

Materialwissenschaftliche und strukturelle
Untersuchungen an
photomechanischen Infrarotrezeptoren bei Insekten
zur Optimierung neuartiger technischer Infrarotsensoren

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von
David Klocke
aus
Bonn

Bonn 2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Helmut Schmitz
2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Bleckmann
Fachnahes Mitglied: Prof. Dr. Wilhelm Barthlott
Fachangrenzendes Mitglied: Prof. Dr. Martin Rumpf

Tag der Promotion: 20.06.2012
Erscheinungsjahr: 2012

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | 5 |
| 1 Einleitung | 7 |
| 1.1 Infrarotstrahlung..... | 7 |
| 1.2 Technisches Problem..... | 7 |
| 1.3 Biologische Vorbilder: IR-Rezeptoren bei <i>Melanophila acuminata</i> und <i>Aradus albicornis</i> | 9 |
| 1.4 Insektenkutikula | 11 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit | 12 |
| 2 Methoden | 14 |
| 2.1 Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie | 14 |
| 2.2 Dreidimensionale Rekonstruktion des IR-Rezeptors von <i>M. acuminata</i> | 14 |
| 2.3 Probenvorbereitung für Rasterkraftmikroskopie und Nanoindentation | 16 |
| 2.3.1 Einbettmedien..... | 16 |
| 2.3.2 Präparation, Einbettung und Anschneiden der Proben..... | 17 |
| 2.4 Rasterkraftmikroskopie | 18 |
| 2.4.1 Messprinzip..... | 18 |
| 2.4.2 Topographische Untersuchungen unter Wasser | 20 |
| 2.5 Nanoindentation..... | 21 |
| 2.5.1 Messungen unter Wasser | 23 |
| 3 Ergebnisse | 25 |
| 3.1 Dreidimensionale Rekonstruktion der inneren Kugel des IR-Rezeptors von <i>M. acuminata</i> | 25 |
| 3.2 Infrared Receptors in pyrophilous (“fire-loving”) Insects as Model for new uncooled Infrared Sensors | 28 |
| 3.2.1 Introduction | 28 |
| 3.2.2 Results..... | 30 |
| 3.2.3 Conclusion | 46 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.4 | Experimental | 47 |
| 3.3 | Water as a major modulator for the mechanical properties of insect cuticle | 49 |
| 3.3.1 | Introduction | 49 |
| 3.3.2 | Material and Methods..... | 53 |
| 3.3.3 | Results..... | 56 |
| 3.3.4 | Discussion | 59 |
| 3.4 | Material properties of photomechanic infrared receptors in pyrophilous <i>Melanophila</i> beetles and <i>Aradus</i> bugs | 66 |
| 3.4.1 | Introduction | 66 |
| 3.4.2 | Material and Methods..... | 68 |
| 3.4.3 | Results..... | 70 |
| 3.4.4 | Discussion | 75 |
| 3.4.5 | Conclusions | 78 |
| 4 | Diskussion | 79 |
| 4.1 | Funktionsmorphologie photomechanischer IR-Rezeptoren | 79 |
| 4.1.1 | Methodik: TEM-basierte 3D-Rekonstruktion..... | 79 |
| 4.1.2 | Miniaturisierung des IR-Rezeptors als Anpassung an den Stimulus..... | 79 |
| 4.1.3 | Anordnung und Funktion der Fluidkanäle..... | 80 |
| 4.2 | Zusammensetzung und Eigenschaften des Fluids | 81 |
| 4.3 | Methodik: Mechanische Charakterisierung rehydrierter Kutikula | 83 |
| 4.4 | Einfluss der Rehydrierung auf die Materialeigenschaften von Kutikula..... | 84 |
| 4.4.1 | Änderung der Materialeigenschaften einzelner Kutikulaschichten..... | 84 |
| 4.4.2 | Rolle der Proteinmatrix..... | 84 |
| 4.5 | Spezialisierte Kutikulatypen photomechanischer IR-Rezeptoren..... | 86 |
| 4.6 | Konzept für den technischen IR-Sensor | 87 |
| 4.6.1 | Funktionsweise des technischen IR-Sensors | 87 |
| 4.6.2 | Geometrie der Absorberfläche und der Zwischenwände | 88 |
| 4.6.3 | Fenster versus Absorberfläche | 88 |
| 4.6.4 | Material der Absorberfläche und der Zwischenwände | 89 |
| 4.6.5 | Fluid und Fluidvolumen | 89 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.6.6 | Ausgleichskanäle | 90 |
| 4.7 | Fazit..... | 90 |
| 5 | Abbildungsverzeichnis | 92 |
| 6 | Tabellenverzeichnis | 93 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 94 |
| 8 | Anhang..... | 102 |
| 8.1 | Getestete Einbettmedien für Nanoindentation und Rasterkraftmikroskopie | 102 |
| 8.2 | Textdatei zur 3D-Rekonstruktion des IR-Rezeptors bei <i>M. acuminata</i> | 103 |
| 8.3 | Berechnung der Volumina und Oberflächen von Materialtypen der 3D-Rekonstruktion des IR-Rezeptors von <i>M. acuminata</i> | 104 |
| 8.4 | Berechnung des Absorptionskoeffizienten von Buprestiden-Kutikula | 104 |
| 8.5 | EDX-Analyse der getrockneten Substanz in Kavitäten des IR-Rezeptor von <i>M. acuminata</i> | 105 |
| 8.6 | Absorberelement des aktuellen Prototyps des makroskopischen IR-Sensors | 106 |
| 8.7 | Publizierte Fachartikel..... | 106 |

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die mechanischen Eigenschaften hoch spezialisierter Insektenkutikula in photomechanischen Infrarotrezeptoren (IR-Rezeptoren) pyrophiler Insekten bei nahezu natürlichem Wassergehalt (quasi-nativ) untersucht. Zusammen mit den Erkenntnissen aus einer dreidimensionalen Rekonstruktion eines IR-Rezeptors wurden diese Ergebnisse für ein weiterentwickeltes Konzept für ungekühlte, technische Infrarotsensoren genutzt.

Zunächst wurde hierzu eine Methode entwickelt, um die mechanischen Eigenschaften einzelner Schichten von getrockneter und quasi-nativer Insektenkutikula durch Nanoindentation zu bestimmen. Zur Methodenentwicklung wurde Kutikula der Sternalplatte der Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) als "Standard-Kutikula" benutzt. Als Ergebnis wurden durch die Erhöhung des Wassergehaltes die Härte und der E-Modul in allen untersuchten Schichten stark herabgesetzt. Hierbei änderten sich die mechanischen Eigenschaften der einzelnen Kutikulaschichten unter dem Einfluss von Wasser unterschiedlich stark. Im Gegensatz zum getrockneten Zustand war in quasi-nativen Proben eine graduelle Zunahme von Härte und E-Modul von der innengelegenen Endokutikula über die Mesokutikula zu der außengelegenen Exokutikula zu finden, was dem zunehmenden Grad der Sklerotisierung (Härtung, chemische Modifikation der Proteinmatrix) von innen nach außen entspricht. Die Ergebnisse legen nahe, dass der Grad der Sklerotisierung den Wassergehalt von Kutikula bestimmt und damit ihre mechanischen Eigenschaften definiert.

Bei unterschiedlichen Indentationsrichtungen traten Anisotropieeffekte auf, die auf die Ausrichtung der Chitinfasern zurückzuführen sind. Diese Effekte waren im rehydrierten Zustand stärker, was den Einfluss des Wassergehaltes auf die mechanischen Eigenschaften der Proteinmatrix verdeutlichen. Durch zyklisches Trocknen und Rehydrieren von Endokutikula wurde demonstriert, dass die mechanischen Eigenschaften durch Änderung des Wassergehaltes reproduzierbar verändert werden können.

Die Materialeigenschaften der kutikularen Komponenten in den photomechanischen IR-Rezeptoren der pyrophilen Arten *Melanophila acuminata* (Buprestidae) und *Aradus albicornis* (Aradidae) sind von entscheidender Bedeutung für den Prozess der Reizübertragung (Translocation). Daher wurden in dieser Arbeit die Härte und der E-Modul der äußeren Exokutikula der inneren Kugel (IR-Exokutikula) und der Mesokutikula im Kern der Kugel (IR-Mesokutikula) in beiden Arten bestimmt. Auch wurden als Referenz Exo- und Mesokutikula in der Umgebung der IR-Rezeptoren getestet. Die IR-Rezeptoren wurden gezielt geöffnet und, nach der zuvor entwickelten Methode, im getrockneten und quasi-nativen Zustand

Zusammenfassung

durch Nanoindentation untersucht. Es zeigte sich, dass in quasi-nativen Proben von *Melanophila* die IR-Exokutikula etwa 50% härter und 20% steifer ist als die Referenz-Exokutikula. In beiden Arten ist die IR-Mesokutikula im quasi-nativen Zustand signifikant weicher (bei *Melanophila* 80%) und elastischer (bei *Melanophila* 90%) als die Referenz-Mesokutikula. Da die thermische Ausdehnung mit den mechanischen Eigenschaften verknüpft ist, konnten die thermischen Ausdehnungskoeffizienten der untersuchten Kutikulatypen abgeschätzt werden. Demnach besitzt die IR-Mesokutikula in beiden Arten, insbesondere im quasi-nativen Zustand, einen relativ hohen thermischen Ausdehnungskoeffizienten (bei *Melanophila* $117 \cdot 10^{-6} \text{K}^{-1}$ im quasi-nativen Zustand), was bei Absorption von Infrarotstrahlung höchstwahrscheinlich zu einem schnellen Druckanstieg im Zentrum des IR-Rezeptors führt. Durch den niedrigen thermischen Ausdehnungskoeffizienten der umgebenden IR-Exokutikula (bei *Melanophila* $44 \cdot 10^{-6} \text{K}^{-1}$ im quasi-nativen Zustand) dehnt sich diese bei Erwärmung relativ wenig aus und bildet, auch aufgrund seines hohen E-Moduls, eine Art Druckgefäß, das das Volumen im Inneren konstant hält. Somit zeigen die Ergebnisse eine Spezialisierung der IR-Exokutikula und der IR-Mesokutikula zur Optimierung der thermomechanischen Prozesse in den photomechanischen IR-Rezeptoren. Dabei weisen die kutikularen Bestandteile der IR-Rezeptoren bei *M. acuminata* offenbar einen höheren Grad der Spezialisierung auf als bei *A. albicornis*.

Die Geometrie der inneren Kugel des IR-Rezeptors von *M. acuminata* wurde durch eine dreidimensionale Rekonstruktion mit hoher Auflösung (100 nm) ermittelt. Hierdurch wurde gezeigt, dass die kelchförmig angeordneten, fluidgefüllten Kavitäten im mesokutikularen Kern lediglich 2% des Volumens der Kugel ausmachen. Dabei erreichen sie durch verzweigte Fluidkanäle in der seitlichen Peripherie des Kerns eine auffällig große Oberfläche, was vermutlich der Wärmeleitung von der IR-Mesokutikula an das Fluid dient.

Die ermittelten thermomechanischen Eigenschaften der spezialisierten Kutikulatypen photomechanischer IR-Rezeptoren, sowie die dreidimensionale Rekonstruktion des IR-Rezeptors von *M. acuminata*, wurden genutzt um ein weiterentwickeltes Konzept für technische, ungekühlte IR-Sensoren zu erstellen. Hierbei wurden Merkmale der biologischen Vorbilder abstrahiert und in entsprechende Empfehlungen für Veränderungen des aktuellen Prototyps umgesetzt. Es wurden unter anderem Veränderungen der Geometrie der Absorberstruktur und des Fluidvolumens empfohlen, als auch eingesetzte Materialien (Fluid, Absorbermaterial) hinsichtlich ihrer thermomechanischen Eigenschaften diskutiert.

1 Einleitung

Pyrophile (feuerliebende) Käfer der Gattung *Melanophila* (Buprestidae) und einige pyrophile Wanzen der Gattung *Aradus* (Aradidae) besitzen Sinnesorgane zur Wahrnehmung von Infrarotstrahlung (Evans 1964; Schmitz et al. 2008). Bei diesen Sinnesorganen handelt es sich um sogenannte, photomechanische Infrarot (IR)-Rezeptoren (Schmitz and Bleckmann 1998; Schmitz et al. 2001). Da auf dem Gebiet der Bionik bereits vielfach Problemlösungen aus der belebten Natur analysiert und in abstrahierter Form in der Technik umgesetzt wurden (Nachtigall 2006), sollen auch die photomechanischen IR-Rezeptoren pyrophiler Insekten als biologisches Vorbild für neue ungekühlte IR-Sensoren dienen.

1.1 Infrarotstrahlung

Infrarotstrahlung ist als elektromagnetische Strahlung im Spektralbereich von 700 nm bis 1 mm Wellenlänge definiert (Vincent 1990). Infrarotstrahlung wird von vielen Festkörpermateriale (z.B. Metallen, aber auch organischen Festkörpern) stark absorbiert, kann jedoch viele kristalline und plastische Materialien sowie Gase passieren. Die Atmosphäre der Erde ist für elektromagnetische Strahlung der Wellenlängen von 3 bis 5 μm sowie von 8 bis 12 μm besonders durchlässig, da in diesem Wellenlängenbereich die Gase der Atmosphäre wenig absorbieren (Vincent 1990). Man spricht hierbei auch von "atmosphärischen Fenstern" für Infrarotstrahlung.

Bei der Absorption von Infrarotstrahlung werden Übergänge zwischen Schwingungs- und Rotationszuständen innerhalb von Molekülen angeregt. Die zur Anregung notwendigen diskreten Energien (und damit Wellenlängen) sind charakteristisch für bestimmte Bindungstypen (Silverstein and Bassler 1963). Folglich bestimmt das Vorkommen von Bindungstypen innerhalb eines Materials dessen Absorptionsverhalten im Infrarotbereich.

1.2 Technisches Problem

Infrarotdetektoren (IR-Detektoren), die sich heute auf dem Markt befinden, lassen sich entsprechend ihrer Funktionsweise in Quantendetektoren und thermische Detektoren gliedern (Rogalski 2002; Rogalski 2003). Die Marktrelevantesten werden im Folgenden kurz dargestellt.

Zu den thermischen IR-Detektoren gehören unter anderem Mikrobolometersysteme und pyroelektrische Sensoren. In Mikrobolometern ändert sich der elektrische Widerstand der absorbierenden Fläche durch die mit der Absorption einhergehende Temperaturänderung. In

Einleitung

Meist sind die absorbierenden Flächen mit Vanadiumoxid beschichtet, da dieses Material eine hohe Änderung seines elektrischen Widerstandes bei Änderung seiner Temperatur aufweist. Letztlich wird hier die Änderung der elektrischen Spannung über das absorbierende Material gemessen. (Vincent 1990; Dereniak and Boreman 1996; Budzier and Gerlach 2010). In pyroelektrischen Detektoren absorbiert ein pyroelektrischer Kristall die IR-Strahlung und reagiert auf die damit einhergehende Temperaturerhöhung mit Ladungstrennung. Die äußere Aufladung des Kristalls wird gemessen (Budzier and Gerlach 2010).

Zu den Quantendetektoren zählen die fotoleitenden Detektoren und Fotovoltaikdetektoren. Es handelt sich hierbei um Halbleitersysteme, die sich den inneren fotoelektrischen Effekt zunutze machen (Vincent 1990; Dereniak and Boreman 1996). Absorbierte Photonen produzieren ungebundene Elektronenlochpaare, wodurch sich die Leitfähigkeit des Halbleitermaterials erhöht. Die Leitfähigkeit stellt in fotoleitenden Detektoren die Messgröße dar. Fotovoltaikdetektoren weisen zusätzlich einen p-n-Übergang auf. Durch die Bildung von Elektronenlochpaaren ergibt sich an der Absorberfläche eine Ladungstrennung, welche als Strom oder als Spannung gemessen wird (Vincent 1990; Dereniak and Boreman 1996). Fotoleitende Detektoren und Fotovoltaikdetektoren können als Arrays hergestellt werden. Normalerweise sind die Detektorfelder jedoch evakuiert und müssen kryogenisch auf -70°C oder tiefer gekühlt werden, um das thermische Rauschen gering zu halten (Vincent 1990). Es wird zwar eine wesentlich höhere Temporaufauflösung als bei ungekühlten Detektoren erzielt, jedoch sind gekühlte Systeme weit kostenintensiver. Zudem ist die Inbetriebnahme aufgrund der Kühlung umständlich und das Gerät insgesamt groß.

Sowohl Mikrobolometer als auch pyroelektrische Detektoren können ebenfalls als Detektorarrays aufgebracht und daher zur Wärmebildgebung eingesetzt werden (Dereniak and Boreman 1996; Budzier and Gerlach 2010). Pyroelektrische Sensoren werden häufig auch in Einzelelement- oder Zeilensensoren verbaut. Beide Systeme arbeiten bei Umgebungstemperatur, die teils durch Peltierelemente konstant gehalten wird. Zudem ist hier eine periodische Abdunkelung des Sensors notwendig (Chopper), um Referenzwerte der einzelnen Detektorelemente zu erhalten. Diese Detektortypen benötigen keine aufwändige Kühlung wie Quantendetektorarrays, erreichen aber auch eine deutlich geringere Temporaufauflösung (NETD, Noise Equivalent Temperature Difference) (Rogalski 2002; Budzier and Gerlach 2010). Zurzeit werden mit Mikrobolometerarrays NETD-Werte von 35-60 mK erreicht.

Eine grundlegende Anforderung an neuartige, marktfähige IR-Sensoren ist demnach das Arbeiten des Systems ohne umständliche Kühlvorrichtungen. Idealerweise sollte das System auch ohne periodische Abdunkelung der Detektorelemente auskommen. Um auf dem Gebiet der Array-fähigen IR-Detektoren konkurrieren zu können, ist eine geringe Größe der Detektorelemente wichtig. Es könnten hierdurch kleinere Sensoren, bzw. größere Pixelzahlen bei

Einleitung

gleicher Größe erreicht werden. Kleinere Sensoren haben u.a. den Vorteil, dass teures Linienmaterial (z.B. Germanium) eingespart wird. Auch sollten eine höhere Temporaturauflösung (NETD) oder geringere Herstellungskosten als bei den herkömmlichen, ungekühlten Systemen erreicht werden (idealerweise Beides). Anforderungen für den Einsatz in Einzel-element- oder Zeilensensoren sind ebenfalls eine hohe Temporaturauflösung und/oder geringe Herstellungskosten.

Als biologisches Vorbild für neue ungekühlte IR-Sensoren dienen hier die photomechanischen IR-Rezeptoren pyrophiler Käfer und Wanzen. Diese ungekühlten IR-Rezeptoren haben einen Durchmesser von weniger als 20 μm und besitzen sehr wahrscheinlich eine hohe Sensitivität (Schmitz and Bleckmann 1998; Schmitz et al. 2007; Schmitz et al. 2008). Von zentraler Bedeutung ist in den photomechanischen IR-Rezeptoren die Kutikula als Rezeptor-Hilfsstruktur. Kutikula ist das Material, aus dem das Exoskelett sowie verschiedene Rezeptorstrukturen an der Körperoberfläche von Insekten besteht (Keil 1997; Gorb 2001). Da es sich bei Kutikula um totes Material handelt, ist der Nachbau dieser Strukturen mit technischen Materialien in abstrahierter Form möglich. Somit ist die Forschung an den Absorberstrukturen der biologischen Vorbilder für die Entwicklung neuer ungekühlter IR-Sensoren lohnend.

1.3 Biologische Vorbilder: IR-Rezeptoren bei *Melanophila acuminata* und *Aradus albicornis*

Pyrophile (feuerliebende) Käfer der Gattung *Melanophila* (Buprestidae) und einige pyrophile Wanzen der Gattung *Aradus* (Aradidae) sind in ihrer Reproduktion auf frische Brandflächen angewiesen (Evans 1964; Schmitz and Bleckmann 1997; Schmitz et al. 2008). Sie besitzen sensorische Strukturen, die es ihnen vermutlich ermöglichen, Waldbrände aus großen Entfernungen aufzuspüren und auf der frischen Brandfläche zu navigieren.

Melanophila-Käfer besitzen zur Feuerdetektion IR-Rezeptoren, die sich in zwei Grubenorganen auf dem Metathorax befinden (Figure 3.2.1 a) (Evans 1964; Schmitz and Bleckmann 1997). Den Hauptbestandteil der reizaufnehmenden Struktur der IR-Rezeptoren bildet Kutikula. Morphologische Untersuchungen haben gezeigt, dass bei *M. acuminata* jeder IR-Rezeptor eine kuppelartige Hülle mit einem Durchmesser von 12-15 μm besitzt, die eine kugelförmige innere Kavität umschließt. Diese ist fast vollständig durch eine Kugel aus Kutikula mit einem Durchmesser von ca. 14 μm ausgefüllt (Schmitz and Bleckmann 1997; Schmitz et al. 2007). Die Kugel besteht aus einem äußeren Mantel aus Exokutikula (IR-Exokutikula) und einem Kern aus Mesokutikula (IR-Mesokutikula) und ist an einem dünnen Stiel an der umgebenden Kuppel aufgehängt (Figure 3.2.2). Zwischen Kugel und Kuppel liegt zudem eine

Einleitung

dünne Schicht aus Hüllzellen. Die IR-Exokutikula besitzt im getrockneten Zustand sowohl eine größere Härte als auch einen größeren Elastizitätsmodul (E-Modul) als die IR-Mesokutikula (Müller et al. 2008). Es wurde gezeigt, dass die Mesokutikula der inneren Kugel unregelmäßig angeordnete Mikrokanäle beinhaltet. Diese enthalten Flüssigkeit und enden in einer größeren Druckkammer, die von einer mechanosensitiven Nervenzelle innerviert wird (Figure 3.2.2). Die mit Flüssigkeit (Fluid) gefüllten Kavitäten bilden zusammen mit der IR-Mesokutikula ein sogenanntes mikrofluidische Zentrum. Nach dem aktuellen Funktionsmodell arbeitet der Infrarotrezeptor bei *M. acuminata* als mikrofluidischer Konverter: Infrarotstrahlung wird absorbiert und führt über Temperaturerhöhung zu einem Druckanstieg im mikrofluidischen Zentrum, der in einer Querkompression der Dendritenspitze resultiert (Schmitz et al. 2007). Vermutlich wird der Druckanstieg innerhalb des mikrofluidischen Zentrums durch den harten Mantel aus IR-Exokutikula begünstigt, der nur eine sehr geringe Volumenzunahme in der Peripherie der Kugel zulässt. Man spricht hierbei vom photomechanischen Prinzip der IR-Rezeption (Schmitz and Bleckmann 1998; Schmitz et al. 2007). Ein weiteres strukturelles Merkmal der IR-Rezeptoren bei *M. acuminata* sind Nanokanäle, die sich durch den äußeren Mantel der Kugel ziehen und höchstwahrscheinlich einen langsamen Durchfluss von Flüssigkeit erlauben (Schmitz et al. 2007). Vermutlich können dadurch langsame Druckänderungen aufgrund von Temperaturänderungen in der Umgebung ausgeglichen werden. Somit reagiert der Rezeptor auf niederfrequente Temperaturänderungen nicht mit Erhöhung der Feuerrate. Die Nanokanäle funktionieren demnach als Hochpassfilter. Zudem wird vermutlich nach einem Druckanstieg durch absorbierte IR-Strahlung der Druck auf den Ausgangswert zurückgesetzt, wodurch das System an eine erhöhte Intensität von IR-Strahlung adaptiert (Schmitz et al. 2007).

Auch bei den feuerliebenden Rindenwanzen der Gattung *Aradus* wurden photomechanische IR-Rezeptoren nachgewiesen (Schmitz et al. 2008). Bei *Aradus albicornis* befinden sich IR-Rezeptoren beidseitig in der Propleuralregion des Prothorax, posterior zum ersten Beinpaar sowie auf dem Metathorax, posterior zum zweiten Beinpaar (Schmitz et al. 2010). Diese IR-Rezeptoren ähneln in ihrer äußeren Morphologie stark den IR-Rezeptoren von *M. acuminata* (Figure 3.2.1). Bei *A. albicornis* besteht der IR-Rezeptor aus einer inneren Kugel von ca. 10 µm Durchmesser, die von einer kuppelförmigen Schicht aus Meso- und Exokutikula bedeckt wird (Figure 3.2.2). Die Kugel besteht auch hier aus einem äußeren Mantel aus IR-Exokutikula und einem inneren Kern aus IR-Mesokutikula. Der Kern enthält fluidgefüllte Kavitäten und bildet mit ihnen das mikrofluidische Zentrum. Eine mechanosensitive Nervenzelle innerviert den Rezeptor, wobei die Dendritenspitze in das mikrofluidische Zentrum hineinragt (Schmitz et al. 2008). Obwohl bei *A. albicornis* die gleichen funktionellen Komponenten der photomechanischen IR-Detektion wie bei *M. acuminata* zu finden sind, gibt es doch strukturelle Unterschiede. So setzt sich das mikrofluidische Zentrum bei *M. acuminata* aus ver-

zweigten Mikrokanälen und einer Flüssigkeitskammer zusammen, während es bei *A. albicornis* aus einer ringartigen Flüssigkeitskammer besteht, welche die Dendritenspitze umgibt (Schmitz et al. 2008). Auch ist bei *A. albicornis* die äußerste Dendritenspitze in amorpher Kutikula verankert (Figure 3.2.2). Die Nanokanäle, wie sie im äußeren Mantel der IR-Rezeptoren von *M. acuminata* vorkommen, konnten bei *A. albicornis* bislang nicht nachgewiesen werden. Auch befindet sich bei *M. acuminata* eine dünne Schicht aus Hüllzellen zwischen der inneren Kugel und der sie umgebenden Kutikulakuppel, während bei *A. albicornis* die innere Kugel im direkten Kontakt mit der umgebenden Kutikula steht (Schmitz et al. 2008).

1.4 Insektenkutikula

Bei Kutikula handelt es sich um einen Verbundwerkstoff aus Chitinfasern, die in eine Proteinmatrix eingebettet sind (Hepburn and Chandler 1976; Vincent 1980; Romano et al. 2007). Chitin ist ein langkettiges Polysaccharid, das aus Acetylglucosamin-Einheiten aufgebaut ist. Diese sind durch β -1,4-glycosidische Bindungen verknüpft (Vincent and Wegst 2004). Die Chitin-Moleküle liegen im Verbund antiparallel zueinander und sind über Wasserstoffbrücken verbunden (Neville 1975; Vincent 1980). 19 Moleküle bilden eine Nanofibrille (Vincent and Wegst 2004). Diese sind von Proteinen ummantelt und formen Fasern (Abbildung 1.4.1 a) (Vincent 2002; Romano et al. 2007).

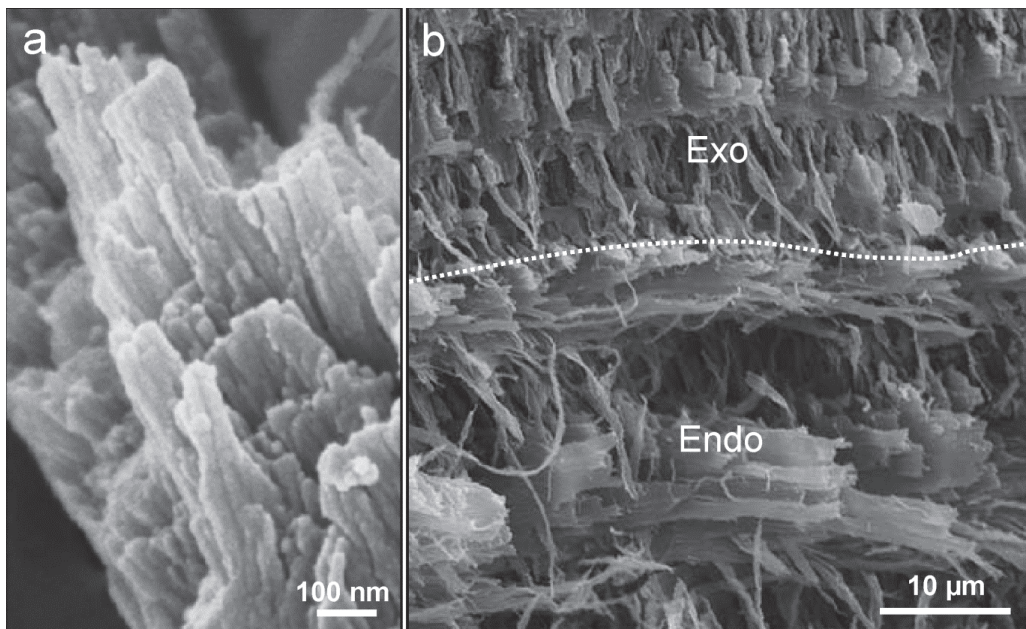


Abbildung 1.4.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Arthropodenkutikula (*Homarus americanus*). **a** Hochauflösende Aufnahme der Architektur der Chitin-Protein-Fasern (Raabe et al. 2006). **b** Querschnitt: Unterschiedlich dichte Schichtung von Chitinfaserlagen zwischen Exokutikula (Exo) und Endokutikula (Endo). Eine Mesokutikula besteht in diesem Fall nicht. Verändert nach Raabe et al. (2005).

Das Exoskelett von Arthropoden setzt sich aus mehreren aufeinanderfolgenden Schichten unterschiedlicher Kutikulatypen zusammen (Neville 1975; Vincent 1980; Vincent and Wegst 2004). Die äußerste, sehr dünne Schicht wird von der Epikutikula gebildet. Sie enthält kein Chitin und weist Lipide und Wachse an ihrer Oberfläche auf. Die Schicht darunter besteht aus Exokutikula. Diese enthält relativ wenig Wasser und stellt typischerweise den härtesten und unelastischsten Kutikulatyp dar. Auch weist sie die dichteste Schichtung von Chitinfaserlagen unterschiedlicher horizontaler Ausrichtung auf (Abbildung 1.4.1 b) (Neville 1975; Vincent 1980; Vincent and Wegst 2004). Darauf folgen Meso- und Endokutikula, die in der Regel einen höheren Wassergehalt, geringere Härte, größere Elastizität und eine weniger dichte Schichtung der Chitinfaserlagen (Abbildung 1.4.1 b) besitzen. Hierbei ist die Endokutikula weicher, elastischer und weniger dicht geschichtet als die Mesokutikula (Vincent and Wegst 2004).

Die mechanischen Eigenschaften von Insektenkutikula werden vom Grad ihrer Sklerotisierung (Härtung) und durch ihren Wassergehalt bestimmt. Einigen Studien zufolge ändern sich die Materialeigenschaften während der Sklerotisierung als direkte Folge der Quervernetzung von Proteinen durch kovalente Bindungen (Pryor 1940).

Dem gegenüber steht das Konzept der kontrollierten Dehydrierung: Durch die Sekretion von Chinonen werden phenolische Verbindungen in die Proteine der Kutikula eingebracht und somit deren Hydrophobie erhöht. Je nach Grad der Sklerotisierung variiert dadurch die Menge an ungebundenem Wasser, das von der Kutikula aufgenommen werden kann (Hillerton and Vincent 1979; Vincent and Ablett 1987). Die Änderung der mechanischen Eigenschaften ist demnach keine direkte Folge der Sklerotisierung, sondern wird hauptsächlich indirekt durch die Änderung des Wassergehaltes aufgrund der chemischen Modifikation der Kutikula-Proteine hervorgerufen. Tatsächlich wurde gezeigt, dass der Wassergehalt mit zunehmendem Grad der Sklerotisierung abnimmt (Fraenkel and Rudall 1940; Vincent and Ablett 1987). Dass der Wassergehalt einen starken Einfluss auf die Materialeigenschaften von Insektenkutikula hat, gilt als erwiesen: Sowohl die Härte als auch der E-Modul nehmen mit steigendem Wassergehalt ab (Vincent and Wegst 2004; Schöberl and Jäger 2006; Vincent 2009). Trotzdem wurde der Einfluss des Wassergehaltes auf einzelne kutikuläre Schichten mit einem unterschiedlichen Grad der Sklerotisierung bislang nicht untersucht.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Erlangung von Erkenntnissen zur Entwicklung marktfähiger technischer IR-Sensoren, die von photomechanischen IR-Rezeptoren bei *Melanophila*

Einleitung

Käfern und *Aradus*-Wanzen abgeleitet sind. Für die Verfeinerung und Weiterentwicklung des bisherigen Konzeptes für den technischen Sensor ist eine umfassende Untersuchung der funktionellen Morphologie und der kutikularen Bestandteile der natürlichen Rezeptoren unerlässlich. Konkrete Ziele dieser Arbeit sind daher:

- Die Ermittlung der dreidimensionalen Geometrie des IR-Rezeptors von *M. acuminata*. Eine maßstabsgetreue und präzise Rekonstruktion soll angefertigt werden, die die Geometrie, Volumina und Grenzflächen der einzelnen, für die Funktion relevanten Rezeptorbestandteile wiedergibt.

- Die Bestimmung der Materialeigenschaften von Kutikulatypen innerhalb der IR-Rezeptoren bei *M. acuminata* und *A. albicornis*. Es sollen die Materialeigenschaften der verschiedenen Kutikulatypen bei möglichst natürlichem (quasi-nativem) Wassergehalt gemessen werden. Hierbei soll auch die Hypothese getestet werden, dass der Wassergehalt die thermomechanischen Eigenschaften von Kutikula definiert. Bisher war es nicht möglich, verschiedene Kutikulatypen innerhalb einer quasi-nativen Probe systematisch zu testen. Daher liegt hier der Schwerpunkt auch auf der Entwicklung einer Methode zur Untersuchung von Härte und E-Modul einzelner kutikularer Domänen in quasi-nativen Kutikulaprobe.

Letztlich soll aufgrund der Ergebnisse der oben genannten Untersuchungen ein weiterentwickeltes Konzept für neue, ungekühlte IR-Sensoren erstellt werden.

2 Methoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden dargestellt. Um eine mehrfache Beschreibung der Methoden zu vermeiden, wird zum Teil auf die Methodenbeschreibungen der Fachartikel verwiesen, die Teil dieser Arbeit sind.

2.1 Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie

Kutikulabereiche mit Infrarotrezeptoren von *A. albicornis* und Infrarotorgane von *M. acuminata* wurden in gekühltem Glutaraldehyd herauspräpariert (3% Glutaraldehyd in 0,05 mol l⁻¹ Cacodylatpufferlösung, pH 7,1) und über Nacht fixiert. Die IR-Organen wurden in Puffer gewaschen, mit 1,5% Osmiumtetroxid im gleichen Puffer nachfixiert, durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert und in Epon 812[®] eingebettet. Semi- (0,5-2 µm Dicke) und Ultradünnschnitte (ca. 100 nm Dicke) wurden mit einem Reichert Ultracut[®] Mikrotom geschnitten. Hierbei wurde ein Diamantmesser benutzt (Diatome[®]).

Gefärbte Semidünnschnitte wurden im Lichtmikroskop (Leitz DM RBE[®]) untersucht. Digitalfotos der Schnitte wurden mit einer Digitalkamera (Nikon Coolpix 5000[®]) aufgenommen (siehe hierzu 3.3.2.1 und 3.4.2.3). Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) (Zeiss Libra 120) untersucht. Digitalfotos wurden über eine integrierte Kamera aufgenommen.

2.2 Dreidimensionale Rekonstruktion des IR-Rezeptors von *M. acuminata*

Es wurde eine Schnittserie von 200 Ultradünnschnitten durch ein Infrarotorgan von *M. acuminata* angefertigt. Somit wurde die innere Kugel eines IR-Rezeptors vollständig erfasst. Die Schnitte wurden kontrastiert, im TEM fotografiert und als jpeg-Dateien gespeichert. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm CorelDRAW X4[®] wurden die Bilder in Graustufen umgewandelt. Mit dem Bildverarbeitungsprogramm Adobe Photoshop[®] wurde anhand des Maßstabsbalkens der TEM-Bilder die Kantenlänge eines einzelnen Pixels berechnet (14,77 nm). Somit konnte die Schnittdicke in eine Anzahl von Pixeln umgerechnet werden (6,67 Pixel pro Schnitt). Die Dateinamen der TEM-Bilder wurden ihrer Reihenfolge gemäß in einer Textdatei gespeichert (Anhang 8.2). Hier wurde der Abstand eines jeden Schnittes zum Beginn der

Methoden

Schnittserie in Pixeln angegeben, um die Schnittdicke in der Rekonstruktion berücksichtigen zu können. Ungeeignete Schnitte wurden hierbei mit einbezogen.

Die Rekonstruktion des IR-Rezeptors wurde mit dem 3D-Rekonstruktionsprogramm AVIZO 6.00[®] erstellt. AVIZO legt während der Erstellung ein Arbeitsskript an, in dem angewandte Funktionen des Programms und speicherbare Zwischenergebnisse dargestellt werden (Abbildung 2.2.1). Eine nachträgliche Bearbeitung eines Zwischenergebnisses bringt jedoch stets das Verwerfen aller bis dahin bestehenden nachfolgenden Zwischenergebnisse mit sich.

Zunächst wurde die Textdatei in AVIZO geladen. Über die Funktion `AlignSlices` wurden die Schnitte manuell an den jeweils benachbarten Schnitten ausgerichtet. Hierbei wurde Priorität auf die korrekte Ausrichtung der inneren Kugel des IR-Rezeptors gelegt. Über die Funktion `Label/Voxel` wurden manuell die verschiedenen Materialien der inneren Kugel (Exokutikula, Mesokutikula, Fluid) und die innervierende Dendritenspitze farblich markiert und als unterschiedliche Materialtypen gespeichert. Durch das Anwenden der Funktion `Resample` wurde die Voxelzahl vermindert und somit die Datenmenge reduziert. Hierdurch wurde die Verarbeitungszeit in den folgenden Arbeitsschritten deutlich vermindert, und die spätere grafische Darstellung der Rekonstruktion erfolgte wesentlich schneller. Über die Funktion `SurfaceGen` wurde nun die eigentliche dreidimensionale Rekonstruktion berechnet und über die Funktion `SurfaceView` grafisch dargestellt. In der grafischen Darstellung können alle gespeicherten Materialtypen entfernt, hinzugefügt und zu einem beliebigen Grad transparent dargestellt werden. Volumina und Oberflächen der einzelnen Materialtypen wurden über `MaterialStatistics` in der Einheit Pixel angezeigt und in die Einheit Kubikmeter umgerechnet (Anhang 8.3).

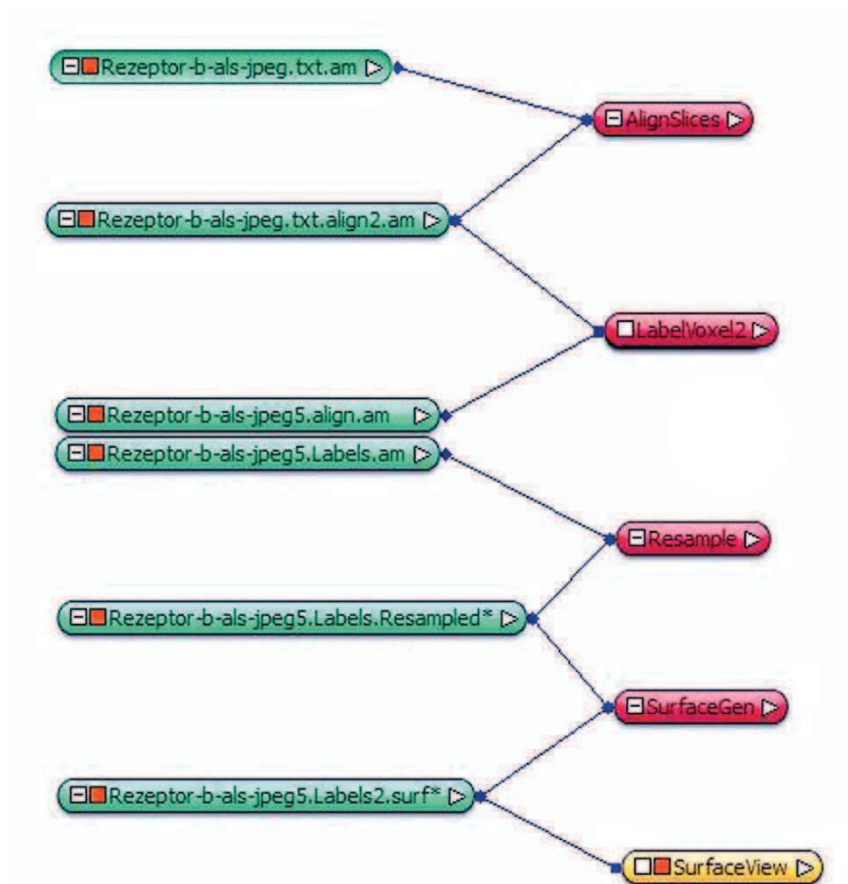


Abbildung 2.2.1 Arbeitsskript zur Erstellung einer 3D-Rekonstruktion in AVIZO 6.00[®]. Die grünen Module sind speicherbare Zwischenergebnisse. Die roten Module stellen Funktionen des Programms dar, die vorangegangene Zwischenergebnisse prozessieren und neue Zwischenergebnisse erzeugen. Das gelbe Modul steht für die grafische Darstellung. (Screenshot aus Programm AVIZO[®].)

2.3 Probenvorbereitung für Rasterkraftmikroskopie und Nanoindentation

2.3.1 Einbettmedien

Für die Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie (2.1) sowie für die Nanoindentation und Rasterkraftmikroskopie (englisch: Atomic force microscopy, AFM) an getrockneten Proben hat sich die Einbettung von Kutikulapräparaten in das Epoxidharzgemisch Epon 812 (Luft 1961) bewährt. Es stellte sich jedoch heraus, dass dieses Epoxidharz bei Kontakt mit Wasser innerhalb weniger Minuten eine "schleimige" Oberfläche aufweist, was sowohl Nanoindentationsversuche als auch topographische Untersuchungen in Wasser unmöglich macht. Es wurden daher verschiedene Einbettmedien (Anhang 8.1) unter Wasser getestet. Das Epoxidharz "L" (Toolcraft[®], Conrad Electronics) erwies sich schließlich als geeignet, da hierin eingebettete Proben auch nach mehreren Stunden unter Wasser problemlos topogra-

Methoden

phisch abgebildet und indentiert werden können. Seine dünnflüssige Konsistenz macht die Einbettung von Kutikulaprobe einfach, da selten Luftblasen an der Oberfläche der Probe verbleiben. Zudem härtet Epoxidharz "L" im Gegensatz zu Epon 812 bei Raumtemperatur aus, wodurch eine Veränderung der Materialeigenschaften der Probe durch hohe Temperaturen ausgeschlossen werden kann.

Die Einbettung von Kutikulaprobe in Epoxidharz macht es möglich, die Morphologie und die mechanischen Eigenschaften von Kutikulapräparaten umfassend an ein und derselben Probe zu untersuchen (Abbildung 2.3.1). Die Verwendung von Epoxidharz "L" ermöglicht zusätzlich die Untersuchung der Topographie und der mechanischen Eigenschaften in Wasser.

2.3.2 Präparation, Einbettung und Anschneiden der Proben

Relevante Kutikularegionen wurden in Wasser aus dem lebenden Insekt präpariert, luftgetrocknet und in Epoxidharz "L" eingebettet. Nach 24 Stunden war das Epoxidharz ausgehärtet. Die Probenblöckchen wurden mit UHU Schnellfest[®] auf AFM-Halterplatten (Stahl, 15 mm Durchmesser) aufgeklebt und mit einer Diamantfräse (TM 60[®], Reichert) bis zur gewünschten Höhe abgefräst. Die Höhe der Probenblöckchen ist durch die Wandhöhe der Fluidzellen für Rasterkraftmikroskopie (6 mm) und Nanoindentation (3 mm) in Wasser begrenzt (Abbildung 2.3.1). Um die Anschnittfläche für das anschließende Schneiden am Mikrotom zu verkleinern, wurden die oberen Kanten des Blöckchens mit der Fräse getrimmt. Semidünnschnitte (0,5-2 µm Dicke) wurden am Mikrotom mit einem Diamantmesser abgetragen, angefärbt und mikroskopisch untersucht, bis die gewünschte Struktur auf der Probe erreicht war. Abschließend wurde die Oberfläche des Blöckchens durch das Anfertigen einiger Ultradünnschnitte (ca. 100 nm Dicke) poliert (siehe hierzu 3.3.2.1 und 3.4.2.3).

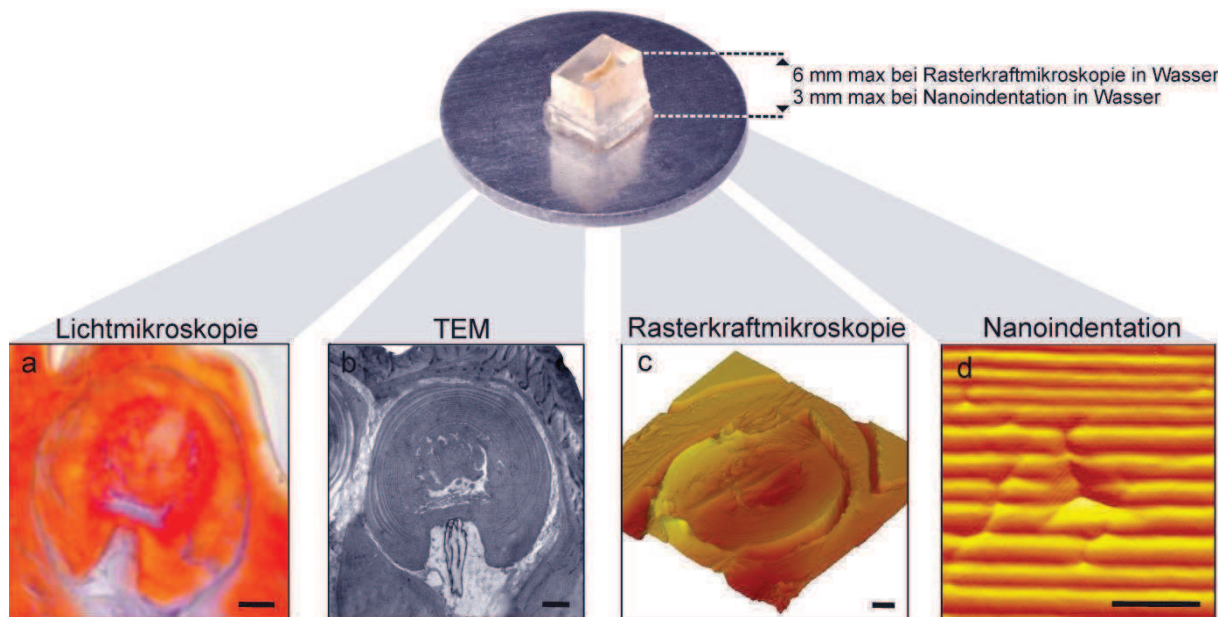


Abbildung 2.3.1 Umfassende Untersuchung von Morphologie, Ultrastruktur und mechanischen Eigenschaften von Insektenkutikula anhand eingebetteter Proben. **Oben:** Poliertes Probenblöckchen, aufgeklebt auf Halterplatte. **a** Lichtmikroskopische Abbildung eines Semidünnschnittes (2 μm Dicke). **b** Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme eines Ultradünnschnittes (ca. 100 nm Dicke). **c** Rasterkraftmikroskopisch gemessene Topographie der Probenoberfläche, dreidimensionale Darstellung. **d** Pyramidaler Eindruck nach Eindrückversuch mit dem Nanoindenter, abgebildet durch Topographie-Scan mit der Nanoindenterspitze. Rasterkraftmikroskopie (**c**) und Nanoindentation (**d**) wurden sowohl in Luft (hier gezeigt) als auch in Wasser durchgeführt. Präparate: **a-c** *M. acuminata*, jeweils zentral angeschnittener IR-Rezeptor. **d** *Locusta migratoria*, Querschnitt der Kutikula der Sternalplatte. Maßstabsbalken 2 μm .

2.4 Rasterkraftmikroskopie

2.4.1 Messprinzip

Die Rasterkraftmikroskopie ist eine Methode zur mechanischen Abtastung von Oberflächen, wobei idealerweise Auflösungen im Nanometerbereich erreicht werden können. Bei der Messung wird eine sehr feine Spitze mit Hilfe von lateralen Piezo-Stellelementen zeilenweise über einen zuvor festgelegten Bereich der Probenoberfläche bewegt. Die an einer Blattfeder (Cantilever) befestigte Spitze tastet die Oberfläche zeilenweise ab (rastern, scannen). Hierbei wird durch die Oberflächenstruktur der Probe der Cantilever je nach Position auf der Probe unterschiedlich weit durchgebogen (Kontaktmodus, s.u.). Über die mit Gold bedampfte Oberseite des Cantilevers wird ein Laserstrahl auf einen Viersegment-Photodetektor reflektiert (Abbildung 2.4.1). Vor Beginn der Messung wird der Strahl so justiert, dass der Laserpunkt auf die Mitte des Photodetektors trifft, und somit alle Segmente den gleichen Photostrom liefern. Die Durchbiegung des Cantilevers führt zu einer vertikalen Auslenkung des Laserstrahls auf dem Photodetektor (Lichtzeigerprinzip). Der Unterschied der Summen der

Methoden

Photoströme (die beiden oberen gegen die beiden unteren Segmente) wird ermittelt und an die Regelungselektronik geleitet. Diese legt eine Spannung an den z-Piezo (Höhenregulierung) an, sodass der Piezo die Höhe des Cantilevers korrigiert bis der Laserstrahl wieder die Mitte des Photodetektors trifft.

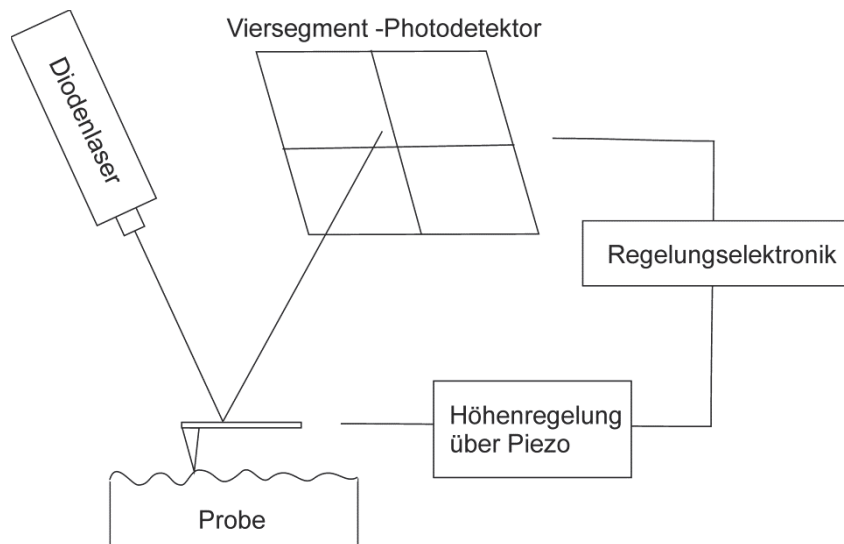


Abbildung 2.4.1 Messprinzip des Rasterkraftmikroskops. (Verändert nach Kaupp 2006.)

Die in dieser Arbeit vorgestellten bildgebenden Messungen wurden ausschließlich im Kontaktmodus durchgeführt. Hierbei steht die Messspitze in direktem mechanischem Kontakt mit der Probenoberfläche. Zwischen den Elektronenhüllen der Atome der Messspitze und jenen der Probenoberfläche entsteht dabei eine starke elektrostatische Abstoßung (Pauli-Prinzip).

Es wurde im Constant Force Mode gearbeitet. Hierbei wird die Kraft, mit der die Cantileverspitze auf dem Substrat aufliegt, vorgegeben (Current Setpoint). Ein Piezo-Stellelement steuert die Höhe des Cantilevers über der Probe so, dass die auf die Spitze wirkende Kraft und damit die Durchbiegung des Cantilevers möglichst konstant bleibt. Ändert sich also während des Scan-Vorgangs die Höhe der Probenoberfläche unter der Spitze, so wird der Cantilever ausgelenkt und dessen Höhe über einen Regelkreis nachgeregelt. Das gemessene Signal (proportional zur Kraft) wird als Ist-Wert dem Regler zugeführt und durch die Höhenänderung des Cantilevers an den Sollwert angepasst (Abbildung 2.4.1). Aus der Information der Nachregelung (Spannung am z-Piezo) wird dann die Topographie der Probenoberfläche berechnet. Durch die Zuordnung von Falschfarben zu den einzelnen Messpunkten wird die Topographie bildlich dargestellt.

2.4.2 Topographische Untersuchungen unter Wasser

Für die rasterkraftmikroskopische Untersuchung von Kutikulaprobe in Wasser wurde der AFM-Messkopf mit einem Cantilever-Halter (Bruker®) für Messungen in Fluid ausgerüstet (Abbildung 2.4.2 a, Inset). Hierdurch wird die Elektronik des Messkopfes vor dem Wasser geschützt. Für Laser und Optik befindet sich ein Glasfenster oberhalb der Cantileverspitze. Die Messungen wurden in einer hierzu speziell angefertigten Fluidzelle (Abbildung 2.4.2 b) durchgeführt. Die Proben wurden zunächst im getrockneten Zustand untersucht. Anschließend wurden sie durch das Einfüllen von Wasser in die Fluidzelle rehydriert (erlangten ihren vollen Wassergehalt) und wurden daraufhin in einem sogenannten quasi-nativen Zustand untersucht (siehe hierzu 3.3.2.2 und 3.4.2.4).

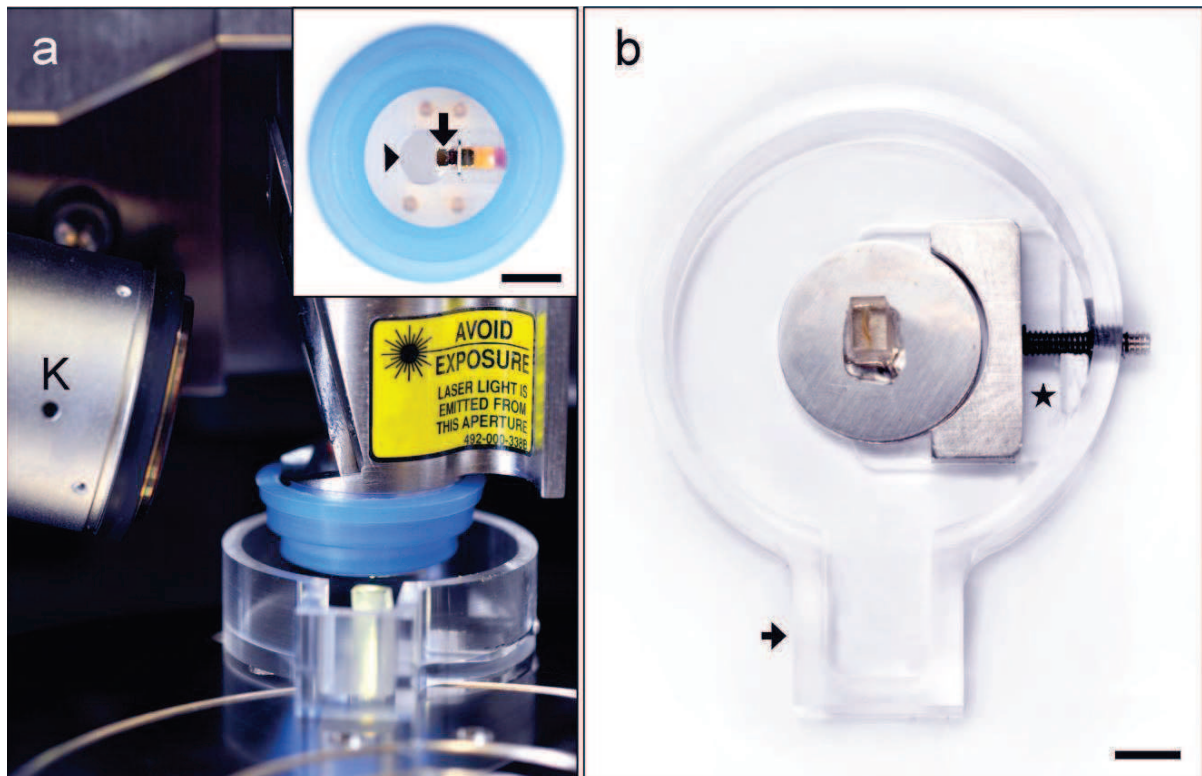


Abbildung 2.4.2 Rasterkraftmikroskopie in Wasser. **a** AFM-Messkopf, ausgerüstet mit Fluid-Cantileverhalter und blauer Dichtung über Fluidzelle (ohne Wasser gezeigt). Kamera (K). **Inset:** Fluid-Cantileverhalter mit Dichtung (Ansicht Unterseite). Cantilever (Pfeil), Fenster für Laser und Kameraoptik (Pfeilkopf). **b** Fluidzelle (Aufsicht) aus Plexiglas, innere Wandhöhe 9 mm. Im Boden befindet sich eine Vertiefung von 1 mm (Stern) zum Fixieren der Halterplatte mit der Klemmvorrichtung. Über den Vorsprung (Pfeil) wird mit einer Spritze Wasser in die Fluidzelle gegeben. Maßstabsbalken 5 mm.

2.5 Nanoindentation

Die Nanoindentation ist eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften von sehr kleinen Materialvolumina. Hierzu wird eine Diamantspitze mit bekannter Geometrie in die zu prüfende Oberfläche hineingedrückt (Oliver and Pharr 1992). Während des Messvorgangs werden gleichzeitig die applizierte Eindringkraft und der Eindringweg der Diamantspitze gemessen. Durch die bekannte Geometrie der Prüfspitze und den aus der Messung resultierenden Kraft-Weg-Kurven können die Härte und der E-Modul des zu untersuchenden Materials bestimmt werden.

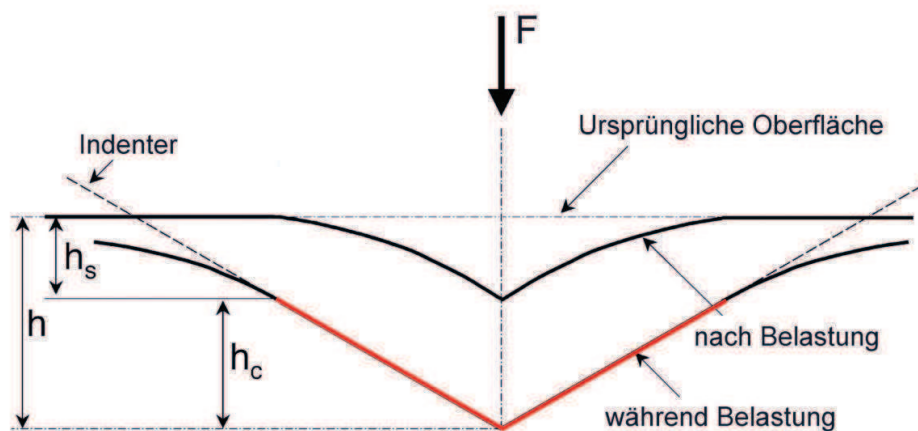


Abbildung 2.5.1 Schematische Darstellung verschiedener Phasen des Eindrückprozesses. Die Kontaktfläche bei maximaler Belastung ist rot markiert. (Verändert nach Oliver und Pharr 1992.)

Die Härte (H) ist die maximale Eindringkraft (F_{max}) geteilt durch die Kontaktfläche (A):

$$H = \frac{F_{max}}{A}$$

Die Kontaktfläche lässt sich berechnen über

$$A = k \cdot h_c$$

wobei h_c die Kontakttiefe und k eine geometrische Konstante der Indenterspitze ist (bei Berkovich-Spitzen beträgt sie 24,5). Mit dem Nanoindenter kann stets nur die maximale Eindringtiefe h_{max} gemessen werden (Abbildung 2.5.1). Die tatsächliche Kontakttiefe h_c ergibt sich aus

$$h_c = h_{max} - h_s$$

Methoden

wobei h_s die elastische Auslenkung der Probenoberfläche am äußeren Rand der Kontaktfläche ist (Abbildung 2.5.1). h_s ist sowohl von der Geometrie der Indenterspitze als auch von den Materialeigenschaften der Probe abhängig und lässt sich wie folgt berechnen:

$$h_s = \varepsilon \frac{F_{\max}}{S}$$

Hierbei ist ε eine geometrische Konstante des Indenters (Oliver and Pharr 1992; Hay and Pharr 2000). S ist die experimentell bestimmte Kontaktsteifigkeit des untersuchten Materials, welche der Steigung am oberen Anfang der Entlastungskurve entspricht.

Der reduzierte E-Modul E_r lässt sich wie folgt berechnen:

$$E_r = \frac{S\sqrt{\pi}}{2\beta\sqrt{A}}$$

Hierbei ist β eine von der Indentergeometrie abhängige Konstante (1.034 bei Berkovich-Spitzen) (Oliver and Pharr 1992; Hay and Pharr 2000). Da auch die Elastizität des Indenters die Messung des E-Moduls beeinflusst, kann der Nanoindenter stets nur der reduzierte E-Modul E_r messen, wie folgende Gleichung zeigt:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{(1 - \nu_p^2)}{E_p} + \frac{(1 - \nu_i^2)}{E_i}$$

Hierbei ist ν_p die Poissonzahl der Probe und E_p der E-Modul der Probe. ν_i und E_i sind die entsprechenden Werte für den Indenter. Die Poissonzahl ist definiert als negatives Verhältnis aus relativer Dickenänderung zur relativen Längenänderung unter Einwirkung einer äußeren Kraft. Aufgrund des sehr hohen E-Moduls der in dieser Arbeit verwendeten Diamantspitze (1141 GPa (Oliver and Pharr 1992)) wird der Term $(1 - \nu_i^2)E_i^{-1}$ sehr klein und kann daher vernachlässigt werden. Im Folgenden wird E_r daher der E-Modul genannt, auch wenn streng genommen der reduzierte E-Modul gemeint ist.

Die Kontaktfläche ist eine ausschlaggebende Größe für die Berechnung von E-Modul und Härte. Theoretisch lässt sie sich für jede Eindringtiefe leicht berechnen ($A_{\text{theor}} = 24,5 h_c^2$ bei Berkovich-Spitzen). Jedoch weicht die tatsächliche Spitzengeometrie von der idealen Geometrie ab, da die Spitze immer eine gewisse Rundung aufweist, und der Radius der Spitze durch Abnutzung der Spitze zunimmt (Kaupp 2006). Zur Erstellung einer Kontaktflächenfunktion (area function) werden Messungen mit verschiedenen Eindringkräften und somit verschiedenen Eindringtiefen auf einer Eichprobe mit bekannter Härte und E-Modul durchge-

Methoden

führt. Zu jeder Messung wird hierbei die Kontaktfläche berechnet. Die berechneten Kontaktflächen werden als Funktion der entsprechenden Kontakttiefen aufgetragen und anschließend wird die folgende Funktion angefitet:

$$A = C_0 h_c^2 + C_1 h_c + C_2 h_c^{1/2} + C_3 h_c^{1/4} + C_4 h_c^{1/8} + C_5 h_c^{1/16}$$

Anhand der in dieser Funktion enthaltenen Konstanten (C_0 - C_5) kann nun auch auf Proben mit unbekanntem Materialeigenschaften für jede ermittelte Kontakttiefe h_c die entsprechende Kontaktfläche ermittelt werden. Somit lassen sich Härte und E-Modul bestimmen.

Der prinzipielle Aufbau des Nanoindentationsversuchs und die Funktionsweise des Nanoindenters kann aus Abbildung 2.5.2 ersehen werden.

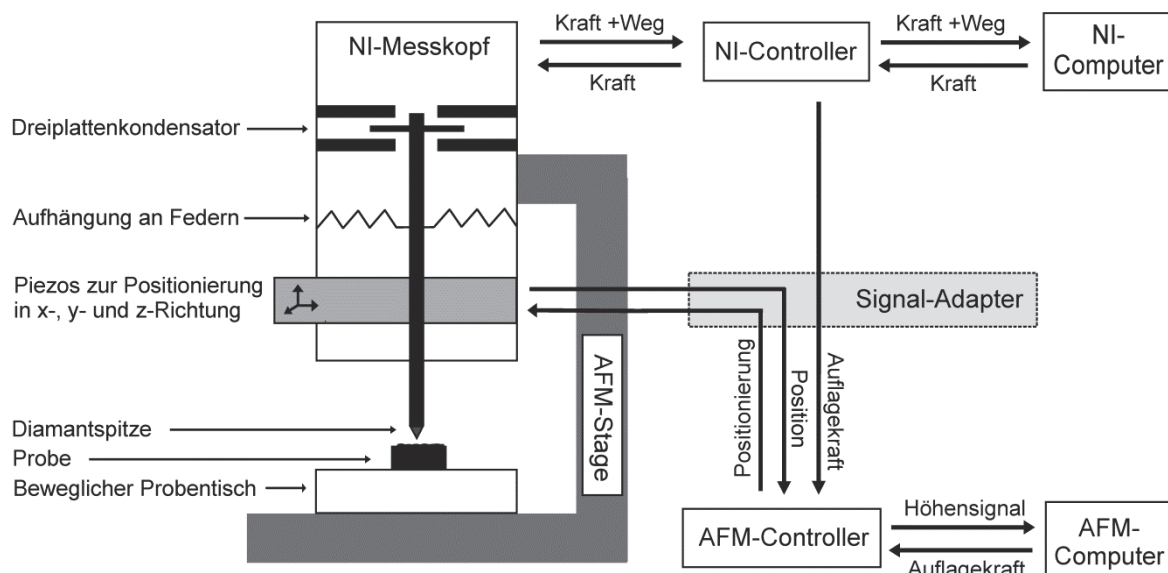


Abbildung 2.5.2 Schematischer Aufbau des Nanoindentationsversuchs. Der Nanoindentations (NI)-messkopf wird auf einer AFM-Stage angebracht. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an den Dreiplattenkondensator des Messkopfes entsteht eine Kraft auf die mittlere Kondensatorplatte. Hierdurch wird der Stift mit der Diamantspitze in die Probenoberfläche gedrückt. Die Verschiebung der mittleren Kondensatorplatte bewirkt eine Kapazitätsänderung der beiden Teilkondensatoren. Hierdurch lassen sich Kraft und Eindringtiefe bestimmen. Über im Messkopf integrierte Piezos ist ein Scannen der Probenoberfläche möglich. Während des Scannens versorgt der NI-Controller das AFM-System mit Informationen über die Auflagekraft, sodass die Höhe der Spitze nachgeregelt werden kann. Vor jedem Eindrückversuch wird der Indenter über die Piezos auf der Probe positioniert.

2.5.1 Messungen unter Wasser

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Nanoindentationsexperimenten erstmalig systematisch verschiedene Kutikulatypen innerhalb rehydrierter Kutikulaprobe getestet. Im Gegensatz

Methoden

zur Probenvorbereitung für die Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Präparate in Epoxidharz "L" eingebettet (2.3.1). Dies ermöglichte Messungen an rehydrierten Proben in Wasser. Weiterhin wurden hierzu eine Berkovich-Spitze für Messungen in Fluid und eine Fluidzelle (Figure 3.3.1 a) benutzt. Zur Durchführung der Indentationsexperimente an rehydrierten Proben siehe 3.3.2.2 und 3.4.2.4.

3 Ergebnisse

Nachfolgend werden in 3.1 die Ergebnisse der Rekonstruktion dargestellt. Die Teile 3.2 und 3.3 sind publizierte Fachartikel. Bei 3.4 handelt es sich um ein bislang nicht veröffentlichtes Manuskript. Es wird zwischen den einzelnen Ergebnisteilen übergeleitet.

3.1 Dreidimensionale Rekonstruktion der inneren Kugel des IR-Rezeptors von *M. acuminata*

Die auf TEM-Aufnahmen basierende Rekonstruktion (Abbildung 3.1.1) zeigt die komplexe dreidimensionale Anordnung der Fluidkanäle innerhalb der inneren Kugel des IR-Rezeptors von *M. acuminata*. Von der Druckkammer ausgehend verzweigen sich die Kavitäten in distaler Richtung (Abbildung 3.1.1 a,b). Nahezu das gesamte Volumen der Fluidkanäle liegt innerhalb des mesokutikularen Kerns der Kugel (vgl. Abbildung 3.1.1 b,c) und bilden mit ihm zusammen das mikrofluidische Zentrum. Die Fluidkanäle distal der Druckkammer bilden ein dichtes Geflecht in der seitlichen Peripherie des mikrofluidischen Zentrums. Im Zentrum des mikrofluidischen Kerns kommen dagegen keine Fluidkanäle vor. Somit bilden die Druckkammer und die Fluidkanäle eine kelchartige Anordnung (Abbildung 3.1.1 Inset). Zum Teil liegen kleine fluidgefüllte Kavitäten, insbesondere im distalen Bereich des mikrofluidischen Zentrums, isoliert voneinander vor (Abbildung 3.1.1 b).

Die Druckkammer wird basal von der Dendritenspitze eines mechanosensitiven Neurons penetriert. Das mikrofluidische Zentrum ist von einem exokutikularen Mantel umgeben (Abbildung 3.1.1 b,c). Zwischen dem birnenförmigen kleinen Kern aus Exokutikula (Schmitz et al. 2007) und der umgebenden Mesokutikula konnte auf den entsprechenden TEM-Aufnahmen keine klare Trennung erkannt werden. Daher wurde der kleine zentrale Kern in der Rekonstruktion nicht berücksichtigt.

Die berechneten Volumina der einzelnen Materialien der Rekonstruktion sind in Tabelle 3.1.1 dargestellt. Für die Umrechnung von Voxel (dreidimensionales Äquivalent zum zweidimensionalen Pixel) zu Kubikmikrometer siehe Anhang 8.3. Die Kontaktfläche zwischen den fluidgefüllten Kavitäten und der umgebenden Kutikula beträgt $972 \mu\text{m}^2$.

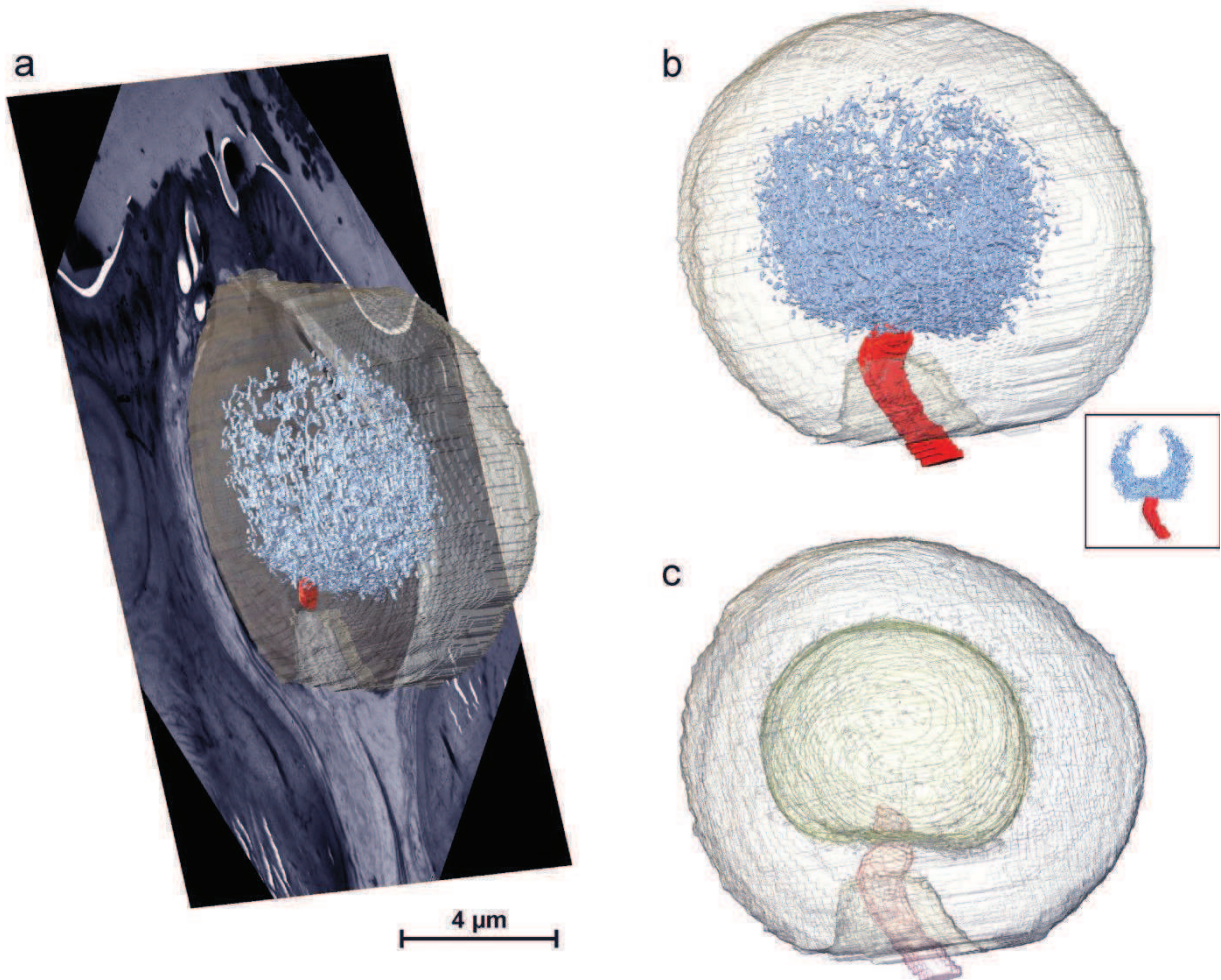


Abbildung 3.1.1 Dreidimensionale Rekonstruktion der inneren Kugel des IR-Rezeptors von *M. acuminata*. **a** TEM-Aufnahme eines Schnittes im Zentrum des IR-Rezeptors, gezeigt an seiner Position innerhalb der Rekonstruktion. **b** Die Kavitäten des mikrofluidischen Zentrums (blau) bilden die basal gelegene Druckkammer (Figure 3.2.2) und die sich nach distal verzweigenden Fluidkanälen. Die Druckkammer wird basal von der Dendritenspitze eines mechano-sensitiven Neurons (rot) penetriert. Exo- und Mesokutikula sind transparent dargestellt. **Inset:** Laterale Bereiche der fluidgefüllten Kavitäten (blau) wurden in Betrachtungsrichtung vor und hinter dem Dendriten (rot) entfernt. **c** Lage der Mesokutikula (grünlich-transparent), dargestellt ohne Kavitäten. Der innervierende Dendrit ist rötlich-transparent dargestellt, die Exokutikula farblos-transparent.

Tabelle 3.1.1 Volumina einzelner Materialien der 3D-Rekonstruktion der inneren Kugel des IR-Rezeptors von *M. acuminata*

| Material | Volumen [μm^3] | Volumenanteil [%] |
|-----------------|-----------------------------|-------------------|
| Exokutikula | 1469 | 80 |
| Mesokutikula | 337 | 18 |
| Kutikula gesamt | 1806 | 98 |
| Fluid | 36 | 2 |

Überleitung

Um das Funktionsprinzip des biologischen Rezeptors in einem technischen IR-Sensor umzusetzen, bedarf es der Analyse der Materialeigenschaften des biologischen Vorbildes. In der nachfolgenden Studie "Infrared receptors in pyrophilous ("fireloving") insects as model for new un-cooled infrared sensors" wurden daher unter anderem die mechanischen Eigenschaften von verschiedenen Kutikulatypen innerhalb des IR-Organs von *M. acuminata* bestimmt. Zusammen mit den Ergebnissen aus morphologischen Untersuchungen lässt sich die grundlegende Funktionsweise der IR-Rezeptoren von *A. albicornis* und *M. acuminata* ableiten.

Das Funktionsprinzip der photomechanischen IR-Perzeption wird in ein vereinfachtes technisches Sensor-Modell umgesetzt. Analytische Berechnungen werden genutzt, um thermische und mechanische Effekte im abgeleiteten Sensormodell abzuschätzen.

3.2 Infrared Receptors in pyrophilous (“fire-loving”) Insects as Model for new uncooled Infrared Sensors

David Klocke, Anke Schmitz, Helmut Soltner, Herbert Bousack, and Helmut Schmitz

Published in: Beilstein Journal of Nanotechnology 2011, 2, pp. 186-197

Abstract

Beetles of the genus *Melanophila* and certain flat bugs of the genus *Aradus* approach forest fires. For the detection of fires and of hot surfaces the pyrophilous species of both genera have developed infrared (IR) receptors, which have developed from common hair mechanoreceptors. Thus this type of insect IR receptor has been termed photomechanic and shows the following two special features: (i) the formation of a complex cuticular sphere consisting of an outer exocuticular shell as well as of a cavernous microfluidic core. (ii) The enclosure of the dendritic tip of the mechanosensitive neuron inside the core in a liquid-filled chamber. Most probably a photomechanic IR sensillum acts as a microfluidic converter of infrared radiation into an increase in internal pressure inside the sphere, which is measured by a mechanosensitive neuron.

A simple model for this biological IR sensor is the Golay sensor, which is filled with a liquid instead of gas. Here the absorbed IR radiation results in a pressure increase of the liquid and the deflection of a thin membrane. For the evaluation of this model analytical formulas are presented, which permits the calculation of the pressure increase in the cavity, the deformation of the membrane and the time constant of an artificial leak to compensate ambient temperature changes. Some organic liquids with high thermal expansion coefficients may improve the deflection of the membrane compared to water.

3.2.1 Introduction

Fire loving (pyrophilous) insects depend on forest fires for their reproduction. Such insects approach ongoing fires and invade the burnt area immediately after a fire. For the long-range navigation toward a fire as well as for the short-range orientation on a freshly burnt area these insects have special sensors for smoke and infrared (IR) radiation. Whereas the olfactory receptors for smoke are located on the antennae, the IR receptors are housed in extra-antennal sensory organs, which can be found on the thorax or on the abdomen. In the pyrophilous beetle *Melanophila acuminata* infrared receptors and their associated sensory neurons are derived from mechanoreceptors (Schmitz et al. 2007). Unlike other mechanosensory neurons, IR sensitive neurons directly send their information to be processed centrally

Ergebnisse

(e.g. by the brain) rather than locally in their respective ganglia of origin (Gronenberg and Schmitz 1999). It is suggested that smoke – derived odours and IR information converge on descending brain neurons which, in turn, control and direct flight toward the forest fire.

Two genera of jewel beetles (family Buprestidae) can be classified as pyrophilous: About a dozen species of the genus *Melanophila*, which are distributed nearly all over the world except for Australia, and the "fire-beetle" *Merimna atrata*, which is endemic to Australia (Poulton 1915; Schmitz and Schmitz 2002). Despite the fact that *Melanophila* and *Merimna* show nearly the same behaviour and belong to the same family of jewel beetles, their IR receptors are totally different from each other.

On the freshly burnt area, the males of both genera often stay on the stems of trees close to burning or glowing wood or hot ashes. As soon as they become aware of a conspecific female, they try to copulate vigorously. After mating, the females deposit the eggs under the bark of burnt trees. The main reason for the pyrophilous behaviour is that the wood-boring larvae of *Melanophila* and *Merimna* can only develop in the wood of burnt trees (Apel 1989; Schmitz and Schmitz 2002);. As a morphological speciality both pyrophilous buprestid genera are equipped with antennal smoke receptors and thoracic or abdominal IR organs (Schmitz and Bleckmann 1997; Schütz et al. 1999; Schmitz et al. 2001; Schmitz and Trenner 2003).

Another pyrophilous beetle can be found in Australia: the "little ash beetle" *Acanthocnemus nigricans* (family Acanthocnemidae). This inconspicuous beetle is only 4 mm long and highly attracted by hot ashes. However, its biology is nearly unknown. Obviously, *Acanthocnemus* also depends on fires for its reproduction and is equipped with a pair of sophisticated prothoracic IR receptors (Schmitz et al. 2002; Kreiss et al. 2005). Recently, IR receptors have also been discovered in a few pyrophilous members of the flat bug genus *Aradus* (Heteroptera, Aradidae) (Schmitz et al. 2010). With respect to morphology and function, the IR receptors of *Aradus* bugs are very similar to those described in *Melanophila* beetles. Consequently, fire detection is the compelling precondition for the survival of all pyrophilous insect species mentioned above. However, the outbreak of a forest fire is highly unpredictable. Therefore, pyrophilous beetles and bugs should be able to detect fires from distances as large as possible. Furthermore, when flying over a burnt area in search for a landing ground, the small insects have to avoid "hot spots" with dangerous surface temperatures above about 60° Celsius.

Especially the so-called photomechanic IR receptors of *Melanophila* beetles and *Aradus* bugs seem to be suitable as models for new uncooled IR receptors. In the present paper we focus on structure and function of the biological model as well as on the design and theoretical evaluation of a technical photomechanic IR sensor.

3.2.2 Results

3.2.2.1 The photomechanic IR receptors in pyrophilous beetles and bugs

Structure and material properties of photomechanic IR receptors

Structure and function of photomechanic insect IR receptors have been best studied in *Melanophila* beetles, which inhabit the palaeartic as well as the nearctic parts of the world. As a special behavioural feature, beetles of both sexes approach forest fires because their brood depends on burnt wood as larval food (Champion 1909; Linsley 1943; Evans 1962; Apel 1989). Therefore, it has to be postulated that the sensory organs, which are used for fire detection, have been subjected to a strong evolutionary pressure especially with regard to sensitivity. The single IR receptors (called sensilla in insects) are situated in two pit organs, which are located on the third thoracic segment. Each IR organ houses about 70 IR sensilla, which are closely packed together at the bottom of the pit (Vondran et al. 1995) (Figure 3.2.1 a).

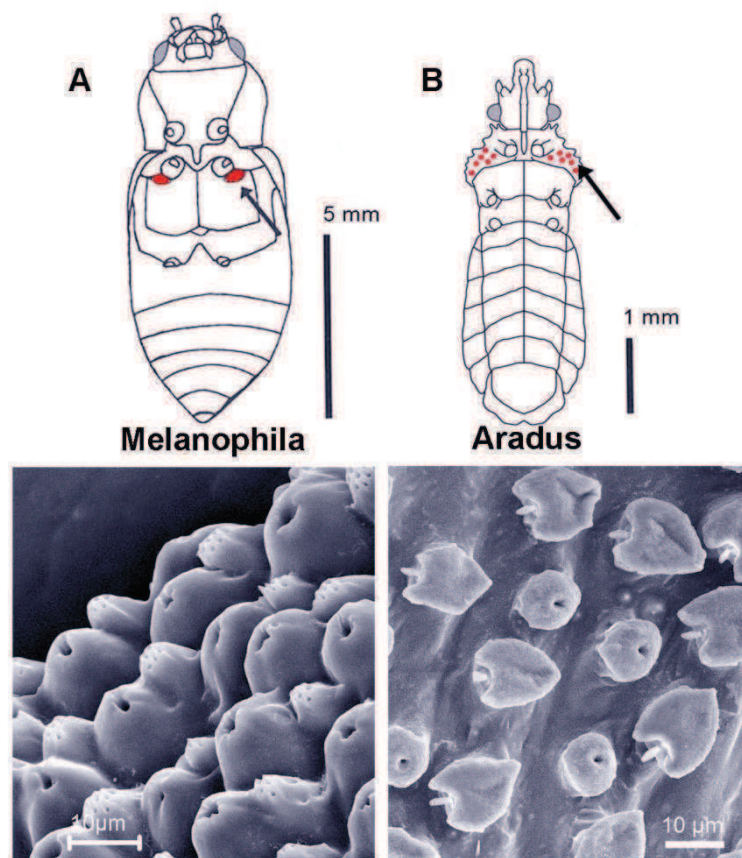


Figure 3.2.1 Infrared receptors in *Melanophila* beetles (A) and pyrophilous bug species of the genus *Aradus* (B). In *Melanophila* about 70 dome-shaped IR receptors (shown below) are densely packed at the bottom of a thoracic pit (indicated in red and by arrow). In *Aradus* bugs about a dozen IR receptors (indicated in red and shown below) are interspersed between mechanosensory bristles on the first thoracic segment (arrow) of the bug.

Ergebnisse

In pyrophilous bugs of the genus *Aradus*, about a dozen IR sensilla are located on the lateral sides (the so-called propleurae) of the prothorax (Figure 3.2.1 b). Here, receptors are loosely interspersed between the common hair mechanoreceptors, which cover the entire outer body surface of the bug (Schmitz et al. 2010) (Figure 3.2.1 b).

From the outside, a single IR sensillum in *Melanophila* beetles and *Aradus* bugs can be recognized by a hemispherical dome with a diameter of about 12 – 15 μm . The dome consists of a thin cuticle, which represents the outer boundary of a spherical internal cavity. The cavity is almost completely filled with a tiny cuticular sphere with a diameter of about 10 μm (Figure 3.2.2 a,b). Based on transmission electron microscopical observations, it has been described that the internal sphere consists of at least two different zones: (i) an outer lamellated zone consisting of exocuticle. The lamellated appearance is caused by many layers of chitin fibres with a periodically changing orientation, and (ii) an internal microfluidic core. From below, the sphere is innervated by a single sensory cell. The outermost tip of the sensory dendrite is anchored in the fluidic core. All morphological as well as all physiological data available so far have demonstrated, that this cell is a ciliary mechanoreceptor (Vondran et al. 1995; Schmitz et al. 2007; Schmitz et al. 2010).

Local testing of different cuticular regions of the *Melanophila* sensillum with a nanoindenter has revealed that the mechanical properties of the exocuticular shell of the sphere and the mesocuticle of the microfluidic core are different. Modulus as well as hardness of the shell are significantly higher (Figure 3.2.2 c,d). Interestingly, modulus and hardness of reference mesocuticle outside the IR pit organs is much higher than those of the mesocuticle inside the sphere. This points to a specialization of the material inside the sphere.

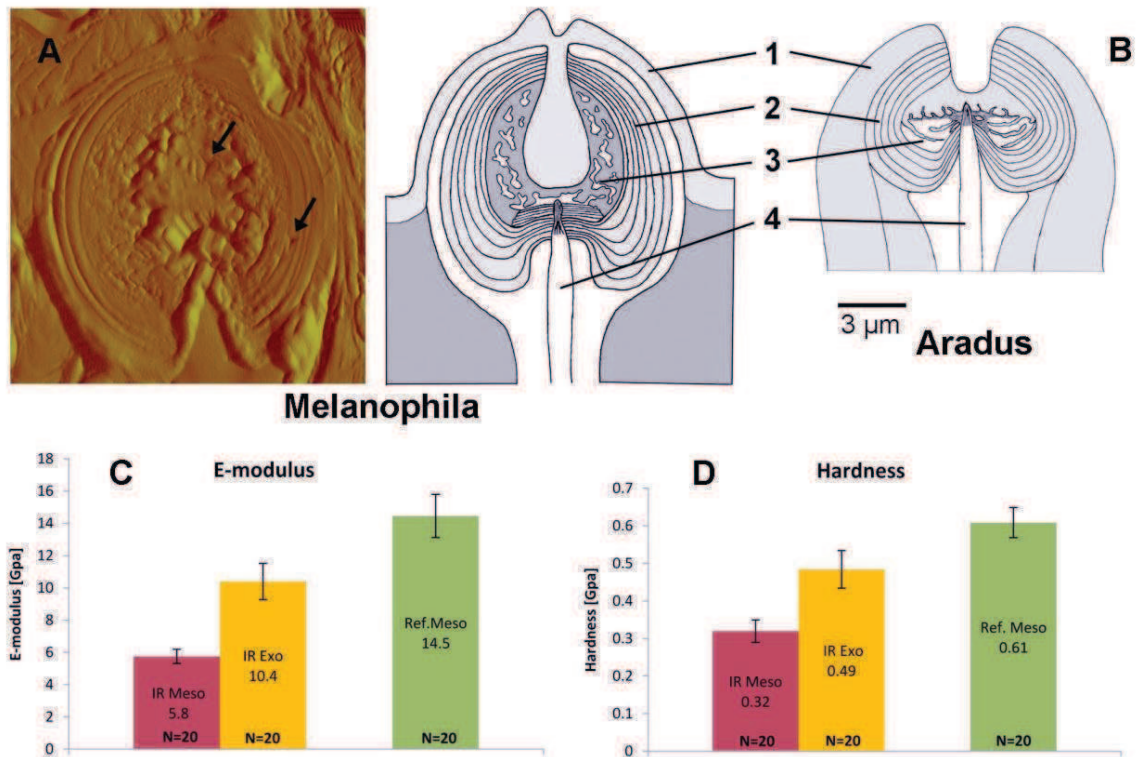


Figure 3.2.2 Schematic drawings of single IR receptors of *Melanophila* (A) and *Aradus* (B). 1: outer exocuticle; 2: exocuticular shell of the inner sphere; 3: microfluidic core; 4: tip of mechanosensory dendrite. For the *Melanophila* sensillum a topographical scan made with the tip of the nanoindenter is also shown on the left. Arrows point to indentations in the exocuticular shell of the sphere (IR Exo in C and D) and in the mesocuticle of the core (IR Meso in C and D). C and D: E-Modulus and hardness of different regions of the *Melanophila* sensillum. 20 indents were made in each region.

3.2.2.2 Receptor function

Currently, two models of sensillum function can be found in the literature. However, these models are inconsistent with each other. (i) More than 12 years ago a so-called photomechanic principle was established (Schmitz et al. 1997; Schmitz and Bleckmann 1998). The authors proposed that the biomolecules (i.e. proteins and chitin) of the cuticular sphere strongly absorb mid-IR radiation. In a way not described in detail, the resulting thermal expansion of the cuticular sphere is measured by the mechanoreceptor. (ii) Assuming the presence of a large air-filled cavity inside the sphere, Evans (Evans 2005) proposed in the second model that IR radiation enters this cavity by a small apical waveguide with a diameter of about 1.5 μm . Due to the absorption of IR photons at the inner cuticular walls of the cavity; the enclosed air is heated up and expands. In a way not further specified the resulting increase in gas pressure should stimulate the mechanoreceptor.

First of all our recent findings have clearly demonstrated that the thoracic infrared (IR) sensilla of the pyrophilous jewel beetle *Melanophila acuminata* most likely have evolved from

Ergebnisse

hair mechanoreceptors (sensilla trichodea) (Schmitz et al. 2007). Hair mechanoreceptors, which can be found in any insect, have a bristle of different length. In insects the pressure-sensitive dendrite of a single mechanosensitive sensory cell innervates the base of the bristle. As a result, even a slight bending of the bristle stimulates the tip of the dendrite. Compared to a hair mechanoreceptor, a photomechanic IR sensillum in *Melanophila* beetles and *Aradus* bugs shows the following special features (Figure 3.2.2): (i) the formation of a complex cuticular sphere instead of the bristle; the sphere consists of an outer hard exocuticular shell as well as of an inner relatively soft cavernous mesocuticular part forming a microfluidic core inside the sphere. (ii) The enclosure of the dendritic tip of the mechanosensitive neuron inside the inner core in a liquid-filled chamber. Most probably, IR radiation absorbed by the proteins, the chitin fibres, and the water of the sensillum heats up the sphere, which immediately causes thermal expansion especially of the liquid inside the microfluidic core. Because the shell of the sphere consists of stiff exocuticle additionally reinforced by many layers of chitin fibres, the only compliant structure in the sphere is the membrane of the tip of the mechanosensitive dendrite. Due to the air filled tracheal system inside the beetle's body most of the cell body of the mechanosensitive cell always is at ambient pressure. Only the outermost tip of the sensory dendrite of the mechanosensor (cf. Figure 3.2.2) is enclosed inside the sphere. Therefore any increase in pressure inside the sphere will cause a cross compression of the dendritic tip which is compensated by the cell volume below the sphere. By deflection of the dendritic membrane in the range of a few nanometers, stretch-activated ion channels will be opened. Hence we propose that an IR sensillum acts as a microfluidic converter of infrared radiation into an increase in internal pressure inside the sphere, which is measured by the mechanosensitive neuron. The principle of transforming IR radiation into a bioelectrical signal has been termed photomechanic. Although it has not been observed that the *Melanophila* beetles turn right and left in flight to search for incoming IR radiation it has been proposed that beetles approach a fire by so-called tropotaxis (i.e. by comparing the input of two symmetrically arranged receptors on either side of their body). Most probably photomechanic IR sensilla have been developed independently in beetles and bugs. This provides strong evidence that mechanoreceptors are promising candidates for the development of IR sensors. Because the products of the evolutionary process are very similar in *Melanophila* beetles and *Aradus* bugs, it can be proposed that a photomechanic IR sensillum represents an optimized biological sensory system for mid IR radiation.

3.2.2.3 Model for the IR-receptor

Golay sensor

After the clarification of the function of the biological IR sensor of the beetle we analyze its principle mathematically to be able to design a technical sensor. For this purpose we investigate the pneumatic Golay sensor (Golay 1947) as a simple model, see Figure 3.2.3. This sensor consists of an internal gas-filled cavity, which is closed on one side by a window and on the other side by a thin membrane. IR-radiation enters through the window and heats up the gas by absorption. The deflection of the membrane caused by the expanding gas can be read out by an optical system (Golay 1947), a capacitive detector (Chevrier et al. 1995), or a tunneling displacement transducer (Kenny 1996). To enhance the IR-absorption in the gas the cavity is equipped with an additional absorber. Reflecting walls of the cavity are another means to enhance the absorption. The temperature changes of the liquid caused by the absorbed IR-radiation are in the range of mK. Therefore, it is absolutely necessary to integrate a leak, which compensates slow variations of the ambient temperature in the range of a few K.

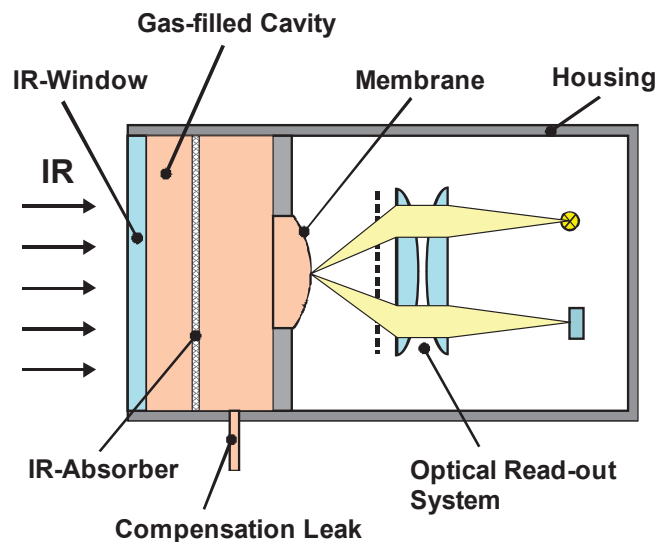


Figure 3.2.3 Principle of a gas-filled Golay sensor with optical read-out. Explanations see text.

Sensor model of the IR-receptor

The model of the sensor, which we want to analyze, is shown in Figure 3.2.4. Similar to the sensillum the sensor contains an internal water-filled cavity, which is etched into a silicon wafer. The cavity is closed on the one side by a window (Suprasil, (Heraeus Quarzglas)) and on the other side by a thin silicon membrane. The IR radiation being absorbed produces a change in pressure or volume, respectively, due to the change of the state of the water. The deflection of the membrane caused by this pressure increase can be read out by e.g. a capacitive detector or a tunneling displacement transducer.

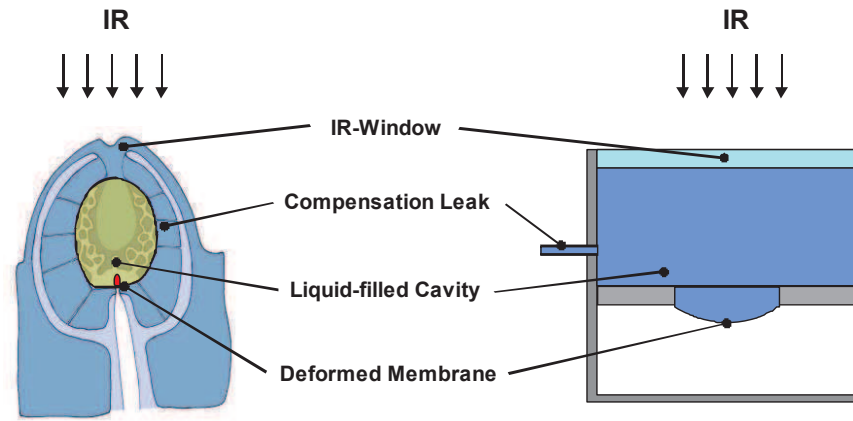


Figure 3.2.4 Comparison of the sensillum (left) with the model of the sensor (right).

Pressure increase of the cavity and deflection of the membrane

For calculating the change of the liquid pressure in the cavity based on the temperature profile the equation of state must be solved. Because the pressure in the cavity depends upon the two independent variables temperature and volume, its total change is given by

$$\Delta P = \beta \cdot \Delta T_{\text{mean}} - \frac{1}{\kappa \cdot V} \cdot \Delta V \quad (1)$$

with ΔP : Pressure increase, $\beta = (\partial P / \partial T)_V$: isochoric tension coefficient, ΔT_{mean} : mean temperature increase averaged over the cavity volume, $\kappa = -(1/V) \cdot (\partial V / \partial P)_T$: isothermal compression coefficient, V : volume of the cavity, ΔV : volume increase. For water (25 °C, 1 bar) $\beta = 5.68 \cdot 10^5$ Pa/K and $\kappa = 4.5 \cdot 10^{-10}$ 1/Pa (Lyde 2004).

The increase of the volume ΔV of the cavity is due to the tiny deflection of the membrane. The deflection y of this membrane caused by a pressure difference can be calculated as a function of the radial distance r with the shell theory (Szabo 2001)

$$y(r) = \frac{\Delta P}{64 \cdot D} \cdot (R^2 - r^2)^2 \quad (2)$$

$$D = \frac{E \cdot t_p^3}{12 \cdot (1 - \nu^2)}$$

with R : radius of the membrane, D : flexural stiffness of the membrane, E : Young's modulus of elasticity, t_p : thickness of the membrane, ν : Poisson's ratio.

Equation 2 is a good approximation for small membrane deflections, normally $y_{\text{max}}/t_p < 1$. The volume ΔV can be calculated in relation to the pressure increase ΔP by using Equation 2

$$\Delta V = \frac{\pi \cdot R^6 \cdot \Delta P \cdot (1 - \nu^2)}{16 \cdot E \cdot t_p^3} \quad (3)$$

Ergebnisse

The combination of Equation 2 and Equation 3 yields a relationship for ΔP , which considers the influence of temperature and volume.

$$\Delta P = \frac{\beta \cdot \Delta T_{\text{mean}}}{1 + \Omega}$$

$$\Delta T_{\text{mean}} = \frac{\int_0^{H_C} \Delta T(z) \cdot dz}{H_C} \quad (4)$$

$$\Omega = \frac{R^4 \cdot (1 - \nu^2)}{16 \cdot E \cdot t_p^3 \cdot H_C \cdot \kappa}$$

with H_C : height of the cylindrical cavity, $\Delta T(z)$: temperature as a function of the axial coordinate z of the cavity and time, ΔT_{mean} : mean temperature increase averaged over the cavity

The factor Ω characterizes the change of state of the liquid inside the cavity due to a temperature increase: For $\Omega \rightarrow 0$, which corresponds to an extremely hard membrane, the change of state is isochoric with a maximal pressure difference. For $\Omega \rightarrow \infty$, as for an extremely soft membrane, the change of state is isobaric with maximal volume increase. The transition between these two cases is at $\Omega \approx 1$. The maximal deflection y_{max} of the circular membrane can be calculated as a function of the factor Ω from using the Equations 2 and 4.

$$y_{\text{max}} = \frac{3 \cdot \alpha \cdot \Omega \cdot \Delta T_{\text{mean}} \cdot H_C}{1 + \Omega} \quad (5)$$

with $\alpha = \beta \cdot \kappa$: isobaric thermal expansion coefficient

The Equations 4 and 5 can be also used for a gas-filled cavity. In this case the isochoric tension coefficient β and the isothermal compression coefficient κ can be calculated from the ideal gas law

$$P \cdot V_C = m \cdot R_G \cdot T \quad (6)$$

with m : mass of gas in the cavity, R_G : individual gas constant

Using Equation 6 yields for the isochoric tension coefficient β , the isothermal compression coefficient κ and the isobaric thermal expansion coefficient α

$$\beta = \left(\frac{\partial P}{\partial T} \right)_V = \frac{P}{T}$$

$$\kappa = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T = \frac{1}{P} \quad (7)$$

$$\alpha = \beta \cdot \kappa = \frac{1}{T}$$

Ergebnisse

When the change of state is small compared to the initial state $T_0 = 300$ K and $P_0 = 10^5$ Pa, these values results in $\beta \approx 330$ Pa/K, $\kappa \approx 1.0 \cdot 10^{-5}$ 1/Pa and $\alpha \approx 3.3 \cdot 10^{-3}$ 1/K.

The calculation of the mean temperature increase ΔT_{mean} in Equation 4 depends strictly on the boundary conditions. When a adiabatic cavity is assumed without any heat loss through the glass window or the cavity wall the highest possible mean temperature increase ΔT_{mean} results.

$$\Delta T_{\text{mean}} = \frac{I_0 \cdot A}{m \cdot c_p} \cdot t \quad (8)$$

with: I_0 : IR power density, A: cross section surface of the cavity, m: mass of fluid inside the cavity, c_p : heat capacity of the fluid inside the cavity, t: time.

However, in reality the heat loss cannot be neglected. The heat loss through the IR window can be calculated for defined boundary conditions. A high IR absorption coefficient of the fluid in the cavity causes the absorption of the IR energy within a very small absorption zone. For water as a liquid with a very high IR absorption coefficient a formula for the temperature profile $\Delta T(z)$ could be derived (Soltner et al. 2009) for the assumption of a infinitely thin boundary layer between glass window and water. This allows a numerical solution of the mean temperature increase in Equation 4 taking into account the heat loss through the IR window. In the case of water as liquid up to 50 % of the absorbed energy can be lost through the window by heat conduction (Bousack et al. 2008). For liquids with lower absorption coefficients than water the mean temperature increase must be calculated by finite elements. Gases have always a significant lower absorption coefficient which requires the application of an additional absorber such as plastic, aluminium, antimony or lead (Golay 1947). When the absorbing film is directly on the inner surface of the window then the assumption of a boundary layer as in the case of water is valid.

3.2.2.4 Evaluation of different liquids and gases as Fluids inside the cavity

Water

Figure 3.2.5 shows the maximal deflection according to Equation 5 for an IR power density of 10 W/m^2 (IR-window without absorption loss assumed) for a cavity with a height and a diameter of 0.5 mm, respectively, filled with water. These values were taken as a reference. Obviously, the maximal deflection is achieved for the isobaric case with a very soft membrane. Due to the very low deflection of less than 1 nm a capacitor as read-out must be extremely sensitive. As an alternative an optical read-out or the use of a tunneling displacement transducer may be useful.

Ergebnisse

With regard to Equation 4 and Equation 5 the maximal deflection of the membrane can be increased by using a liquid with a high thermal expansion coefficient α and a high mean temperature increase ΔT_{mean} due to a low product of heat capacity and density in a small cavity. Additionally the IR-window and the cavity material should have a low heat conduction to avoid heat losses during measurement.

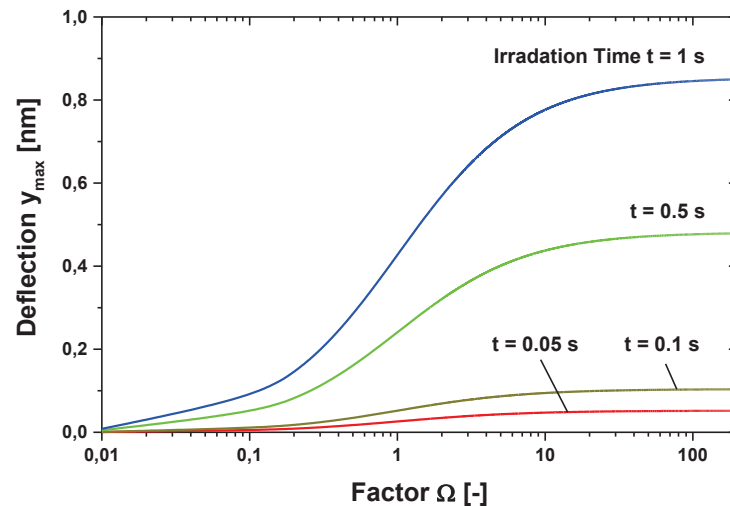


Figure 3.2.5 Maximum central deflection y_{max} of a circular membrane as function of factor Ω and irradiation time for a water-filled cavity. IR power density 10 W/m^2 , diameter and height of the cavity: 0.5 mm.

Hydrocarbons

The inner pressure chamber of the sensillum is filled with a liquid, which consists mostly of water. Regarding the thermal expansion coefficient water is not an optimal liquid. Hydrocarbons such as n-pentane, toluene, or methanol, which are also used as fluids in thermometers, are more appropriate. Table 3.2.1 shows the material properties of different hydrocarbons in comparison to water.

Table 3.2.1 Comparison of material properties of different hydrocarbons with water. The absorption coefficients were calculated in the band width $3 - 5 \mu\text{m}$ using data from (National Institute of Standards and Technology (NIST) ; Schussig and Norkus ; Wieliczka et al. 1989)

| | α [10^{-5} 1/K] | κ [10^{-5} 1/bar] | ρ [kg/m^3] | λ [$\text{W/m}\cdot\text{K}$] | C_p [kJ/kg K] | α_{OPT} [$1/\text{cm}$] |
|------------------|---------------------------------------|---|-------------------------------|--|-------------------------------|--|
| water | 21 | 4.6 | 998 | 0.61 | 4.18 | 1140 |
| n-pentane | 158 | 25.0 | 627 | 0.11 | 2.31 | 73 |
| toluene | 107 | 9.1 | 870 | 0.14 | 1.72 | 94 |

Ergebnisse

The thermal expansion coefficients of the hydrocarbons in Table 3.2.1 are about eight times higher compared to water so that the deflection of the membrane increases by this factor. The heat capacity and density of hydrocarbons is about 40 – 50% lower in comparison to water, which results in a higher mean temperature increase ΔT_{mean} for the same amount of stored energy.

The absorption coefficients in Table 3.2.1 were calculated in the atmospheric mid-wave window between 2 – 5 μm using data from (National Institute of Standards and Technology (NIST) ; Schussig and Norkus ; Wieliczka et al. 1989). Compared to water the absorption coefficients of hydrocarbons are up to two orders of magnitude lower. For this reason the temperature distribution along the cavity axis is more uniform compared to water.

For the evaluation and comparison of the different liquids regarding the maximum membrane deflection in Equation 5 the mean temperature increase ΔT_{mean} has to be calculated. An IR power density of 10 W/m^2 at the outer window surface in a bandwidth of 3 – 5 μm and an irradiation time of 50 ms is taken as a reference situation. For simplification it is assumed that the IR power density is independent from wavelength in this bandwidth. Figure 3.2.6 shows the decrease of the power density as function of the coordinate z for different liquids. Obviously the decrease of the power density in water occurs only within a thin absorption zone directly behind the window, whereas in the case of hydrocarbons the entire depth of the cavity contributes to absorption. The power density profiles in Figure 3.2.6 were used to numerically calculate the temperature distribution after 50 ms in Figure 3.2.7. Due to the thin absorption zone in water the maximum temperature appears directly behind the window resulting in heat conducting losses through the window. For hydrocarbons, however, the maximum temperature is shifted deeper into the cavity causing smaller heat losses through the window. Based on the temperature profiles in Figure 3.2.7 the mean temperature increase ΔT_{mean} is calculated in Table 3.2.2. Here the advantage of using hydrocarbons instead of water is also obvious.

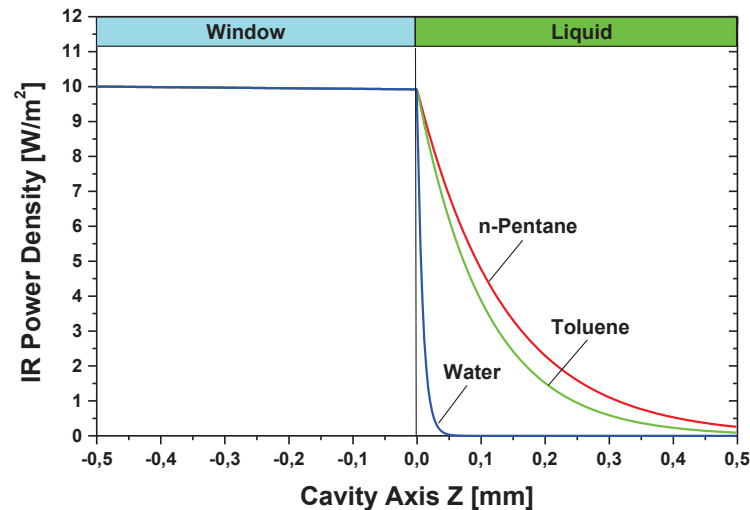


Figure 3.2.6 IR power density as function of the cavity axis for different liquids. Suprasil[®] 300 was used as material for the window with an absorption coefficient of 0.16 1/cm (Heraeus Quarzglas).

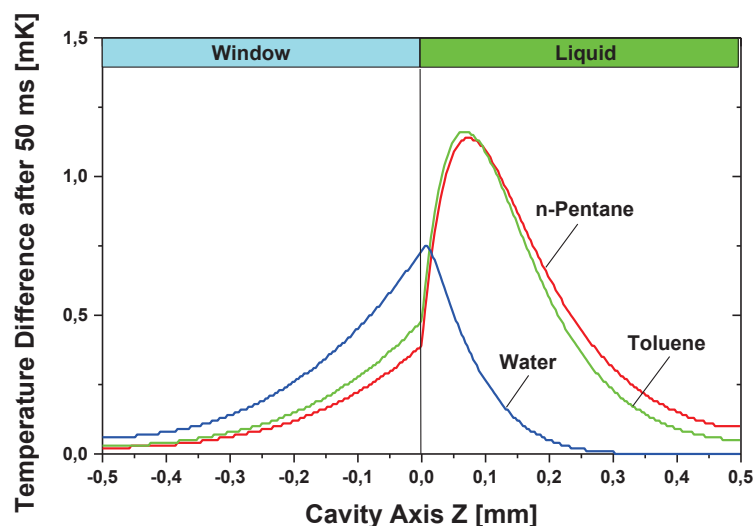


Figure 3.2.7 Temperature distribution along the cavity axis 50 ms after the onset of irradiation for different liquids with an IR power density at the outer window surface of 10 W/m², see Figure 3.2.6

The silicon membrane ($E = 166$ GPa, $\nu = 0.28$ (Beadle et al. 1985)) has a diameter of 0.5 mm and a thickness of 1 μm , resulting in a factor Ω of 1000 to 6000 for the different liquids in Table 3.2.2. Regarding Figure 3.2.4 this is the isobaric case, and due to the high factor Ω a softer membrane will not result in a larger deflection of the membrane. With the data of the membrane the deflection can be calculated by using Equation 5, see Table 3.2.2. A value of only about 1 nm results for the hydrocarbons. The increase of the deflection in case of the hydrocarbons by a factor 10 compared to water as liquid can be explained with an increase of the mean temperature of about 4 – 5 and an increase of the expansion coefficient by the

Ergebnisse

factor 5 – 7. It can be assumed as a first approximation, that the deflection is proportional to the IR power density and the irradiation time.

Table 3.2.2 Comparison of the mean temperature increase ΔT_{mean} , the factor Ω , and the maximum deflection of y_{max} of the membrane due to different liquids after an IR power density of 10 W/m^2 for 50 ms

| | ΔT_{mean} [mK] | Ω [-] | Y_{max} [nm] |
|------------------|----------------------------------|-----------------|--------------------------|
| water | 0.14 | 6245 | 0.04 |
| n-pentane | 0.53 | 1126 | 1.26 |
| toluene | 0.64 | 3093 | 1.03 |

If a pure liquid is used the thermal and optical properties are coupled, that means a liquid with an optimal product of density and heat capacity may have a low IR absorption, which makes this fluid disadvantageous for the application. A decoupling of thermal and optical properties can be achieved with a matrix of a good absorber, e.g. a meshwork of plastic or tiny plastic beads, immersed in the fluid. The plastic matrix absorbs most of the radiation and transfers the absorbed energy to the fluid, which provides optimal thermal properties and a large thermal expansion. The choice of the plastic matrix has to ensure a large surface-to-volume ratio and a low product of density and heat capacity. The decoupling of the thermal and optical properties permits to determine an optimal absorption coefficient approximately for each cavity depth to absorb the IR energy completely in the cavity without any unused fluid volume.

Gas

Using gas instead of water in the cavity as in the well-known pneumatic Golay sensors yields different results due to the changed material properties, in particular density ρ , heat capacity c_p and the coefficients β , κ , α in Equation 7. For a better comparison with the water-filled cavity it is assumed that also a thin zone due to a thin absorbing film on the inner glass surface exist where all radiation is absorbed and this energy heats up the gas by heat conduction. The resulting temperature profile for water and gas is shown in Figure 3.2.8 based on the same IR power density 10 W/m^2 . Mainly due to the lower product of density and heat capacity the temperature in the gas is higher; the mean temperature increase ΔT_{mean} is in the case of water 1.2 mK respectively 4.8 mK in the case of gas. Using the Equation 4 this causes e.g. for a $\Omega = 1$ a pressure difference ΔP of 350 Pa in the case of water but only 0.8 Pa in the case of gas, see Figure 3.2.9. However the maximal deflection of the membrane in the case of gas is 12 nm compared to 0.2 nm in the case of water. This surprising fact can be

Ergebnisse

explained by the higher mean temperature increase and especially by the higher thermal expansion coefficient in the case of gas compared to water.

Using different ideal gases will not change the result notable because only the individual gas constant and the heat capacity are variable. However, using a gas with low heat conductivity will reduce the radial heat losses into the cavity wall and yield a higher temperature.

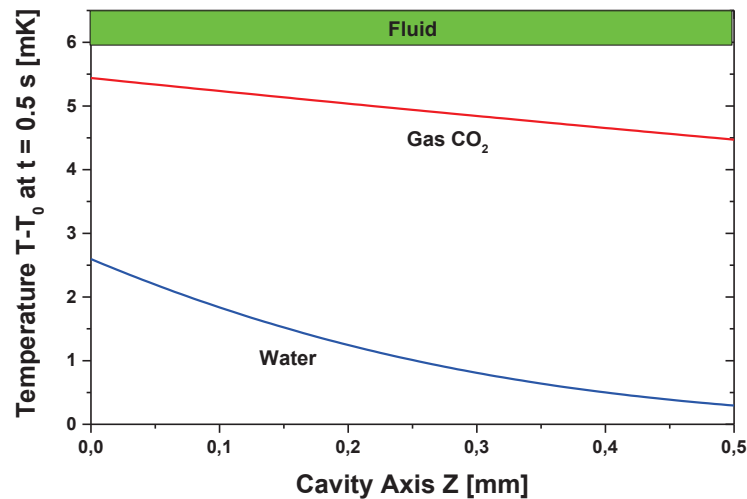


Figure 3.2.8 Temperature distribution along the cavity axis 0.5 s after the onset of irradiation for a water-filled and a CO₂-filled cavity with an IR power density at the outer window surface of 10 W/m². In the case of gas a thin IR absorber film is assumed on the inner glass surface where all the IR energy is absorbed.

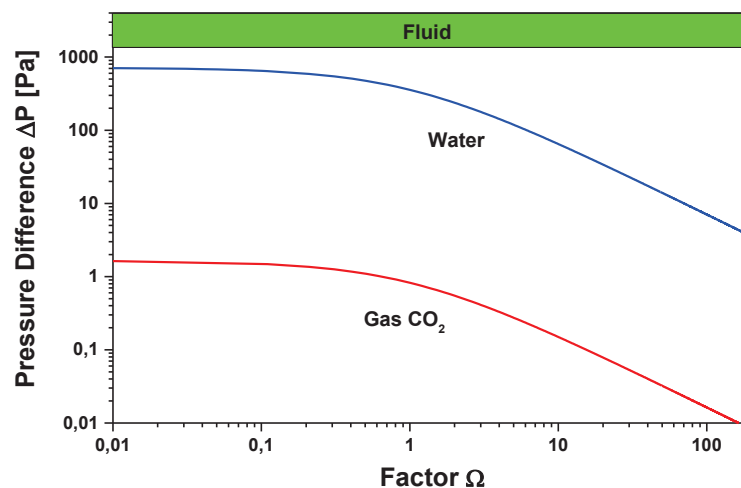


Figure 3.2.9 Pressure difference ΔP of a circular membrane as function of factor Ω for a water-filled and CO₂-filled cavity. IR power density 10 W/m², diameter and height of the cavity: 0.5 mm.

3.2.2.5 Read-out of the membrane deflection

The calculated deformation of the membrane in the case of water as liquid and the deformation of the tip of the dendrite in the sensillum have the same magnitude. In mechanoreceptors like the sensillum deformations of the tip of the dendrite of only 0.1 nm – corresponding to an energy of 10^{-19} J – yield a receptor potential (Dettner and Peters 1999).

As a consequence of the tiny deformation of the membrane the technical sensor needs a read-out system that is able to detect deformations in the nm-range, such as interferometry, tunneling contacts (Kenny 1996), or a capacitive position sensor with nanometer resolution (MicroSense LLC).

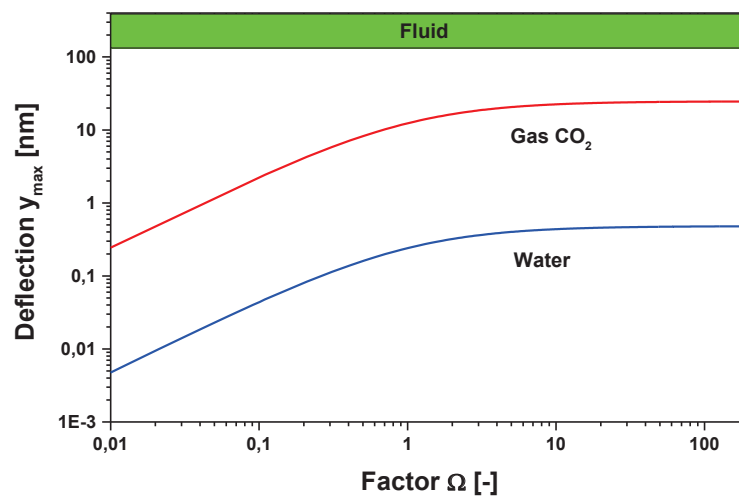


Figure 3.2.10 Maximum central deflection y_{\max} of a circular membrane as function of factor Ω for a water-filled and CO₂-filled cavity. IR power density 10 W/m^2 , diameter and height of the cavity: 0.5 mm.

3.2.2.6 Compensation leak

In the *Melanophila* IR receptor the inner sphere is enclosed by a thin layer of liquid in an outer compartment. Therefore the nanocanals in the shell of the sphere allow the exchange of liquid in and out of the microfluidic core in the sphere. Thus any internal pressure change, which may be caused by the slowly changing ambient temperature, can be compensated. Golay sensors also use such compensation leaks for compensating changes of ambient temperatures (Golay 1947). Figure 3.2.11 shows a simplified model of the sensillum with the core connected by nanocanals with the outer compartment and the geometric design of such a compensation leak. For the design of a compensation leak a formula will be derived.

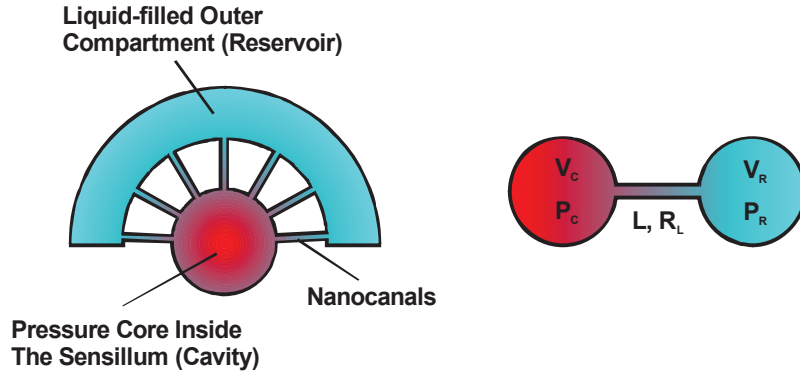


Figure 3.2.11 Left: Model of the pressure core in the sensillum connected by nanocanals with the outer compartment, right: Calculation model for pressure compensation between the core (cavity, Volume V_C , Pressure P_C) connected by a canal (length L , radius R_L) with a reservoir (Volume V_R , Pressure P_R) and $P_C > P_R$.

For a liquid a mass balance between the two volumes of the cavity and of the reservoir yields a system of two partial differential equations, if we assume a Hagen-Poiseuille flow in the canal (Bousack et al. 2008; Spurk and Aksel 2008).

$$\frac{dV_L}{dt} = \frac{\pi \cdot R_L^4}{8 \cdot \eta \cdot L} \cdot (P_C(t) - P_R(t)) \quad (9)$$

with $\frac{dV_L}{dt}$: volumetric flow rate, R_L : Radius of canal, L : Length of canal, $P_C(t)$, $P_R(t)$: time-dependant pressure in the cavity and the reservoir, η : dynamic viscosity

The solution of the differential equations results in

$$\begin{aligned} P_C(t) &= \frac{1}{1 + \frac{V_C}{V_R}} \cdot \left[P_R(t=0) + \frac{V_C}{V_R} \cdot P_C(t=0) + \Delta P(t=0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \right] \\ P_R(t) &= \frac{1}{1 + \frac{V_C}{V_R}} \cdot \left[P_R(t=0) + \frac{V_C}{V_R} \cdot \left(P_C(t=0) - \Delta P(t=0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \right] \\ \Delta P(t=0) &= P_C(t=0) - P_R(t=0) \quad \psi_C = \frac{8 \cdot V_C \cdot \eta \cdot L}{\pi \cdot R_L^4} \\ \kappa &= - \frac{1}{V} \cdot \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \quad \tau = \frac{\psi_C \cdot \kappa}{1 + \frac{V_C}{V_R}} \end{aligned} \quad (10)$$

with t : time, $P_C(t=0)$, $P_R(t=0)$: initial pressure in the cavity and the reservoir at $t = 0$

Ergebnisse

With N similar canals between the cavity and the reservoir, the time constant in Equation 10 is reduced by this number

$$\tau = \frac{\psi_C \cdot \kappa}{N \cdot \left(1 + \frac{V_C}{V_R}\right)} \quad (11)$$

By assuming only little changes of the liquid density, $\Delta\rho/\rho \cong 0$, Equation 10 and Equation 11 can be used with $\kappa = 1/P$ for gas. This assumption is justified when $P_C(t=0)$ is similar to $P_R(t=0)$. With $V_C \ll V_R$, i.e. an infinite reservoir, and with gas as liquid the time constant τ in Equation 10 is equal to the time constant in (Chevrier et al. 1995) derived with an electrical circuit analogy. Three examples of the pressure release between a cavity V_C (\varnothing 0.5 mm, depth 0.5 mm) connected by two compensation leaks to reservoirs V_R with different size and water as liquid are shown in Figure 3.2.12. The initial pressure difference ΔP of 100 Pa is e.g. generated by a ΔT_{mean} in the cavity of about 1 mK. The time necessary for pressure compensation is about 0.15 s, when the cavity volume and the reservoir volume are equal, and is increased up to 0.3 s when the reservoir volume is 10 times larger than the cavity volume.

The time constant of the compensation leak must be considerably larger than the time constant of the temperature change in the cavity due to an IR-signal in order to minimize the effect of the compensation leak on the measurement. It is obvious that the time constant of the compensation leak can be tuned by the geometry and the number of the canals and the ratio of the cavity volume and the reservoir volume. Figure 3.2.13 shows the time constants of a compensation leak as function of the radius

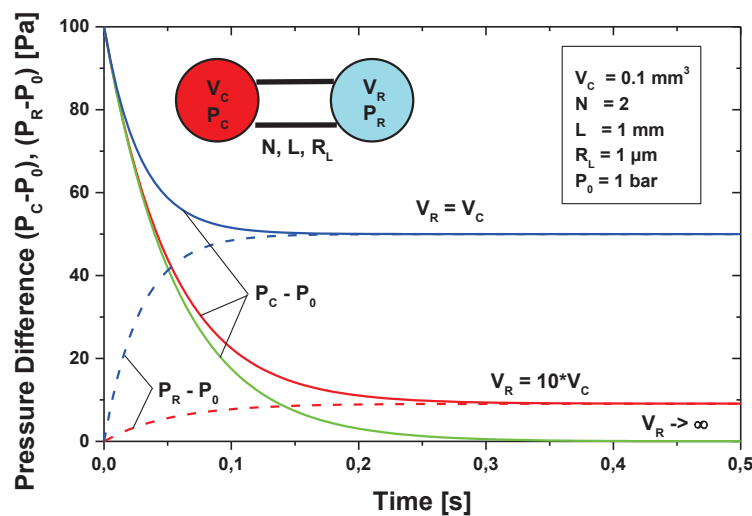


Figure 3.2.12 Pressures in the cavity, P_C , and in the reservoir, P_R , as function of time for a cavity with a volume $V_C = 0.1 \text{ mm}^3$ connected by 2 compensation leaks to a reservoir volume V_R for different values of V_R/V_C , P_0 : ambient pressure

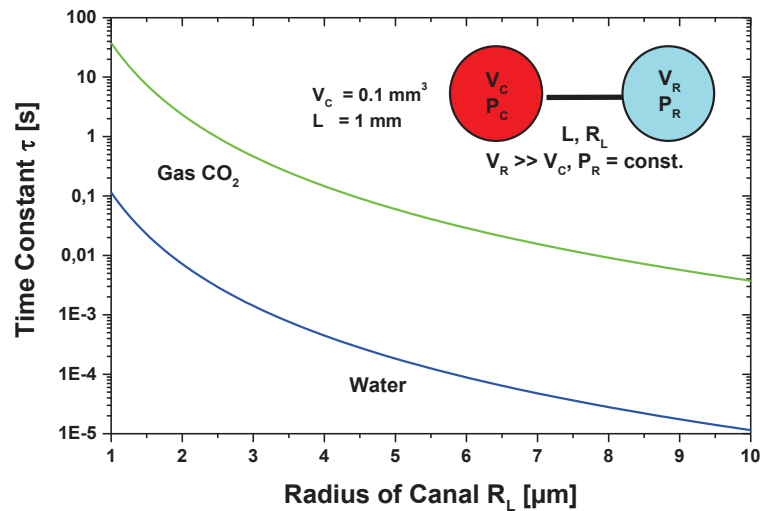


Figure 3.2.13 Comparison of time constants for a compensation leak of a cavity filled with water respectively with CO_2 gas as function of the radius of the canal.

of the canal and the fluid in the cavity, water or CO_2 gas. Especially due to the higher compressibility of the gas the time constant is in this case up to three orders of magnitude greater than in the case of water. When a time constant of 1 s is assumed, then in the case of water the compensation canal needs a canal of some mm length with a very radius smaller than $1 \mu\text{m}$. Using gas instead of water will require a simpler manufacturing due to larger radius of the canal.

3.2.3 Conclusion

Like in the photomechanic insect IR receptors, our technical model features very small displacements of the membrane in the sensing device in the range of 1 nm and less. The insects, however, have the advantage of possessing a very sensitive mechanoreceptor, the mechanosensitive neuron, which can detect very minute deflections of its membrane. It seems that this sensitivity of the beetle is difficult to achieve for a technical sensor.

For our miniaturized technical sensor, an appropriate technical read-out mechanism with a high resolution of 1 nm may be necessary. So far a sensor with a capacitor as read-out is near to completion in the *Center of Advanced European Studies and Research (Caesar)*, Bonn. As an alternative read-out for displacements in the nm-range tunneling displacement transducers are under investigation. Several read-out methods will be evaluated, but it has to be stressed that it must yield a rugged and cost-effective design in order to be able to compete with existing IR sensors.

An obvious method to enhance the displacement of the membrane is to choose liquids with optimal thermal properties, e.g. high thermal expansion factor and low heat capacity. Here

several liquids permit an improvement. Methanol is a good candidate compared to n-pentane and toluene because of better handling during the filling process of the cavity.

Additionally care has to be taken in selecting appropriate wall materials with the same low thermal conduction necessary to preserve the thermal energy inside the cell. Until now silicon is used due to its well known manufacturing technology for micro systems. As an alternative micro injection molding of plastic materials with low heat conductivity are under investigation.

3.2.4 Experimental

Morphological methods used all are based on well established light and electron microscopical procedures.

Mechanical tests were conducted in a nanomechanical test system capable of normal loading as well as *in situ* SPM (TriboScope; Hysitron, Minneapolis, USA). Indentation tests were performed by using a three-sided Berkovich diamond tip with a total included angle of 142.3° . A proper area function was established by indenting in a PMMA test specimen with known hardness and modulus. Contact depths range from 250 to 1100 nm. The maximum load during indentation was 1,000 μN with loading and unloading rates of 100 $\mu\text{N/s}$, and a 10 s hold time at peak load to compensate for material creeping and to make sure that most of the plastic deformation was completed. It was repeatedly checked that longer holding times did not result in differing values. Hardness (H) and reduced Young's modulus (E_r) both were calculated from the unloading portions of the load-displacement curves following well established procedures.

Acknowledgments

The authors acknowledge the measurements of absorption coefficients by Dr. Ing. V. Norkus and Dipl.-Ing. M. Schussig of the Institut für Festkörperelektronik (Technische Universität Dresden) and helpful discussions of the results. Funded by grants from BMBF (Grant No. 01RB0909A) and the German Science Foundation (DFG) through the Graduate Program GRK 1572.

Überleitung

Die mechanischen Eigenschaften von Insektenkutikula werden vermutlich vor allem durch den Grad ihrer Sklerotisierung und dem hierdurch beeinflussten Wassergehalt geprägt (1.4). Nach der Bestimmung der Materialeigenschaften an getrockneten Proben von *M. acuminata* (3.2.2.1) wurde daher die Prüfung der mechanischen Eigenschaften der verschiedenen Kutikulatypen in den IR-Rezeptoren von *M. acuminata* und *A. albicornis* in einem quasi-nativen Zustand (mit möglichst natürlichem Wassergehalt) angestrebt. Die hierzu notwendige Methodik galt es zu entwickeln.

In der folgenden Arbeit "Water as a major modulator for the mechanical properties of insect cuticle" wird eine neue Methode vorgestellt mit der die Materialeigenschaften verschiedener Kutikulatypen innerhalb einer quasi-nativen Kutikulaprobe systematisch bestimmt werden können. Aufgrund ihrer Verfügbarkeit und dem relativ einfachen Aufbau ihres Exoskeletts wurde als Versuchstier die Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) gewählt.

3.3 Water as a major modulator for the mechanical properties of insect cuticle

David Klocke, Helmut Schmitz

Published in: Acta Biomaterialia 2011, 7, pp. 2935-2942

Abstract

The mechanical properties of the sternal cuticle of the locust were investigated by nanoindentation. Modulus and hardness of the exo-, meso-, and endocuticular layers were locally measured under dry and fully wetted conditions in the normal (i.e. perpendicular to the outer surface) as well as in the Transverse direction (i.e. parallel to the alignment of the respective layers). The results show that water has a major impact on the mechanical properties of all layers. After drying the endocuticle, in particular, became harder by a factor of up to 9 and stiffer by a factor of up to 7.4. Additionally the gradual decrease in hardness and Young's modulus from the outer exo- to the inner endocuticle, characteristic of native cuticle, was eliminated or even reversed in dried cuticle. A pronounced anisotropy was revealed in all layers when comparing data obtained by probing in the normal (lower values) vs. probing in the transverse direction (higher values). Cyclic drying and rewetting of the endocuticle showed that the mechanical properties can be reproducibly changed by altering the water content. Based on our results we propose a new role of the epicuticle: fine-tuning of the mechanical properties of the different cuticular layers can be accomplished by setting the local cuticular transpiration.

3.3.1 Introduction

One of the main reasons for the great evolutionary success of insects is their lightweight and efficient exoskeleton made of cuticle. Showing an almost uniform density of about 1.2 kg dm^{-3} , the elastic modulus of insect cuticle covers a range of more than 8 orders of magnitude (Vincent and Wegst 2004). This tremendous bandwidth in stiffness is unmatched by other biological and almost all man-made materials. Although developed in ancestral arthropods already 400 million years ago, insect cuticle can be compared to present composite materials like fibre reinforced polymers (Vincent 2002). During millions of years of evolution, the mechanical properties of cuticle have been adapted a great variety of mechanical demands: the outer envelope of the body of an insect like the stiff tibia of a jumping leg of a locust or the

Ergebnisse







rugged mandible of a wood-boring beetle larva as well as the tender and flexible tubular hull of a maggot is made of this highly versatile biomaterial.

The impressive range of mechanical properties of the cuticle is achieved on the one hand by adjusting the grade of cross-linking between the proteins of the matrix (i. e. the grade of tanning) and on the other hand by modifying the quantity and spatial orientation of the crystalline chitin fibres embedded in the matrix (Neville 1975; Hepburn and Chandler 1976; Banerjee 1988). However, another very important factor also strongly influences the mechanical properties: the water content (Andersen 1996; Vincent and Wegst 2004; Vincent 2009). In general, it is well known that an increase in water content decreases hardness and modulus in many biological materials including insect cuticle (Cusack and Miller 1979; Vincent 1990; Thompson and Czernuszka 1995; Schöberl and Jäger 2006; Vincent 2009). Taking entire pieces of soft, untanned cuticle from a maggot, Vincent could show that a decrease in water content of only a few percent caused a 10-fold increase in stiffness (Vincent 2004). If the soft cuticle of a maggot is artificially tanned or chemically fixed, the shear stiffness also decreases significantly with increasing water content (Vincent 2004). In the abdominal cuticle of the bug *Rhodnius* an increase of cuticular water from about 26 to 31% decreased the stiffness from 250 to 10 MPa (Reynolds 1975). Local testing of insect cuticle in the micro- or nanorange also has revealed marked differences in mechanical properties between fresh (hydrated) and dry material (see Table 3.3.1). Especially the local mechanical properties of the head part of the head-to-neck articulation system (the so-called gula plate) of the beetle *Pachnoda marginata* have been measured in detail by probing from outside by nanoindentation. After drying, the cuticle became harder and stiffer by a factor of about 5 (Enders et al. 2004; Barbakadze et al. 2006).







However, as revealed by Table 3.3.1, a systematic study showing how the mechanical properties of each identifiable microdomain (i.e. single cuticular layer) of a given piece of cuticle changes if water is removed or added is still missing. For this purpose we made horizontal as well as cross sections through the cuticle of a sternal plate of the locust exposing the exo-, meso-, and endocuticle to the tip of a nanoindenter in normal and transverse direction. Our measurements show that the water content has a huge impact on mechanical properties like hardness and modulus in all layers. Results also revealed that the gradual decrease in hardness and modulus from the outer exo- to the inner endocuticle characteristic for native cuticle was eliminated or even reversed in dried cuticle.

Ergebnisse

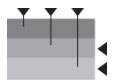
Table 3.3.1 Local testing of material properties in insect cuticle


| Specimen | Test method | Comments | Data DRY (GPa) | Data WET (GPa) | Reference |
|---|---|--|---|-----------------------------------|--|
| Locust cuticle | Miniload hardness tester  | Various regions of cuticle were probed. After drying material became harder by a factor of 4.5 | H: 0.23 – 0.32 | H: 0.07 – 0.12 (metathoracic leg) | Hillerton et al. 1982 On the indentation hardness of insect cuticle. J. exp. Biol. 96:45-52. |
| Dragonfly wing | Nano-hardness tester  | | H: 0.2 – 0.33 E: 1.5 | | Kreuz et al. 1999 Mechanische Eigenschaften biologischer Materialien am Beispiel Insektenflügel. BIONA Rep.14:201-202. |
| Hard exoskeletal parts of beetles | Nanoindent.  | Foreleg tibia, clypeus, elytra, and prothorax were probed | H: 0.27 – 1.98 E: 2.2 - 16 | | Sun et al. 2008 Nanomechanical behaviours of cuticle of three kinds of beetle. J. Bionic Eng. 5:152-157. |
| Elytra of beetles | Nanoindent.  | | H: 0.15 – 0.51 E: 4.3 – 8.8 | | Dai and Yang 2010 Macro-/micro-structures of elytra, mechanical properties of the biomaterial and the coupling strength between elytra in beetles. J. Bionic Eng. 7:6-12. |
| IR sensillum of <i>Melanophila</i> beetle | Nanoindent.  | | <u>Exocuticle</u> H: 0.53 E: 8.0 <u>Mesocuticle</u> H: 0.29 E: 4.8 | | Müller et al. 2008 Micromechanical properties of consecutive layers in specialized insect cuticle: the gula of <i>Pachnoda marginata</i> (Coleoptera, Scarabaeidae) and the infrared sensilla of <i>Melanophila acuminata</i> (Coleoptera, Buprestidae). J. exp. Biol. 211:2576-2583. |
| Head neck articulation (gula) of <i>Pachnoda</i> beetle | Nanoindent.  | After drying material became harder and stiffer by a factor of 5 | H: 0.45 E: 8.0 | H: 0.09 E: 1.6 | Enders et al. 2004 Exploring biological surfaces by nanoindentation. J. Mater. Res.19:880-887. |


Ergebnisse

| | | | | | |
|---|--|---|--|--|--|
| Head neck articulation (gula) of <i>Pachnoda</i> beetle | Nanoindent.  | After drying material became harder and stiffer by a factor of about 5 | H: 0.49 E: 7.5 | H: 0.1 E: 1.5 | Barbakadze et al. 2006 Local mechanical properties of the head articulation cuticle in the beetle <i>Pachnoda marginata</i> (Coleoptera, Scarabaeidae). J. exp. Biol. 209(4):722-730. |
| Head neck articulation (gula) of <i>Pachnoda</i> beetle | Nanoindent.  | Probing in normal direction from outside yielded: H: 0.21 GPa E: 6.2 GPa (dry material) | <u>Exocuticle</u> H: 0.4 E: 8.4 <u>Mesocuticle</u> H: 0.3 – 0.43 E: 5.5 – 9.9 <u>Endocuticle</u> H: 0.3 E: 5.8 | | Müller et al. 2008 - see above - |
| <i>Drosophila</i> | Nanoindent.  | Live larvae, pupae, and adults were probed | | <u>larva:</u> E: 0,39 MPa <u>puparium:</u> E: 15.4 MPa <u>adult:</u> E: 4.4 MPa | Kohane et al. 2003 Nanoscale in vivo evaluation of the stiffness of <i>Drosophila melanogaster</i> integument during development. J. Biomed. Mater. Res. Pt A 66A:633-642. |
| Grasshopper mandible | Nanoindent.  | After drying material became harder and stiffer by a factor of 2 | <u>Harder region:</u> H: 0.54 E: 10 | <u>Harder region:</u> H: 0.27 E: 5 | Schöberl and Jäger 2006 Wet or dry - hardness, stiffness and wear resistance of biological materials on the micron scale. Adv. Eng. Mat. 8(11):1164 - 1169. |
| Mandibles of 6 termites | Nanoindent.  | Dry material 5 – 10 % harder and stiffer. No significant differences between dry and wet specimens. | H: 0.33 – 1.1 E: 6.3 – 10.8 | n.s. | Cribb et al. 2008 Insect mandibles-comparative mechanical properties and links with metal incorporation. Naturwissenschaften 95(1):17-23. |
| Jewel beetle mandible | Nanoindent.  | Differences between dry and wet larval mandibles were insignificant | <u>Larva:</u> H: 1.63 E: 14.1 <u>Adult:</u> H: 1.09 E: 10.74 | <u>Larva:</u> H: 1.5 E: 13 | Cribb et al. 2010 Hardness in arthropod exoskeletons in the absence of transition metals. Acta Biomater 6(8):3152-56. |

Ergebnisse

| | | | | | |
|-----------------------------------|---|---|------------------|------------------|------------|
| Sternal cuticle of <i>Locusta</i> |  | After drying material became harder by a factor of 9 and stiffer by a factor of 7.4 | See Figure 3.3.3 | See Figure 3.3.3 | This paper |
|-----------------------------------|---|---|------------------|------------------|------------|

 Cuticle probed in normal direction from outside

 1-3 layers probed in transversal direction

3.3.2 Material and Methods

3.3.2.1 Specimen Preparation and Characterization

Sternal plates were excised from anesthetized adult locusts and dried in air. Locusts had completed the final moult a few days before the experiments. After embedment in Epoxy Resin L (Toolcraft) in a standard embedding form (Agar Aids LTD) semithin cross and horizontal sections were cut from the resin blocks containing the sternal plates with a Reichert Ultracut microtome using a diamond knife (Diatome). Semithin sections (0.5 – 2 µm) were stained with a 0.05% toluidine-blue/borax solution and examined with a Leitz DM RBE light microscope. When an appropriate cut of the specimen was identified the surface of the resin block was polished by cutting 1 - 3 ultrathin sections and glued to a sample mounting disc for subsequent probing with a nanoindenter (Figure 3.3.1 a, see 3.3.2.2). To demonstrate the different types of cuticle, the embedding epoxy resin was removed in some sections (2 µm thick) by immersion in an alcoholic KOH solution (i.e. a solution of absolute ethanol saturated with potassium hydroxide (Weyda 1982)). After washing in 96% ethanol, sections were stained with a Mallory trichrome solution for 5 min. Non-melanized exocuticle, which does not really stain, appears in a faint yellow or amber, mesocuticle appears red and endocuticle blue (Weyda 1982). Digital images of the sections were taken with a Nikon Coolpix 5000.

To compare values obtained from rewetted samples with specimens that are as close as possible to the native stage, freshly excised pieces of cuticle were painted with PU-lacquer (Farben Wolf, Vienna, Austria). This lacquer hardens by air moisture thus conserving the wet cuticle inside. Furthermore, contact between the wet cuticle and the embedding Epoxy Resin was prevented. After polishing the surface and storage in a moist chamber at nearly 100% relative humidity, samples were submerged in water and probed in transverse direction as described below.

3.3.2.2 Mechanical testing

Mechanical tests were conducted in ambient air and in A. dest. in a nanomechanical test system capable of normal loading as well as *in situ* SPM (TriboScope; Hysitron, Minneapolis, USA). Indentation tests were performed by using a three-sided Berkovich diamond tip with a total included angle of 142.3° also suitable for measurement in fluid. A proper area function was established by indenting in a PMMA test specimen with known hardness and modulus. Contact depths ranged from 250 to 1,100 nm. The maximum load during indentation was $1,000 \mu\text{N}$ with loading and unloading rates of $100 \mu\text{N s}^{-1}$, and a 10 s hold time at peak load to compensate for material creeping and to make sure that most of the plastic deformation was completed. It was repeatedly checked that longer holding times did not produce differing results. To avoid interference between consecutive measurements the space between adjacent impressions was always greater than $5 \mu\text{m}$. Hardness (H) and reduced Young's modulus (E_r , for reasons of conciseness in the following also termed "modulus") both were calculated from the unloading portions of the load-displacement curves following established procedures (Oliver and Pharr 1992; Bhushan and Li 2003; Müller et al. 2008).

Probing was done in normal (i. e. perpendicular to the surface, see Figure 3.3.2) and in transverse direction (i.e. parallel to the surface of the cuticle). In samples prepared for indentation in transverse direction a small cleft between the outer surface and the embedding resin occurred. It turned out that the values measured close to the outer edge of the exocuticle were influenced by the cleft. So hardness and modulus already decreased before the impression of the tip became incomplete due to partly indenting into the cleft. Therefore, we did not probe the exocuticle systematically in transverse direction.

To obtain data from rewetted cuticle, we first scanned a dry sample until a region of interest was identified. Afterwards the tip was lifted about $20 \mu\text{m}$ above the surface without changing its horizontal position. With a syringe distilled water was filled into the groove of the fluid cell (c.f. Figure 3.3.1 a) until the sample and the tip were fully submerged. After 30 minutes the tip was lowered onto the sample and the surface was scanned. Subsequent mechanical testing and SPM imaging in water was carried out for up to 150 minutes.

To test the reproducibility of rewetting and subsequent drying we added and removed water three times during a period of 6 hours. During this experimental trial, modulus and hardness of the endocuticle and of the embedding resin was measured every 10 minutes.

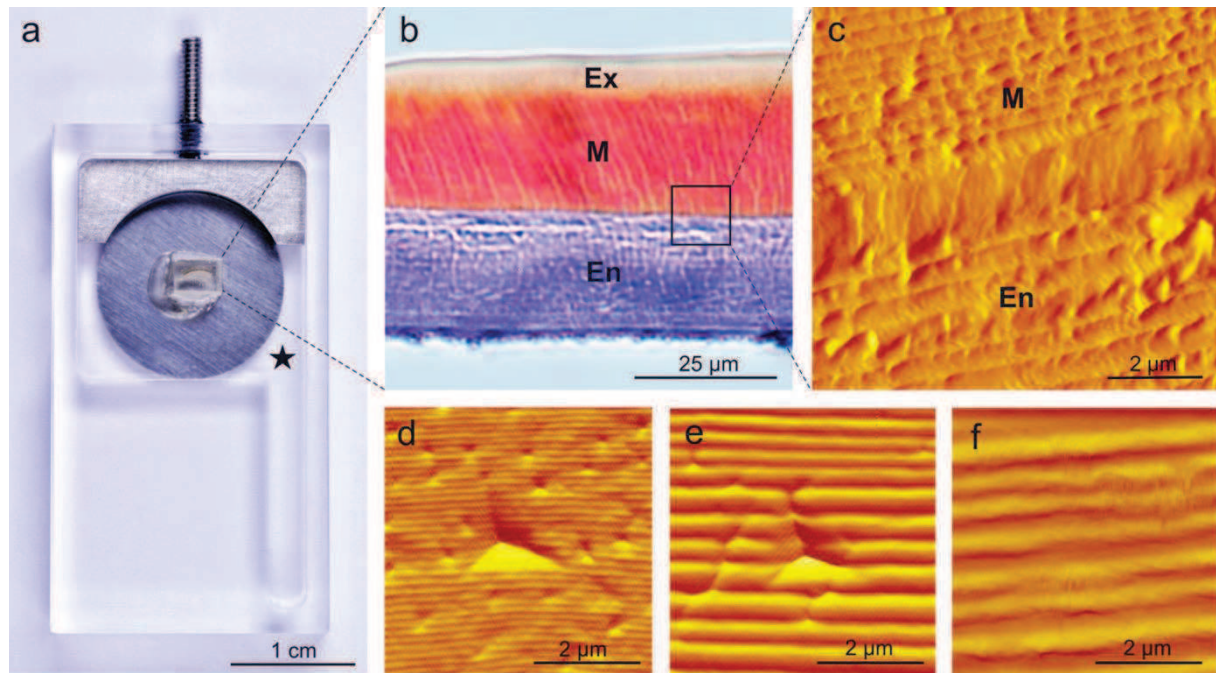


Figure 3.3.1 Nanoindentation in distinct cuticle layers in air and under water. **a**, Fixture for cuticle samples. Embedded and polished samples are glued on holder plate, fixed by a grub screw. The plate is located in a depression with a depth of 5 mm (black asterisk), connected with a groove for filling with water. **b**, Cross section of embedded cuticle, stained with Mallory trichrome stain (Light microscope, thickness 1 μm). Exocuticle (Ex) is stained yellow, mesocuticle (M) red and endocuticle (En) blue. The area marked by a square is enlarged in **c**. **c**, Cross-section of embedded cuticle (Nanoindenter scan). Meso- and endocuticle can be identified by the thickness of lamellae. **d-f**, Scans of indents with pyramidal Berkovich-tip, approximately 10 min after indentation. **d**, Indent in dry mesocuticle. **e**, Indent in dry endocuticle. **f**, Indent in endocuticle under water (depression hardly visible).

3.3.2.3 Statistics

Data obtained from the different cuticular layers were grouped into material classes. Means and corresponding standard deviations of H and E_r of each class were calculated. The data from indentation experiments in normal direction were analysed using the Kruskal-Wallis test (Kruskal and Wallis 1952). Data resulting from indentation in transverse direction were analysed with an independent two-sample t-test. Data were regarded as significantly different if P was smaller than 0.01.

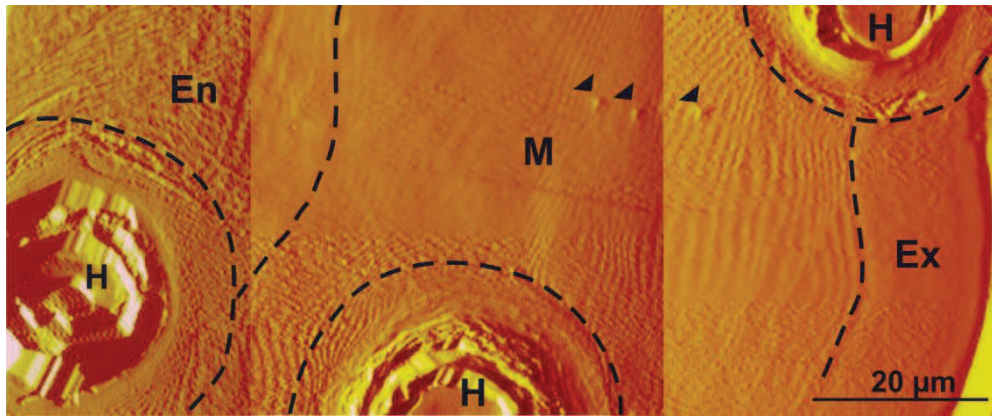


Figure 3.3.2 **Nanoindenter scan of horizontally cut cuticle.** Distinct cuticle layers can be recognized due to the different thickness of lamellae and surface structure: Exocuticle (**Ex**), mesocuticle (**M**) and endocuticle (**En**) (only upper part is shown). Depressions resulting from indents in mesocuticle are labelled by arrowheads. Marked areas around the bases of hair-mechanoreceptors (**H**) were not indented.

3.3.3 Results

3.3.3.1 Composition of the sternal cuticle

The semithin sections stained with Mallory trichrome stain revealed that the sternal cuticle of the locust consists of three layers: the exo-, the meso- and the endocuticle (Figure 3.3.1 b). Total thickness in the examined region was between 35 and 50 µm. The innermost endocuticle which appears in a distinct blue is characterized by relatively large distances between the repetitive layers of the helicoidally arranged chitin fibres (distance between layers between 0.5 to 1 µm, Figure 3.3.1 c,e,f). In the overlying layer of red coloured mesocuticle distances between the layers are between 100 to 350 nm (Figure 3.3.1 d). The thinnest layer is the outer exocuticle with a thickness of 3 to 5 µm. Here, the distances between the chitin layers again are slightly denser than in the mesocuticle. However, a sharp transition could not be found. In some of our Mallory stained sections an exocuticular layer could not clearly be distinguished from the mesocuticle. In most sections, however, it appeared in faint amber (cf. Figure 3.3.1 b) which means that this thin outer layer did not take up the dye readily. An outermost epicuticle could not be identified with the light microscope. Because of the presence of a small cleft between the outer surface and the embedding resin (see 3.3.2.2) a high resolution topographical scan of the epi-/exocuticle with the tip of the nanoindenter was not possible. Therefore we used TEM micrographs to depict these two outer layers. In the TEM images (not shown) we could identify an outermost layer of about 1.5 µm thickness where no inclusions of chitin fibres could be detected. Thus we conclude that this layer represents the outermost epicuticle.

3.3.3.2 Mechanical properties

Modulus - Probing the dry cuticle of the sternal plate in normal direction yielded a uniform modulus of about 5.2 GPa for all three layers; no significant differences could be detected (Figure 3.3.3 a). However, when probing in transverse direction, a distinct difference between meso- and endocuticle became evident: it turned out that the endocuticle is significantly stiffer than the mesocuticle and also two times stiffer than when probed in normal direction. The mesocuticle showed a similar increase in modulus compared to the probing in normal direction: a 50% increase was measured (Figure 3.3.3 b, Figure 3.3.5).

The relationships markedly changed when the cuticle was measured in water. In the rewetted cuticle probing generally yielded much lower moduli in all layers. However, in contrast to the situation in the dry stage, a noticeable decrease in modulus from the exo- to the endocuticle became obvious (Figure 3.3.3 a,b). When probing in normal direction the modulus of the exocuticle decreased by a factor of 2.4 compared to the dry state. Accordingly, the decrease in modulus in the meso- and endocuticle was considerably larger: in the mesocuticle the modulus decreased by a factor of 5.7, and in the endocuticle by a factor of 7.4 (Figure 3.3.3 a). The same tendency was observed when probing in transverse direction. Here, the modulus of the mesocuticle decreased by a factor of 2.2; in the endocuticle by a factor of 4.1. In contrast to the dry state the modulus of the mesocuticle now was significantly larger than that of the endocuticle (Figure 3.3.3 b). The values found in the PU-lacquer treated endocuticle (E_r : 2.23 ± 0.19 GPa versus 2.65 ± 0.44 GPa in the rewetted cuticle) and in the PU-lacquer treated mesocuticle (E_r : 3.22 ± 0.408 versus 3.55 ± 0.309 GPa in the rewetted stage) were significantly lower (t-test; $P < 0.01$) than values obtained in the rewetted cuticle (see arrowheads with dotted lines in the columns of the rewetted cuticle in Figure 3.3.3 b).

Comparing the modulus of meso- and endocuticle of the rewetted cuticle as a function of the direction of indentation (i. e. normal versus transverse direction) the same tendency as in the dry cuticle was observed. Moduli were significantly higher when the cuticle was probed in transverse direction: in the mesocuticle by a factor of 4, in the endocuticle by a factor of 3.7 (Figure 3.3.5).

Hardness – Probing of the dry cuticle in normal direction revealed significant differences in hardness between the mesocuticle on the one hand and the endo- and exocuticle on the other hand. However, no statistically significant differences could be found between the exo- and the endocuticle (Figure 3.3.3 c). Results showed that the dry exocuticle had the lowest hardness of 0.25 ± 0.013 GPa whereas hardness of the dry meso- and endocuticle was 0.3 ± 0.019 GPa and 0.27 ± 0.035 GPa respectively. The tendency that hardness of the dry

Ergebnisse

mesocuticle is somewhat higher than hardness of the dry endocuticle was also observed when probing in transverse direction. However, in transverse direction, this difference was statistically insignificant (Figure 3.3.3 d). When probing in transverse direction an increase in hardness of 10 % could be measured in the meso- as well as in the endocuticle compared to probing in normal direction (Figure 3.3.3 d, Figure 3.3.5).

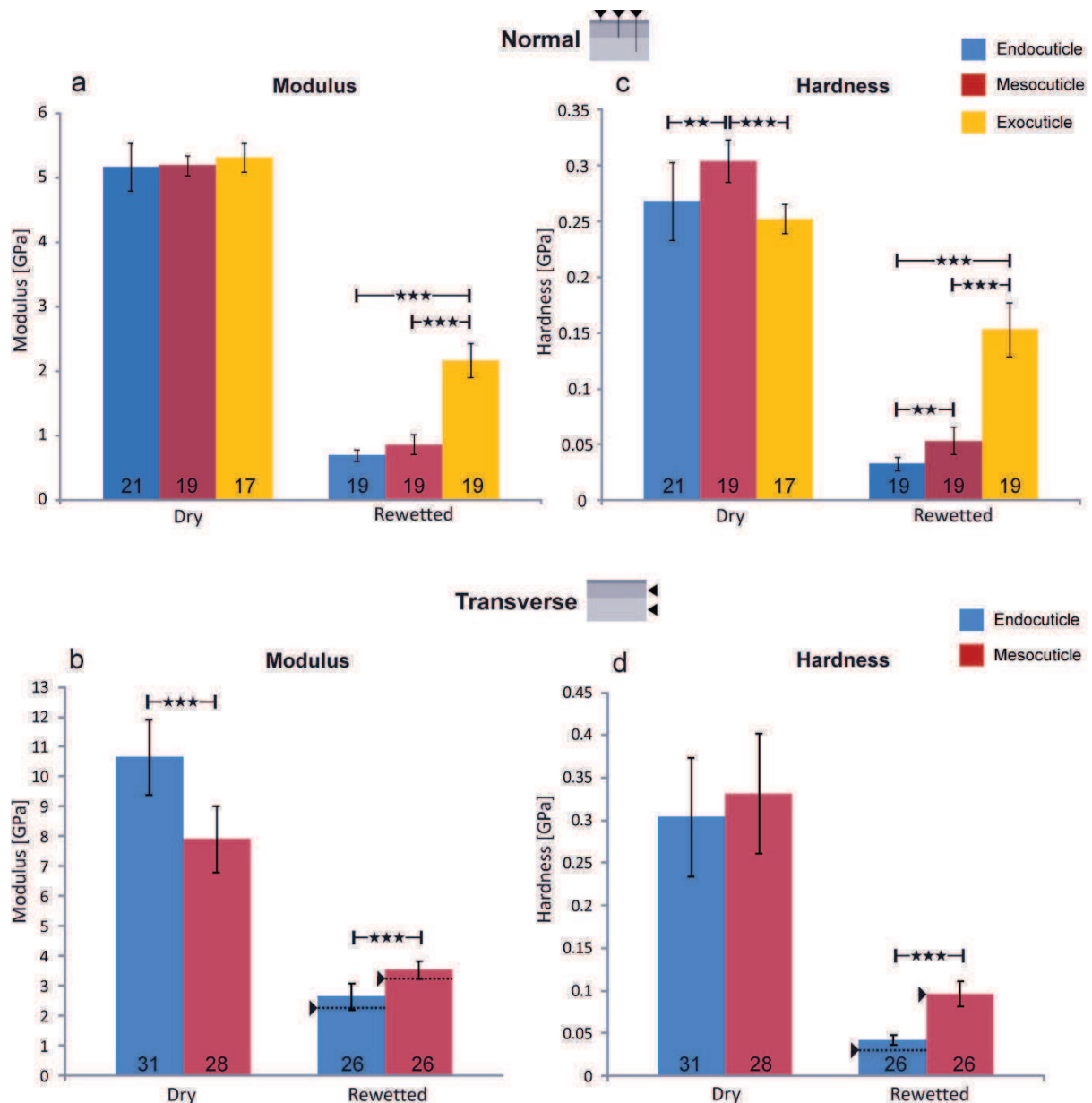


Figure 3.3.3 Modulus and hardness of the exo-, meso-, and endocuticle under dry and rewetted conditions probed in the normal (a, c) and transverse (b, d) directions. Numbers of indentations (n) used for calculation of means and standard deviations (indicated by vertical lines) are given at the bottom of the bars. Asterisks indicate levels of statistically significant differences at $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***). Mean values of samples treated with PU lacquer are marked by arrowheads and dotted lines in the bars of the rewetted samples in (b) and (d) ($n = 39$, standard deviation not shown).

Ergebnisse

Like in the modulus, the situation significantly changed when the cuticle was rewetted. Indentation in normal direction revealed a significant and continuous decrease in hardness from the exo- to the endocuticle (Figure 3.3.3 c). While hardness of the exocuticle decreased by a factor of 1.6 in comparison to the dry stage, decreases were considerably larger in the mesocuticle (by a factor of 6) and the endocuticle (by a factor of 9). The same behaviour was measured when probing in transverse direction. In comparison with the dry cuticle hardness of the meso- and endocuticle decreased by a factor of 3.3 and 7.5 respectively. The values found in the PU-lacquer treated endocuticle (hardness: 0.03 ± 0.005 GPa versus 0.04 ± 0.006 GPa in the rewetted stage) were significantly lower than in the rewetted cuticle (t-test; $P < 0.01$). No differences in hardness could be found in the PU-lacquer treated mesocuticle in comparison with the rewetted stage (see dotted line and arrowheads in the column of the rewetted cuticle in Figure 3.3.3 d).

When considering the influence of the direction of indentation in the rewetted cuticle it turned out that hardness of the mesocuticle was increased by a factor of 2 when probing in transverse direction; the hardness of the endocuticle was increased by a factor of 1.3.

Cyclic drying and rewetting - Finally we tested the impact of water on the mechanical properties of endocuticle over a period of 6 hrs (Figure 3.3.4). The three wetting and drying cycles demonstrate that the pronounced changes in modulus and hardness can be controlled by adding and removing of water in a quite reproducible way. In contrast, the material properties of the embedding resin changed only slightly (Figure 3.3.4).

3.3.4 Discussion

As pointed out in the *Introduction*, the mechanical properties of insect cuticle can span a very large range. Sclerotised cuticle exhibits a hardness between 0.07 GPa (Hillerton et al. 1982) and nearly 2 GPa (Sun et al. 2008). The modulus can be between 1 and 20 GPa (Wainwright et al. 1976; Vincent and Wegst 2004). Considerably lower moduli have been reported in the study of Kohane et al. 2003 (see Table 3.3.1). However, these data should be considered with some care because entire animals (i.e. larvae, pupae, and adults) of *Drosophila* were fixed to a plate with double-sided tape. The tape as well as the haemocoel, containing air-filled tracheae and air sacs, could have introduced additional compliance during probing. Thus moduli of the integument measured by nanoindentation may be underestimated. Thus our data obtained at the exocuticle are well within the range already described by other workers.

Modulus of soft cuticles has been specified from 1 kPa to 60 MPa (Reynolds 1975; Vincent and Wegst 2004). The lowest value which has been measured in our study was 700 MPa in the rewetted endocuticle. However it has to be taken into consideration that the moduli

Ergebnisse

measured so far for soft cuticle have been measured at highly hydrated extensible intersegmental membranes, at the rubbery protein resilin, or at the ductile abdominal cuticle of a larva of a blood-sucking bug (60 MPa) (Reynolds 1975). The abdominal cuticle of the bug shows pronounced viscoelastic behaviour and can be plasticized to allow for extensive swelling of the abdomen after a blood meal. In our study, however, we measured the modulus of a hydrated endocuticular layer reinforced with many layers of chitin fibres which may account for the higher modulus. In contrast, the mechanical properties of the abdominal cuticle of the bug larva are determined largely by the matrix material. The chitin microfibrils may mainly act as a kind of reinforcing filler for short-term, rapid stresses (Reynolds 1975). Data about the hardness of unsclerotised cuticle are sparse. Müller et al. 2008 [18] have measured a hardness of 0.3 GPa in the dry endocuticle of the gula of the beetle *Pachnoda* (cf. Table 3.3.1). However, it can be assumed that this value does not reflect *in vivo* conditions because of the dehydrated state. This is corroborated by our data because we measured a six- to tenfold lower hardness in the meso- and endocuticle.

It is a well known fact that the mechanical properties of insect cuticle are strongly affected by water (Hillerton et al. 1982; Enders et al. 2004; Vincent and Wegst 2004; Schöberl and Jäger 2006). In previous studies where the local mechanical properties have already been measured under dry and wet conditions in the micro- or in the nanorange, cuticle became harder and stiffer at most by a factor of 5 after drying (Table 3.3.1).). When indenting in normal direction we found an even larger effect: after drying the hardness of the endocuticle increased by a factor of 9; the modulus by a factor of 7.4. Results also show that the susceptibility for modifications of the mechanical properties by changes in water content is different in the respective cuticular layers. The modulus of the exocuticle only increased by a factor of 2.4 after drying; hardness increased by a factor of 1.6. Effects were significantly larger in the underlying mesocuticle and – as mentioned above - in the endocuticle. In addition, the important impact of water became also obvious when looking at the gradation of modulus and hardness from the outside to the inside. In the rewetted cuticle a clear decrease in modulus and hardness could be seen from the outer exo- to the inner endocuticle. This characteristic gradation was completely lost when the cuticle was dried. After drying the modulus of all layers increased to similar high values. Hardness became highest in the mesocuticle and reached about the same high values in exo- and endocuticle (Figure 3.3.3 c).

In principle, the same tendencies could be observed when probing the cuticle in transverse direction (Figure 3.3.3 b,d). However, values were generally higher than values obtained in normal direction which reveals anisotropy in the mechanical properties. Furthermore, the measurements with the PU-lacquer treated cuticle indicated that a hydrogen-bonded material like hydrated insect cuticle, once dried, will not fully rehydrate to the same level. Therefore

Ergebnisse

hardness and modulus of the rewetted cuticle were somewhat higher than those of the freshly excised material embedded in the PU-lacquer (cf. Figure 3.3.3 b,d). However, compared to the mechanical properties of the dry cuticle differences are minor.

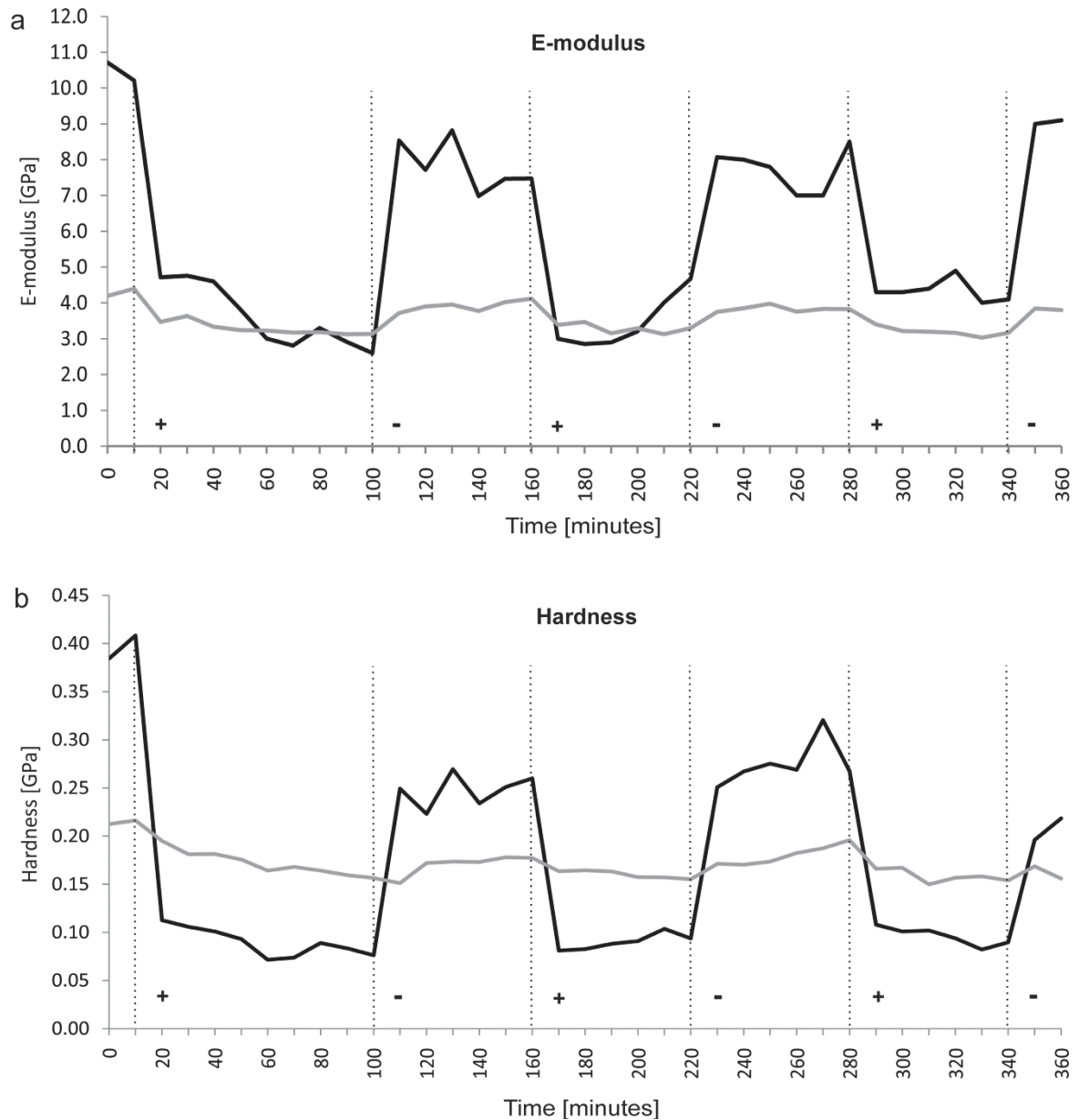


Figure 3.3.4 Change of E-Modulus(a) and hardness (b) of endocuticle (black line) and embedding resin (grey line) over time. Dotted lines indicate moments, when the specimen was submerged in water (+) or when the water was removed (-).

3.3.4.1 Anisotropic behaviour

Figure 3.3.5 shows the observed anisotropy revealed by probing in two directions displaced by 90°. Anisotropy is a characteristic feature of arthropod cuticle (Vincent and Wegst 2004;

Ergebnisse

Romano et al. 2007; Sachs et al. 2008; Lin et al. 2009). It is caused by the laminated inclusion of the crystalline chitin fibres in the protein matrix parallel to the outer surface. The modulus of chitin fibres is about 150 GPa (Vincent 2002). When probing perpendicular (i. e. in normal direction) to the fibre, results are mainly determined by the mechanical properties of the embedding protein matrix. When probing in parallel to the fibre bundles, material properties are governed by the mechanical properties of the high modulus chitin fibres (Vincent and Wegst 2004). A single indent generally affected an area revealing several layers of helioidally arranged chitin fibres (cf. Figure 3.3.1 d,e). Thus the resulting data represent an average of the mechanical properties of the protein matrix and especially the chitin fibres oriented in angles between 0° (i.e. parallel) and 90° (perpendicular) to the load. Our results show (Figure 3.3.5) that the influence of the chitin fibres is obvious in the dry as well as in the rewetted cuticle. However, anisotropy was especially predominant in the rewetted cuticle. If water was added, the protein matrix became softer and more compliant. Consequently, the contribution of the fibres increased when comparing normal versus transverse direction of probing in the rewetted cuticle: in the mesocuticle the modulus increased by a factor of 4 and hardness by a factor of 2; in the endocuticle modulus increased by a factor of 3.7 and hardness by a factor of 1.3. The larger differences measured in the mesocuticle may be explainable by the denser packaging of chitin fibres within this layer (cf. Figure 3.3.1 c-e).

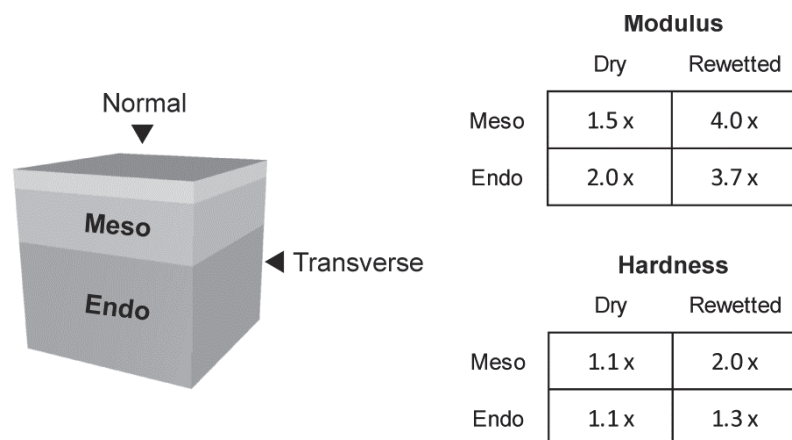


Figure 3.3.5 Anisotropy in the meso- and endocuticular layers revealed by probing in normal versus transverse direction. Factors by which modulus and hardness were increased when probing in transverse direction are given in the table.

3.3.4.2 Interaction of water with the cuticle

Repeated adding and removal of water revealed that the impact of water on the mechanical properties of cuticle can be measured within a few minutes in the microdomains as shown in Figure 3.3.4 for the endocuticle which showed the largest differences between the dry and the wet condition. Furthermore, results demonstrate that changes in modulus and hardness are reversible to a large extent. This indicates that the effect of water uptake by the cuticle is

based on a fast fundamental physical effect. Interaction of water with the cuticle most probably is associated with the protein matrix, because the chitin is highly crystalline and chitin fibres are enveloped by a layer of protein (Minke and Blackwell 1978; Vincent and Wegst 2004). Most probably water molecules interact with polar groups of proteins by secondary non-covalent links. Additional "free" water can easily be added by the formation of hydrogen bonds to the absorbed "bound" water molecules of the monolayer. Thereby a layer of free bulk water is generated which can easily be manipulated. It can be concluded that stiffness increases as the bulk water disappears (Nissan 1976). Consequently, a change of a relatively small amount of water will induce a large change in stiffness (Vincent 2009).

According to the decreasing grade of tanning from outer exo- to the inner endocuticle, increasing amounts of water can be absorbed in the respective layers. Tanning or sclerotization is always accompanied by the loss of water. Based on this phenomenon, Vincent and coworkers have established a well-founded concept of sclerotization as a process of controlled dehydration (Hillerton and Vincent 1979; Vincent and Hillerton 1979; Vincent 1980; Vincent and Ablett 1987). In brief, tanning by phenols increases the hydrophobicity of the proteins which in turn expels the water during the process of sclerotisation. Thus the capacity for maximal uptake of bulk water is limited depending on the amount of tanning agents embedded in the respective layer. Accordingly, heavily sclerotised hard exocuticle contains only about 12 % of water (Vincent and Ablett 1987); in contrast, unsclerotized soft cuticle can contain up to 75 % of water (Vincent and Wegst 2004). Because of the low amount of water in heavily sclerotized cuticle no or only insignificant changes in the mechanical properties in mandibles of termites or jewel beetle larvae were found after the removal of water (Cribb et al. 2008; Cribb et al. 2010) as listed in Table 3.3.1. In this way the capacity for water uptake and, by means of that, the mechanical properties of the layers are adjusted.

3.3.4.3 Adjustment of mechanical properties by regulating the water content

In our study we measured the two extrema in hardness and modulus by probing the cuticle in air as well as fully submerged in water. However it can be speculated that the real *in vivo* stage lies in between. The precise water content of a native cuticle is largely unknown because it is difficult to measure (Schöberl and Jäger 2006). This is especially true for the water content of a single layer. Our study again shows that water is a major modulator for the mechanical properties of insect cuticle and that hardness and modulus of each layer is strongly affected by its water content.

When looking at a specific cuticular region of a given insect species, it can be stated that the local mechanical properties are decisively adjusted by the water content in each of the cuticular layers. Based on our results, we propose a two-stage adjustment process: First of all the grade of tanning defines the maximal possible uptake of water in each layer. However, as

already pointed out by other workers, it is unlikely that the cuticular water content is always maximal in a living insect (Vincent and Ablett 1987). Thus a further fine tuning may be achieved by regulating cuticular water loss by transpiration. The most important component to regulate cuticular transpiration is the waxy epicuticle (Locke 1965; Hadley 1982; Gibbs 1998). Therefore we speculate that the role of the epicuticle is not only the saving of water in general. As a new additional function we propose that the development of the epicuticle in a specific functional area of the cuticle may set a specific rate of water loss which in turn accounts for a site-specific percentage of water in the underlying cuticular layers. The mechanical properties are simultaneously adjusted. Further experiments have to show if this assumption is correct.

3.3.4.4 Conclusions

From a technical point of view chitin-fibre reinforced arthropod cuticle can be regarded as a fibre composite material consisting of up to three functional sublayers. Because the mechanical properties of each sublayer can be adjusted individually, the resulting overall properties of the cuticle as a whole are superior to a single-layer composite material of the same thickness and weight. With respect to various kinds of mechanical strengths, fracture and fatigue properties, and the capability to store energy multilayered materials have many advantages. Thus insect cuticle can be an interesting source of inspiration for the development of new technical materials. As already emphasized by Vincent and co-workers, a very promising feature of insect cuticle is that water not only is used for the synthesis of cuticle but also for the maintenance of its structural and functional properties (Vincent and Wegst 2004; Vincent 2009). Transferring the principles and mechanisms of insect cuticle to man-made advanced materials in which, for example, the mechanical properties can be elegantly adjusted by controlling the water content of one or more layers would be a highly promising biomimetic attempt.

Acknowledgements

We are indebted to Horst Bleckmann for his continuous interest in our work and for providing lab space; Anke Schmitz gave valuable comments and helped to improve the English. The helpful comments of two anonymous referees are greatly acknowledged. Funded by grants from BMBF (Grant No. 01RB0909A) and the German Science Foundation (DFG) through Graduate Program GRK 1572.

Überleitung

Nach der Entwicklung einer Methode zur systematischen Prüfung verschiedener Schichten vollständig gewässerter Kutikula an Heuschrecken (3.3) erfolgte die Übertragung der Methodik auf die IR-Rezeptoren von *M. acuminata* und *A. albicornis*. Im folgenden Manuskript "Material properties of photomechanic infrared receptors in pyrophilous *Melanophila* beetles and *Aradus* bugs" werden die Materialeigenschaften verschiedener Kutikulatypen innerhalb der IR-Rezeptoren sowie in bestimmten Referenzregionen präsentiert. Hierbei werden jeweils die Ergebnisse von quasi-nativen und von getrockneten Proben gegenübergestellt. Durch topographische Untersuchungen wird zusätzlich das Quellungsverhalten der Exo- und Mesokutikula der photomechanischen IR-Rezeptoren charakterisiert.

3.4 Material properties of photomechanic infrared receptors in pyrophilous *Melanophila* beetles and *Aradus* bugs

David Klocke, Helmut Schmitz

Abstract

Jewel beetles of the genus *Melanophila* and some pyrophilous species of the flat bugs genus *Aradus* show a pyrophilous behaviour and have developed so-called photomechanic infrared (IR) receptors. In a spherical photomechanic IR sensillum incoming IR radiation is converted into micromechanical action finally stimulating the dendritic tip of a mechanosensitive sensory cell. The tip is located inside a tiny cuticular sphere with a diameter of about 12 μm . The material properties of the different cuticular components of this sphere are of great importance for stimulus generation. We measured modulus and hardness of the outer exocuticular shell of the sphere and of the mesocuticle inside the core. Measurements were made by nanoindentation at sensilla which were partly cut open under dry as well as under rewetted (i.e. quasi-natural) conditions. Important results are that in rewetted sensilla the outer exocuticular shell of the sphere in the *Melanophila* sensillum is about 50% harder and 20% stiffer than reference exocuticle and that in both species especially the rewetted mesocuticle of the inner core of the IR sensilla is significantly softer (about 80% in *Melanophila*) and more compliant (about 90% also in *Melanophila*) than the reference mesocuticle. Findings can be interpreted as special adaptations of the cuticular microdomains of photomechanic infrared sensilla to enhance thermo-mechanical performance and, thereby, sensitivity.

3.4.1 Introduction

Jewel beetles of the genus *Melanophila* belonging to the *acuminata* or “flattened type” like *M. consputa*, *M. notata*, *M. opaca*, *M. atropurpurea*, or *M. acuminata* are well-known to approach forest fires (Ricksecker 1885). The same so-called pyrophilous behaviour has been observed in a few flat bug species of the genus *Aradus* (Heteroptera, Aradidae).

In both groups so called photomechanic IR receptors have been found (Vondran et al. 1995; Schmitz et al. 2008). This unique type of sensillum is innervated by a mechanosensitive cell and is strikingly similar in beetles and bugs (see Figure 3.4.1 a,b). In brief, a photomechanic IR sensillum shows the following functional components: a spherical IR absorbing cuticular apparatus built by a minute sphere with a diameter about 12 to 15 μm . The sphere consists of an outer shell made of hard exocuticle which is reinforced by many layers of chitin fibres.

Ergebnisse

Inside the sphere a core of softer mesocuticle is situated. In contrast to the massive shell the mesocuticle has a spongy texture caused by a three-dimensional system of fluid-filled microlacunae and nanocanals (Figure 3.4.1 c,d). From below the tip of the mechanoreceptor enters the sphere through a pore in the shell and terminates inside the mesocuticular core (cf. Figure 3.4.1 c,d) (Schmitz et al. 2007; Schmitz et al. 2010).

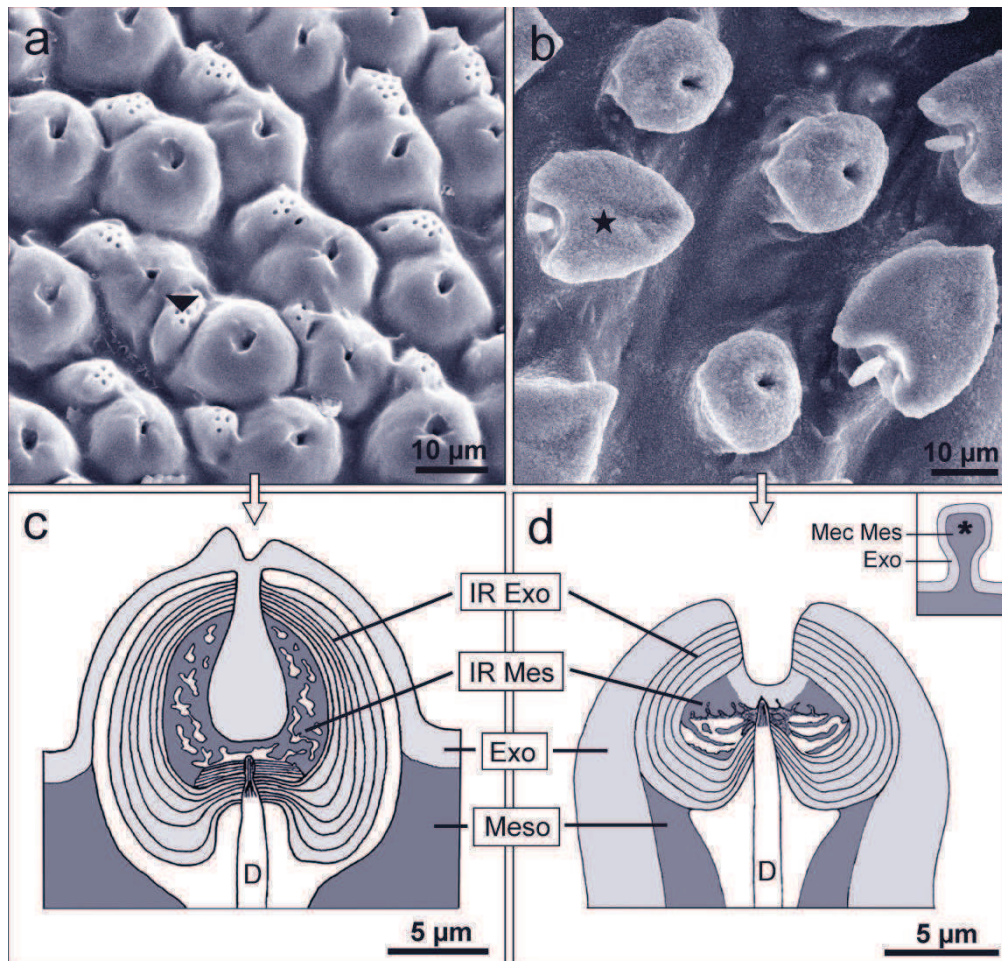


Figure 3.4.1 **a** SEM image of dome-shaped IR receptors and associated wax glands (arrowhead) located at the bottom of the pit organ of *M. acuminata*. **b** IR receptors and hair mechanoreceptors (asterisk) of the propleural region of the prothorax of *A. albicornis*. Below: Schematic drawings of single IR receptors of *Melanophila* (**c**) and *Aradus* (**d**) composed of different types of cuticle. The microfluidic core is penetrated by the tip of mechanosensory dendrite (D). Inset: Schematic drawing of a contact mechanoreceptor of *Aradus*. Mes Mes in the marked region (*) was tested.

According to the photomechanic model IR radiation is absorbed by the organic molecules (i.e. proteins and chitin) as well as by the water inside the mesocuticular lacunae of the sphere. The corresponding increase in temperature mainly results in a thermal expansion of the microfluidic core consisting of mesocuticle and the fluid enclosed by the shell of the sphere. However, an omnidirectional expansion is restrained by the outer shell. Thus the

Ergebnisse

dendritic tip of the mechanoreceptor as the only compliant element is compressed which represents the adequate stimulus for a mechanosensitive neuron. Electrophysiological experiments have shown that at least the IR receptors of *Melanophila* beetles are fast transformers of IR radiation into a micromechanical event. Latencies were in the range of a few milliseconds (Schmitz and Bleckmann 1998; Schmitz et al. 2000). Although the real sensitivity of the photomechanic receptors is still unknown, there is evidence that at least the IR receptors in *Melanophila* beetles have an outstanding sensitivity. If one postulates that *Melanophila* beetles and *Aradus* bugs use their IR sensilla for fire detection, a high sensitivity is substantiated by older reports in the entomological literature that *Melanophila* beetles have approached fires over great distances and in large numbers (Ryle 1923; VanDyke 1928; Linsley 1943). Untold numbers of *Melanophila consputa* were observed at a large burning oil storage tank close to Coalinga in California (VanDyke 1926). Because Coalinga is situated in the arid San Joaquin Valley, the next coniferous forests which most probably were the source for the beetles were 50 to 100 miles away. Great numbers of beetles have been attracted by a large smelter plant where the next coniferous forest also was about 50 miles away (Linsley 1933). *Melanophila consputa* and *M. occidentalis* swarmed in numbers of several thousand individuals about two cement plants in southern California where the beetles congregated near the kilns at high ambient temperatures. Beetles were especially numerous in the vicinity of the burning zone of the kilns. It's also of importance to note that at the first plant the next coniferous forest was 20 miles away, at the second facility the distance to the next forest was 40 miles (Linsley and Hurd 1957).

Consequentially the cuticular sphere has to efficiently transform the IR radiation energy into mechanical displacement. Therefore, the thermo-mechanical properties of the spherical cuticular apparatus have to be optimized for this purpose. In a preceding paper Müller and al. already have locally measured modulus and hardness of the different cuticular components of the *Melanophila* IR sensillum. However, only dry material was investigated. Because the fluid is crucial for the function we measured the mechanical properties as well as water uptake behaviour (swelling properties) in dry and also fully hydrated (i.e. rewetted) sensilla of pyrophilous *Melanophila acuminata* and *Aradus albicornis*. Results were discussed with respect to stimulus translation.

3.4.2 Material and Methods

3.4.2.1 Animals

In summer 2010, adult *M. acuminata* hatched from burnt logs which were stored in the animal house of the Zoological Institute of Bonn University. The wood originated from forest fires in Catalonia, Spain, happening in summer 2009 during the reproduction period of

Ergebnisse

Melanophila. Animals were kept for several weeks in plastic boxes and fed with raisins, peanuts and walnuts. Water was given ad libitum.

Adult *A. albicornis* were caught after fires on burnt areas in Eucalypt forests in February 2011 in Western Australia. Bugs were kept alive for several months in plastic boxes on burnt logs infested with post-fire fungi.

3.4.2.2 Scanning electron microscopy

Beetles and bugs fixed in 70% ethanol were cleaned by sonication in a mixture of chloroform and ethanol (2:1) for 2 min. After drying in air, specimens were glued onto holders with carbon glue (Leit-C, Fa. Neubauer), sputtered with gold, and examined in a LEO 440i (Leica, Bensheim, Germany) scanning electron microscope (SEM).

3.4.2.3 Specimen preparation

Sensory IR pit organs together with about 0.5 mm of surrounding cuticle were excised from the metathorax of anesthetized *M. acuminata*. Also, pieces of cuticle containing IR receptors were excised from the propleural regions of the prothorax of anesthetized *A. albicornis*. After drying in air specimens were embedded in Epoxy Resin L (Toolcraft) in a standard embedding form (Agar Aids LTD). Semithin cross sections were cut from the embedded specimens with a Reichert Ultracut microtome using a diamond knife. The sections (1 µm) were stained with a 0.05% toluidine-blue/borax solution and examined with a Leitz DM RBE light microscope. When an appropriate cross-sectional profile was identified the surface was polished by cutting a few ultrathin sections.

In the inner sphere of the IR receptors of *M. acuminata*, the intermediate layer consisting of mesocuticle ("IR Mes") as well as the lamellated exocuticular shell ("IR Exo") were probed (cf. Figure 3.4.1 c). As a reference, exocuticle and mesocuticle from the cuticle surrounding the IR pit organ were tested (called "Ref Exo" and "Ref Mes", respectively). Hair mechanoreceptors were not tested in *M. acuminata* as the cuticular structures of the basal region turned out to be too small for systematic probing.

In the inner sphere of the IR receptors of *A. albicornis*, the mesocuticle inside the central fluidic core (here called "IR Mes") as well as the exocuticle of the shell ("IR Exo") was probed (cf. Figure 3.4.1 d). As a reference, standard exocuticle and mesocuticle of the propleural region was tested (called "Ref Exo" and "Ref Mes", respectively). Inside the bollard-shaped hair mechanoreceptors of *A. albicornis*, we probed the mesocuticle in the distal region (called "Mec Mes"), corresponding to the position of the inner sphere in the IR receptors (see inset in Figure 3.4.1 d).

3.4.2.4 SPM/Nanoindentation

High resolution SPM-imaging was carried out in contact mode using an Atomic Force Microscope (Dimension 3100; Digital Instruments). The scanner head was equipped with a tip holder appropriate for scanning in fluid, allowing the scanning of specimens in air and in A. dest.. Mechanical tests were conducted in ambient air and in A. dest. in a nanomechanical test system capable of normal loading as well as *in situ* SPM (TriboScope; Hysitron, Minneapolis, USA). Indentation tests were performed by using a three-sided Berkovich diamond tip with a total included angle of 142.3° which is suitable for measurements in fluid. A proper area function was established by indenting in a PMMA test specimen with known hardness and modulus. Contact depths ranged from 130 to 400 nm. The maximum load during indentation was 200 µN with loading and unloading rates of 20 µN/s, and a 10 s holding time at peak load to compensate for material creeping and to make sure that most of the plastic deformation was completed. To avoid interference the space between adjacent impressions were always greater than 2 µm. Hardness (H) and reduced Young's modulus (E_r) both were calculated from the unloading portions of the load-displacement curves following established procedures (Oliver and Pharr 1992; Bhushan and Li 2003; Müller et al. 2008). To obtain data from cuticle that is fully saturated with water, we carried out mechanical testing in water for up to 150 minutes (Klocke and Schmitz 2011).

3.4.2.5 Statistics

Data obtained from the different kinds of cuticle were grouped into material classes. Means and corresponding standard deviations of H and E_r of each class were calculated. The data were analysed using the Mann-Whitney-test (Mann and Whitney 1947). Mean values were regarded as significantly different at $P < 0.05$.

3.4.3 Results

3.4.3.1 Mechanical properties of IR sensilla and adjoining reference cuticle

As depicted in Figure 3.4.1 c and d, two cuticular components which build up the internal sphere are supposed to be crucial for the thermo-/mechanical action of a photomechanic IR sensillum: the outer exocuticular shell of the sphere (IR Exo) and the mesocuticle inside the microfluidic core of the sensillum (IR Mes). Thus moduli were measured in these layers within cross sections through IR sensilla. For reasons of comparison we also measured modulus and hardness of exo- and mesocuticle of adjoining "normal" cuticle and of the mesocuticle inside bollard-shaped mechanoreceptors on the propleural region in *Aradus albicornis* (Figure 3.4.1 c,d).

3.4.3.2 Modulus

Data measured under dry and rewetted conditions in *Melanophila* and *Aradus* are given in Figure 3.4.2 a. For reasons of clarity, the results of statistical testing for significant differences between the different cuticular layers are provided in Table 3.4.1.

At a first glance, it became obvious that moduli of all types of cuticle always are significantly lower in *Aradus* than in *Melanophila* whereas the relative differences between the different cuticular layers within one species are comparable.

Under dry conditions means of the moduli of IR Exo and Ref Exo in *Melanophila* were about 10.5 GPa; no significant difference was detectable. With a mean of 14.5 GPa the modulus of the reference mesocuticle (Ref Mes) was significantly higher whereas the modulus of IR Mes showed by far the lowest value (mean 5.8 GPa). Under rewetted conditions, all moduli decreased significantly. A moderate decrease by factors between 2.2 to 2.7 was measured in IR Exo, Ref Exo and Ref Mes, whereas the modulus of IR Mes decreased by a factor of 11.6 (i.e. more than a 90% reduction in modulus was caused by the water). In addition, under rewetted conditions, the modulus of IR Exo (mean 4.8 GPa) was slightly but significantly higher than the modulus of Ref Exo (mean 3.9 GPa).

In *Aradus*, IR Exo, Ref Exo, and Mec Mes all showed a mean modulus around 6.7 GPa under dry conditions; no significant differences could be detected. Like in *Melanophila*, Ref Mes had a significantly higher mean of 8.9 GPa and the lowest mean of 4.3 GPa was measured in IR Mes which was significant different from all other layers. Rewetting resulted in significant lower moduli in all layers. Now the moduli of IR Exo, Ref Exo, and – in contrast to the dry condition – Ref Mes had a mean modulus between 2.8 to 3.0 GPa (no significant difference detectable). This corresponded to a decrease by factors between 2.2 to 3 compared to the dry condition. In comparison to the means of the other layers the mean of Mec Mes remained significantly higher at 4.2 GPa (corresponding to a decrease by a factor of only 1.6). As in *Melanophila* the lowest modulus was measured in IR Mes (mean of 1.3 GPa) corresponding to a loss in modulus by a factor of 3.3 compared to the dry condition (thus a 70% decrease was caused by adding water).

Ergebnisse

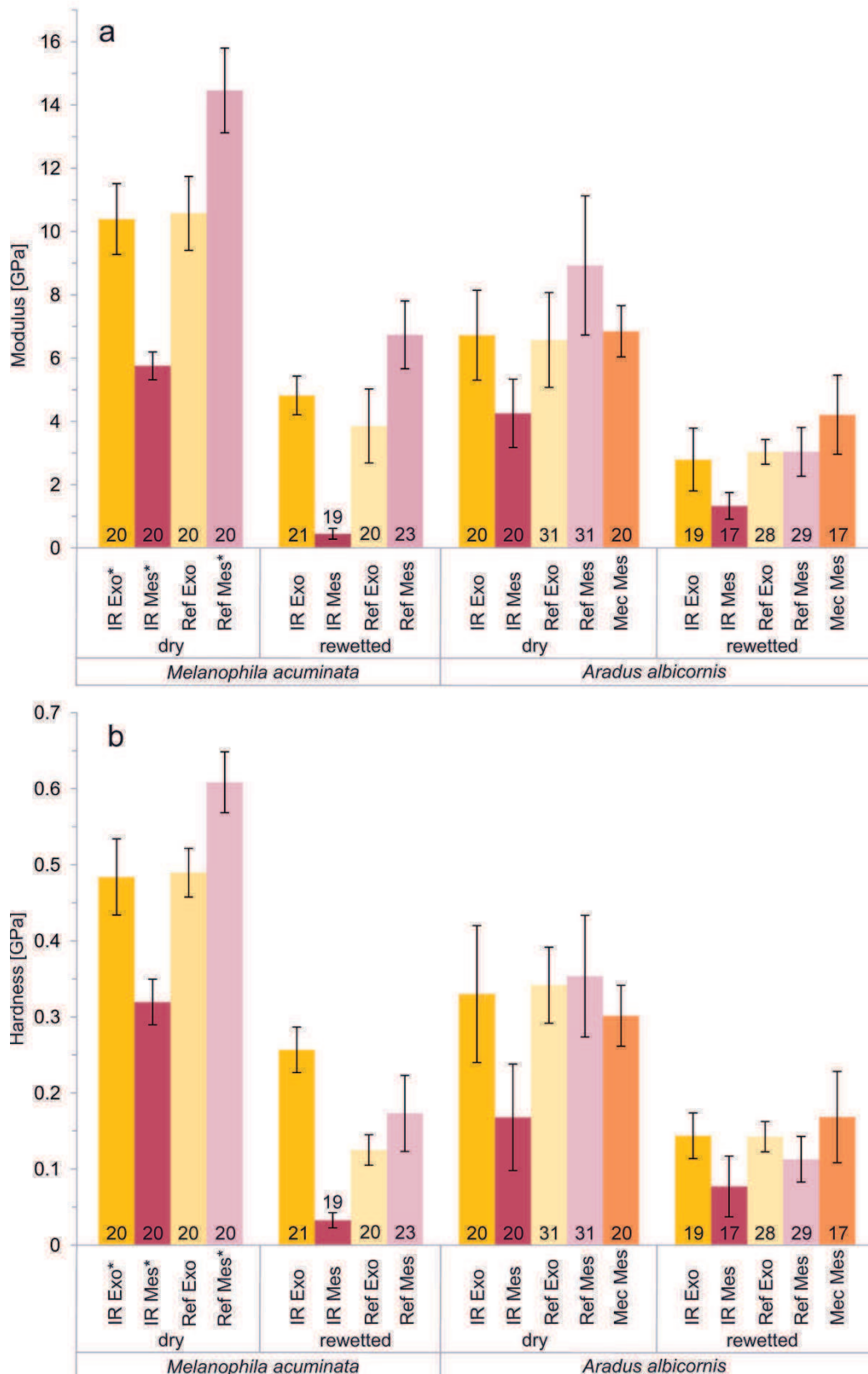


Figure 3.4.2 Modulus (a) and hardness (b) of different types of cuticle in *M. acuminata* and *A. albicornis* under dry and rewetted conditions (for details see “Material and Methods” section). Numbers of indentations (n) used for calculation of means and standard deviations (indicated by vertical lines) are given at the bottom of the bars. Data marked with asterisks have been published in Klocke et al. (2011).

Ergebnisse

Table 3.4.1 Mann-Whitney-test for hardness and modulus of the different types of cuticles showing significant differences (+) or not (-). Significance level was set at $P < 0.05$. Upper right corner for significance testing of hardness, lower left corner for modulus.

| | | <i>M. acuminata</i> | | | | | | | | <i>A. albicornis</i> | | | | | | | | Hardness | | |
|----------------------|----------|---------------------|--------|---------|---------|----------|--------|---------|---------|----------------------|--------|---------|---------|----------|--------|--------|---------|----------|---------|---------|
| | | Dry | | | | Rewetted | | | | Dry | | | | Rewetted | | | | | | |
| | | IR Exo | IR Mes | Ref Exo | Ref Mes | IR Exo | IR Mes | Ref Exo | Ref Mes | IR Exo | IR Mes | Ref Exo | Ref Mes | Mec Mes | IR Exo | IR Mes | Ref Exo | | Ref Mes | Mec Mes |
| <i>M. acuminata</i> | Dry | IR Exo | | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | IR Mes | + | | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + |
| | | Ref Exo | - | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | Ref Mes | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Rewetted | IR Exo | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | IR Mes | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | Ref Exo | + | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| | | Ref Mes | + | + | + | + | + | + | + | | + | - | + | + | + | - | + | + | + | - |
| <i>A. albicornis</i> | Dry | IR Exo | + | + | + | + | + | + | + | - | | + | - | - | - | + | + | + | + | + |
| | | IR Mes | + | + | + | + | - | + | - | + | + | | + | + | + | - | + | - | + | - |
| | | Ref Exo | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | | - | + | + | + | + | + | + |
| | | Ref Mes | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | + | + | + | + | + |
| | | Mec Mes | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | + | | + | + | + | + | + |
| | Rewetted | IR Exo | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | - | + | - |
| | | IR Mes | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | + | + | + |
| | | Ref Exo | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | | + | - |
| | | Ref Mes | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | | + |
| | | Mec Mes | + | + | + | + | - | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | |

Modulus

3.4.3.3 Hardness

Data for hardness are provided in Figure 3.4.2 b. As for the moduli results of statistical testing are provided in Table 3.4.1. Considering the relative differences between respective cuticular layers in both species, the same ratios as observed for the moduli have been found.

Under dry conditions hardness of IR Exo and Ref Exo in *Melanophila* are only insignificantly different from each other (means 0.48 and 0.49 GPa, respectively). Ref Meso showed the highest hardness which is significantly different from the hardness of all other layers (mean 0.61 GPa) and IR Meso had the lowest hardness (mean 0.32 GPa; also significantly different from all other layers). Under rewetted conditions hardness significantly decreased in all lay-

Ergebnisse

ers. The smallest decrease was measured in IR Exo; here, hardness decreased by a factor of 1.8 to a mean of 0.26 GPa. Hardness of Ref Exo and Ref Meso both decreased by a factor of about 3.6 to 0.13 and 0.17 GPa respectively (mean values). The largest loss was measured in IR Mes. In IR Mes hardness decreased by a factor of 10.6 to a mean of 0.03 GPa which means that addition of water caused a 90% decrease in hardness in this layer. In the rewetted stage, hardness of IR Exo is twice as high as hardness of Ref Exo.

In *Aradus*, under dry conditions, mean hardness of IR Exo, Ref Exo, and Ref Mes were in the range between 0.33 to 0.35 GPa without significant differences. Hardness of Mec Mes was slightly but significantly lower (mean of 0.3 GPa) and the lowest hardness was measured in IR Mes (mean 0.17 GPa) which was significantly lower compared to the other layers. Rewetting significantly decreased the hardness in all layers. The lowest loss in hardness was measured in Mec Mes where hardness decreased by a factor of 1.8 to a mean of 0.17 GPa (significantly different from hardness of all other rewetted layers). Hardness of IR Exo and Ref Exo both decreased by a factor of about 2.3 to a mean of 0.14 GPa. Hardness of Ref Mes decreased by a factor of 3.2 to a mean 0.11 GPa. However, this is not significantly different from IR Exo and Ref Exo. The lowest hardness was measured in IR Mes (mean 0.08) which corresponds to a decrease in hardness by a factor of 2.1 which is significantly different from all other layers.

3.4.3.4 Influence of water on the cuticle of the IR sensilla

Addition of water changes the surface profile of IR sensilla which were cut open in the middle. If water was added to dried specimens of IR sensilla of *Melanophila* and *Aradus*, especially the region consisting of mesocuticle showed a pronounced swelling behaviour (Figure 3.4.3).

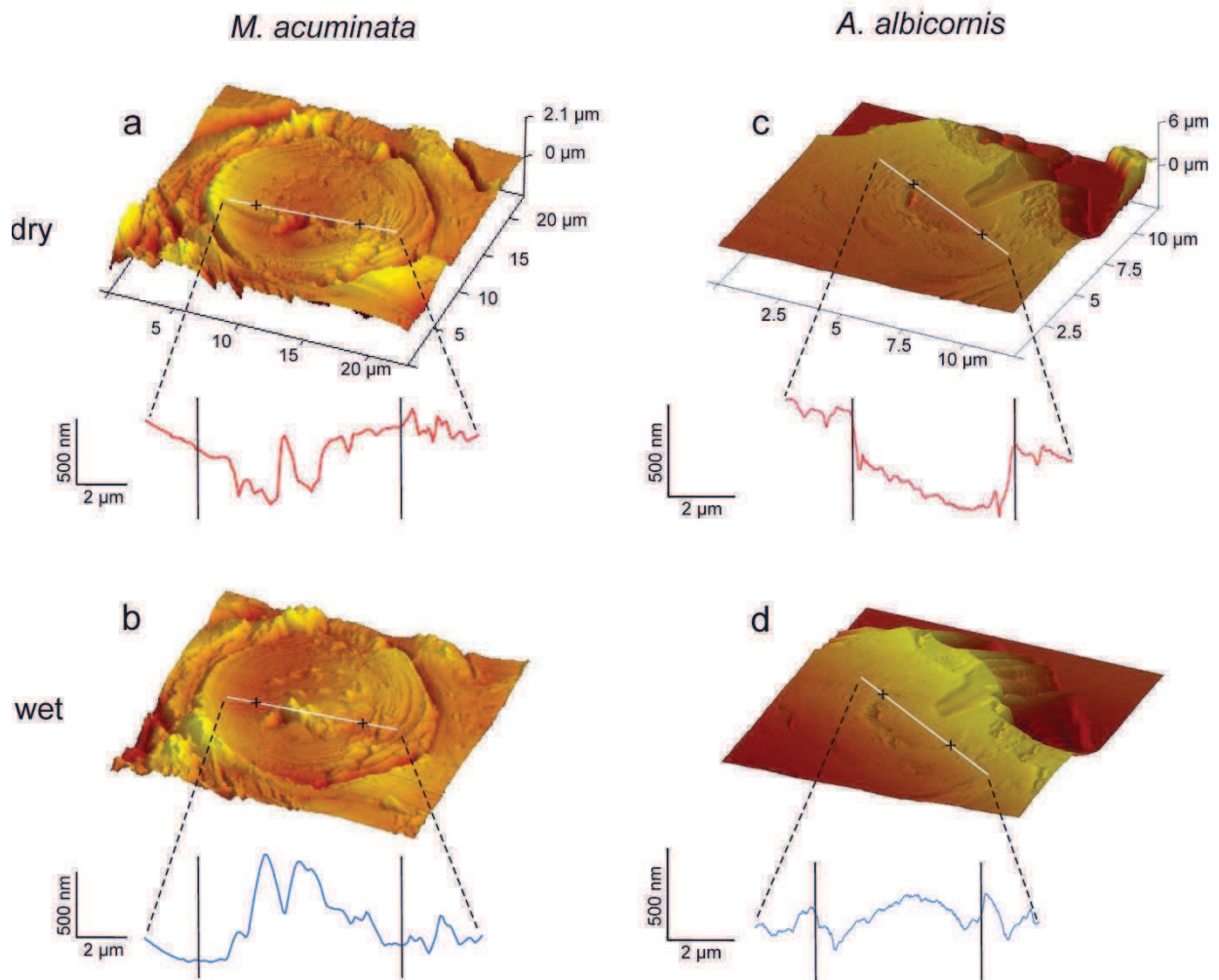


Figure 3.4.3 Topography SPM-Scans of IR receptors of *M. acuminata* (a,b) and *A. albicornis* (c,d) depicted in 3D surface plots. The upper images originate from scans of dried samples, the lower from samples that were scanned in water. Coloured curves below each image show the topography along a section (white line) through the receptor. Within each section, the inner mesocuticle is framed in both the white line (black crosses) and the corresponding topography curve (vertical black lines).

3.4.4 Discussion

3.4.4.1 Characteristics of the cuticle inside photomechanic IR sensilla

In dried sensilla of both pyrophilous species the mechanical properties of the exocuticle of the outer shell of the sphere (IR Exo) are not significantly different from the respective reference exocuticle. However, modulus and hardness are significantly lower in *Aradus*. In the *Melanophila* sensillum modulus and hardness are comparable to results also obtained by nanoindentation by Müller et al. 2008. In a comparable approach a modulus of 8 GPa and a hardness of 0.51 GPa was measured in the dried exocuticular shell of a *Melanophila* sensillum (Müller et al. 2008). Because in that study standard deviations were considerably larger

Ergebnisse

than in our study, results are comparable. Much lower moduli of only 3 GPa were measured in an older study where moduli were measured by SPM (Hazel et al. 2001). However, indentation depths of only 10 - 20 nm were achieved. Therefore we assume that moduli were considerably underestimated.

In our present study we measured the mechanical properties of the cuticular apparatus of photomechanic IR sensilla for the first time also in fluid which is much closer to the natural situation. Results clearly show that water has a major impact on modulus and hardness as it had been shown for the sternal cuticle in locusts (Klocke and Schmitz 2011). Nearly all measured values were at least halved in both species. While in *Aradus* modulus and hardness of the rewetted exocuticular shell of an IR sensillum and of the reference exocuticle are still only insignificantly different from each other, the exocuticle of the outer shell of the *Melanophila* sensillum turned out to be 20 % stiffer and 50% harder than the reference exocuticle. This can be interpreted as a specialization of the exocuticular shell of a *Melanophila* sensillum.

A strikingly higher level of specialization was found in the mesocuticle. Under dry conditions, the mesocuticle inside the core of the IR sensilla in *Melanophila* and *Aradus* already showed a much lower modulus and hardness than the reference mesocuticle, the exocuticle and – as measured in *Aradus* – the mesocuticle inside a mechanoreceptor. In the preceding paper of Müller et al. even a lower modulus of 4.5 GPa has been measured for IR Mes in the *Melanophila* sensillum. In this respect it has to be stressed that under dry conditions moduli and hardness of the reference mesocuticle are higher in both species than modulus and hardness of the exocuticle. However, values for the mesocuticle inside the IR sensilla are also significantly lower than the values for IR Exo and Ref Exo.

The relative differences again dramatically changed when water was added. Under rewetted conditions modulus and hardness of the mesocuticle inside the IR sensilla strongly decreased: the modulus by 90% in *Melanophila* and by 70% in *Aradus*; the hardness also by 90% in *Melanophila* and by 50% in *Aradus*. Now modulus and hardness of IR Mes exhibited by far the lowest values of all types of cuticle investigated. Because the standard deviations are not larger than in the other types of cuticle, it can be excluded that measurements were distorted because some indentations were made (at least partly) into microcavities which can be found in the mesocuticular core of an IR sensillum (cf. Figure 3.4.1 c,d).

Under rewetted and, therefore, quasi-natural conditions it became clear that the mechanical properties of the exocuticular shell of an IR sensillum of *Melanophila* and especially of the mesocuticular core (IR Mes) in both species differ from the “normal” surrounding cuticle. Ad-

ditionally, the pronounced swelling capability of IR Mes can also be interpreted as special feature indicating an increased water uptake capacity (cf. Figure 3.4.3).

3.4.4.2 Functional significance of the mechanical properties for sensillum performance

The photomechanic model of the function of the IR receptors in *Melanophila* beetles and *Aradus* bugs implies that IR radiation initially is absorbed by the entire cuticular apparatus (i. e. the small sphere). Absorption by the cuticle and most probably also by the fluid inside the mesocuticular core of the sensillum causes thermal expansion. However, expansion is quite different in the different components. It has been suggested that the outer exocuticular shell of the sphere shows by far the lowest coefficient of thermal expansion. This has been postulated because the shell consists of sclerotized (i.e. hard and stiff) exocuticle which is reinforced by many layers of chitin fibres which show a very high modulus of about 150 GPa (Vincent and Wegst 2004). On the other hand the softer mesocuticle inside the core should reveal a higher coefficient of thermal expansion. Finally, the fluid inside the microcavities of the core has the highest coefficient. The only compliant structure inside the sphere is the outermost tip of the mechanosensitive dendrite (cf. Figure 3.4.1 c,d). The dendrite is located in an inner pressure chamber and, thus, a decrease in internal pressure can be achieved by a slight cross-compression of the dendritic membrane (Schmitz et al. 2007; Müller et al. 2008; Schmitz et al. 2008).

The results of our study strongly support this model. Under rewetted conditions in the *Melanophila* sensillum the outer shell of the sphere is significantly stiffer and harder than the reference exocuticle. This is in consistence with a role of the outer shell as a quasi isochoric “pressure chamber” focussing thermal expansion to the tip of the dendrite. In contrast, in the rewetted *Aradus* sensillum modulus and hardness are not higher than those of the reference cuticle. Because there is some evidence that the *Melanophila* sensillum has a higher sensitivity than the *Aradus* sensillum (Evans 1966; Schmitz and Bleckmann 1998) results are in accordance with the expectations that the *Melanophila* sensillum should show a higher grade of specialization. A look at the mechanical properties of the mesocuticle inside the core of the IR sensilla conclusively reveals that modulus and hardness are obviously adapted to provide a high coefficient of thermal expansion. A correlation between modulus and the coefficient of thermal expansion has been found in a variety of solid materials and a linear log-log inverse relation has been described between these material properties in many materials (Barker 1963; Arenz 2005). Thus, we propose that especially the relatively low modulus of IR Mes in the water saturated sensilla accounts for a considerable increase of the coefficient of thermal expansion.

Ergebnisse

On the other hand, modulus and hardness of the mesocuticle inside the rewetted bollard-like hair mechanoreceptors (Mec Mes) of *Aradus* remain on a significantly higher level compared to the reference mesocuticle and especially to IR Mes. This is in accordance with the function of the contact mechanoreceptor where the base should provide a rigid fixture for the moveable bristle.

3.4.5 Conclusions

Photomechanic IR sensilla have been discovered in jewel beetles of the genus *Melanophila* (Vondran et al. 1995; Schmitz and Bleckmann 1998) and in some pyrophilous species of the flat bug (Aradidae) genus *Aradus* (Schmitz et al. 2008; Schmitz et al. 2010). When IR radiation is absorbed by these spherical sensilla a micromechanical action inside a tiny cuticular spherule is induced which causes a cross-compression of the dendrite tip of a ciliary mechanoreceptor (Vondran et al. 1995; Schmitz et al. 1997). The results of our study show that the mechanical properties of the different cuticular components of photomechanic IR sensilla are adapted on the one hand to minimize the coefficient of thermal expansion of the outer exocuticular shell of the sphere (as shown for IR Exo in the *Melanophila* sensillum) and on the other hand to enhance thermal expansion of the fluidic core of the sensillum. By both mechanisms the mechanical impact on the dendritic tip of the mechanoreceptor is increased. Most probably, the crucial parameter which determines the mechanical properties of the different cuticular layers in all kinds of cuticle examined is the water content as shown recently in the sternal cuticle of the locust (Klocke and Schmitz 2011).

Acknowledgements

We are indebted to Horst Bleckmann for his continuous interest in our work and for providing lab space. Supported by grants from BMBF (Grant No. 01RB0909A) and the German Science Foundation (DFG) through Graduate Program GRK 1572.

4 Diskussion

Nachfolgend werden die Morphologie und die mechanischen Eigenschaften der IR-Rezeptoren von *M. acuminata* und *A. albicornis* hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Translationsprozess bei der IR-Detektion diskutiert. Darauf basierend werden Empfehlungen zur zukünftigen Entwicklung ungekühlter technischer IR-Sensoren gegeben.

4.1 Funktionsmorphologie photomechanischer IR-Rezeptoren

4.1.1 Methodik: TEM-basierte 3D-Rekonstruktion

In dieser Arbeit wurde eine maßstabsgetreue dreidimensionale Rekonstruktion der inneren Kugel des IR-Rezeptors von *M. acuminata* hergestellt. Während 3D-Rekonstruktionen anhand von Schnittserien normalerweise mit lichtmikroskopischen Aufnahmen von Semidünnschnitten hergestellt werden, handelt es sich hierbei um die erste Rekonstruktion eines IR-Rezeptors von *M. acuminata*, die auf TEM-Aufnahmen von Ultradünnschnitten basiert. Der entscheidende Vorteil hierbei ist, dass in der Richtung senkrecht zur Schnittebene (Bildebene) eine Auflösung von ca. 100 nm erreicht wird, was der Dicke eines Ultradünnschnittes entspricht. In den beiden anderen Raumrichtungen ist die Auflösung deutlich höher (hier ca. 15 nm). Eine hohe Auflösung ist bei der Rekonstruktion des *Melanophila*-Rezeptors unabdingbar, zum einen aufgrund seiner Miniaturisierung, zum anderen um auch die sehr kleinen ($\ll 1 \mu\text{m}$) fluidgefüllten Mikrokanäle innerhalb des mikrofluidischen Zentrums erfassen zu können.

Ein Teil der fluidgefüllten Kavitäten der Rekonstruktion des IR-Rezeptors von *M. acuminata* liegen nicht als durchgängige Kanäle, sondern, insbesondere im distalen Bereich, fragmentiert vor. Eine mögliche methodische Ursache ist die unterschiedliche Ausdehnung, die die Ultradünnschnitte durch Bestrahlung im TEM zeigen. Eine weitere mögliche Ursache sind Scherkräfte, die beim Schneiden auf die Probe wirken und diese Stauchen. Hierdurch kann es zu Verzerrungen der abzubildenden Strukturen kommen. Möglicherweise kann dadurch die Kontinuität der Kavitäten nicht von Schnitt zu Schnitt nachverfolgt werden, was zur teilweise fragmentierten Darstellung der Fluidkanäle führen könnte.

4.1.2 Miniaturisierung des IR-Rezeptors als Anpassung an den Stimulus

Eine auf den ersten Blick nicht direkt interpretierbare Eigenschaft der IR-Rezeptoren, sowohl von *M. acuminata* als auch *A. albicornis*, ist ihre geringe Größe (1.3). Jedoch ist darin möglicherweise eine wichtige Anpassung an den adäquaten Reiz zu sehen.

Diskussion

Durch Bestrahlung eines gereinigten und getrockneten Infrarotorgans von *M. acuminata* mit einem Infrarotlaser bestimmten Vondran et al. die Transmission durch das IR-Organ (Vondran et al. 1995). Über die Dicke der Kutikula im Bereich des IR-Organs lässt sich der Absorptionskoeffizient a für den relevanten Wellenlängenbereich (3-5 μm , atmosphärisches Fenster nahe dem Emissionsmaximum eines Walbrandes (Evans 1966)) als $a=0,065 \mu\text{m}^{-1}$ abschätzen (Berechnung im Anhang 8.4). Hieraus ergibt sich bei einer Eindringtiefe von ca. 15 μm , das entspricht in etwa der Distanz zwischen der Kutikulaoberfläche und der Basis der inneren Kugel, eine Abschwächung auf etwa 37% des Ausgangswertes. Demnach absorbieren die dünne Kutikula-Kuppel, die dünne Schicht aus Hüllzellen und die innere Kugel des *Melanophila*-Rezeptors bereits den größten Teil der Strahlungsenergie. Zu bedenken ist, dass bei der zugrundeliegenden Transmissionsmessung getrocknete Präparate verwendet wurden. Da Wasser einen relativ hohen Absorptionskoeffizienten besitzt ($a=0,114 \mu\text{m}^{-1}$) (Table 3.2.1), ist die Absorption im nativen System vermutlich höher und damit die Eindringtiefe für IR-Strahlung noch geringer.

Zwar bestehen strukturelle Unterschiede zwischen den IR-Rezeptoren bei *M. acuminata* und *A. albicornis* (1.3), jedoch sind sie ähnlich dimensioniert. Daher sollten in *A. albicornis* die gleichen physikalischen Effekte auftreten, wie sie hier für *M. acuminata* diskutiert wurden. Die Miniaturisierung der IR-Rezeptoren ermöglicht demnach in beiden Arten eine relativ hohe Strahlungsintensität in der Kutikula der inneren Kugel. In der ähnlichen Dimensionierung der unabhängig voneinander entwickelten IR-Rezeptoren der beiden Arten kann demnach eine Anpassung an den adäquaten Reiz (elektromagnetische Strahlung mit geringen Eindringtiefen in Kutikula) gesehen werden.

4.1.3 Anordnung und Funktion der Fluidkanäle

Das auffälligste Merkmal der Geometrie des IR-Rezeptors bei *M. acuminata* stellt die kelchförmige Anordnung der Fluidkanäle dar. Distal der Druckkammer bilden die feinen Mikrokanäle ein dichtes Geflecht im seitlich-peripheren Bereich der Mesokutikula der inneren Kugel. Die Intensität der Strahlung nimmt mit zunehmender Schichtdicke des absorbierenden Materials näherungsweise exponentiell ab (Demtröder 2008). Die Intensität der einfallenden IR-Strahlung ist daher im distalen Bereich und in der seitlichen Peripherie des mikrofluidischen Zentrums vermutlich deutlich höher als im Zentrum der Kugel oder an seiner Basis. Folglich wird in der seitlichen Peripherie und im distalen Bereich durch Absorption mehr Energie in Form von Wärme frei. Zudem wird vermutlich auch Wärme aus der umgebenden und ebenfalls absorbierenden Exokutikula an den peripheren Bereich des mikrofluidischen Zentrums abgegeben. Dies alles führt bei Absorption von IR-Strahlung vermutlich zur schnellen Erwärmung des peripheren Bereichs des mesokutikularen Kerns und des Fluids.

Diskussion

Die Verbindung der Druckkammer mit der Peripherie des mesokutikularen Kerns über Fluidkanäle deutet stark darauf hin, dass das Fluid als Hydraulikflüssigkeit wirkt. Der durch die Ausdehnung der Mesokutikula und des Fluids selbst erzeugte Druck wird höchstwahrscheinlich hydraulisch auf die nachgiebige Dendritenmembran übertragen (Schmitz et al. 2007). Gegenüber einer Druckübertragung durch reine Verformung massiver Mesokutikula wird die auftretende Reibung während der Translation stark vermindert. Hierdurch wird die Übertragung des Druckes vermutlich schneller und effizienter. Somit steigert diese auf minimalen Fluidmengen basierende Hydraulik des mikrofluidischen Zentrums die Reaktionsgeschwindigkeit und Empfindlichkeit des Rezeptors.

In 4.1.1 wurde eine mögliche methodische Ursache für das Auftreten fragmentierter fluidgefüllter Kavitäten diskutiert. Es ist jedoch auch denkbar, dass es sich hierbei nicht um ein Artefakt handelt, sondern im distalen Bereich der inneren Kugel tatsächlich kleine Fluidkavitäten isoliert voneinander vorliegen. Die Mesokutikula weist im lebenden Tier vermutlich einen hohen Wassergehalt auf (4.5). Da Wasser praktisch inkompressibel ist (Kittel 2005), ergibt sich hierdurch für die Mesokutikula höchstwahrscheinlich ebenfalls eine nur geringe Kompressibilität. Somit fungiert das mikrofluidische Zentrum aufgrund der umgebenden, harten Exokutikula als ein geschlossener Druckkörper mit nahezu gleichbleibendem Volumen. Der in isolierten Fluidkavitäten erzeugte Druck würde demnach sowohl über die Verformung der Mesokutikula (bei konstantem Volumen) als auch hydraulisch über zusammenhängende Fluidkanäle auf die nachgiebige Plasmamembran der Dendritenspitze wirken.

Die fluidgefüllten Kavitäten (inklusive der Druckkammer) haben bei *M. acuminata* insgesamt ein Volumen von $36 \mu\text{m}^3$ und machen somit nur ca. 2% des Gesamtvolumens der inneren Kugel aus. Die fluidgefüllten Kavitäten erreichen durch ihre Verzweigungen distal der Druckkammer eine Grenzfläche zur umgebenden Mesokutikula von $972 \mu\text{m}^2$. Nimmt man eine Kugel mit demselben Volumen von $36 \mu\text{m}^3$ an, so hat diese eine Oberfläche von nur $52 \mu\text{m}^2$. Dieser Vergleich verdeutlicht, dass durch die feine Verästelung der Mikrokanäle eine extrem große Grenzfläche zwischen Fluid und Mesokutikula erreicht wird.

Eine relativ große Grenzfläche sollte die Wärmeleitung von Mesokutikula in das Fluid erleichtern, was vermutlich in einer schnelleren Erwärmung des Fluids resultiert. Setzt man voraus, dass das Fluid einen höheren thermischen Ausdehnungskoeffizienten besitzt als die umgebende Mesokutikula (4.2), geht damit ein schneller Druckanstieg innerhalb des mikrofluidischen Zentrums einher.

4.2 Zusammensetzung und Eigenschaften des Fluids

Das Fluid des mikrofluidischen Zentrums lässt sich zu einem großen Anteil durch einfache Lufttrocknung der IR-Rezeptoren entfernen (Figure 3.4.3). Es ist anzunehmen, dass ein Grundbestandteil des Fluids Wasser ist. Wasser mag sich gut als hydraulische Flüssigkeit

Diskussion

eigenen (siehe 4.1.3). Allerdings sollte man für eine effiziente Umsetzung absorbierter IR-Strahlung in einen Druckanstieg, einen hohen thermischen Ausdehnungskoeffizienten, nicht nur der umgebenden Kutikula, sondern auch des Fluids selbst erwarten. Der räumliche Ausdehnungskoeffizient von Wasser liegt mit einem Wert von $0,21 \cdot 10^{-3} \text{K}^{-1}$ um ein Vielfaches niedriger als der von organischen Flüssigkeiten (Lyde 2004). Eine größere thermische Ausdehnung des Fluids kann demnach nur durch Einlagerung weiterer Substanzen in die fluidgefüllten Kavitäten erreicht werden. Tatsächlich wurde bei Topographieaufnahmen angeschnittener IR-Rezeptoren von *M. acuminata* unter Wasser eine gallertige Substanz nachgewiesen, die aus den angeschnittenen Kavitäten des mikrofluidischen Zentrums herausquoll (Figure 3.4.3). Diese Substanz war zuvor bei Aufnahmen derselben Rezeptoren im getrockneten Zustand nicht abgebildet worden. Damit ist erstmals nachgewiesen, dass die Kavitäten der IR-Rezeptoren von *M. acuminata* eine quellfähige Substanz enthalten. Die elementare Zusammensetzung dieser Substanz wurde daraufhin per energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) an getrockneten Proben untersucht. Es zeigten sich keinerlei Auffälligkeiten der elementaren Zusammensetzung gegenüber der umgebenden Mesokutikula des mikrofluidischen Zentrums (Anhang 8.5). Somit ist gezeigt, dass das Fluid, zumindest bei *M. acuminata*, nur organische Verbindungen enthält. Vermutlich wird die thermische Ausdehnung des Fluids durch Einlagerung dieser Substanz gesteigert. Das Fluid würde sich hierdurch bei Erwärmung relativ stark ausdehnen. Bei Absorption von IR-Strahlung würde somit ein Druckanstieg im mikrofluidischen Zentrum schnell und effektiv generiert.

Möglicherweise beeinflussen die eingelagerten organischen Verbindungen auch das Absorptionsverhalten des Fluids gegenüber IR-Strahlung. Letztere regt bestimmte Übergänge zwischen Schwingungs- und Rotationszuständen innerhalb von Molekülen an. Diese Übergänge können wiederum entsprechenden Bereichen des IR-Spektrums zugeordnet werden (Silverstein and Bassler 1963). Durch EDX konnten sowohl in der getrockneten quellfähigen Substanz als auch in der Mesokutikula des mikrofluidischen Zentrums die Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff nachgewiesen werden (Anhang 8.5). Es ist stark anzunehmen, dass auch Wasserstoff in beiden Proben vorhanden ist. Wasserstoff kann jedoch grundsätzlich nicht durch EDX nachgewiesen werden. Die Bindungen zwischen diesen Elementen liegen mit ihren Absorptions-Peaks im Wellenlängenbereich elektromagnetischer Strahlung zwischen 2,8 und 6 μm (Silverstein and Bassler 1963), während Wasser relativ schmalbandig um 3 μm absorbiert. Somit verstärken organische Verbindungen im Fluid des IR-Rezeptors möglicherweise nicht nur die räumliche Ausdehnung des Fluids bei Temperaturzunahme, sondern erweitern auch das Absorptionsspektrum des Fluids gegenüber Infrarotstrahlung auf den relevanten Bereich des atmosphärischen Fensters (3-5 μm) und darüber hinaus. Eine starke Absorption des Fluids im relevanten Wellenlängenbereich führt zu

schneller Erwärmung und Ausdehnung desselben und somit zu einem schnellen Druckanstieg im mikrofluidischen Zentrum.

4.3 Methodik: Mechanische Charakterisierung rehydrierter Kutikula

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass der Wassergehalt die mechanischen Eigenschaften von Insektenkutikula beeinflusst (Reynolds 1975; Vincent 1990; Andersen 1996; Vincent 2004; Vincent 2009). In allen bisherigen Studien wurden die Kutikulapräparate in Luft untersucht. Es wurden entweder frisch präparierte Kutikulaproben getestet (Enders et al. 2004; Barbakadze et al. 2006), oder die Proben wurden getrocknet, danach rehydriert und nach dem Entfernen des Wassers in Luft untersucht (Schöberl and Jäger 2006; Cribb et al. 2010). Da bei mechanischen Tests stets eine gewisse Anzahl von Messwerten nötig ist, wird die Probenoberfläche über mehrere Minuten der Raumluft ausgesetzt. Dabei kann permanent Wasser aus der Probenoberfläche verdunsten. Hierdurch werden die Messergebnisse innerhalb weniger Minuten massiv modifiziert, was in dieser Arbeit durch zyklisches Trocknen und Rehydrieren von Endokutikula von *L. migratoria* demonstriert wurde (Figure 3.3.4). Folglich können sich aufgrund der zunehmenden Austrocknung der Probenoberfläche die Materialeigenschaften während einer Messreihe in kürzester Zeit stark ändern (Schöberl and Jäger 2006). Zudem werden die Materialeigenschaften tendenziell falsch eingeschätzt (z.B. Härte und E-Modul überschätzt). Beide Effekte treten insbesondere bei Nanoindentationsexperimenten auf, da hier häufig Indentationstiefen von nur einigen hundert Nanometern vorkommen und Probenmaterialien bis zu dieser Tiefe entsprechend schnell austrocknen.

In dieser Arbeit wurden alle Proben sowohl getrocknet in Luft als auch rehydriert in Wasser getestet. Hierbei wird, den Wassergehalt betreffend, in zwei extremen Situationen gemessen. Es ist anzunehmen, dass die Materialeigenschaften im lebenden Tier zwischen den hier für beide Situationen ermittelten Werten liegen. Da im lebenden Tier die Kutikula auch hydriert vorkommt, ist anzunehmen, dass die Materialeigenschaften im lebenden Tier den in rehydrierter Kutikula ermittelten Werten sehr nahe kommen. Eine Veränderung der Wasseraufnahmekapazität der Kutikulaproben durch die vorherige Trocknung und eine damit verbundene Änderung der Materialeigenschaften in rehydrierten gegenüber frischen Proben konnte durch Kontrollversuche mit frisch eingebetteten Proben weitgehend ausgeschlossen werden (3.3.4, Figure 3.3.3 b,d). Durch die Messung in destilliertem Wasser können über mehrere Stunden unter gleichbleibenden und definierten Bedingungen die Proben systematisch getestet werden. So können Eindrücke mithilfe von Topographieaufnahmen exakt plat-

ziert werden, was die mechanische Charakterisierung von Kutikuladomänen mit einem Durchmesser von nur wenigen Mikrometern erlaubt.

4.4 Einfluss der Rehydrierung auf die Materialeigenschaften von Kutikula

4.4.1 Änderung der Materialeigenschaften einzelner Kutikulaschichten

Es konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass der Wassergehalt einen entscheidenden Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften von Insektenkutikula hat. Die Werte für Härte und E-Modul wurden unter dem Einfluss von Wasser zum Teil um ein Vielfaches vermindert (Figure 3.3.3, Figure 3.4.2). Auch wurde der Einfluss von Wasser auf die Materialeigenschaften einzelner kutikularer Schichten untersucht. In Nanoindentationsexperimenten an Kutikula der Sternalplatte von *L. migratoria* wurden bei getrockneten Proben relativ ähnliche Werte für E-Modul und Härte in den untersuchten Schichten gemessen. Im Gegensatz dazu war in den quasi-nativen Proben eine graduelle Zunahme des E-Moduls und der Härte von der innen gelegenen Endokutikula über die Mesokutikula zur außen gelegenen Exokutikula festzustellen, sowohl bei der Indentation senkrecht ("Normal-Indentation") als auch parallel zur Kutikulaoberfläche ("Transverse-Indentation") (Figure 3.3.3). Bei entsprechenden Experimenten an Referenz-Kutikula bei *M. acuminata* und *A. albicornis* änderten sich die Materialeigenschaften der einzelnen Schichten zwar stark unter dem Einfluss von Wasser; die für *L. migratoria* beschriebene graduelle Zunahme der Härte und des E-Moduls von der Meso- zur Exokutikula bei quasi-nativen Proben war aber nicht zu beobachten. Innerhalb der IR-Rezeptoren beider pyrophiler Arten jedoch zeigte jeweils die IR-Mesokutikula durch den Einfluss von Wasser eine deutlich stärkere Abnahme von Härte und E-Modul als die IR-Exokutikula (Figure 3.4.2). Insgesamt wurde damit auch gezeigt, dass sich die mechanischen Eigenschaften einzelner kutikularer Schichten unter dem Einfluss von Wasser unterschiedlich stark ändern. Unter anderem definiert also der Wassergehalt die mechanischen Eigenschaften dieser Schichten.

4.4.2 Rolle der Proteinmatrix

Dass der Wassergehalt insbesondere die mechanischen Eigenschaften der Proteinmatrix beeinflusst, wurde in dieser Arbeit unter anderem durch Anisotropie-Effekte demonstriert. So war die relative Änderung von Härte und E-Modul der Endo- und Mesokutikula bei *L. migratoria* unter dem Einfluss von Wasser bei der Normal-Indentation wesentlich größer als bei der Transverse-Indentation (Figure 3.3.5). Die Proteinmatrix wird durch die Wasseraufnahme weicher und elastischer. Härte und E-Modul werden dann stärker von den eingelagerten Chitinfasern dominiert, was am Einfluss der Indentationsrichtung relativ zur Faserausrichtung zu erkennen ist (Figure 3.3.5).

Diskussion

Sowohl beim Exoskelett von *L. migratoria* als auch innerhalb der untersuchten IR-Rezeptoren zeigt die stärker sklerotisierte Exokutikula eine relativ geringe Änderung ihrer mechanischen Eigenschaften unter dem Einfluss von Wasser (Figure 3.3.3, Figure 3.4.2). Im Vergleich nahmen E-Modul und Härte der schwächer sklerotisierten Meso- und Endokutikula durch die Rehydrierung wesentlich stärker ab. Auch wurde bei *L. migratoria* die weniger stark sklerotisierte Endokutikula in Wasser signifikant weicher und elastischer als die Mesokutikula. Eine Ausnahme ist hier der E-Modul bei Normal-Indentation, wo kein signifikanter Unterschied zwischen Meso- und Endokutikula festgestellt werden konnte. Trotzdem liegt auch hier der Mittelwert der Mesokutikula höher. Die Ergebnisse legen nahe, dass mit zunehmendem Grad der Sklerotisierung in den verschiedenen Schichten der Einfluss des Wassers auf die mechanischen Eigenschaften geringer wird. Dieser Effekt konnte auch von Müller aus vorangegangenen Studien abgeleitet werden (Müller 2008): Die Erhöhung der Werte für E-Modul und Härte durch Dehydrierung bei stark sklerotisierter Kutikula (Exokutikula) ist relativ klein gegenüber schwach sklerotisierter Kutikula (Endokutikula) (Hillerton et al. 1982; Barbakadze et al. 2006; Song et al. 2007). Höchstwahrscheinlich wirkt sich also der Grad der Sklerotisierung auf den Wassergehalt der Kutikula, und somit auf ihre mechanischen Eigenschaften im quasi-nativen bzw. im natürlichen Zustand aus.

In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der Wassergehalt mit zunehmendem Grad der Sklerotisierung abnimmt (Fraenkel and Rudall 1940; Vincent and Ablett 1987). So liegt bei stark sklerotisierter und damit harter und unelastischer Kutikula wie Exokutikula der Wassergehalt bei bis zu 12%, während er bei schwach sklerotisierter Kutikula (Endokutikula) 40-70% betragen kann (Vincent and Wegst 2004). Direkt lässt sich der Wassergehalt von Insektenkutikula, insbesondere für einzelne Kutikulaschichten, nur schwer bestimmen. Durch Topographieaufnahmen rehydrierter Proben wurde in dieser Arbeit jedoch gezeigt, dass die IR-Mesokutikula der IR-Rezeptoren von *M. acuminata* und *A. albicornis* gegenüber der umgebenden IR-Exokutikula stärker anschwillt (Figure 3.4.3 b,d). Dies deutet auf eine größere Wasseraufnahmekapazität der mesokutikularen gegenüber der exokutikularen Schicht hin. Somit ist anzunehmen, dass die IR-Mesokutikula auch im lebenden Tier deutlich mehr Wasser enthält als die umgebende IR-Exokutikula.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen das Konzept der kontrollierten Dehydrierung (Hillerton and Vincent 1979; Vincent and Ablett 1987). Demnach werden die mechanischen Eigenschaften nicht direkt durch die Sklerotisierung bestimmt, sondern hauptsächlich indirekt durch die Änderung des Wassergehaltes aufgrund der chemischen Modifikation der Kutikulaproteine (1.4).

4.5 Spezialisierte Kutikulatypen photomechanischer IR-Rezeptoren

Sowohl im getrockneten als auch im quasi-nativen Zustand ist die IR-Exokutikula der IR-Rezeptoren beider Arten deutlich härter und steifer als die IR-Mesokutikula. Bei quasi-nativen Proben von *M. acuminata* ist die IR-Exokutikula sogar steifer und härter als die Referenz-Exokutikula. Dies legt eine Funktion des exokutikularen Mantels als eine Art Druckgefäß nahe, das bei Druckzunahme innerhalb des mikrofluidischen Zentrums nur eine äußerst geringe Volumenzunahme erlaubt (1.3). Somit ist in den relativ hohen Werten für Härte und E-Modul eine Spezialisierung der IR-Exokutikula zu sehen.

Die IR-Mesokutikula der IR-Rezeptoren von *A. albicornis* und *M. acuminata* ist bereits im getrockneten Zustand weicher und elastischer als die sie ummantelnde IR-Exokutikula. Durch Rehydrierung nahmen Härte und E-Modul der IR-Mesokutikula in beiden Arten überproportional ab (Figure 3.4.2). Dabei verringerten sich bei *M. acuminata* Härte und E-Modul der IR-Mesokutikula um 90%, während die Werte für die IR-Exokutikula lediglich auf die Hälfte der Werte im getrockneten Zustand zurückgingen. Der gleiche Effekt der Rehydrierung konnte auch bei *A. albicornis* gefunden werden, wenn auch weniger stark ausgeprägt. Zudem konnten bei Topographieaufnahmen angeschnittener IR-Rezeptoren unter Wasser nachgewiesen werden, dass die IR-Mesokutikula, unter dem Einfluss von Wasser, in beiden Arten stärker anschwillt als die IR-Exokutikula (Figure 3.4.3 b,d), was auf eine größere Wasseraufnahmekapazität zurückzuführen ist. Es ist daher anzunehmen, dass die IR-Mesokutikula auch im lebenden Tier einen höheren Wassergehalt aufweist als die IR-Exokutikula.

Aufgrund der ermittelten Werte für den E-Modul lässt sich eine Abschätzung des thermischen Ausdehnungskoeffizienten für die einzelnen Kutikulatypen vornehmen (3.4.4.2, Tabelle 4.5.1) (Barker 1963; Arenz 2005). Es zeigt sich hier, dass die IR-Mesokutikula beider Arten bereits im getrockneten Zustand einen höheren thermischen Ausdehnungskoeffizienten besitzt als die anderen getesteten Kutikulatypen. Im quasi-nativen Zustand ist dieser Effekt noch deutlicher zu finden. Bei *M. acuminata* ist der thermische Ausdehnungskoeffizient der IR-Mesokutikula im quasi-nativen Zustand daher wahrscheinlich sogar um ein Vielfaches höher als in den anderen Schichten. In beiden Arten führt ein hoher thermischer Ausdehnungskoeffizient der IR-Mesokutikula bei Erwärmung zu einem schnellen Druckanstieg innerhalb des mikrofluidischen Zentrums. Durch den relativ geringen thermischen Ausdehnungskoeffizienten der IR-Exokutikula dehnt sich diese in nur geringem Maße aus. Hierdurch bildet der exokutikulare Mantel des Rezeptors eine Art Druckgefäß, das das Volumen im Inneren nahezu konstant hält. Somit sind die verschiedenen thermomechanischen Eigenschaften der beiden Kutikulatypen als Spezialisierung zur Optimierung des Translationsprozesses innerhalb des IR-Rezeptors anzusehen. Hierbei scheint der Grad der Spezialisierung bei *M. acuminata* höher zu sein als bei *A. albicornis*.

Tabelle 4.5.1 Abschätzung des thermischen Ausdehnungskoeffizienten (α) aufgrund des E-Moduls (E_r) für verschiedene Kutikulatypen in getrockneten und quasi-nativen Proben von *A. albicornis* und *M. acuminata*.

| | | <i>A. albicornis</i> | | <i>M. acuminata</i> | |
|-------------|----------|----------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| | | E_r [GPa] | α [$1/K \cdot 10^{-6}$] | E_r [GPa] | α [$1/K \cdot 10^{-6}$] |
| getrocknet | IR Exo | 6.7 | 38 | 10,4 | 31 |
| | IR Meso | 4.3 | 46 | 5,8 | 40 |
| | Ref Exo | 6.6 | 38 | 10,6 | 31 |
| | Ref Meso | 8.9 | 33 | 14,5 | 27 |
| quasi-nativ | IR Exo | 2,8 | 55 | 4,8 | 44 |
| | IR Meso | 1,3 | 77 | 0,5 | 117 |
| | Ref Exo | 3,0 | 54 | 3,9 | 48 |
| | Ref Meso | 3,0 | 54 | 6,7 | 38 |

4.6 Konzept für den technischen IR-Sensor

In dieser Arbeit wurden in photomechanischen IR-Rezeptoren die für den Translationsprozess notwendigen Kutikulastrukturen durch Bestimmung ihrer mechanischen Eigenschaften und ihrer dreidimensionalen Geometrie untersucht. Im Folgenden werden Empfehlungen zur Verbesserung des aktuellen Prototyps des technischen IR-Sensors gegeben und dessen geometrische Eigenschaften sowie darin eingesetzte Materialien diskutiert. Hierbei liegt der Schwerpunkt auf dem Infrarotabsorber des Sensors.

4.6.1 Funktionsweise des technischen IR-Sensors

Vereinfacht ausgedrückt setzen sich die untersuchten biologischen Rezeptoren aus einer äußeren Druckkammer, bestehend aus IR-Exokutikula, und dem mikrofluidischen Zentrum zusammen, in dem bei Erwärmung durch Druckgenerierung eine mechanosensitive Nervenzelle stimuliert wird. Im technischen Sensor wird dieser prinzipielle Aufbau abstrahiert übernommen. Auch hier wird eine steife äußere Druckkammer mit einer Flüssigkeit gefüllt, die den durch Temperaturerhöhung erzeugten Druck hydraulisch auf eine flexible Membran überträgt. Die Auslenkung dieser Membran wird dann kapazitiv oder optisch gemessen. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe um Prof. H. Schmitz ein Prototyp (Anhang 8.6) entwickelt, der nach dem photomechanischen Prinzip funktioniert und bereits erfolgreich getestet wurde. Die nachfolgende Diskussion bezieht sich überwiegend auf diesen makroskopischen Prototyp.

4.6.2 Geometrie der Absorberfläche und der Zwischenwände

Beim aktuellen Prototyp besteht die Sensoroberfläche Richtung IR-Quelle aus Polyoxymethylen und fungiert selbst als Absorber. Die erzeugte Wärme wird an das darunterliegende Fluidvolumen abgegeben.

Im *Melanophila*-Rezeptor beträgt die Eindringtiefe der IR-Strahlung ca. 15 μm . Der Rezeptor ist vermutlich durch seine Miniaturisierung an den Stimulus angepasst (4.1.2). Wenn man annimmt, dass die Eindringtiefe von IR-Strahlung der Wellenlänge 3-5 μm in Polyoxymethylen annähernd ähnlich groß ist wie in Insektenkutikula, findet in der Absorberfläche eine nahezu vollständige Absorption der IR-Strahlung innerhalb einer Tiefe im zweistelligen Mikrometerbereich statt. Die Absorberfläche im aktuellen Prototyp hat eine Dicke von ca. 300 μm (Anhang 8.6). Entsprechend groß ist ihre absolute Wärmekapazität; entsprechend langsam ist die Wärmeleitung durch die Absorberfläche an das Fluid. Damit die in der Absorberfläche freigewordene Wärme schnell und effizient an das Fluid weitergeleitet werden kann, bzw. eine möglichst hohe Strahlungsintensität das Fluid erreicht, sollte die Absorberfläche, wie im biologischen Vorbild, eine geringe Dicke haben. Um sie für einen signifikanten Teil der IR-Strahlung passierbar zu machen, müsste ihr Durchmesser mindestens um den Faktor 10 verringert werden. Solch geringe Schichtdicken bergen u.U. den Nachteil, dass sie bei Druckzunahme im Inneren des Sensors zum Durchbiegen nach außen neigen, was der Auslenkung der Membran an der Ausleseöffnung entgegenwirkt. Daher sollte die Absorberfläche keine großen ungestützten Flächen aufweisen. Beim aktuellen Prototyp ist eine Zwischenwand (ebenfalls Polyoxymethylen) spiralförmig unter der Absorberfläche angeordnet (Anhang 8.6). Der Abstand zweier gegenüberliegender Wände beträgt 200 μm . Eine Auslenkung der Absorberfläche wird hierdurch vermutlich weitgehend verhindert. Bei der, hier vorgeschlagenen, geringen Dicke der Absorberfläche sollte auch entsprechend der Abstand zwischen abstützenden Zwischenwänden herabgesetzt werden.

4.6.3 Fenster versus Absorberfläche

Erdacht wurde zwischenzeitlich ein IR-durchlässiges Fenster (Suprasil[®]) (3.2.2.3). Hierdurch würde einfallende IR-Strahlung erst durch das Fluid absorbiert. Berechnungen haben gezeigt, dass im Fall von flüssigen Kohlenwasserstoffen als Füllung die IR-Strahlung innerhalb der

ersten 500 μm des Fluids, im Fall von Wasser innerhalb von 50 μm nahezu vollständig absorbiert wird (Figure 3.2.6). Damit wird viel Wärme sehr nah am Fenster frei, wodurch ein großer Teil der Wärme konduktiv an das Fenster abgegeben wird (Figure 3.2.7), was sehr ungünstig ist. Im Fall von Wasser als Füllung wird so ca. die Hälfte der im Wasser freigewordenen Wärme auf das Fenstermaterial übertragen (Soltner et al. 2009).

Falls es gelänge ein extrem dünnes IR-transparentes Fenster mit den oben beschriebenen eng stehenden Stützwänden (z.B. aus Polyoxymethylen) zu verbinden, würde die Strahlung direkt vom Fluid bzw. den im Fluid liegenden Stützwänden absorbiert. Durch seine geringe Dicke würde auch die absolute Wärmekapazität des Fensters klein, was den Wärmefluss vom Fluid ans Fenster begrenzen würde. Allerdings dürfte hierzu die Dicke des Suprasil-Fensters nur wenige Mikrometer betragen (Figure 3.2.7), was technisch schwer umzusetzen sein dürfte. Es wird daher die Verwendung einer dünnen Absorberfläche empfohlen.

4.6.4 Material der Absorberfläche und der Zwischenwände

Beim IR-Rezeptor von *M. acuminata* wurde eine auffallend große Grenzfläche zwischen Fluid und der umgebenden Kutikula festgestellt (3.1), was möglicherweise der verbesserten Wärmeleitung von Kutikula an das Fluid dient (4.1.3). Eine Vergrößerung der Grenzfläche zwischen dem absorbierenden Feststoff und dem Fluid ist beim aktuellen Prototyp teilweise bereits durch die Einheit aus Absorberfläche und Zwischenwänden umgesetzt. Wie beschrieben ist zu erwarten, dass die meiste Wärme im äußeren Bereich der Absorberfläche frei wird. Damit die Wärmeleitung schnell und effektiv an das Fluid abgegeben werden kann, sollte das Material der Absorberfläche und der Zwischenwände eine hohe Wärmeleitfähigkeit aufweisen. Hierdurch könnte die Wärmeleitung sowohl direkt von der Absorberfläche auf das Fluid als auch über die Zwischenwände geschehen, die dann als "Heizlamellen" fungieren. Das im Prototyp verwendete Polyoxymethylen besitzt mit $0,31 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ eine im Vergleich zu anderen Feststoffen relativ hohe, als Kunststoff jedoch eine moderate thermische Leitfähigkeit. Denkbar wäre auch eine Fertigung der Absorberstruktur aus einem Carbonfaserstab (Schmitz, persönliche Mitteilung). Hierbei sollte die Faserausrichtung senkrecht zur Absorberoberfläche liegen. Durch die hohe thermische Leitfähigkeit in Faserrichtung würde die durch IR-Absorption entstandene Wärme effizient und schnell zum Fluid geleitet.

4.6.5 Fluid und Fluidvolumen

Die mikrofluidischen Zentren der untersuchten IR-Rezeptoren setzen sich aus einem Fluid und der IR-Mesokutikula zusammen, die wahrscheinlich einen hohen thermischen Ausdehnungskoeffizienten besitzt (4.5). Das Fluid besteht höchstwahrscheinlich aus Wasser und darin gelösten organischen Substanzen, durch die vermutlich die thermische Ausdehnung des Fluids gesteigert wird (4.2). Das mikrofluidische Zentrum wird im technischen Sensor in stark abstrahierter Form umgesetzt und beschränkt sich auf die Füllung des Sensors mit einer geeigneten Flüssigkeit. Berechnungen sagen voraus, dass flüssige Kohlenwasserstoffe einen 4-6 mal größeren thermischen Ausdehnungskoeffizienten und zudem eine deutlich geringere Wärmekapazität und Dichte besitzen als Wasser (Table 3.2.1). Auch in Testreihen bei denen ein früherer Prototyp mit verschiedenen Flüssigkeiten gefüllt wurde, konnte mit

Diskussion

Ethanol die höchste Sensitivität erreicht werden (Kahl 2011). Nicht zuletzt aufgrund seiner relativ einfachen Handhabbarkeit wird hier Ethanol als Füllung empfohlen.

Die Tiefe des Fluidvolumens senkrecht zur Absorberfläche beträgt im aktuellen Prototyp ca. 2,7 mm. Ein solch tiefes Fluidvolumen ist für die Funktion des Sensors nicht nötig. Zwar sind Flüssigkeiten praktisch inkompressibel (Kittel 2005), jedoch wirkt der entstehende Druck auch auf die Seitenwände und die Rückwand des Sensors. Große Wandflächen werden durch den im Inneren entstehenden Druck leichter nach außen durchgebogen, was vermutlich der Auslenkung der Auslesemembran entgegenwirkt. Empfohlen wird daher eine starke Verringerung der Tiefe des Fluidvolumens, je nach Machbarkeit, bis auf wenige Mikrometer.

4.6.6 Ausgleichskanäle

Eine wichtige strukturelle Besonderheit der IR-Rezeptoren von *M. acuminata* sind die Nanokanäle, die sich durch den exokutikularen Mantel der inneren Kugel ziehen (1.3). Auch im technischen Sensor sollten eine oder mehrere Ausgleichskapillaren das Fluidvolumen mit einem Ausgleichsbehälter verbinden (Figure 3.2.11). Der Ausgleichsbehälter sollte ein veränderbares Volumen haben (also z.B. eine sehr nachgiebige Membran besitzen). Der Strömungswiderstand der Ausgleichskapillaren kann über ihre Anzahl, ihre Länge und ihren Durchmesser so eingestellt werden, dass sie, wie beim IR-Rezeptor von *M. acuminata*, als Hochpassfilter wirken. Niederfrequente Temperaturänderungen bewirken dann idealerweise keine Auslenkung der Membran an der Ausleseöffnung und somit kein Detektionssignal (3.2.2.6). Der Sensor reagiert so ausschließlich auf Änderungen der Intensität der IR-Strahlung und kann durch Druckausgleich an langfristige Erhöhung der Strahlungsintensität adaptieren (1.3).

4.7 Fazit

In dieser Arbeit wurde eine maßstabsgetreue Rekonstruktion der inneren Kugel des IR-Rezeptors von *M. acuminata* angefertigt. Hierdurch wurden die genaue dreidimensionale Geometrie und relevante Volumina und Grenzflächen einzelner Rezeptorbestandteile ermittelt. Zudem wurde eine Methode zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften quasinativer Insektenkutikula entwickelt. Es konnte hierdurch gezeigt werden, dass sich die Materialeigenschaften einzelner kutikularer Schichten unter dem Einfluss von Wasser unterschiedlich stark ändern. Vermutlich ist dies bedingt durch unterschiedliche Wasseraufnahmekapazitäten durch unterschiedliche Grade der Sklerotisierung. Bei den Kutikulatypen innerhalb der IR-Rezeptoren von *M. acuminata* und *A. albicornis* kann aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften bei verschiedenen Wassergehalten und aufgrund ihres Quellverhalten auf eine Spezialisierung dieser Schichten geschlossen werden. Es wurde hier gezeigt, dass

Diskussion

der Wassergehalt zu einem großen Maße die thermomechanischen Eigenschaften von Kutikula definiert.

Aufgrund der neu erlangten Kenntnisse über die Geometrie und die Materialeigenschaften spezialisierter Rezeptorbestandteile wurden Empfehlungen zur Entwicklung neuer ungekühlter IR-Sensoren gegeben.

5 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1.4.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Arthropodenkutikula | 11 |
| Abbildung 2.2.1 Arbeitsskript zur Erstellung einer 3D-Rekonstruktion in AVIZO 6.00® | 16 |
| Abbildung 2.3.1 Umfassende Untersuchung von Morphologie, Ultrastruktur und mechanischen Eigenschaften von Insektenkutikula | 18 |
| Abbildung 2.4.1 Messprinzip des Rasterkraftmikroskops..... | 19 |
| Abbildung 2.4.2 Rasterkraftmikroskopie in Wasser | 20 |
| Abbildung 2.5.1 Schematische Darstellung verschiedener Phasen des Eindrückprozesses... | 21 |
| Abbildung 2.5.2 Schematischer Aufbau des Nanoindentationsversuchs | 23 |
| Abbildung 3.1.1 Dreidimensionale Rekonstruktion der inneren Kugel des IR-Rezeptors von <i>M. acuminata</i> | 26 |
| Figure 3.2.1 Infrared receptors in <i>Melanophila</i> beetles and pyrophilous bug species of the genus <i>Aradus</i> | 30 |
| Figure 3.2.2 Schematic drawings and material properties of IR receptors of <i>Melanophila</i> and <i>Aradus</i> | 32 |
| Figure 3.2.3 Principle of a gas-filled Golay sensor with optical read-out | 34 |
| Figure 3.2.4 Comparison of the sensillum with the model of the sensor | 35 |
| Figure 3.2.5 Maximum central deflection y_{\max} of a circular membrane as function of factor Ω and irradiation time for a water-filled cavity..... | 38 |
| Figure 3.2.6 IR power density as function of the cavity axis for different liquids..... | 40 |
| Figure 3.2.7 Temperature distribution along the cavity axis 50 ms after the onset of irradiation for different liquids..... | 40 |
| Figure 3.2.8 Temperature distribution along the cavity axis 0.5 s after the onset of irradiation for a water-filled and a CO ₂ -filled cavity..... | 42 |
| Figure 3.2.9 Pressure difference ΔP of a circular membrane as function of factor Ω for a water-filled and CO ₂ -filled cavity..... | 42 |
| Figure 3.2.10 Maximum central deflection y_{\max} of a circular membrane as function of factor Ω for a water-filled and CO ₂ -filled cavity..... | 43 |
| Figure 3.2.11 Left: Model of the pressure core in the sensillum and calculation model for pressure compensation..... | 44 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Figure 3.2.12 Pressures in the cavity and in the reservoir as function of time..... | 45 |
| Figure 3.2.13 Comparison of time constants for a compensation leak of a cavity filled with water respectively with CO ₂ gas as function of the radius of the canal. | 46 |
| Figure 3.3.1 Nanoindentation in distinct cuticle layers in air and under water.. | 55 |
| Figure 3.3.2 Nanoindenter scan of horizontally cut cuticle..... | 56 |
| Figure 3.3.3 Modulus and hardness of the exo-, meso-, and endocuticle under dry and rewetted conditions probed in the normal and transverse directions..... | 58 |
| Figure 3.3.4 Change of E-Modulus and hardness of endocuticle and embedding resin in a rewetting cycle | 61 |
| Figure 3.3.5 Anisotropy in the meso- and endocuticular layers revealed by probing in normal versus transverse direction | 62 |
| Figure 3.4.1 SEM image of dome-shaped IR receptors and schematic drawings of single IR receptors of <i>Melanophila</i> and <i>Aradus</i> | 67 |
| Figure 3.4.2 Modulus and hardness of different types of cuticle in <i>M. acuminata</i> and <i>A. albicornis</i> under dry and rewetted conditions | 72 |
| Figure 3.4.3 Topography SPM-Scans of IR receptors of <i>M. acuminata</i> and <i>A. albicornis</i> | 75 |

6 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 3.1.1 Volumina einzelner Materialien der 3D-Rekonstruktion der inneren Kugel des <i>IR</i> -Rezeptors von <i>M. acuminata</i> | 26 |
| Tabelle 4.5.1 Abschätzung des thermischen Ausdehnungskoeffizienten α | 87 |
| Table 3.2.1 Comparison of material properties of different hydrocarbons with water | 41 |
| Table 3.3.1 Local testing of material properties in insect cuticle | 51 |
| Table 3.4.1 Mann-Whitney-test for hardness and modulus of the different types of cuticles ... | 73 |

7 Literaturverzeichnis

- Andersen, S. O. (1996). Cuticular sclerotization in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology* 113(4): 689-705.
- Apel, K.-H. (1989). Zur Verbreitung von *Melanophila acuminata* (Coleoptera, Buprestidae). *Entomologische Nachrichten und Berichte* 33: 278-280.
- Arenz, R. J. (2005). Relation of elastic modulus to thermal expansion coefficient in elastic and viscoelastic materials. *SEM Proceedings, 23rd Conference and Exposition on structural dynamics*.
- Arenz, R. J. (2005). Relation of elastic modulus to thermal expansion coefficient in elastic and viscoelastic materials. *23rd Conference and Exposition on Structural Dynamics, Orlando, FL, USA*, Society for Experimental Mechanics.
- Banerjee, S. (1988). Organisation of wing cuticle in *Locusta migratoria* Linnaeus, *Tropidacris cristata* Linnaeus and *Romalea microptera* Beauvis (Orthoptera: Acrididae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 17: 313-326.
- Barbakadze, N., Enders, S., Gorb, S. and Arzt, E. (2006). Local mechanical properties of the head articulation cuticle in the beetle *Pachnoda marginata* (Coleoptera, Scarabaeidae). *Journal of Experimental Biology* 209(4): 722-730.
- Barker, R. E. (1963). An approximate relation between elastic moduli and thermal expansivities. *Journal of Applied Physics* 34(1): 107-116.
- Beadle, W. E., Tsai, J. C. C. and Plummer, R. D. (1985). Quick reference manual for silicon integrated circuit technology. Wiley.
- Bhushan, B. and Li, X. (2003). Nanomechanical characterization of solid surfaces and thin films. *International Materials Reviews* 48: 125-164.
- Bousack, H., Schmitz, H. and Offenhäusser, A. (2008). Design of a fluidic infrared detector based on the infrared sensilla in the beetle *Melanophila acuminata*. *Actuator 2008, 11th International Conference on New Actuators*. Bremen: 786 - 789
- Budzier, H. and Gerlach, G. (2010). *Thermische Infrarotsensoren*, Wiley. Weinheim.
- Champion, G. C. (1909). A buprestid and other Coleoptera on pine injured by "heath fires" in N. W. Surrey. *Entomologist's Monthly Magazine* 45: 247-250.
- Chevrier, J., Baert, K. and Slater, T. (1995). An infrared pneumatic detector made by micromachining technology. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 5: 193 - 195.

Literaturverzeichnis

- Cribb, B. W., Lin, C. L., Rintoul, L., Rasch, R., Hasenpusch, J. and Huang, H. (2010). Hardness in arthropod exoskeletons in the absence of transition metals. *Acta Biomaterialia* 6(8): 3152-3156.
- Cribb, B. W., Stewart, A., Huang, H., Truss, R., Noller, B., Rasch, R. and Zalucki, M. P. (2008). Insect mandibles - comparative mechanical properties and links with metal incorporation. *Naturwissenschaften* 95(1): 17-23.
- Cusack, S. and Miller, A. (1979). Determination of the elastic constants of collagen by Brillouin light scattering. *Journal of Molecular Biology* 135: 39-51.
- Demtröder, W. (2008). *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*. Springer, Berlin.
- Dereniak, E. L. and Boreman, G. D. (1996). *Infrared detectors and systems*. Wiley, New York.
- Dettner, K. and Peters, W. (1999). *Lehrbuch der Entomologie*. Fischer, Stuttgart.
- Enders, S., Barbakadse, N., Gorb, S. N. and Arzt, E. (2004). Exploring biological surfaces by nanoindentation. *Journal of Materials Research* 19: 880-887.
- Evans, W. G. (1962). Notes on the biology and dispersal of *Melanophila* (Coleoptera: Buprestidae). *Pan-Pacific Entomologist* 38: 59-62.
- Evans, W. G. (1964). Infrared receptors in *Melanophila acuminata* De Geer. *Nature* 202: 211.
- Evans, W. G. (1966). Perception of infrared radiation from forest fires by *Melanophila acuminata* De Geer (Buprestidae, Coleoptera). *Ecology* 47: 1061-1065.
- Evans, W. G. (2005). Infrared radiation sensors of *Melanophila acuminata* (Coleoptera: Buprestidae): A thermopneumatic model. *Annals of the Entomological Society of America* 98(5): 738-746.
- Fraenkel, G. and Rudall, K. M. (1940). A study of the physical and chemical properties of insect cuticle. *Proceedings of the Royal Society* 129: 1 - 35.
- Gibbs, A. G. (1998). Water-proofing properties of cuticular lipids. *American Zoologist* 38: 471-482.
- Golay, M. (1947). A pneumatic infra-red detector. *The Review of Scientific Instruments* 18(5): 357 - 362.
- Gorb, S. N. (2001). *Attachment devices of the insect cuticle*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Gronenberg, W. and Schmitz, H. (1999). Afferent projections of infrared sensilla in the beetle *Melanophila acuminata* (Coleoptera: Buprestidae). *Cell Tissue Research* 297: 311-318.
- Hadley, N. F. (1982). Cuticle ultrastructure with respect to the lipid waterproofing barrier. *Journal of Experimental Zoology* 222: 239-248.

Literaturverzeichnis

- Hay, J. L. and Pharr, G. M. (2000). Instrumented indentation testing: ASM metals handbook. ASM International, Novelty.
- Hazel, J., Fuchigami, N., Gorbunov, V., Schmitz, H., Stone, M. and Tsukruk, V. V. (2001). Ultramicrostructure and microthermomechanics of biological IR detectors: Materials properties from a biomimetic perspective. *Biomacromolecules* 2(1): 304-312.
- Hepburn, H. R. and Chandler, H. D. (1976). Material properties of arthropod cuticles: the arthroal membranes. *Journal of Comparative Physiology* 109: 177-198.
- Heraeus Quarzglas. Hanau.
- Hillerton, J. E., Reynolds, S. E. and Vincent, J. F. V. (1982). On the indentation hardness of insect cuticle. *Journal of Experimental Biology* 96: 45-52.
- Hillerton, J. E. and Vincent, J. F. V. (1979). The stabilisation of insect cuticle. *Journal of Insect Physiology* 25: 957 - 963.
- Kahl, T. (2011), Vergleichende Messungen mit einem neuartigen Infrarot Demonstratorsensor nach dem Vorbild von *Melanophila acuminata* (Buprestidae) und Untersuchungen zu den thermischen Eigenschaften der Kutikula von *Melanophila acuminata*, *diploma thesis*, Institut für Zoologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Kaupp, G. (2006). Atomic force microscopy, scanning nearfield optical microscopy and nanoscratching. Springer, Berlin.
- Keil, T. A. (1997). Functional morphology of insect mechanoreceptors. *Microscopy Research and Technique* 39: 506-531.
- Kenny, T. (1996). Micromachined infrared sensors using tunneling displacement transducers. *Review of Scientific Instruments* 67(1): 112- 128.
- Kittel, C. (2005). Einführung in die Festkörperphysik. Oldenbourg: 776.
- Klocke, D., Schmitz, A., Soltner, H., Bousack, H. and Schmitz, H. (2011). Infrared receptors in pyrophilous ("fire loving") insects as model for new un-cooled infrared sensors. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 2: 186-197.
- Klocke, D. and Schmitz, H. (2011). Water as a major modulator of the mechanical properties of insect cuticle. *Acta Biomaterialia* 7: 2935-2942.
- Kreiss, E. J., Schmitz, A. and Schmitz, H. (2005). Morphology of the prothoracic discs and associated sensilla of *Acanthocnemus nigricans* (Coleoptera, Acanthocnemidae). *Arthropod Structure & Development* 34(4): 419-428.
- Kruskal, W. H. and Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47(260): 583-621.

Literaturverzeichnis

- Lin, H.-T., Dorfmann, A. L. and Trimmer, B. A. (2009). Soft-cuticle biomechanics: A constitutive model of anisotropy for caterpillar integument. *Journal of Theoretical Biology* 256: 447 - 457.
- Linsley, E. G. (1933). Some observations on the swarming of *Melanophila*. *Pan-Pacific Entomologist* 9: 138.
- Linsley, E. G. (1943). Attraction of *Melanophila* beetles by fire and smoke. *Journal of Economic Entomology* 36: 341-342.
- Linsley, E. G. and Hurd, P. D. (1957). *Melanophila* beetles at cement plants in southern California (Coleoptera, Buprestidae). *The Coleopterists' Bulletin* 11: 9 - 11.
- Locke, M. (1965). Permeability of insect cuticle to water and lipids. *Science* 147: 295-298.
- Luft, J. H. (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 9(2): 409pp.
- Lyde, D. R. (2004). Handbook of Chemistry and Physics. CRC Press.
- Mann, H. B. and Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of 2 random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics* 18(1): 50-60.
- MicroSense LLC. Capacitive Position Sensor for Nanopositioning - MicroSense Mini. Online unter: www.microsense.net/products-position-sensors-microsense-mini.htm.
- Minke, R. and Blackwell, J. (1978). The structure of alpha-chitin. *Journal of Molecular Biology* 120: 167-181.
- Müller, M. (2008), Aufbau und Materialeigenschaften kutikulärer Gelenkstrukturen und Infrarotrezeptoren bei Insekten und ihre funktionale Bedeutung, *Ph.D. thesis*, Institut für Zoologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Müller, M., Olek, M., Giersig, M. and Schmitz, H. (2008). Micromechanical properties of consecutive layers in specialized insect cuticle: the gula of *Pachnoda marginata* (Coleoptera, Scarabaeidae) and the infrared sensilla of *Melanophila acuminata* (Coleoptera, Buprestidae). *Journal of Experimental Biology* 211: 2576-2583.
- Nachtigall, W. (2006). Bionik, Grundlagen und Beispiele für Ingenieure und Naturwissenschaftler. Springer, Berlin.
- National Institute of Standards and Technology (NIST). Chemistry WebBook. Online unter: <http://webbook.nist.gov/>.
- Neville, A. C. (1975). Biology of the arthropod cuticle. Springer, Berlin.
- Nissan, A. H. (1976). H-bond dissociation in hydrogen bond dominated solids. *Macromolecules* 9: 840-850.

Literaturverzeichnis

- Oliver, W. C. and Pharr, G. M. (1992). An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments *Journal of Materials Research* 7: 1564-1583.
- Poulton, E. B. (1915). The habits of the Australian buprestid "fire-beetle" *Merimna atrata*. *Transactions of the Entomological Society of London* 1.
- Pryor, M. G. M. (1940). On the hardening of ootheca of *Blatta orientalis*. *Proceedings of the Royal Society* 128: 378-393.
- Raabe, D., Romano, P., Sachs, C., Fabritius, H., Al-Sawalmih, A., Yi, S.-B., Servos, G. and Hartwig, H. G. (2006). Microstructure and crystallographic texture of the chitin–protein network in the biological composite material of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*. *Materials Science and Engineering A* 421: 143–153.
- Raabe, D., Sachs, C. and Romano, P. (2005). The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. *Acta Materialia* 53(15): 4281-4292.
- Reynolds, S. E. (1975). The mechanical properties of the abdominal cuticle of *Rhodnius* larvae. *Journal of Experimental Biology* 62: 69 - 80.
- Ricksecker, L. E. (1885). Habits of some California beetles. *Entomologica Americana* 1: 96-98.
- Rogalski, A. (2002). Infrared detectors: an overview. *Infrared Physics & Technology* 43(3-5): 187-210.
- Rogalski, A. (2003). Infrared detectors: status and trends. *Progress in Quantum Electronics* 27(2-3): 59-210.
- Romano, P., Fabritius, H. and Raabe, D. (2007). The exoskeleton of the lobster *Homarus americanus* as an example of a smart anisotropic biological material. *Acta Biomaterialia* 3: 301-309.
- Ryle, G. B. (1923). Further notes on the natural history of *Melanophila acuminata* DeG. *Entomologist's Monthly Magazine* 59: 1-3.
- Sachs, C., Fabritius, H. and Raabe, D. (2008). Influence of microstructure on deformation anisotropy of mineralized cuticle from the lobster *Homarus americanus*. *Journal of Structural Biology* 161: 120-132.
- Schmitz, A., Gebhardt, M. and Schmitz, H. (2008). Microfluidic photomechanic infrared receptors in a pyrophilous flat bug. *Naturwissenschaften* 95: 455-460.
- Schmitz, A., Schätzel, H. and Schmitz, H. (2010). Distribution and functional morphology of photomechanic infrared sensilla in flat bugs of the genus *Aradus* (Heteroptera, Aradidae). *Arthropod Structure & Development* 39(1): 17-25.

Literaturverzeichnis

- Schmitz, A., Sehrbrock, A. and Schmitz, H. (2007). The analysis of the mechanosensory origin of the infrared sensilla in *Melanophila acuminata* (Coleoptera; Buprestidae) adduces new insight into the transduction mechanism. *Arthropod Structure & Development* 36: 291-303.
- Schmitz, H. and Bleckmann, H. (1997). Fine structure and physiology of the infrared receptor of beetles belonging to the genus *Melanophila* (Coleoptera: Buprestidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology* 26: 205-215.
- Schmitz, H. and Bleckmann, H. (1998). The photomechanic infrared receptor for the detection of forest fires in the buprestid beetle *Melanophila acuminata*. *Journal of Comparative Physiology A* 182: 647-657.
- Schmitz, H., Mürtz, M. and Bleckmann, H. (1997). Infrared detection in a beetle. *Nature* 386: 773-774.
- Schmitz, H., Mürtz, M. and Bleckmann, H. (2000). Responses of the infrared sensilla of *Melanophila acuminata* (Coleoptera : Buprestidae) to monochromatic infrared stimulation. *Journal of Comparative Physiology A* 186(6): 543-549.
- Schmitz, H. and Schmitz, A. (2002). Australian fire-beetles. *Landscape* Spring 2002: 36-41.
- Schmitz, H., Schmitz, A. and Bleckmann, H. (2001). Morphology of a thermosensitive multipolar neuron in the infrared organ of *Merimna atrata* (Coleoptera, Buprestidae). *Arthropod Structure & Development* 30(2): 99-111.
- Schmitz, H., Schmitz, H., Trenner, S. and Bleckmann, H. (2002). A new type of insect infrared organ of low thermal mass. *Naturwissenschaften* 89: 226-229.
- Schmitz, H. and Trenner, S. (2003). Electrophysiological characterization of the multipolar thermoreceptors in the "fire-beetle" *Merimna atrata* and comparison with the infrared sensilla of *Melanophila acuminata* (both Coleoptera, Buprestidae). *Journal of Comparative Physiology A* 189(9): 715-722.
- Schöberl, T. and Jäger, I. L. (2006). Wet or dry - hardness, stiffness and wear resistance of biological materials on the micron scale. *Advanced Engineering Materials* 8(11): 1164 - 1169.
- Schussig, M. and Norkus, V. Unpublished measurements
- Schütz, S., Weissbecker, B., Hummel, H. E., Apel, K.-H., Schmitz, H. and Bleckmann, H. (1999). Insect antennae as a smoke detector. *Nature* 398: 298-299.
- Silverstein, R. and Bassler, G. (1963). Spectrometric identification of organic compounds. Wiley.
- Soltner, H., Bousack, H. and Schmitz, H. (2009). Zur transienten Temperaturentwicklung in einem fluidischen Infrarot-Detektor auf der Basis der infrarotempfindlichen Sensillen des Schwarzen Kiefernprachtkäfers *Melanophila acuminata*. MikroSystemTechnik Kongress. Berlin.

Literaturverzeichnis

- Song, F., Xiao, K. W., Bai, K. and Bai, Y. L. (2007). Microstructure and nanomechanical properties of the wing membrane of dragonfly. *Materials Science and Engineering A* 457(1-2): 254-260.
- Spurk, J. H. and Aksel, N. (2008). Fluid Mechanics. Springer, Berlin.
- Sun, J. Y., Tong, J. and Ma, Y. H. (2008). Nanomechanical Behaviours of Cuticle of Three Kinds of Beetle. *Journal of Bionic Engineering* 5: 152-157.
- Szabo, I. (2001). Höhere technische Mechanik. Springer, Berlin.
- Thompson, J. I. and Czernuszka, J. T. (1995). The effect of two types of cross-linking on some mechanical properties of collagen. *Bio-Medical Materials and Engineering* 5(37-48).
- VanDyke, E. C. (1926). Buprestid swarming. *Pan-Pacific Entomologist* 3: 41.
- VanDyke, E. C. (1928). *Melanophila consputa*. *Pan-Pacific Entomologist* 4: 113.
- Vincent, J. D. (1990). Fundamentals of infrared detector operation and testing. Wiley, New York.
- Vincent, J. F. V. (1980). Insect cuticle - a paradigm for natural composites. The Mechanical Properties of Biological Materials. J. F. V. Vincent and J. D. Curry, Symposia of the Society for Experimental Biology. 34: 183 - 210.
- Vincent, J. F. V. (1990). Structural Biomaterials. Princeton University Press, Princeton.
- Vincent, J. F. V. (2002). Arthropod cuticle - a natural composite shell system. *Composites: Part A* 33: 1311-1315.
- Vincent, J. F. V. (2004). Dynamics of drying in phenolically tanned materials. *Journal of Bionic Engineering* 1: 4 - 8.
- Vincent, J. F. V. (2009). If it's Tanned it Must be Dry: A Critique. *Journal of Adhesion* 85(11): 755-769.
- Vincent, J. F. V. and Ablett, S. (1987). Hydration and tanning in insect cuticle. *Journal of Insect Physiology* 33: 973-979.
- Vincent, J. F. V. and Hillerton, J. E. (1979). The tanning of insect cuticle - a critical review and a revised mechanism. *Journal of Insect Physiology* 25: 653 - 658.
- Vincent, J. F. V. and Wegst, U. G. K. (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Structure & Development* 33: 187-199.
- Vondran, T., Apel, K. H. and Schmitz, H. (1995). The infrared receptor of *Melanophila acuminata* De Geer (Coleoptera: Buprestidae): Ultrastructural study of a unique insect

Literaturverzeichnis

thermoreceptor and its possible descent from a hair mechanoreceptor. *Tissue Cell* 27(6): 645-658.

Wainwright, S. A., Biggs, W. D., Currey, J. D. and Gosline, J. M. (1976). Mechanical design in organisms. Princeton University Press, Princeton.

Weyda, F. (1982). Adaptation of Mallory's trichrome stain to insect tissue epoxy sections. *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung* 96: 79-80.

Wieliczka, D., Wenig, S. and Querry, M. (1989). Wedge-shaped cell for highly absorbent liquids: infrared optical constants of water. *Applied Optics* 28(9): 1714-1719.

8 Anhang

8.1 Getestete Einbettmedien für Nanoindentation und Rasterkraftmikroskopie in Wasser

| Materialtyp | Produktname | Eignung |
|-----------------------------|---|---|
| Epoxidharze | Epoxidharz "L" [®] , Toolcraft | Gut geeignet |
| | Epon 812 [®] | Bilden in Wasser schleimige Oberfläche |
| | EP Fix [®] , Deitermann | |
| | Araldite [®] | |
| | Schnellfest [®] UHU | Rauhe Oberfläche nach Schneiden |
| Polyethylenglycol (PEG) | PEG 10000, Merck | Sprödes Verhalten, Material bricht beim Schneiden |
| | PEG 20000, Merck | |
| | PEG 35000, Merck | |
| Polymethylmetacrylat (PMMA) | Paladur [®] , Heraus | Prinzipiell geeignet, Einbettung schwierig aufgrund hoher Zähigkeit und sehr schnellen Aushärtens |

8.2 Textdatei zur 3D-Rekonstruktion des IR-Rezeptors bei *M. acuminata*

| | | | | | |
|---------------------|--------|----------------------|--------|---------------------|--------|
| Schnitt1,A1,b.jpg | 0 | Schnitt54,P1,b.jpg | 358,28 | Schnitt111,F2,b.jpg | 743,6 |
| Schnitt3,E1,b.jpg | 13,52 | Schnitt55,R1,b.jpg | 365,04 | Schnitt112,H2,b.jpg | 750,36 |
| Schnitt4,G1,b.jpg | 20,28 | Schnitt57,K2,b.jpg | 378,56 | Schnitt113,J2,b.jpg | 757,12 |
| Schnitt5,I1,b.jpg | 27,04 | Schnitt58,M2,b.jpg | 385,32 | Schnitt114,A3,b.jpg | 763,88 |
| Schnitt6,B2,b.jpg | 33,8 | Schnitt59,O2,b.jpg | 392,08 | Schnitt115,C3,b.jpg | 770,64 |
| Schnitt7,D2,b.jpg | 40,56 | Schnitt60,Q2,b.jpg | 398,84 | Schnitt116,E3,b.jpg | 777,4 |
| Schnitt8,F2,b.jpg | 47,32 | Schnitt61,S2,b.jpg | 405,6 | Schnitt117,G3,b.jpg | 784,16 |
| Schnitt9,H2,b.jpg | 54,08 | Schnitt63,L3,b.jpg | 419,12 | Schnitt119,B4,b.jpg | 797,68 |
| Schnitt10,J2,b.jpg | 60,84 | Schnitt64,N3,b.jpg | 425,88 | Schnitt120,D4,b.jpg | 804,44 |
| Schnitt11,A3,b.jpg | 67,6 | Schnitt65,P3,b.jpg | 432,64 | Schnitt122,F4,b.jpg | 817,96 |
| Schnitt12,C3,b.jpg | 74,36 | Schnitt66,R3,b.jpg | 439,4 | Schnitt124,H4,b.jpg | 831,48 |
| Schnitt13,E3,b.jpg | 81,12 | Schnitt67,T3,b.jpg | 446,16 | Schnitt125,J4,b.jpg | 838,24 |
| Schnitt14,G3,b.jpg | 87,88 | Schnitt68,K4,b.jpg | 452,92 | Schnitt126,A5,b.jpg | 845 |
| Schnitt15,I3,b.jpg | 94,64 | Schnitt70,O4,b.jpg | 466,44 | Schnitt127,C5,b.jpg | 851,76 |
| Schnitt16,B4,b.jpg | 101,4 | Schnitt71,R4,b.jpg | 473,2 | Schnitt128,E5,b.jpg | 858,52 |
| Schnitt17,D4,b.jpg | 108,16 | Schnitt72,S4,b.jpg | 479,96 | Schnitt129,G5,b.jpg | 865,28 |
| Schnitt18,F4,b.jpg | 114,92 | Schnitt74,N5,b.jpg | 493,48 | Schnitt130,I5,b.jpg | 872,04 |
| Schnitt19,H4,b.jpg | 121,68 | Schnitt75,P5,b.jpg | 500,24 | Schnitt131,B6,b.jpg | 878,8 |
| Schnitt20,J4,b.jpg | 128,44 | Schnitt76,R5,b.jpg | 507 | Schnitt132,D6,b.jpg | 885,56 |
| Schnitt21,A5,b.jpg | 135,2 | Schnitt77,T5,b.jpg | 513,76 | Schnitt133,F6,b.jpg | 892,32 |
| Schnitt22,E5,b.jpg | 141,96 | Schnitt78,K6,b.jpg | 520,52 | Schnitt134,H6,b.jpg | 899,08 |
| Schnitt23,G5,b.jpg | 148,72 | Schnitt79,M6,b.jpg | 527,28 | Schnitt135,J6,b.jpg | 905,84 |
| Schnitt24,I5,b.jpg | 155,48 | Schnitt80,O6,b.jpg | 534,04 | Schnitt136,A7,b.jpg | 912,6 |
| Schnitt25,B6,b.jpg | 162,24 | Schnitt82,S6,b.jpg | 547,56 | Schnitt137,C7,b.jpg | 919,36 |
| Schnitt26,D6,b.jpg | 169 | Schnitt83,L7,b.jpg | 554,32 | | |
| Schnitt27,F6,b.jpg | 175,76 | Schnitt84,N7,b.jpg | 561,08 | | |
| Schnitt28,H6,b.jpg | 182,52 | Schnitt85,P7,b.jpg | 567,84 | | |
| Schnitt30,J6,b.jpg | 196,04 | Schnitt86,R7,b.jpg | 574,6 | | |
| Schnitt32,C7,b.jpg | 209,56 | Schnitt87,T7,b.jpg | 581,36 | | |
| Schnitt33,E7,b.jpg | 216,32 | Schnitt88,K8,b.jpg | 588,12 | | |
| Schnitt35,I7,b.jpg | 229,84 | Schnitt90,O8,b.jpg | 601,64 | | |
| Schnitt36,B8,b.jpg | 236,6 | Schnitt92,S8,b.jpg | 615,16 | | |
| Schnitt37,D8,b.jpg | 243,36 | Schnitt94,N9,b.jpg | 628,68 | | |
| Schnitt38,F8,b.jpg | 250,12 | Schnitt95,P9,b.jpg | 635,44 | | |
| Schnitt39,H8,b.jpg | 256,88 | Schnitt96,R9,b.jpg | 642,2 | | |
| Schnitt41,A9,b.jpg | 270,4 | Schnitt97,T9,b.jpg | 648,96 | | |
| Schnitt42,C9,b.jpg | 277,16 | Schnitt98,K10,b.jpg | 655,72 | | |
| Schnitt43,E9,b.jpg | 283,92 | Schnitt99,M10,b.jpg | 662,48 | | |
| Schnitt44,G9,b.jpg | 290,68 | Schnitt100,O10,b.jpg | 669,24 | | |
| Schnitt45,I9,b.jpg | 297,44 | Schnitt101,Q10,b.jpg | 676 | | |
| Schnitt46,B10,b.jpg | 304,2 | Schnitt102,S10,b.jpg | 682,76 | | |
| Schnitt47,D10,b.jpg | 310,96 | Schnitt103,A1,b.jpg | 689,52 | | |
| Schnitt49,H10,b.jpg | 324,48 | Schnitt104,C1,b.jpg | 696,28 | | |
| Schnitt50,J10,b.jpg | 331,24 | Schnitt105,E1,b.jpg | 703,04 | | |
| Schnitt51,L1,b.jpg | 338 | Schnitt106,G1,b.jpg | 709,8 | | |
| Schnitt52,N1,b.jpg | 344,76 | Schnitt107,I1,b.jpg | 716,56 | | |
| Schnitt53,N1,b.jpg | 351,52 | Schnitt109,D2,b.jpg | 730,08 | | |

8.3 Berechnung der Volumina und Oberflächen von Materialtypen der 3D- Rekonstruktion des IR-Rezeptors von *M. acuminata*

Oberflächendreiecke, Oberfläche und Volumen der einzelnen Materialien der Rekonstruktion werden von AVIZO ausgegeben:

| Material | Anzahl der Dreiecke | Fläche [pix] | Volumen [vox] |
|--------------|---------------------|--------------|---------------|
| Exokutikula | 2155414 | 6278099 | 455934944 |
| Mesokutikula | 1902626 | 5198094 | 104593136 |
| Fluid | 1638092 | 4459536 | 11087343 |
| Dendrit | 64386 | 170264 | 2325102 |

In der vorliegenden Rekonstruktion entspricht eine Pixellänge 3,222 nm .

Umrechnung von Voxel auf Kubikmikrometer (μm^3) am Beispiel Exokutikula:

$$3,222 \text{ nm}^3 * 455.934.944 = 1.469.387.137.523\text{nm}^3 = 1.469\mu\text{m}^3$$

Entsprechend geschieht auch die Umrechnung von Pixel auf Quadratmikrometer (μm^2).

8.4 Berechnung des Absorptionskoeffizienten von Buprestiden-Kutikula

Grundlagen:

- Messung der Transmission durch IR-Organ von *M acuminata* (Vondran et al. 1995), IR-Organ ohne Wachsfasern, Wellenlängenbereich 3-5 μm . Integrierte Fläche unter der Transmissionskurve (innerhalb des atmosphärischen Fensters von 3-5 μm): 7,5% Transmission
- Dicke der Kutikula im Bereich des Infrarotorgans (ca. 40 μm)

Aus der ursprünglichen Intensität I_0 und der Intensität nach dem Durchdringen der Probe I lässt sich die Absorption A berechnen:

$$A = \ln(I_0/I)$$

$$A = \ln\left(\frac{1}{0,075}\right) = 2,60$$

Aus A und der Schichtdicke x ergibt sich der Absorptionskoeffizient a :

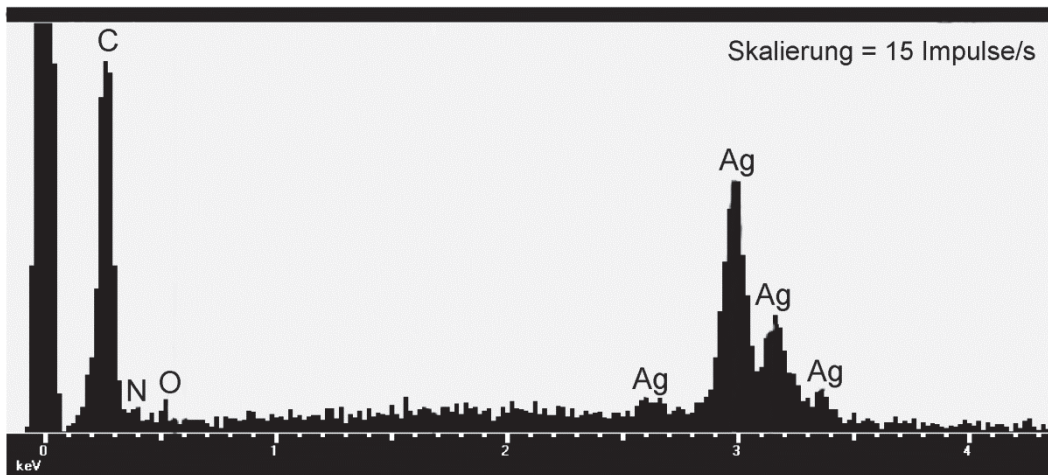
$$a = \frac{A}{x} = \frac{2,60}{40 \mu m} = 0,065 \mu m^{-1}$$

Der Kehrwert des Absorptionskoeffizienten ergibt die Eindringtiefe (hier beträgt die Intensität ca. 37% der ursprünglichen Intensität):

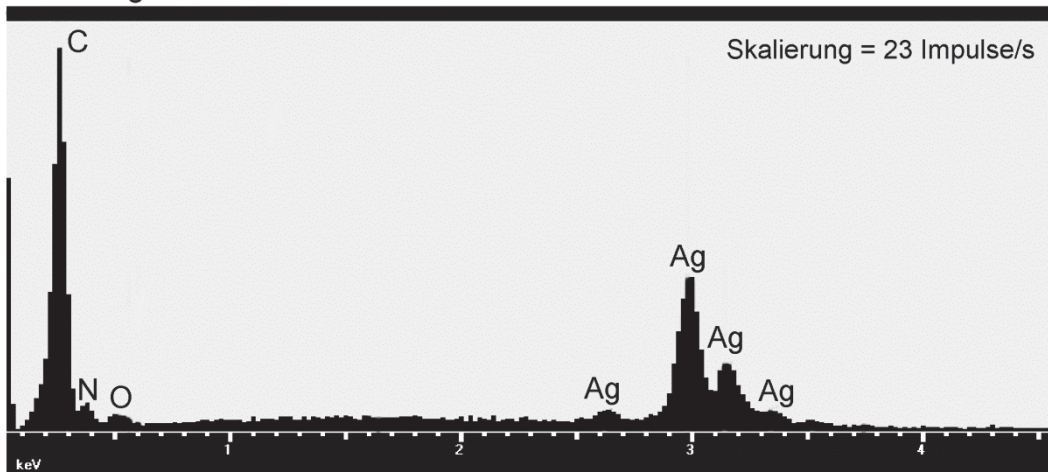
$$\frac{1}{a} = \frac{1}{0,065 \mu m^{-1}} = 15,38 \mu m$$

8.5 EDX-Analyse der getrockneten Substanz in Kavitäten des IR-Rezeptor von *M. acuminata*

Getrocknete Substanz in Kavität des IR-Rezeptors

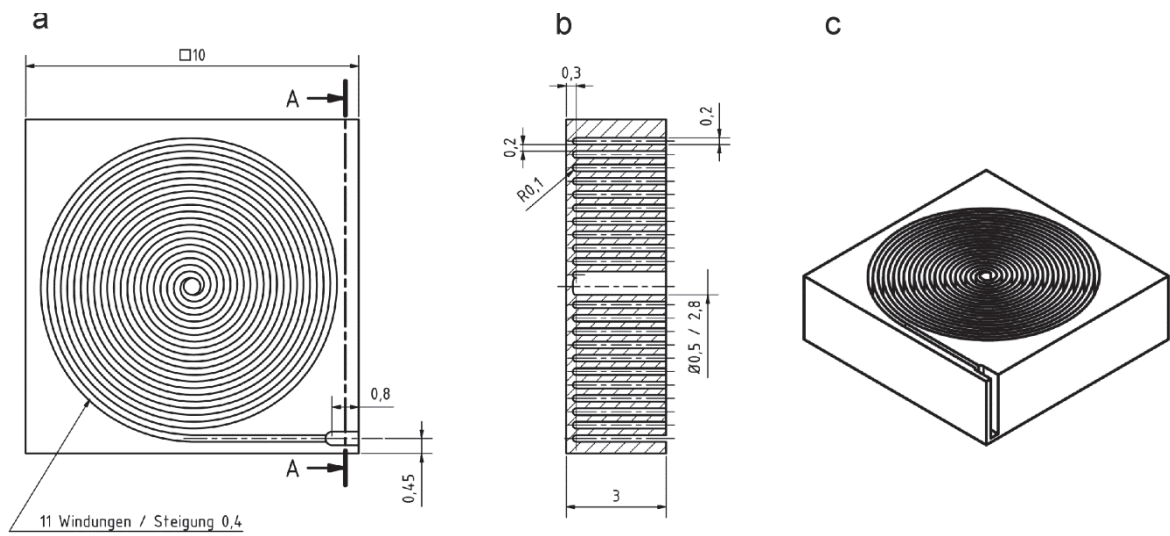


Zum Vergleich: IR-Mesokutikula



Aufgrund der Bedampfung der Proben mit Silber wird dieses hier nachgewiesen.

8.6 Absorberelement des aktuellen Prototyps des makroskopischen IR-Sensors



Absorberelement, gezeigt ohne Rückwand. **a** Aufsicht auf Absorberelement. **b** Zentraler Querschnitt. **c** Dreidimensionale Darstellung.

8.7 Publierte Fachartikel

Auf den folgenden Seiten befinden sich die publizierten Fachartikel, die Teil dieser Arbeit sind, in ihrer Erscheinungsform in den jeweiligen Fachzeitschriften.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Helmut Schmitz für seine fortwährende Unterstützung, seine Vermittlung von Zuversicht, seine Diskussionsbereitschaft und vielfältige Hilfestellungen während der gesamten Dauer meiner Doktorarbeit. Seiner Frau PD Dr. Anke Schmitz danke ich für die Einführung in vielfältige komplexe Methoden und ihre große Hilfsbereitschaft.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Förderung der Doktorarbeit durch das Graduiertenkolleg Bionik (DFG Graduiertenkolleg 1572).

Desweiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Horst Bleckmann für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung von Labor und Gerätschaften, sowie für die Übernahme des Koreferats.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wilhelm Barthlott für die Möglichkeit der Nutzung des Rasterelektronenmikroskops am NEES-Institut.

Für das Mitwirken bei der Korrektur danke ich der lieben Hanni Kramm, Erik Schneider und Frido Jaron.

Für die schöne Zeit und die freundschaftliche Unterstützung danke ich meinen Kollegen Adrian, Hendrik, Maren, Thilo, Daniela, Marlene, Alexander, Jens, André, Ruben, Anal und Heike.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie wirklich immer für mich da ist.

Erklärung

David Klocke

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Institut für Zoologie

Poppelsdorfer Schloss

53115 Bonn

An Eides statt versichere ich, dass ich die Dissertation persönlich, selbstständig und unter Offenlegung der erhaltenen Hilfen angefertigt habe, dass diese oder eine ähnliche Arbeit noch nicht anderweitig als Dissertation eingereicht wurde, dass sie an den nachstehend aufgeführten Stellen auszugsweise veröffentlicht worden ist:

Klocke D, Schmitz A, Soltner H, Bousack H, Schmitz H (2011) Infrared receptors in pyrophilous ("fire loving") insects as model for new un-cooled infrared sensors *Beilstein J. Nanotechnol.* 2, 186-197

Klocke D, Schmitz H (2011) Water as a major modulator for the mechanical properties of insect cuticle *Acta Biomaterialia* 7, 2935-2942

Datum

Unterschrift