



Abh. Ber. Naturkundemus. Görlitz	Band 76 Heft 1	S. 25 – 31	2004
--	-------------------	------------	------

ISSN 0373-7586

Beitrag zum 4. Milbenkundlichen Kolloquium vom 26. bis 27. September 2003
im Zoologischen Institut und Museum der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Elementaranalysen der Cuticula und des Ceroteguments bei *Damaeus onustus* (C. L. Koch, 1844) und *Eupelops torulosus* (C. L. Koch, 1836) (Acari: Oribatida)

THOMAS MATISCHEK¹, EDITH STABENTHEINER², GÜNTHER RASPOTNIG¹
& GÜNTHER KRISPER¹

¹Institut für Zoologie, Karl-Franzens Universität Graz

²Institut für Pflanzenphysiologie, Karl-Franzens Universität Graz

Abstract

Elemental analysis of the cuticle and the cerotegument of *Damaeus onustus* (C. L. Koch, 1844) and *Eupelops torulosus* (C. L. Koch, 1836) (Acari: Oribatida) – The elemental composition of distal layers of the cuticle and its distinct outermost part – the so-called cement layer of the cerotegument – was analysed using an EDAX-detector of a scanning electron microscope.

Only a few oribatid species appeared to be well suited for this method as in most cases the cement layer was too thin to handle it separately from the cuticle. Two species from different families were compared: *Damaeus onustus* (Damaeidae) and *Eupelops torulosus* (Phenopelopidae). The results show significant differences in the composition of elements between the cement layers of the two species. Calcium, sulphur, and potassium dominate the cement-layer of *Damaeus onustus*, while silicon is the outstanding element of the cement layer of *Eupelops torulosus*. The composition of the other distal cuticular layers of both species appeared to be similar, containing a series of different elements such as calcium, potassium, chlorine, phosphorus and sulphur.

Keywords: cement-layer, silicon, calcium, EDAX-analysis

Zusammenfassung

Die Elementzusammensetzung der »äußeren Cuticula« (äußere Epicuticula, Epicuticula s. str., oberste Schichten der Exocuticula) sowie ihre äußerste, oft stark strukturierte Schicht – die Zementschicht des Cerotegumentes – wurde mit Hilfe eines EDAX-Detektors im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Für diese Analysen wurden zwei Oribatiden-Arten ausgewählt, deren Zementschicht mächtig entwickelt ist: *Damaeus onustus* (Damaeidae) und *Eupelops torulosus* (Phenopelopidae). Die Ergebnisse zeigen signifikante Unterschiede in der elementaren Zusammensetzung der Zementschicht dieser beiden Arten. Calcium, Schwefel und Kalium herrschen in der Zementschicht von *Damaeus onustus* vor, während Silizium das bedeutendste Element der Zementschicht von *Eupelops*

torulosus darstellt. Die Zusammensetzung des darunter liegenden Bereiches (die »äußere Cuticula«) scheint ähnlich zu sein; es treten verschiedene Elemente wie Calcium, Kalium, Chlor, Phosphor und Schwefel auf.

1. Einleitung

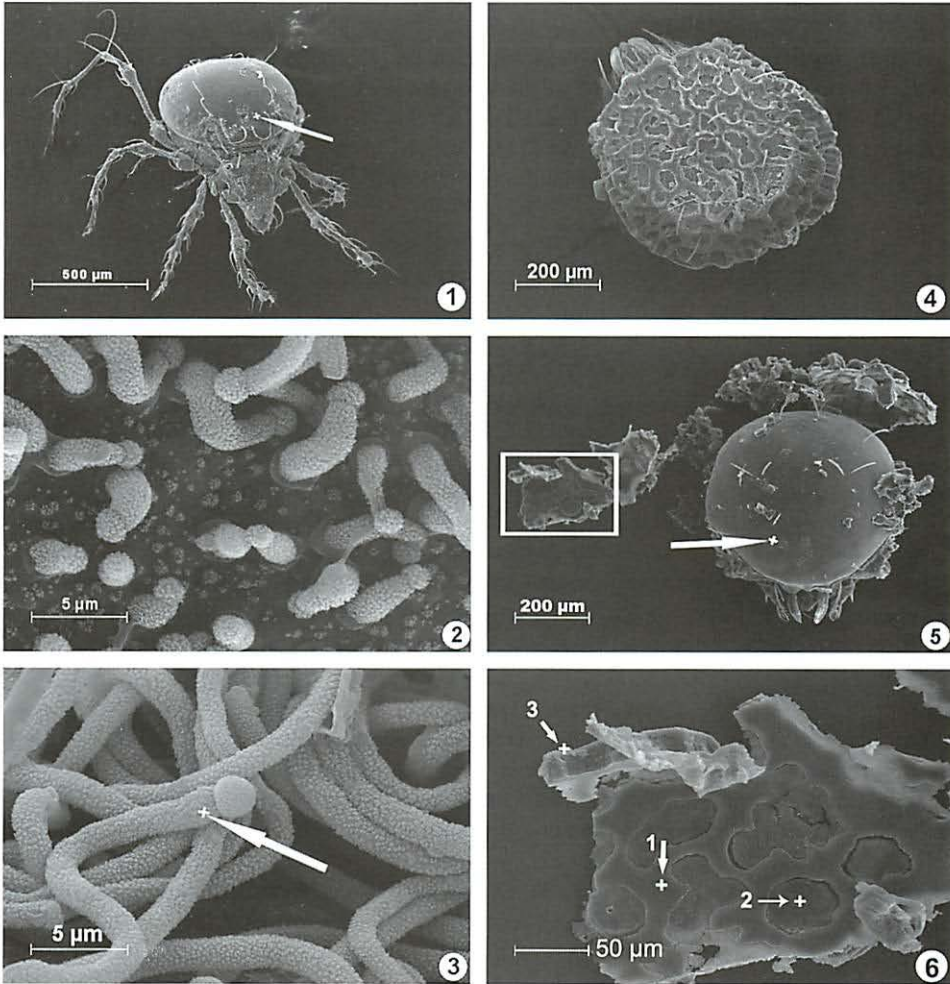
Die äußerste Körperschicht der Oribatiden – das Cerotegument – teilt sich in drei Schichten. Die äußere Epicuticula, die Wachsschicht und, als äußerste Lage, die Zementschicht. Letztere ist bei den Oribatiden oft sehr massiv ausgebildet und kann teilweise bizarre Ausprägungen annehmen. Obwohl diese verschiedenen Zementschichtbildungen (so vorhanden) bei vielen Arten morphologisch genau beschrieben sind, ist über die Genese und den Chemismus dieser Schicht nur wenig bekannt (EVANS 1992, ALBERTI & COONS 1999).

Eine qualitative Analyse der am Aufbau der Zementschicht beteiligten Elemente mit Hilfe des EDAX-Analyseverfahrens (EDAX = Energiedispersive Röntgenanalyse) im Rasterelektronenmikroskop sollte eventuelle Hinweise auf den Chemismus liefern. Die Fragestellung lautete: Gibt es Unterschiede in der Elementarzusammensetzung zwischen der Zementschicht und den darunter liegenden Schichten an ein und demselben Tier, und gibt es Unterschiede zwischen den Zementschichten verschiedener Spezies?

2. Material und Methoden

Die Tiere wurden mit Hilfe eines Bodensiebes in einem Kiefernwald südlich von Ferlach (Kärnten/Österreich) gesammelt. Um die Oberflächenschichten chemisch nicht zu verändern, wurden die in Frage kommenden Oribatidenarten per Hand unter dem Binokular ausgesucht und lebende Milben durch Tieffrieren abgetötet. Tiere, bei denen die Zementschicht zur Untersuchung mechanisch abgelöst werden musste, wurden einen Tag lang in Hexan getaucht und anschließend für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet.

Die erste Untersuchung völlig unbehandelter Proben im REM (Philips XL 30 ESEM) erfolgte im sogenannten ESEM-Modus bei niedrigem Vakuum (0,4 torr.) mit dem EDAX-Detektor. Bei dem EDAX-Verfahren handelt es sich um eine qualitative und semiquantitative Methode zur Elementaranalyse, bei der vor allem die Mengenverhältnisse der detektierten Elemente zueinander bestimmt werden können. Bei starken Aufladungserscheinungen wurde die Probe mit Kohlenstoff bedampft und anschließend im Hochvakuum analysiert. Für die Bestimmung der durchschnittlichen Elementarzusammensetzung dienten sieben bis zehn nebeneinander liegende Messpunkte. Aufgrund der relativ hohen Eindringtiefe des Messstrahls (bis zu 0,7 µm) in die Probe kamen nur Tiere mit sehr dicken Zementschichtstrukturen für diese Untersuchung in Frage, um zu vermeiden, darunter liegende Schichten mitzumessen. Bei entfernter Zement- und Wachsschicht erfasst der Messstrahl nicht nur die äußere Epicuticula, sondern auch die Epicuticula s. str. (ALBERTI & COONS 1999) sowie die obersten Schichten der Exocuticula (alle zusammen der Einfachheit halber in der Folge als »äußere Cuticula« bezeichnet). Adulte Tiere zweier Arten aus unterschiedlichen Familien – *Damaeus onustus* (C. L. Koch, 1844) und *Eupelops torulosus* (C. L. Koch, 1836) – wurden untersucht und miteinander verglichen.



Tafel 1

Abb. 1 – 3 *Damaeus onustus*:

1: Pfeil = Messpunkt »äußere Cuticula«

2: Zementschichtbildungen Notogaster lateral

3: Zementschichtbildungen ventral zwischen Beincoxae, Pfeil = Messpunkt

Abb. 4 – 6 *Eupelops torulosus*:

4: Habitus dorsal

5: Dorsalansicht nach Ablösen der Zementschicht, Pfeil = Messpunkt »äußere Cuticula«

6: Abgelöste Zementschichtschuppe, Pfeil 1 = Messpunkt Wallunterseite,
Pfeil 2 = Messpunkt Scheibchen, Pfeil 3 = Messpunkt Wallkrone

3. Ergebnisse

Elementaranalysen der Zementschicht wie auch der »äußeren Cuticula« zeigten generell einen extrem hohen Kohlenstoff-(C)-Peak und unmittelbar daneben einen weniger (etwa $\frac{1}{3} - \frac{1}{4}$) intensiven Sauerstoff-(O)-Peak. Das ist ein Messbild, wie es für viele Kohlenwasserstoffverbindungen typisch ist (Tafel 2/Abb. 1 – 6). Der zweifellos vorhandene Wasserstoff (H) und eventuell vorhandener Stickstoff (N) konnten gerätebedingt nicht erfasst werden.

Dameus onustus

Bei allen Exemplaren fanden sich an exponierten Stellen wie am Notogaster und an den Anal- und Genitalplatten große Bereiche blankgescheuerter Körperoberfläche, die für die Messungen der »äußeren Cuticula« herangezogen wurden (Tafel 1/Pfeil in Abb. 1). Das Messdiagramm zeigte stets einen extrem hohen Calcium-(Ca)-Peak, wesentlich geringer fielen die Peaks von Chlor (Cl), Kalium (K), Schwefel (S), Phosphor (P) und Aluminium (Al) aus (Tafel 2/Abb. 1). Die Zementschicht bildete ursprünglich am ganzen Körper wurstförmige Fortsätze mit rundem Endköpfchen (Tafel 1/Abb. 2). Im Bereich der Beincoxae waren diese Strukturen sehr lang und bildeten einen dichten Filz, so dass dort mit Sicherheit keine anderen Schichten außer der Zementschicht gemessen werden konnten (Tafel 1/Abb. 3). Auch diese Messungen zeigten einen Ca-Peak, allerdings deutlich geringer und etwa der Höhe der Peaks von Schwefel und Phosphor entsprechend. Noch niedriger, aber deutlich zuzuordnen waren die Peaks von Al, Mg und K (Tafel 2/Abb. 2).

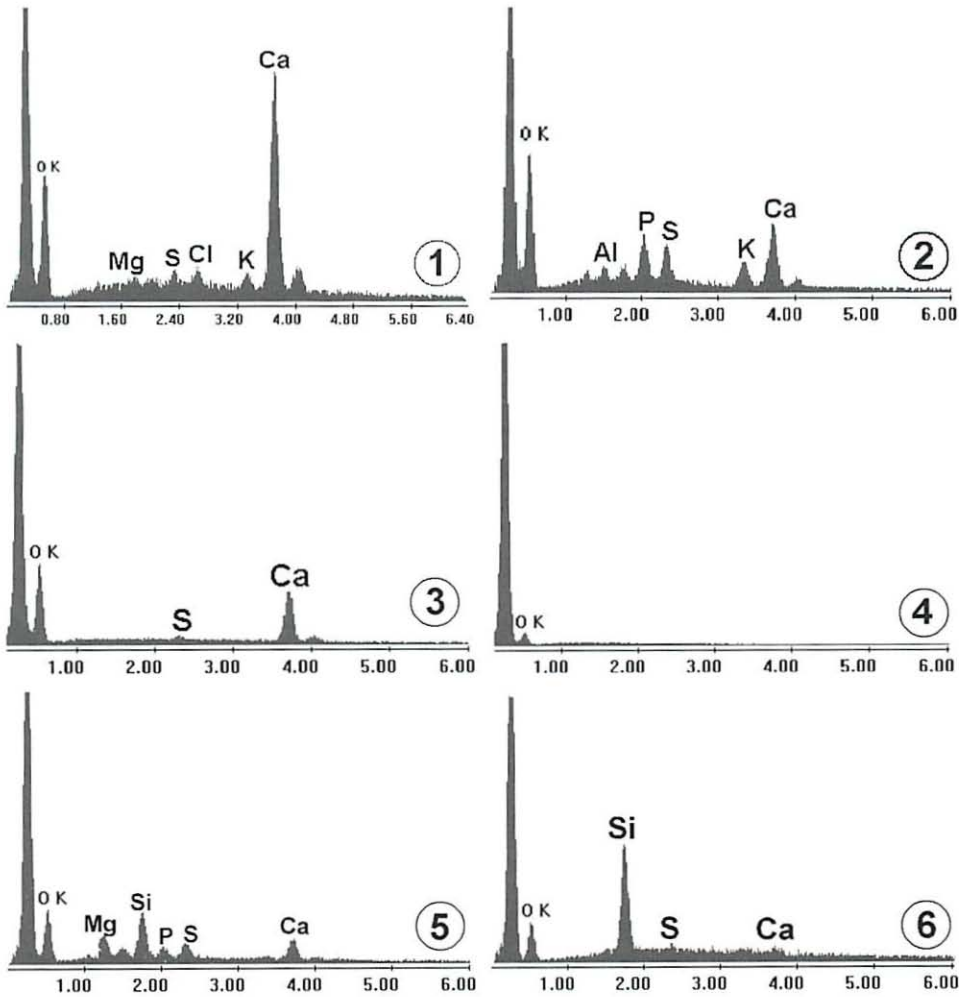
Eupelops torulosus

Die Zementschicht bildet mächtige, vernetzte, wallartige Strukturen, die bis zu 20 μm hoch aufragen (Tafel 1/Abb. 4). Nach einer Vorbehandlung mit Hexan ließ sich die ganze Schicht leicht ablösen. Gleichzeitig löste sich die Lipidschicht des Ceroteguments auf, so dass die »äußere Cuticula« zur Messung frei lag (Tafel 1/Abb. 5); diese enthielt ebenfalls Ca, allerdings deutlich weniger als bei *D. onustus*. Darüber hinaus fand sich nur noch ein kleiner Schwefel-Peak (Tafel 2/Abb. 3). Die großen, abgelösten Zementschichtschuppen boten aufgrund ihrer Struktur drei verschiedene Ansatzpunkte zur EDAX-Messung (Tafel 1/Abb. 6).

Messpunkt 1: An der Basis der wallartigen Strukturen (von der Unterseite her gemessen) fanden sich erstaunlicherweise keine Elemente außer Kohlenstoff und Sauerstoff.

Messpunkt 2: In den nur ca. 1 μm dicken Scheibchen zwischen den Wällen fanden sich eine Reihe von Elementen wie Al, P, S, und Magnesium (Mg). Auffällig war aber der relativ hohe Silizium-(Si)-Peak (Tafel 2/Abb. 5).

Messpunkt 3: Bei der Messung außen auf der Wallkrone fiel vor allem der extrem hohe Si-Peak auf (Tafel 2/Abb. 6). Nur noch in Spuren wurden Mg, P, und S gefunden.



Tafel 2 Spektren der Elemente durch EDAX-Analyse (X-Achse: Energie (keV); Y-Achse: cps – counts per second).

Abb. 1 – 2 Messergebnisse *Damaeus onustus*:
 1: »äußere Cuticula«
 2: Zementschicht

Abb. 3 – 6 Messergebnisse *Eupelops torulosus*:
 3: »äußere Cuticula«
 4: Wallbasis
 5: Scheibchen
 6: Wallkrone

4. Diskussion

Nach den hier vorliegenden Daten weisen sowohl die Zementschichten als auch die »äußeren Cuticula« beider Arten eine deutlich unterschiedliche Elementarzusammensetzung auf (Tab. 1). Die Zementschichten zumindest dieser Species unterscheiden sich damit nicht nur in ihrer Morphologie, sondern auch in ihrer chemischen Zusammensetzung. Eine endgültige Aufklärung des Chemismus kann mit dieser qualitativen Elementaranalyse allerdings nicht erfolgen. Auch die Frage, ob es sich im Falle der Zementschicht um eine Proteinverbindung handelt, kann nicht beantwortet werden, obwohl Hinweise darauf vorliegen. Die Präsenz von Stickstoff wäre ein eindeutiges Indiz, dieser kann aber vom Gerät nicht detektiert werden. Immerhin lässt das Vorhandensein von Schwefel den Schluss auf ein Strukturprotein mit Disulfidbrücken (schwefelhaltige Aminosäuren Cystein und Methionin) zu, dagegen spricht aber die Abwesenheit von Schwefel an der Basis der Zementschichtwälle bei *E. torulosus*. Dass hier an der Unterseite der Zementschicht die zum Teil aus Fettsäuren und Lipiden bestehende Wachsschicht gemessen wurde, ist auszuschließen, da diese Schicht durch das Einlegen der Tiere in Hexan aufgelöst wurde (RASPOŤNIG & KRISPER 1998).

Tab. 1 Detektierte Elemente (ohne C und O) der Zementschicht und der »äußeren Cuticula« im Vergleich zwischen *Damaeus onustus* und *Eupelops torulosus*. Element * = geringe Mengen, Element ** = mittlere Mengen, Element *** = große Mengen

	<i>Damaeus onustus</i>	<i>Eupelops torulosus</i>
Zementschicht	Ca, S, P ** Al, Mg, K *	Si *** Mg, Al, P, S *
»äußere Cuticula«	Ca *** Cl, K, S, P, Al **	Ca ** S *

Der hohe Anteil von Silizium in der Zementschicht dieser Tiere ist ungewöhnlich, da es sich dabei um ein bei Arthropoden nur selten gefundenes Element handelt. Bisher fand man es zum Beispiel als Ablagerung in der Mitteldarmdrüse von Opilioniden (LIPOVŠEK et al. 2002) oder als Kieselsäure (SiO₂) im Exoskelett eines unbekanntes Arthropoden auf Borneo (MASCHWITZ et al. 1994). Zwar findet man Silizium nur in den äußeren Bereichen der Zementschicht, dass es sich dabei nur um eine Verunreinigung durch Bodenpartikel handelt, ist aber dennoch auszuschließen. Zum einen müsste dann auch *D. onustus* ähnliche Si-Werte zeigen, zum anderen lässt sich im REM der Punkt, an dem der Messstrahl positioniert wird, optisch sehr genau auf eventuelle Partikel prüfen. Immerhin wäre es denkbar, dass Silizium aus der Umgebung durch Enzyme, ähnlich den Silafinen der Diatomeen, an die Oberfläche gebunden wird (KRÖGER et al. 2002).

Der überaus hohe Kalziumgehalt in der Cuticula von *D. onustus* ist nicht weiter überraschend, ähnliches wurde schon bei anderen Oribatiden nachgewiesen (NORTON & BEHAN-PELLETIER 1991, ALBERTI et al. 2001).

5. Literatur

- ALBERTI, G. & L. B. COONS (1999): Acari: Mites. – In HARRISON, F. W. & R. F. FOELIX (eds.): *Microscopic Anatomy of Invertebrates* Vol. 8 C. Wiley-Liss, New York: 515 – 1265
- , R. A. NORTON & J. KASBOHM (2001): Fine structure and mineralisation of cuticle in Euarthropoda and Lohmannioidea (Acari: Oribatida). – In HALLIDAY, R. B., D. E. WALTER, H. C. PROCTOR, R. A. NORTON & M. J. COLLOFF (eds.): *Acarology. Proceedings of the 10th International Congress (Canberra)*. CSIRO Publishing, Collingwood: 230 – 241
- EVANS, G. O. (1992): *Principles of Acarology*. CAB International, Wallingford, 563 pp.
- KRÖGER, N., S. LORENZ, E. BRUNNER & M. SUMPER (2002): Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis. – *Science* **298**: 584 – 586
- LIPOVŠEK, S., I. LETOFSKY-PAPST, F. HOFER & M. A. PAPST (2002): Seasonal- and age-dependent changes of the structure and chemical composition of the spherites of the midgut gland of the harvestmen *Gyas annulatus* (Opiliones). – *Micron* **33**: 647 – 654
- MASCHWITZ, U., D. METZELTIN & H. LANGE-BERTALOT (1994): Ein Mikroarthropode mit Kieselpanzer? Fund eines rätselhaften Tieres in einem Fließgewässer von Borneo. – *Natur und Museum* **124** (2): 29 – 37
- NORTON, R. A. & V. M. BEHAN-PELLETIER (1991): Calcium carbonate and calcium oxalate as cuticular hardening agents in oribatid mites (Acari: Oribatida). – *Can. J. Zool.* **69**: 1504 – 1511
- RASPOTNIG, G. & G. KRISPER (1998): Fatty acids as cuticular surface components in oribatid mites (Acari: Oribatida). – In EBERMANN, E. (ed.): *Arthropod Biology: Contributions to Morphology, Ecology and Systematics*. – Biosystematics and Ecology Series 14: Österreichische Akademie der Wissenschaften, Wien: 215 – 243

Manuskriptannahme: 30. Juni 2004

Anschriften der Verfasser:

Thomas Matischek / Dr. Günther Raspotnig / Dr. Günther Krisper*
Institut für Zoologie
Karl-Franzens Universität
Universitätsplatz 2
A-8010 Graz, Austria
E-Mail: guenther.krisper@uni-graz.at

Dr. Edith Stabentheiner
Institut für Pflanzenphysiologie
Karl-Franzens Universität
Universitätsplatz 2
A-8010 Graz, Austria

*korrespondierender Verfasser