl. Abschnitt 4.1.3.2). Bei den Untersuchungen zum Schutz gegenüber Echtem Mehltau wurde bei *C. sativus* sogar eine Konzentration von 180 mg l^{-1} Cu („Cu-EDTA“, „Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) als Sprühapplikation verwendet, ohne offensichtliche Schäden zu

verursachen (vgl. Abschnitt 4.1.3.5). Es ist davon auszugehen, dass die vorhandene Menge freier Cu^{2+} -Ionen für die Schäden verantwortlich ist. Auf Grund der schlechten Verträglichkeit von „ CuCl_2 “ bei *S. telephium* wurde als Vergleichsvariante, die Kupfer in gelöster Form enthielt, „Cu-EDTA“ verwendet. Diese führte in den ersten 24 Stunden zu höheren Kupferkonzentration im Blatt (Abb. 40, A) als bei den übrigen Behandlungen. Die übrigen Varianten („Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“) unterschieden sich zu diesem Zeitpunkt nicht. Nach 48 Stunden unterschieden sich die Kupferkonzentrationen im Blatt bei keiner der Behandlungen mehr signifikant, waren jedoch bei „Cu-EDTA“ am höchsten. Bei der prozentual aufgenommenen Menge Kupfer nach 24 Stunden (Abb. 40, B) erzielte die Behandlung mit „Cu-EDTA“ den höchsten Wert, während sich die übrigen Behandlungen („Kupferoxychlorid“, „Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“) nicht unterschieden. Nach 48 Stunden hatten die Behandlungen „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ ein höheres Niveau als nach 24 Stunden erreicht und unterschieden sich nicht mehr zu „Cu-EDTA“, was auf eine stetige, jedoch etwas langsamere Aufnahme von Kupfer hinweist. Der Unterschied von „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ zu „Kupferoxychlorid“ war nach 48 Stunden jedoch nicht signifikant. „Kupferoxychlorid“ hatte nach 48 Stunden bei der prozentual aufgenommene Menge Kupfer immer noch einen geringeren Wert als bei „Cu-EDTA“ und zeigte einen ähnlichen Wert wie bereits nach 24 Stunden, sodass hier nicht von einer stetigen Kupferaufnahme, bezogen auf den Zeitraum von 48 Stunden auszugehen ist. Bei den Präparaten „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ wurde im Versuch mit Agar (vgl. Abschnitt 4.2.3.1) mit zunehmender Zeit eine steigende Freisetzung der Cu^{2+} -Ionen festgestellt (Abb. 37, B). Im Versuch mit *S. telephium* stieg die prozentuale Kupferaufnahme bei „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ mit der Zeit an (Abb. 40, B). Wenn man diese beiden Erkenntnisse zusammenführt, lässt sich vermuten, dass bei diesen beiden Präparaten („Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“) vorwiegend eine ionische Aufnahme in das Blatt (*S. telephium*) stattfand, sodass die Aufnahme von Partikeln weiterhin als unwahrscheinlich eingeschätzt wird. Dennoch kann die Aufnahme ganzer Partikel bei den Präparaten „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“, über z.B. die Stomata unter den angewendeten Versuchsbedingungen nicht ausgeschlossen werden. Bei „Kupferoxychlorid“ nahm die Cu^{2+} -Ionenfreisetzung im Experiment mit Agar (vgl. Abschnitt 4.2.3.1) und die prozentuale Aufnahme in das Blatt (*S. telephium*) mit der Zeit nicht zu. Dadurch lässt sich vermuten, dass nur zu Anfang in der Suspension verfügbare Cu^{2+} -Ionen aufgenommen werden und keine zusätzliche Freisetzung von Cu^{2+} -Ionen aus dem partikulären Material und damit Aufnahme stattfand. Die Aufnahme ganzer Partikel wird auch bei „Kupferoxychlorid“ eher als unwahrscheinlich eingeschätzt. Bisherige Studien beschreiben zwei verschiedene Aufnahmewege über die Blattoberfläche. Für lipophile Stoffe wird eine Aufnahme über Polymere der Kutikula beschrieben (Schönherr 2002). Für polare und ionische Stoffe besteht die Möglichkeit des Eindringens in das Blatt über hydrophile Bereiche der Kutikula (Schönherr 1976, 2000). Sogenannte wässrige polare Poren sollen sich bilden, wenn Wassermoleküle an hydrophileren Bestandteilen der Kutikula adsorbiert werden und eine Art flüssige Verbindung zwischen der Blattoberfläche und dem Blattinneren bilden, die eine Diffusion in das Blattinnere ermöglicht (Chamel et al. 1991; Tyree et al. 1990). Der Radius

dieser Poren wird auf einen Bereich zwischen 0,3 nm (Schönherr 1976; Popp et al. 2005) und 2,4 nm (Eichert und Goldbach 2008) geschätzt. Eine weitere Möglichkeit des Eindringens von polaren Substanzen in das Blattinnere besteht über die Stomata (Eichert et al. 1998; Eichert und Burkhardt 2001; Eichert und Goldbach 2008), wobei je nach Pflanzenart der Porendurchmesser auf größer als 20 nm geschätzt wird (Eichert und Goldbach 2008). Bei der Aufnahme über Stomata wird ebenfalls vermutet, dass Wasser an hydrophile Komponenten der Oberfläche der Kutikula der Schließzellen adsorbiert und somit eine Verbindung in das Blattinnere besteht (Eichert und Burkhardt 2001). Eichert et al. (2008) konnten belegen, dass die Aufnahme von Partikeln über Stomata mit einer Größe von 43 nm möglich ist, während größere Partikel (1,1 µm) nicht in das Blattinnere gelangten. Kaiser (2014) zeigte hingegen, dass die stomatare Aufnahme von relativ großen mineralischen CaCO₃-Partikeln (Partikelgröße: 1-4 µm) möglich ist, jedoch nur, wenn eine siliziumorganischen Verbindung als Netzmittel verwendet wurde, die stomatare Infiltration auslösen kann. Ein solches Netzmittel wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet, sodass nicht davon auszugehen ist, dass µm-Partikel aufgenommen werden konnten. Bei den verwendeten Cu-Np (10 nm laut Herstellerangaben) sollte eine partikuläre Aufnahme jedoch theoretisch möglich sein, was jedoch nach den erzielten Ergebnissen eher als unwahrscheinlich eingeschätzt wurde. Eine potentielle Ursache für die ausbleibende Aufnahme ganzer Partikel könnte mit der möglichen Ausbildung größerer Aggregate (im Bereich mehrerer µm) in der Suspension zusammenhängen.

Die eingangs formulierte Hypothese (4) vermutet einen Vorteil darin, dass bei „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ höhere Konzentrationen auf die Blattoberfläche aufgetragen werden können als beim selben Stoff in gelöster Form, ohne dass Blattschäden durch die Applikation entstehen und dennoch eine stetige Nährstoffaufnahme erzielt wird. Dies konnte teilweise bestätigt werden. Im Vergleich zu „CuCl₂“ waren die Stoffe „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ tatsächlich verträglicher (vgl. Tab. 2). Im Vergleich zu „Cu-EDTA“ waren die Np-Präparate („Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“) weniger verträglich (vgl. Tab. 2). Eine verträgliche Konzentration (40 mg l⁻¹) der Np-Präparate („Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“) bewirkte jedoch über eine Dauer von 48 Stunden eine gleich gute prozentuale Kupferaufnahme wie „Cu-EDTA“ (Abb. 40, B). Die Behandlungen mit „Cu-EDTA“ und „Kupferoxychlorid“ zeigte keine Schäden bei den getesteten Konzentrationen (10-200 mg l⁻¹). Bei „Kupferoxychlorid“ wurde jedoch auch die schwächste Wirkung (vgl. Abschnitt 4.1.3.4) und prozentuale Kupferaufnahme (vgl. Abschnitt 4.2.3.2) gezeigt, was vermutlich mit dem geringen Ionenfreisetzungsvermögen (vgl. Abschnitt 4.2.3.1) dieser Partikel zusammenhängt. Das Präparat „Cu-EDTA“ hatte im Vergleich zu den anderen Präparaten die beste Verträglichkeit und wurde am schnellsten und in den höchsten Mengen aufgenommen.

4.3 Zusammenfassende Diskussion

Die gewonnenen Erkenntnisse zum Cu^{2+} -Ionenfreisetzungsverhalten und zur Kupferaufnahme in das Blatt decken sich mit den zuvor festgestellten Düngeeffekten (vgl. Abschnitt 4.1.4.1 - 4.1.4.6) auf die Biomasse und den Chlorophyllgehalt von Pflanzen, die unter Kupfermangel litten. Damit wurde gezeigt, dass ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Düngewirkung, der Nährstoffaufnahme und dem Ionenfreisetzungsvermögen der Stoffe besteht. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Technik der Entfernung der Epidermis zu einem verlässlichen Ergebnis bei der Beurteilung der Aufnahme von Stoffen in das Blattinnere führte. Das alleinige oberflächliche Abwaschen der Präparate scheint die Ergebnisse bezüglich der aufgenommenen Mengen in das Blattinnere eines Stoffes zu überschätzen. Die zuvor in 4.1.4.4 beschriebene effektivere Wirkung der Behandlungen „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ ist im Vergleich zu einem herkömmlichen partikulären Blattdüngemittelpräparat („Kupferoxychlorid“), vermutlich auf eine bessere Cu^{2+} -Ionenfreisetzung (Abb. 37) und bessere Kupferaufnahme (Abb. 40) zurückzuführen. Im Vergleich zu dem gelösten Präparat (CuCl_2) war die Düngewirkung von „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ meistens etwas schwächer (vgl. Abschnitt 4.1), was möglicherweise mit der etwas langsameren Cu^{2+} -Ionenfreisetzung (Abb. 37) und langsameren Kupferaufnahme (Abb. 40) zusammenhing. Wie aus den REM-Untersuchungen hervorgeht, war die durchschnittliche Größe der Partikel bei „Cu-Np-Überstand“ offensichtlich kleiner als bei „Cu-Np“ (vgl. Abschnitt 4.1.3.4). Die exakte durchschnittliche Größe der Partikel des jeweiligen Präparates wurde jedoch nicht quantifiziert. Trotz des vermeintlichen Größenunterschiedes verzeichneten „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ jedoch die gleiche Düngewirkung (vgl. Abschnitt 4.1.3.4) und das gleiche Cu^{2+} -Ionenfreisetzungsvermögen (vgl. Abschnitt 4.2.3.1). Die prozentuale Aufnahme von Kupfer in das Blatt war bei beiden Behandlungen („Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“) ebenfalls gleich (vgl. Abschnitt 4.2.3.2). Jedoch hatte „Cu-Np“ eine bessere Verträglichkeit als „Cu-Np-Überstand“, da es in höheren Konzentrationen aufgetragen werden konnte als „Cu-Np-Überstand“, ohne dabei Schäden zu verursachen (vgl. Tab. 2). Die schlechtere Verträglichkeit von „Cu-Np-Überstand“ hing vermutlich mit einem höheren Anteil anfänglich vorhandener Cu^{2+} -Ionen in dem Behandlungspräparat zusammen, was eine Folge der Zentrifugation des Materials war. Im Vergleich zu „ CuCl_2 “ konnte bei den Np-Präparaten („Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“) eine bessere Verträglichkeit (vgl. Tab. 2) festgestellt werden. Verglichen mit „Cu-EDTA“ waren „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ schlechter Verträglich, erzielten jedoch bei einer verträglichen Konzentration mit zunehmender Versuchsdauer eine ähnlich hohe Kupferaufnahme. Für die Fe-Np wurde keine Düngewirkung festgestellt, was vermutlich daran lag, dass sich relativ schnell nicht wasserlösliche Eisenoxidverbindungen (Fe_3O_4) in der Suspension oder auf der Blattoberfläche bildeten.

Bei der Untersuchung des protektiven Schutzes gegen echten Mehltau zeigte „Cu-EDTA“ die effektivste und am längsten anhaltende Wirkung im Vergleich zu den anderen Kupferpräparaten. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass die Wirkung in erster Linie mit der Menge freier Cu^{2+} -Ionen zusammenhängt.

Die Präparate „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ setzen zwar stetig Cu^{2+} -Ionen frei, vermutlich jedoch nur so lange die Präparate nicht eingetrocknet waren und nur an Stellen, an denen die Np auf der Blattoberfläche auflagen. Im Versuch zur Schutzwirkung gegenüber Echtem Mehltau trockneten die Präparate jedoch rasch auf der Pflanzenoberfläche ein, sodass die Cu^{2+} -Freisetzung vermutlich gering war und gegenüber „Cu-EDTA“ eine deutlich geringere effektive Menge Cu^{2+} -Ionen auf der Pflanzenoberfläche vorhanden war. Auch wenn eine stetige Ionenfreisetzung stattfindet, ist von keiner besseren horizontalen oberflächlichen Verteilung der Ionen auszugehen, was eine Voraussetzung für einen besseren protektiven Schutz wäre. Daher nahm der Befall bei den Pflanzen, die mit „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ behandelt worden waren, schneller zu als bei „Cu-EDTA“. Das gleiche galt für das Präparat „Kupferoxychlorid“. Eine systemische Wirkung wurde für keines der Kupferpräparate festgestellt.

4.4 Schlussfolgerung

Insgesamt zeigen die Ergebnisse (Abschnitt 4), dass Nano-Pflanzennährstoffe im Fall der Cu-Np als Depot auf die Blattoberfläche aufgetragen werden können und dort eine Nährstoffaufnahme in das Blatt erfolgt wodurch letztendlich eine Düngewirkung erzeugt wird. Vermutlich steht die Düngewirkung bzw. Kupferaufnahme im Zusammenhang mit dem Cu^{2+} -Ionenfreisetzungsvermögen des jeweiligen Präparates. Der Untersuchungszeitraum mit 48 Stunden war jedoch relativ gering, sodass keine Aussage zur Wirkweise über einen längerfristigen Zeitraum getätigt werden kann. Im Vergleich zu „ CuCl_2 “ waren bei den Cu-Np-Präparaten („Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“) höhere Anwendungskonzentrationen möglich, ohne Blattschäden zu verursachen (vgl. Tab. 2). Gegenüber „Cu-EDTA“ verursachten die Cu-Np-Präparate allerdings bereits bei geringeren Konzentrationen Schäden auf der Blattoberfläche. Die Verträglichkeit der Präparate steht vermutlich im Zusammenhang mit den anfänglich vorhanden freien Cu^{2+} -Ionen, welche in hohen Konzentrationen Schäden auf der Blattoberfläche verursachen. In den meisten Fällen wurde durch die Cu-Np keine effektivere Wirkung erzielt als bei den gelösten Präparaten. Wenn die auf der Blattoberfläche eingetrockneten Präparate regelmäßig wiederbefeuchtet wurden, wirkten die gelösten Präparate bei geringeren Konzentrationen (20 mg l^{-1}) etwas besser als „Cu-Np“ (vgl. Abschnitt 4.1.4.1). Lediglich bei einer ausbleibenden Wiederbefeuchtung der eingetrockneten Präparate auf der Blattoberfläche erzielte „Cu-Np“ eine etwas effektivere Wirkung als „ CuCl_2 “ (vgl. Abschnitt 4.1.4.1). Dabei war jedoch insgesamt eine höhere Anwendungskonzentration (80 mg l^{-1}) nötig. Bei einer Anwendung von „Cu-Np“ unter natürlichen Umweltbedingungen wäre jedoch durch Regenwasser oder sich niederschlagende Luftfeuchtigkeit eine regelmäßige Wiederbefeuchtung gewährleistet, wodurch der gezeigte Vorteil der Behandlung „Cu-Np“ zunichte gemacht werden würde. In diesem Zusammenhang und im Hinblick auf eine längerfristige Wirkung müsste jedoch auch die Regenfestigkeit der miteinander zu vergleichenden Stoffe berücksichtigt werden. Möglicherweise lassen sich Np-Präparate nicht so leicht Abwaschen wie gelöste Präparate, wodurch wiederum ein Vorteil für die Np-Präparate entstehen würde. Diese Untersuchungen

wurden im Rahmen der Arbeit jedoch nicht durchgeführt. Im Vergleich zu einem herkömmlichen partikulären Blattdünger (Kupferoxychlorid) war eine effektivere Wirkung der Behandlungen „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ bei einer Konzentration von 40 mg l^{-1} festzustellen. Für die getesteten Fe-Np konnte keine Wirkung gezeigt werden, was vermutlich mit der raschen Bildung von nicht pflanzenverfügbaren Eisenoxiden zu erklären ist. Es wird darauf hingewiesen, dass die durchschnittliche Größe der Partikel sowohl bei „Cu-Np“ und „Cu-Np-Überstand“ als auch den Fe-Np nach dem Eintrocknen auf der Oberfläche offensichtlich nicht einem „Nanomaterial“ gemäß der zu Beginn formulierten Definition (1.1) entspricht. Ob die Partikel vor dem Eintrocknen in der Suspension eine kleinere Größe hatten, bleibt unklar. Dadurch können die Ergebnisse nicht eindeutig belegen, ob Stoffe, die explizit als „Nano“ deklariert sind, wirklich eine gesonderte Wirkung im Vergleich zu größeren Partikeln oder gelösten Materialien des gleichen Stoffes haben. Sollte eine gesonderte Wirkung von Nanomaterialien oder auch größeren partikulären Strukturen im Hinblick auf die Pflanzenernährung vorhanden sein, so steht diese sicherlich im Zusammenhang mit dem Ionenfreisetzungsvermögen des Stoffes, wie sich durch die Ergebnisse vermuten lässt. Die Aufnahme ganzer Partikel z. B. durch Stomata ist unter Berücksichtigung der Größe der Partikel zwar durchaus denkbar, wurde jedoch, wegen der gemessenen Konzentrationen im Blattinneren (*S. telephium*) und im Zusammenhang mit dem Ionenfreisetzungsvermögen (Agar) sowie der Ausbildung größerer Aggregate nach dem Eintrocknen auf der Blattoberfläche, eher als unwahrscheinlich eingeschätzt. Im Hinblick auf eine protektive Schutzwirkung gegenüber Echtem Mehltau verzeichnete keines der partikulären Präparate („Cu-Np“, „Cu-Np-Überstand“ und „Kupferoxychlorid“) eine bessere Wirkung als das gelöste Präparat (Cu-EDTA). Eine systemische fungizide Wirkung wurde weder für eines der partikulären noch für das gelöste Präparat nachgewiesen.

5 Fazit und Ausblick

5.1 Potentielle Wirkungen und Risiken von Nanomaterialien in Bezug auf Pflanzen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern wichtige Erkenntnisse im Hinblick auf die Bewertung der Wirkung von Nanomaterialien auf die Entwicklung von Pflanzen. Es wurde betont, dass eine Vielzahl von Eigenschaften, wie z.B. die Löslichkeit und die Anwesenheit von Stabilisatoren die Wirkung von Nanomaterialien beeinflussen können. Die Ergebnisse bestätigen, dass im Vergleich zu den entsprechenden Bulk-Materialien für Np eine gesonderte Bewertung der Wirkung auf Pflanzen notwendig ist. Bei der Identifizierung der Wirkursachen der Ag-Np auf die Pflanzenentwicklung wurde gezeigt, dass ein Großteil der negativen Einflüsse durch freigesetzte Ag^+ -Ionen hervorgerufen wurde. Zusätzlich konnte in Abhängigkeit von der verwendeten Pflanzenspezies und der Expositionsdauer ein zusätzlicher „Ag-Np-Effekt“ festgestellt werden, der womöglich jedoch durch die Zugabe von CaCl_2 gefördert wurde. Bei der Beurteilung der Wirkung von Nanomaterialien sollte die Erforschung der Ursache-Wirkungsbeziehung stets im Mittelpunkt stehen. Dies bietet die Grundlage, mögliche Risiken

oder positive Eigenschaften von Nanostoffen langfristig beurteilen zu können. Da die Untersuchungen unter weitestgehend kontrollierten Bedingungen durchgeführt wurden, ist eine direkte Übertragung der Ergebnisse über die Wirkung von Np auf das Wachstum von Pflanzen auf realistische Szenarien unter Umweltbedingungen nur bedingt möglich. Im Hinblick auf die Auswirkung von Nanomaterialien auf Pflanzen oder andere Organismen sollte daher für weiterführende Studien unbedingt das Verhalten von Nanomaterialien in umweltrelevanten Medien, wie z.B. Böden oder Gewässern im Fokus stehen. Dazu bedarf es vor allem Techniken, die es ermöglichen Nanomaterialien in diesen Medien zu erkennen und von natürlichen Partikeln zu unterscheiden. In diesem Zusammenhang ist es grundlegend notwendig, dass tatsächliche Konzentrationen von Nanostoffen in der Umwelt quantifiziert werden, um mögliche Risiken besser abschätzen und Inhalte weiterführender Forschungsarbeiten festlegen zu können. Es sollte verstärkt die Aggregations- und Löslichkeitskinetik der entsprechenden Nanomaterialien untersucht werden, da diese Eigenschaften grundlegend die Wirkung auf Organismen beeinflussen. Mit diesen Kenntnissen ließen sich zukünftig Untersuchungen zur Wirkung von Nanomaterialien unter umweltnahen Bedingungen durchführen, wodurch mögliche Risiken realistischer eingeschätzt werden könnten. Die Ursachen der in dieser Arbeit und auch in anderen veröffentlichten Studien gezeigten positiven Wirkungen von Nanomaterialien auf die Entwicklung von Pflanzen in einer nicht zielgerichteten Anwendung, sollten ebenfalls in weiterführender Studien untersucht werden. Zusätzlich sollte, um mögliche Gefahren durch das Anreichern von Nanomaterialien in der Nahrungskette vorzubeugen, die mögliche Akkumulation von Nanomaterialien in Ökosystemen und Pflanzen unbedingt näher erforscht werden. Dabei wäre es interessant, mögliche Aufnahmewege der Np, wie z. B. Stomata oder Wurzeln, sowie deren mögliche Verlagerungen innerhalb der Pflanzen im Detail zu erforschen.

5.2 Zielgerichtete Einsatzmöglichkeiten von Nanomaterialien in der Pflanzenproduktion

Im Hinblick auf gezielte Anwendungsmöglichkeiten von Nanomaterialien für landwirtschaftliche Zwecke ist es insgesamt sehr fragwürdig, ob sie sich gewinnbringend einsetzen lassen. Die zumeist unbekannte Kinetik (wie z. B. Aggregations- und Löslichkeitsverhalten) und geringe Stabilität von Nanomaterialien unter Umweltbedingungen lassen bisher keine zielgerichteten verlässlichen Anwendungen zu. Darüber hinaus sind die Risiken einer möglichen Anreicherung von Np in der Nahrungskette durch landwirtschaftliche Anwendungen bisher nicht hinreichend untersucht und beurteilt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Np-Präparate teilweise eine Wirkung als Dünger oder Pflanzenschutzmittel erzeugen konnten, wobei jedoch die Wirkungen im Vergleich zu gelösten Präparaten meistens weniger effektiv waren. Im Vergleich zu einem herkömmlichen partikulären Präparat war durch die Np eine effektivere Wirkung festzustellen. Mögliche vorteilhafte Anwendungen wären durch die gezeigte Eigenschaft, über einen Zeitraum von 48 Stunden stetig Nährstoffe freizusetzen, durchaus vorstellbar. Hier besteht der Bedarf, die Freisetzungsraten auch über einen längeren Zeitraum zu beurteilen. Um die Wirkweise besser zu verstehen, wären z.B. weitere

Untersuchungen der Nährstoffaufnahmen bei verschiedenen Luftfeuchten in das Blatt denkbar. Um die Wirkung unter natürlichen Bedingungen besser beurteilen zu können, sollte der Einfluss mehrfachen Eintrocknens und wiederbefeuchten auf Ionenfreisetzungsraten untersucht werden. In diesem Zusammenhang könnten die entwickelten Techniken des Abziehens der Epidermis und der Untersuchung der Freisetzungsraten mit Hilfe einer Dialysemembran hilfreich sein. Für eine weitere Entwicklung von Np als Blattdünger sollten anschließende Experimente im Hinblick auf die Regenfestigkeit der Präparate durchgeführt werden. Ergänzend wäre es sinnvoll, die Wirkung der Np-Anwendungen unter Freilandbedingungen zu testen. Zusätzlich wäre es interessant zu untersuchen, ob ganze Partikel oder Aggregate in das Blatt, z.B. durch Stomata aufgenommen und in andere Pflanzenteile verlagert werden können und dort womöglich eine Wirkung zu erzeugen. Damit verbunden sollte die theoretisch denkbare Anreicherung von Np in der Nahrungskette beurteilt werden. Sollte es zukünftig möglich sein, stabile Nanomaterialien herzustellen, die gezielt unter entsprechenden Umweltbedingungen Nährstoffe oder Pflanzenschutzwirkstoffe freisetzen, besteht durchaus die Möglichkeit, sichere und effektive Anwendungen für die Landwirtschaft zu entwickeln. Wenn es beispielsweise möglich wäre, Nanomaterialien herzustellen, die auf der Blattoberfläche regenbeständig sind und kontinuierlich Nährstoffe freisetzen, könnten womöglich höhere Aufwandmengen eingesetzt werden, ohne dabei Blattverbrennungen zu erzeugen und dennoch den Nährstoffbedarf der Pflanzen sichern. Eine bessere Verträglichkeit und eine gute Kupferaufnahme konnten in dieser Arbeit bereits ansatzweise bei den Cu-Np im Vergleich zu CuCl_2 gezeigt werden. Im Vergleich zu Cu-EDTA wurde durch die Cu-Np, zwar mit einiger Verzögerung, eine ähnlich gute Kupferaufnahme bewirkt, jedoch war die Verträglichkeit deutlich geringer. Nanomaterialien, die über die Eigenschaft verfügen, stetig Nährstoffe freizusetzen, wären auch für eine Bodenausbringung geeignet, da somit Auswaschungsverluste, Festsetzung und dadurch auch die Aufwandmengen reduziert werden könnten. In diesem Zusammenhang hätten Nanomaterialien, die Makronährstoffe wie z.B. Stickstoff, Phosphat oder Kalium enthalten, ein großes Potenzial, die landwirtschaftliche Produktion weiter zu optimieren. Dazu ist jedoch zunächst eine umfangreiche und grundlegende Beurteilung der Stabilität, Funktionalität, Wirkungsbeziehungen mit anderen Stoffen und Risiken von entsprechenden Nanomaterialien und -technologien unter Labormaßstäben notwendig.

6 Literaturverzeichnis

- Abadía J., Vázquez S., Rellán-Álvarez R., El-Jendoubi H., Abadía A., Alvarez-Fernández A., López-Millán A. F. (2011b). Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiology and Biochemistry* 49 (5), 471–482.
- Agnihotri S., Mukherji S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances* 4 (8), 3974–3983.
- Alexander A., Schroeder M. (1987). Modern trends in foliar fertilization. *Journal of Plant Nutrition* 10, 1391-1399.
- Ali M.A., Rehman I., Iqbal A., Din S., Rao A.Q., Latif A., Samiullah T.R., Azam S., Husnain T. (2014). Nanotechnology: A new frontier in Agriculture. *Nanotechnology, a new frontier in Agriculture. Advanced life Science*. 1 (3), 129-138.
- Álvarez-Fernández A., Abadía J., Abadía A. (2006). Iron deficiency, fruit yield and fruit quality. In: L.L. Barton, J. Abadía (Hg.), *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. Springer, Dordrecht, Netherlands, 85-101.
- Álvarez-Fernández A., Garcíá-Lavina P., Fidalgo C., Abadía J., Abadía A. (2004). Foliar fertilization to control iron chlorosis in pear (*Pyrus communis* L.) trees. *Plant Soil* 263, 5–15.
- Álvarez-Fernández A., Melgar J. C., Abadía J., Abadía A. (2011). Effects of moderate and severe iron deficiency chlorosis on fruit yield, appearance and composition in pear (*Pyrus communis* L.) and peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Environmental and Experimental Botany* 71 (2), 280–286.
- Andersen C. P., King G., Plocher M., Storm M., Pokhrel L. R., Johnson M. G., Rygiewicz P. T. (2016). Germination and early plant development of ten plant species exposed to TiO₂ and CeO₂ nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35 (9), 2223-2229.
- Anderson W. B. (1982). Diagnosis and correction of iron deficiency in field crops - an overview. *Journal of Plant Nutrition* 5 (4-7), 785–795.
- Askary M., Amirjani M. R., Saberi T. (2016). Comparison of the effects of nano-iron fertilizer with iron chelate on growth parameters and some biochemical properties of *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Nutrition* 40 (7), 974–982.
- Ayres P. G. (2004). Alexis Millardet: France's forgotten mycologist. *Mycologist* 18, 23–26.
- Baek Y.-W., An Y.-J. (2011). Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *The Science of the Total Environment* 409 (8), 603–1608.
- Bakhtiari M., Moaveni P., Sani B. (2015). The effect of iron nanoparticles spraying time and concentration on wheat. *Biology Forum-An International Journal* 7, 679–683.

- Barrena R., Casals E., Colon J., Font X., Sanchez A., Puntès V. (2009). Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere* 75 (7), 850–857.
- Beyer E. M. Jr. (1979). Effect of silver ion, carbon dioxide, and oxygen on ethylene action and metabolism. *Plant Physiology* 63, 169-73
- Blaser S. A., Scheringer M., Macleod M., Hungerbühler K. (2008). Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *The Science of the Total Environment* 390 (2-3), 396–409.
- Bramhanwade K., Shende S., Bonde S., Gade A., Rai M. (2016). Fungicidal activity of Cu nanoparticles against *Fusarium* causing crop diseases. *Environmental Chemistry Letters* 14 (2), 229–235.
- Burke D. J., Pietrasiak N., Situ S. F., Abenojar E. C., Porche M., Kraj P., Lakliang Y., Samia A. C. S. (2015). Iron oxide and titanium dioxide nanoparticle effects on plant performance and root associated microbes. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (10), 23630–23650.
- Calabrese E. J., Baldwin L. A. (2002). Defining hormesis. *Human and Experimental Toxicology* 21, 91–97.
- Calabrese E. J., Mattson M. P. (2017). How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *npj Aging and Mechanisms of Disease* 3, 13.
- Chamel A., Pineri M., Escoubes M. (1991). Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. *Plant Cell and Environment* 14 (1), 87–95.
- Chen, Y., Barak, P. (1982). Iron Nutrition of Plants in Calcareous Soils. *Advances in Agronomy Volume* 35 (35), 217–240.
- Clement L., Hurel C., Marmier N. (2013). Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants - effects of size and crystalline structure. *Chemosphere* 90 (3), 1083–1090.
- Corradini E., Moura M. R. de, Mattoso L. H. C. (2010). A preliminary study of the incorporation of NPK fertilizer into chitosan nanoparticles. *Express Polymer Letters* 4 (8), 509–515.
- Cox A., Venkatachalam P., Sahi S., Sharma N. (2016). Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. *Plant Physiology Biochemistry* 107, 147–163.
- Cvjetko P., Milošić A., Domijan A.-M., Vinković Vrček I., Tolić S., Peharec Štefanić P. (2017). Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137, 18–28.
- Delfani M., Baradarn Firouzabadi M., Farrokhi N., Makarian H. (2014). Some Physiological Responses of Black-Eyed Pea to Iron and Magnesium Nanofertilizers. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 45 (4), 530–540.

- Deng Y., Petersen E. J., Challis K. E., Rabb S. A., Holbrook R. D., Ranville J. F. (2017). Multiple Method Analysis of TiO₂ Nanoparticle Uptake in Rice (*Oryza sativa* L.) Plants. *Environmental Science & Technology* 51 (18), 10615–10623.
- DeRosa M. C., Monreal C., Schnitzer M., Walsh R., Sultan Y. (2010). Nanotechnology in fertilizers. *Nature Nanotechnology* 5 (2), 91-91.
- Dimkpa C. O., McLean J. E., Latta D. E., Manangón E., Britt D. W., Johnson W. P., Boyanov M. I., Anderson A. J. (2012). CuO and ZnO nanoparticles: Phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of Nanoparticle Research* 14 (9), 1125–1129.
- Dimkpa C. O., McLean J. E., Martineau N., Britt D. W., Haverkamp R., Anderson A. J. (2013). Silver nanoparticles disrupt wheat (*Triticum aestivum* L.) growth in a sand matrix. *Environmental Science & Technology* 47 (2), 1082–1090.
- Eichert T., Burkhardt J. (2001). Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system. *Journal of Experimental Botany* 52 (357), 771–781.
- Eichert T., Goldbach H. E., Burkhardt J. (1998). Evidence for the Uptake of Large Anions through Stomatal Pores. *Botanica Acta* 111 (6), 461–466.
- Eichert T., Goldbach H. E. (2008). Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces-further evidence for a stomatal pathway. *Physiologia Plantarum* 132 (4), 491–502.
- Eichert T., Kurtz A., Steiner U., Goldbach H. E., (2008). Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum* 134, 151–160.
- EU commission (2011). Commission recommendation on the definition of nanomaterial OJ L 275/38, 18 October 2011
- Federici G., Shaw B. J., Handy R. D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 84 (4), 415–430.
- Feizi H., Rezvani Moghaddam P., Shahtahmasebi N., Fotovat A. (2012). Impact of bulk and nanosized titanium dioxide (TiO₂) on wheat seed germination and seedling growth. *Biological Trace Element Research* 146 (1), 101–106.
- Fernández V., Ebert G. (2005). Foliar Iron Fertilization: A Critical Review. *Journal of Plant Nutrition* 28 (12), 2113–2124.

- Finnegan M. P., Zhang H., Banfield J. F. (2007). Phase stability and transformation in titania nanoparticles in aqueous solutions dominated by surface energy. *The Journal of Physical Chemistry C* 111 (5), 1962–1968.
- Foltete A.-S., Masfaraud J.-F., Bigorgne E., Nahmani J., Chaurand P., Botta C., Labille J., Rose J., Ferard J.-F., Cotelle S. (2011). Environmental impact of sunscreen nanomaterials: ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO₂ nanocomposites on *Vicia faba*. *Environmental Pollution* 159 (10), 2515–2522.
- Franzen D. W., McMullen M. V., Mosset D. S. (2008). Spring Wheat and Durum Yield and Disease Responses to Copper Fertilization of Mineral Soils. *Agronomy Journal* 100 (2), 371-375.
- Gagne F., Andre C., Skirrow R., Gelinat M., Auclair J., van Aggelen G., Turcotte P., Gagnon C. (2012). Toxicity of silver nanoparticles to rainbow trout: a toxicogenomic approach. *Chemosphere* 89 (5), 615–622.
- García-Gómez C., Babin M., Obrador A., Álvarez J. M., Fernández M. D. (2015). Integrating ecotoxicity and chemical approaches to compare the effects of ZnO nanoparticles, ZnO bulk, and ZnCl₂ on plants and microorganisms in a natural soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (21), 16803-16813.
- García-Sánchez S., Bernales I., Cristobal S. (2015). Early response to nanoparticles in the *Arabidopsis* transcriptome compromises plant defence and root-hair development through salicylic acid signalling. *BMC Genomics*, 16 (1), 341-356.
- Geisler-Lee J., Wang Q., Yao Y., Zhang W., Geisler M., Li K. (2013). Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology* 7 (3), 323–337.
- Ghafariyan M. H., Malakouti M. J., Dadpour M. R., Stroeve P., Mahmoudi M. (2013). Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll. *Environmental Science & Technology* 47 (18), 10645–10652.
- Ghormade V., Deshpande M. V., Paknikar K. M. (2011). Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology Advances* 29 (6), 792–803.
- Ghosh M., Bandyopadhyay M., Mukherjee A. (2010). Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. *Chemosphere* 81 (10), 1253–1262.
- Gottschalk F., Sun T., Nowack B. (2013). Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. *Environmental Pollution* 181, 287–300.

- Gunawan C., Teoh W. Y., Marquis C. P., Amal R. (2011). Cytotoxic origin of copper (II) oxide nanoparticles: comparative studies with micron-sized particles, leachate, and metal salts. *ACS Nano* 5 (9), 7214–7225.
- Hansen N., Hopkins B., Ellsworth J., Jolley V. (2006). Iron nutrition in field crops. In: Barton L. L., Abadía J. (Hg.), *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. Springer, Dordrecht, Netherlands, 23-59.
- Hansen N. C., Jolley V. D., Naeve S. L., Goos R. J. (2004). Iron deficiency of soybean in the North Central U.S. and associated soil properties. *Soil Science and Plant Nutrition* 50 (7), 983–987.
- Harris A. T., Bali R. (2008). On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. *Journal of Nanoparticle Research* 10 (4), 691–695.
- Hu L., Cui Y. (2012). Energy and environmental nanotechnology in conductive paper and textiles. *Energy & Environmental Science* 5 (4), 6423–6435.
- Jiang H.-S., Qiu X.-N., Li G.-B., Li W., Yin L.-Y. (2014). Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33 (6), 1398–1405.
- Judy J. D. (2013). Bioavailability of manufactured nanomaterials in terrestrial ecosystems. PhD Thesis. University of Kentucky. Lexington, Kentucky, USA
- Kaiser H. (2014). Stomatal uptake of mineral particles from a sprayed suspension containing an organosilicone surfactant. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 177, 869–874.
- Kalatehjari P., Yousefian M., Khalilzadeh M. A. (2015). Assessment of antifungal effects of copper nanoparticles on the growth of the fungus *Saprolegnia* sp. on white fish (*Rutilus frisii kutum*) eggs. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 41 (4), 303–306.
- Kanhed P., Birla S., Gaikwad S., Gade A., Seabra A. B., Rubilar O. et al. (2014). In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi. *Materials Letters* 115, 13–17.
- Karamanos R. E., Goh T. B. (2005). Effect of Rate of Copper Application on Yield of Hard Red Spring Wheat. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35 (13-14), 2037–2047.
- Karamanos R. E., Goh T. B., Harapiak J. T. (2003). Determining wheat responses to copper in prairie soils. *Canadian Journal of Soil Science* 83 (2), 213–221.
- Keller A. A., Lazareva A. (2014). Predicted releases of engineered nanomaterials: From global to regional to local. *Environmental Science & Technology Letters* 1 (1), 65–70.
- Khanna P. K., Singh N., Kulkarni D., Deshmukh S., Charan S., Adhyapak P. V. (2007). Water based simple synthesis of re-dispersible silver nano-particles. *Materials Letters* 61 (16), 3366–3370.

- Khot L. R., Sankaran S., Maja J. M., Ehsani R., Schuster E. W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Protection* 35, 64–70.
- Klancnik K., Drobne D., Valant J., Dolenc Koce J. (2011). Use of a modified *Allium* test with nanoTiO₂. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 (1), 85–92.
- Koo Y., Wang J., Zhang Q., Zhu H., Chehab E. W., Colvin V. L. (2015). Fluorescence reports intact quantum dot uptake into roots and translocation to leaves of *Arabidopsis thaliana* and subsequent ingestion by insect herbivores. *Environmental Science & Technology* 49 (1), 626–632.
- Korzeniowska J., Stanislawska-Glubiak E. (2011). The effect of foliar application of copper on content of this element in winter wheat grain. *Polish Journal of Agronomy* 4, 3-6.
- Lal R. (2008). Promise and limitations of soils to minimize climate change. *Journal of Soil and Water Conservation* 63 (4), 113A-118A.
- Lamsal K., Kim S.-W., Jung J. H., Kim Y. S., Kim K. S., Lee Y. S. (2011). Inhibition Effects of Silver Nanoparticles against Powdery Mildews on Cucumber and Pumpkin. *Mycobiology* 39 (1), 26–32.
- Larue C., Castillo-Michel H., Sobanska S., Cécillon L., Bureau S., Barthès V. (2014a) Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for internalization and changes in Ag speciation. *Journal of Hazardous Materials* 264, 98–106.
- Larue C., Laurette J., Herlin-Boime N., Khodja H., Fayard B., Flank A.-M., Brisset F., Carriere M. (2012). Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): Influence of diameter and crystal phase. *The Science of the Total Environment* 431, 197–208.
- Lee S., Chung H., Kim S., Lee I. (2013). The Genotoxic effect of ZnO and CuO nanoparticles on early growth of buckwheat, *Fagopyrum Esculentum*. *Water Air and Soil Pollution* 224 (9), 1668–1678.
- Lee W.-M., An Y.-J., Yoon H., Kweon H.-S. (2008). Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*phaseolus radiatus*) and wheat (*triticum aestivum*): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (9), 1915-1921.
- Lei R., Wu C., Yang B., Ma H., Shi C., Wang Q. (2008). Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid in vivo screening method for nanotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 232 (2), 292–301.
- Lin D., Xing B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 150 (2), 243–250.
- Lin D., Xing B. (2008). Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 42 (15), 5580–5585.

- Li P., Li L., Du Y., Hampton M. A., Nguyen A. V., Huang L. (2014). Potential foliar fertilizers with copper and zinc dual micronutrients in nanocrystal suspension. *Journal of Nanoparticle Research* 16, 1-11.
- Liu R., Lal R. (2015). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *The Science of the Total Environment* 514, 131–139.
- Lopez-Moreno M. L., La Rosa G. de, Hernandez-Viezcas J. A., Castillo-Michel H., Botez C. E., Peralta-Videa J. R., Gardea-Torresdey J. L. (2010). Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environmental Science & Technology* 44 (19), 7315–7320.
- Lowry G. V., Hotze E. M., Bernhardt E. S., Dionysiou D. D., Pedersen J. A., Wiesner M. R., Xing B. (2010). Environmental occurrences, behavior, fate, and ecological effects of nanomaterials: An Introduction to the special series. *Journal of Environmental Quality* 39 (6), 1867–1874.
- Mahajan P., Dhoke S. K., Khanna A. S. (2011). Effect of nano-ZnO on growth of mung bean (*Vigna radiata*) and chickpea (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. *Applied Biological Research* 13 (2), 54–61.
- Malhi S. S., Karamanos R. (2014). Feasibility of copper fertilization for optimum crop yield in the Canadian Prairies. Online verfügbar unter: <http://neag.ca/wp-content/uploads/2017/04/Feasability-of-Copper-Fertilization.pdf>
- Mangematin V., Walsh S. (2012). The future of nanotechnologies. *Technovation* 32 (3-4), 157–160.
- Marschner H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, San Diego.
- Martins G., Miot-Sertier C., Lonvaud-Funel A., Masneuf-Pomarède I. (2016) Grape berry bacterial inhibition by different copper fungicides. *BIO Web Conference*. 7 (1043).
- Maynard A. D., Aitken R. J., Butz T., Colvin V., Donaldson K., Oberdorster G., Philbert M. A., Ryan J., Seaton A., Stone V., Tinkle S. S., Tran L., Walker N. J., Warheit D. B. (2006). Safe handling of nanotechnology. *Nature* 444 (7117), 267–269.
- Ma X., Geisler-Lee J., Geiser-Lee J., Deng Y., Kolmakov A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *The Science of the Total Environment* 408 (16), 3053–3061.
- Miao L., Wang C., Hou J., Wang P., Ao Y., Li Y. et al. (2015). Enhanced stability and dissolution of CuO nanoparticles by extracellular polymeric substances in aqueous environment. *Journal of Nanoparticle Research* 17 (10), 709.
- Mihrianyan A., Ferraz N., Strømme M. (2012). Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science* 57 (5), 875–910.

- Millardet P.M.A. (1885). The discovery of Bordeaux mixture. Translated from French by Schneiderhan FJ. American Phytopathological Society 1933.
- Misra S. K., Dybowska A., Berhanu D., Luoma S. N., Valsami-Jones E. (2012b). The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *The Science of the Total Environment* 438, 225–232.
- Mortimer M., Kasemets K., Kahru A. (2010). Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to *ciliated protozoa Tetrahymena thermophila*. *Toxicology* 269 (2-3), 182–189.
- Musante C., White J. C. (2012). Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: differential effects of nano and bulk-size particles. *Environmental Toxicology* 27 (9), 510–517.
- Mustafa G., Sakata K., Hossain Z., & Komatsu S. (2015). Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress. *Journal of Proteomics* 122, 100-118.
- Nair R., Varghese S. H., Nair B. G., Maekawa T., Yoshida Y., Kumar D. S. (2010). Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science* 179 (3), 154–163.
- Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N., Sigg L., Behra R. (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* 42 (23), 8959–8964.
- Nekrasova G. F., Ushakova O. S., Ermakov A. E., Uimin M. A., Byzov I. V. (2011). Effects of copper (II) ions and copper oxide nanoparticles on *Elodea densa Planch.* *Russian Journal of Ecology* 42 (6), S. 458–463.
- Nel A., Xia T., Madler L., Li N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311 (5761), 622–627.
- Niemietz C. M., Tyerman S. D. (2002). New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin. *FEBS Letters* 531 (3), 443-447.
- Nowack B., Bucheli T. D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150 (1), 5–22.
- Ouda S. M. (2014). Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *Research Journal of Microbiology* 9 (1), 34–42.
- Oukarroum A., Barhoumi L., Pirastru L., Dewez D. (2013). Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32 (4), 902–907.
- Paramelle D., Sadovoy A., Gorelik S., Free P., Hobbey J., Fernig D. G. (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *The Analyst* 139 (19), 4855–4861.

- Parveen A., Rao S. (2015). Effect of nanosilver on seed germination and seedling growth in *Pennisetum glaucum*. *Journal of Cluster Science* 26 (3), 693-701.
- Pestana M., Correia P. J., Varennes A. de, Abadía J., Faria E. A. (2001). Effectiveness of different foliar iron applications to control iron chlorosis in orange trees grown on a calcareous soil. *Journal of Plant Nutrition* 24 (4-5), 613–622.
- Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B. (2012). Industrial production quantities and uses of engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research* 14, 1109–1120.
- Poole C. P., Owens F. J. (2003). *Introduction to Nanotechnology*. J. Wiley, Hoboken
- Popp C., Burghardt M., Friedmann A., Riederer M. (2005). Characterization of hydrophilic and lipophilic pathways of *Hedera helix* L. cuticular membranes: permeation of water and uncharged organic compounds. *Journal of Experimental Botany* 56 (421), 2797–2806.
- Prasad R., Bhattacharyya A., Nguyen Q. D. (2017). Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives. *Frontiers in Microbiology* 8, 1014.
- Roduner E. (2006). Size matters: Why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews* 35 (7), 583–592.
- Rombolà A.D., Tagliavini M., (2006). Iron nutrition of fruit tree crops. In: L.L. Barton, J. Abadía (Hg.), *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. Springer, Dordrecht, Netherlands, 61-83.
- Ruffini Castiglione M., Giorgetti L., Geri C., Cremonini R. (2011). The effects of nano-TiO₂ on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. *Journal of Nanoparticle Research* 13 (6), 2443–2449.
- Rui M., Ma C., Hao Y., Guo J., Rui Y., Tang X. (2016). Iron Oxide Nanoparticles as a Potential Iron Fertilizer for Peanut (*Arachis hypogaea*). *Frontiers in Plant Science* 7, 815.
- Savery L. C., Viñas R., Nagy A. M., Pradeep P., Merrill S. J., Hood A. M., Malghan S. G., Goering P. L., Brown R. P. (2017). Deriving a provisional tolerable intake for intravenous exposure to silver nanoparticles released from medical devices. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 85, 108-118.
- Schmidt J., Vogelsberger W. (2009). Aqueous long-term solubility of titania nanoparticles and titanium (IV) hydrolysis in a sodium chloride system studied by adsorptive stripping voltammetry. *Journal of Solution Chemistry* 38 (10), 1267–1282.

- Schönherr J. (1976). Water permeability of isolated cuticular membranes: The effect of pH and cations on diffusion, hydrodynamic permeability and size of polar pores in the cutin matrix. *Planta* 128, 113–126.
- Schönherr J. (2002). A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across astomatous cuticular membranes. *Pest Management Science* 58 (4), 343–351.
- Schönherr J. (2000). Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta* 212 (1), 112–118.
- Sekhon B. S. (2014). Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, Science and Applications* 7, 31–53.
- Shah V., Belozerova I. (2009a). Influence of Metal Nanoparticles on the Soil Microbial Community and Germination of Lettuce Seeds. *Water, Air and Soil Pollution* 197 (1-4), 143–148.
- Shaw A. K., Hossain Z. (2013). Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. In *Chemosphere* 93 (6), 906–915.
- Shaymurat T., Gu J., Xu C., Yang Z., Zhao Q., Liu Y., Liu Y. (2012). Phytotoxic and genotoxic effects of ZnO nanoparticles on garlic (*Allium sativum* L.): a morphological study. *Nanotoxicology* 6 (3), 241–248.
- Sheth P., Sandhu H. Singhal D., Malick W., Shah N., Kislalioglu M. S. (2012). Nanoparticles in the pharmaceutical industry and the use of supercritical fluid technologies for nanoparticle production. *Current Drug Delivery* 9, 269-284.
- Shvedova A. A., Kisin E. R., Mercer R., Murray A. R., Johnson V. J., Potapovich A. I., Tyurina Y. Y., Gorelik O., Arepalli S., Schwegler-Berry D., Hubbs A. F., Antonini J., Evans D. E., Ku B. K., Ramsey D., Maynard A., Kagan V. E., Castranova V., Baron P. (2005). Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 289 (5), 698–708.
- Sienkiewicz-Cholewa U., Kieloch R. (2016). Effect of sulphur and micronutrients fertilization on yield and fat content in winter rape seeds (*Brassica napus* L.). *Plant, Soil and Environment*. 61 (4), 164–170.
- Spadaro J. A., Becker R. (1976). Some Specific Cellular Effects of Electrically Injected Silver and Gold Ions. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 3, 49-57.
- Stampoulis D., Sinha S. K., White J. C. (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science & Technology* 43 (24), 9473–9479.
- Stebbing, A. R. D. (1982). Hormesis - The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of The Total Environment* 22 (3), 213–234.

- Stensberg M. C., Wei A., Sepulveda M. S., McLamore E. S., Porterfield D. M., Wie A., Sepúlveda M. S. (2011). Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine* 6 (5), 879–898.
- Strader L. C., Beisner E. R., Bartel B. (2009). Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene response. *The Plant Cell* 21 (11), 3585–3590.
- Studer A. M., Limbach L. K., van Duc L., Krumeich F., Athanassiou E. K., Gerber L. C. (2010). Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicology Letters* 197 (3), 169–174.
- Tripathi D. K., Singh S., Singh V. P., Prasad S. M., Chauhan, D. K., Dubey, N. K. (2016). Silicon nanoparticles more efficiently alleviate arsenate toxicity than silicon in maize cultivar and hybrid differing in arsenate tolerance. *Frontiers in Environmental Science* 4, 46.
- Tripathi D. K., Singh S., Singh S., Pandey R., Singh V. P., Sharma N. C., Pandey R., Singh V. P., Prasad S. M., Dubey N. K. (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* 110, 2-12.
- Tyree M. T., Scherbatskoy T. D., Tabor C. A. (1990). Leaf cuticles behave as asymmetric membranes: Evidence from the measurement of diffusion potentials. *Plant Physiology* 92, 103–109.
- Wang J., Koo Y., Alexander A., Yang Y., Westerho S., Zhang Q., Qingbo Z., Jerald L., Schnoor Vicki L., Colvin Braam J., Alvarez P. J. (2013). Phytostimulation of poplars and Arabidopsis exposed to silver nanoparticles and Ag⁺ at sublethal concentrations. *Environmental Science & Technology* 47 (10), 5442-5449.
- Weyers J. D. B., Travis. A. J. (1981). Selection and preparation of leaf epidermis for experiments on stomatal physiology. *Journal of Experimental Botany* 32, 837-50.
- Yang Z., Chen J., Dou R., Gao X., Mao C., Wang L. (2015). Assessment of the phytotoxicity of metal oxide nanoparticles on two crop plants, maize (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12 (12), 15100-15109.
- Yin L., Colman B. P., McGill B. M., Wright J. P., Bernhardt E. S. (2012). Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. *PloS One* 7 (10), e47674.
- Yin L., Cheng Y., Espinasse B., Colman B. P., Auffan M., Wiesner M., Rose J., Liu J., Bernhardt E. S. (2011). More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science & Technology* 45 (6), 2360–2367.
- Zhao X.-C., Qu X., Mathews D. E., Schaller G. E. (2002). Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Plant Physiology* 130 (4), 1983–1991.

Zhu H., Han J., Xiao J. Q., Jin Y. (2008). Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring* 10 (6), 713–717.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Eichert für das Vertrauen, mir die Bearbeitung des Themas zu übertragen, für zahlreiche Ratschläge, für viele aufbauenden Worte, für die gewährte Betreuung über die gesamte Dauer des Projektes sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bedanken bei folgenden Personen und Institutionen:

Herrn Prof. Dr. Gabriel Schaaf für die Übernahme des Koreferates und der Unterstützung während meiner Arbeit. Bei Herrn Prof. Heiner Goldbach für die zahlreichen Anregungen und konstruktiven Ideen die entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Zusätzlich bei PD Dr. Ulrike Steiner für die Anleitung bei der Verwendung des Rasterelektronenmikroskop und für Ratschläge bei der Durchführung von Experimenten sowie die Übernahme der Position des fachnahen Mitgliedes im Prüfungsausschuss. Außerdem bei Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Südekum für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes im Rahmen des Promotionskolloquiums. Bei Christian Heck, Dr. Stefanie Höller, Steffen Kemper, Waltraud Esser, Bernard Liese, die als Kollegen durch viele kreative Beiträge (Spritwoch, Sergey Lazarev, Magic Power, Liebe Frau Anderson... etc.) das alltägliche Institutsleben bereichert haben und durch fachliche Unterstützung ebenfalls zum Erfolg der Arbeit beigetragen haben. Bei Waltraud Köhler und Elke Gast für die gewissenhafte Mitwirkung an den Experimenten und Pflege der Pflanzen im Gewächshaus. Weiterhin bei allen Mitarbeitern und Kollegen der Abteilung Pflanzenernährung, besonders bei Brigitte Überbach für die Unterstützung bei den Analysearbeiten im Labor. Ebenfalls für die Durchführung einiger Analysearbeiten bei der Abteilung der Bodenwissenschaften und dem Institut für Geowissenschaften und Meteorologie. Bei der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn für die finanzielle Förderung des Vorhabens. Zuletzt bei meiner Freundin Lena und meiner Familie, die mich vor allem seelisch und moralisch über den gesamten Zeitraum der Arbeit unterstützt haben.