

The presence of bacteria in calcium bodies of the terrestrial isopods
Androniscus roseus and *Haplophthalmus mengei*

Prisotnost bakterij v kalcijevih telescih kopenskih enakonožcev *Androniscus roseus* in *Haplophthalmus mengei*

Miloš Vittori*, Jasna Štrus

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, SI-1000
Ljubljana, Slovenija

*correspondence: milos.vittori@bf.uni-lj.si

Izvleček: Pri kopenskih enakonožcih iz družine Trichoniscidae so prisotna kalcijeva telesa, epitelne vrečke, v katerih se kopičijo kalcijevi minerali. Predhodne raziskave so pokazale, da sta pri vrstah *Titanethes albus* in *Hyloniscus riparius* prisotna po dva para teh organov. Pri *T. albus* so vsa kalcijeva telesa napolnjena z bakterijami, pri *H. riparius* pa vsebuje bakterije le posteriorni par. V tej raziskavi smo preučili ultrastrukturo kalcijevih telesc pri vrstah *Androniscus roseus* in *Haplophthalmus mengei*. Pri obeh vrstah sta prisotna po dva para kalcijevih telesc, ki vsebujejo paličaste bakterije. Mineraliziran matriks z bakterijami je obdan z enoslojnim epitelijem z nagubano apikalno plazmalemo, ki jo prekriva tanka ovojnica, ki je plast elektronsko gostega matriksa. Rezultati potrjujejo, da je ultrastruktura kalcijevih telesc z bakterijami splošna značilnost predstavnikov družine Trichoniscidae. Kalcijeva telesa brez bakterij, ki funkcionalno nadomeščajo kalcijeve sternalne depozite, so bila dosedaj opisana zgolj pri predstavniku rodu *Hyloniscus*.

Ključne besede: Trichoniscidae, biomineralizacija, simbioza, raki

Abstract: Terrestrial isopods of the family Trichoniscidae possess calcium bodies, epithelial sacs that accumulate calcium minerals. Previous studies have demonstrated that two pairs of these organs are present in the species *Titanethes albus* and *Hyloniscus riparius*. In *T. albus*, all calcium bodies are filled with bacteria, whereas only the posterior pair of calcium bodies contains bacteria in *H. riparius*. In the present work we studied the ultrastructure of calcium bodies in *Androniscus roseus* and *Haplophthalmus mengei*. Two pairs of calcium bodies containing rod-shaped bacteria are present in both species. The bacteria-containing mineralized matrix is enclosed in a simple epithelium with a folded apical plasma membrane, which is covered by a thin, electron dense envelope. Our results show that the presence of bacteria is a general feature of trichoniscid calcium bodies, which are ultrastructurally similar. A combination of bacteria-containing calcium bodies and calcium bodies lacking bacteria has only been found in the genus *Hyloniscus*, in which bacteria-free calcium bodies likely functionally replace sternal CaCO₃ deposits.

Keywords: Trichoniscidae, biomineralization, symbiosis, crustacean

Uvod

Kutikula rakov je mineraliziran eksoskelet, ki ga raki redno obnavljajo v procesu levitve. Pred levitvijo raki kalcijev karbonat pogosto kopičijo v začasnih mineraliziranih strukturah v prebavilu ali prostoru med staro ter nastajajočo novo kutikulo (Luquet 2012). Kopenski enakonožci (Oniscidea) pred levitvijo minerale praviloma kopičijo v sternalnih depozitih, kjer se nalagajo v obliki granul amorfnega kalcijevega karbonata (Zidar in sod. 1998, Štrus in Blejcek 2001, Ziegler in sod. 2005). Pri kopenskih enakonožcih iz družine Trichoniscidae so znana tudi kalcijeva telesa, posebne strukture, v katerih se kopičijo kalcijevi minerali (Verhoeff 1926, Méhely 1932, Ziegler 2003, Vittori in sod. 2012a,b). Do sedaj so bili ti organi raziskani na mikroskopskem nivoju pri vrstah *Titanethes albus* ter *Hyloniscus riparius* (Vittori in sod. 2012b, 2013). Pri obeh vrstah sta prisotna po dva para kalcijevih telesc v telesni votlini posteriornih členov pereona. Histološke in ultrastrukturne raziskave dveh parov kalcijevih telesc pri vrsti *Titanethes albus* so pokazale, da gre za epiteljske vrečke, ki vsebujejo številčno populacijo bakterij v zunajceličnem matriksu, mineraliziranem z apatitom. Med pripravo na levitev se med bakterijami in epitelijem oblikuje dodatna plast mineraliziranega matriksa, ki vsebuje amorfni kalcijev karbonat ter amorfni kalcijev fosfat in se po levitvi razgradi (Vittori in sod. 2012b). Pri vrsti *H. riparius* so bakterije prisotne zgolj v posteriornem paru kalcijevih telesc, v anteriornem paru pa niso bile opažene. V posteriornih kalcijevih telescih te vrste sta sestava in dinamika mineraliziranega matriksa, ki vsebuje kalcijev fosfat, med pripravo na levitev podobna kot pri vrsti *T. albus*, medtem ko se v anteriornih kalcijevih telescih, kjer bakterij ni, kopiči razmeroma čist kalcijev karbonat (Vittori in sod. 2013). Po levitvi žival resorbira začasno naložene minerale tako v anteriornih kot v posteriornih kalcijevih telescih. Pri tem je *Hyloniscus* izjemen tudi z vidika odsotnosti sternalnih depozitov kalcija, ki so sicer splošna značilnost kopenskih enakonožcev in se pojavljajo tudi pri trichoniscidih, npr. pri vrsti *T. albus* (Vittori in sod. 2012a). Anteriorna kalcijeva telesa pri *H. riparius* verjetno funkcionalno nadomeščajo sternalne depozite CaCO_3 .

V tej raziskavi smo preučili histološke in ultrastrukturne značilnosti kalcijevih telesc še pri dveh vrstah trichoniscidov. *Androniscus roseus* je predstavnik poddružine Trichoniscinae, v katero uvrščajo tudi obe do sedaj preučeni vrsti, *Haplophthalmus mengei* pa je uvrščen v poddružino Haplophthalminae. Predstavniki obeh vrst kopenskih enakonožcev so veliki nekaj milimetrov in živijo v prsti. Želeli smo ugotoviti, ali so bakterije splošno prisotne v kalcijevih telescih družine Trichoniscidae in ali so anteriorna kalcijeva telesa brez bakterij, kakršna najdemo znotraj rodu *Hyloniscus*, prisotna tudi pri drugih vrstah.

Material in metode

Uporabljeni enakonožci

V raziskavi smo preučili osebkke vrst *Androniscus roseus* in *Haplophthalmus mengei*, ki smo jih nabrali v Središču ob Dravi. Uporabili smo spolno zrele osebkke *H. mengei* v velikostnem razredu od 2,5 mm od 3 mm in pri *A. roseus* v velikostnem razredu od 3 mm do 5 mm. Živali smo žive prenesli v laboratorij, kjer smo jih fiksirali.

Svetlobna mikroskopija

Za prikaz položaja in števila kalcijevih telesc smo živali fiksirali v 70% etanolu. Osebkkom smo odstranili noge, jih prepojili z glicerolom čez noč in pripravili sveže preparate v glicerolu na objektnih steklih z utorom. Za prikaz položaja kalcijevih telesc smo izkoristili avtofluorescenco tkiva ob vzbujanju z ultravijolično svetlobo. Mikrofografije smo zajeli s fluorescenčnim mikroskopom AxioImager Z1 (Zeiss), opremljenim z digitalno kamero AxioCam MRm (Zeiss).

Presevna elektronska mikroskopija

Za presevno elektronsko mikroskopijo smo tkiva fiksirali v mešanici 2,5% glutaraldehida in 2% paraformaldehida v 0,1 M kakodilatnem pufru (pH = 7,3). Po spiranju fiksativa smo material dekalcinirali v 10% vodni raztopini EDTA čez noč in postfiksirali z 1% vodno raztopino OsO_4 . Fiksativ smo sprali s tremi menjavami deionizirane vode. Tkiva smo nato dehidrirali v naraščajoči vrsti

etanola in vklopili v umetno smolo Spurr (SPI).

Poltanke rezine (500 nm) tkiv smo zbrali na objektnih steklih in jih obarvali z mešanico barvil Azur II in metilenskega modrega (Richardson 1960). Ultratanke rezine (70 nm) kalcijevih telesc smo prenesli na bakrene mrežice ter jih kontrastirali z 1% uranil acetatom in 0,5% svinčevim citratom. Rezine smo opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom CM 100 (Philips). Mikrografije smo zajeli s kamero 792 BioScan (Gatan).

Vrstična elektronska mikroskopija

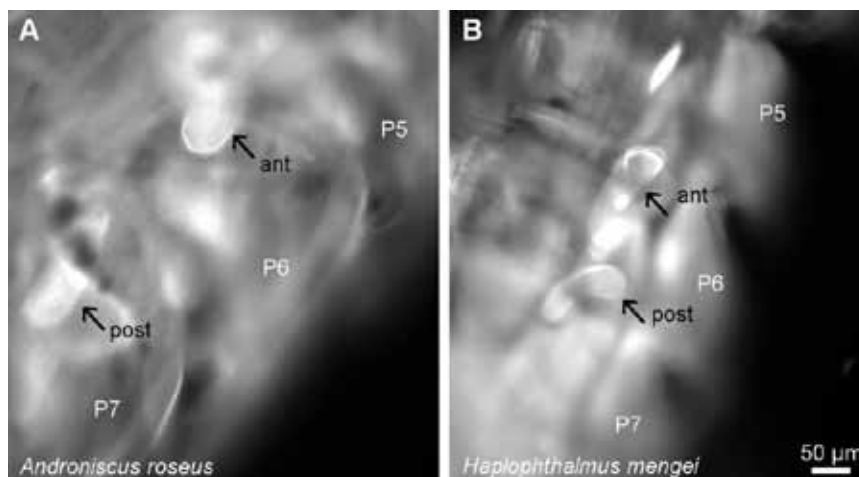
Za vrstično elektronsko mikroskopijo smo tkiva fiksirali enako kot za presevno elektronsko mikroskopijo. Po postfiksaciji z 1% vodno raztopino OsO₄ in spiranju fiksativa smo material dehidrirali v naraščajoči koncentracijski vrsti etanola. Nato smo ga najprej prenesli v izopropanol in potem v ksilen ter vklopili v parafin. Pripravili smo 10 µm debele parafinske rezine, ki smo jih zbrali na krovnih steklih in deparafinizirali s ksilenom. Tega smo nato nadomestili najprej z izopropanolom ter potem z absolutnim etanolom in posušili v heksametildisilazanu (HMDS). Posušene vzorce smo pritrdili na medeninaste nosilce in jih naprašili s 14 nm platine. Mikrografije smo zajeli

z vrstičnim elektronskim mikroskopom na poljsko emisijo JSM-7500F (JEOL).

Rezultati

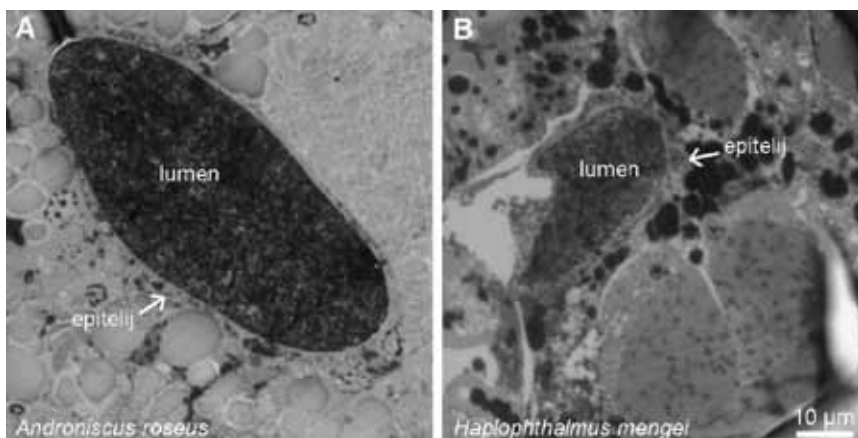
Položaj kalcijevih telesc in histološke značilnosti

Pri obeh vrstah enakonožcev sta prisotna po dva para kalcijevih telesc ledvičaste oblike v posteriornih členih pereona (slika 1). Anteriorni par kalcijevih telesc leži na meji med 5. in 6. pereonitom, posteriorni par pa na meji med 6. in 7. pereonitom. Vsako od kalcijevih telesc pri 5 mm dolgem osebku *A. roseus* meri v dolžino približno 150 µm in v širino okoli 50 µm (slika 1A). Oblika kalcijevih telesc pri *H. mengei* je podobna (slika 1B). Pri 3 mm dolgih osebkih so kalcijeva telesa dolga približno 130 µm s premerom približno 30 µm. Pri obeh vrstah gre za vrečaste strukture, ki se nahajajo ventrolateralno v telesni votlini in jih obdaja enoslojni kubični epitelij, debeline med 2 µm in 5 µm (slika 2). Notranjost (lumen) kalcijevih telesc je napolnjena z bakterijami, ki so s svetlobno mikroskopijo vidne kot zrnat material (slika 2).



Slika 1: Položaj in oblika kalcijevih telesc pri *Androniscus roseus* (A) in *Haplophthalmus mengei* (B). P5 = pereonit 5; P6 = pereonit 6; P7 = pereonit 7; ant = anteriorno kalcijevo telesce; post = posteriorno kalcijevo telesce.

Figure 1: The position and shape of calcium bodies in *Androniscus roseus* (A) and *Haplophthalmus mengei* (B). P5 = pereonite 5; P6 = pereonite 6; P7 = pereonite 7; ant = anterior calcium body; post = posterior calcium body.



Slika 2: Poltanke rezine kalcijevih telesc pri *Androniscus roseus* (A) in *Haplophthalmus mengei* (B). Steno telesca tvori enoslojen epitelij, lumen telesca pa je zapolnjen z bakterijami.

Figure 2: Semithin sections of calcium bodies in *Androniscus roseus* (A) and *Haplophthalmus mengei* (B). The wall of a calcium body is formed by a simple epithelium and its lumen is filled with bacteria. Epitelij = epithelium; lumen = calcium body lumen.

Ultrastruktura kalcijevih telesc

Kalcijeva telesca obeh vrst imajo podobno ultrastrukturo (slika 3). Obdaja jih enoslojni epitelij, z apikalno površino usmerjen proti lumnu kalcijeva telesca (slika 3A,B). Apikalna plazmalema celic epitelija oblikuje številne prstaste izrastke debele okoli 300 nm in je prekrita s približno 40 nm debelo elektronsko gosto ovojnico (slika 3C). V lumnu je prisotno tudi večje število elektronsko gostih lamin (slika 3D). Kljub dekalcinaciji tkiv, ki je olajšala pripravo rezin, so v matriksu pogosto še vedno prisotni elektronsko gosti kristali minerala (slika 3C). Celice epitelija imajo dobro razvit zrnati endoplazemski retikulum in vsebujejo številne mitohondrije ter elektronsko goste vezikle (slika 3A,B). V lumnu kalcijevih telesc se nahaja mineraliziran zunajcelični matriks, ki vsebuje številne bakterije (slika 4A, B).

Zunanja morfologija bakterij

Vrstična elektronska mikroskopija kalcijevih telesc je pokazala veliko gostoto bakterij v zunajceličnem matriksu v lumnu kalcijevih telesc pri obeh enakonožcih (slika 4C,D). Z uporabo vrstične elektronske mikroskopije smo lahko opisali morfologijo bakterij in pokazali, da gre

za drobne paličaste bakterije, dolge okoli 1 μm in debele okoli 0,4 μm .

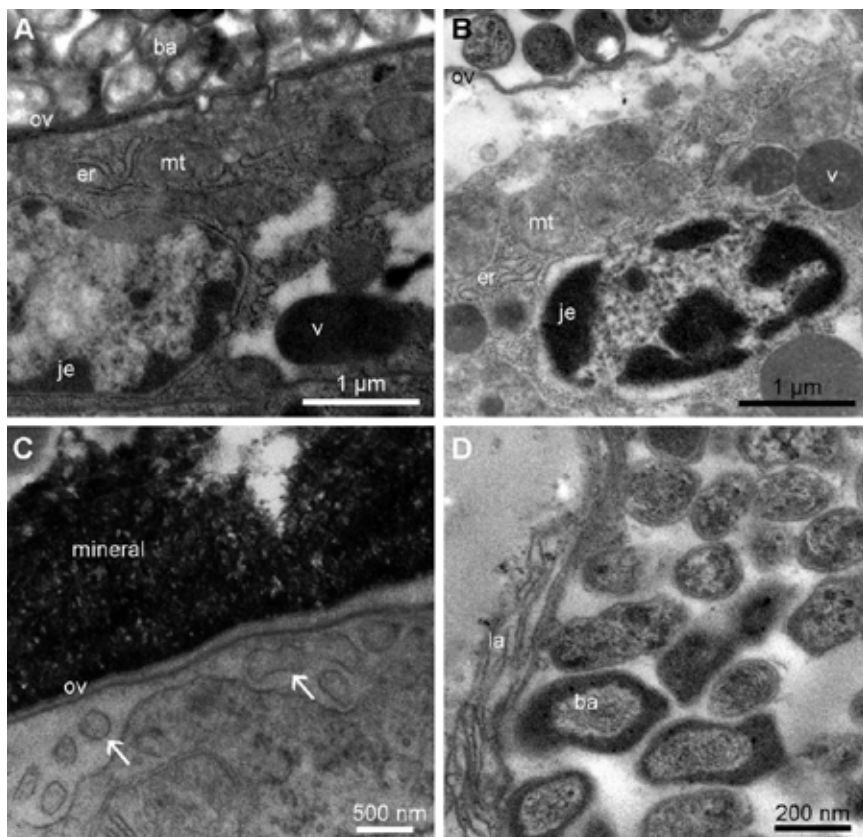
Diskusija

Ugotovili smo, da sta pri vrstah *A. roseus* in *H. mengei* prisotna po dva para razmeroma majhnih kalcijevih telesc, ki ultrastrukturno spominjajo na že opisana kalcijeva telesca jamske vrste *T. albus* (Vittori in sod. 2012b). Naši rezultati so pokazali, da so bakterije prisotne v obeh parih kalcijevih telesc pri obeh preučenihi vrstah. V kalcijevih telescih je bakterijska populacija številčna in povsem zapolnjuje njihov lumen.

Položaj kalcijevih telesc pri vrstah *A. roseus* in *H. mengei* lahko primerjamo z drugimi do sedaj preučenihi trichoniscidi iz rodov *Titanethes* in *Hyloniscus* (slika 5). Pri rodu *Titanethes* anteriorna kalcijeva telesca segajo od meje med 5. in 6. pereonitom do sredine 7. pereonita, posteriorna kalcijeva telesca pa se začnejo na meji med 6. in 7. pereonitom ter se nadaljujejo do začetka pleona (Vittori in sod. 2012b). Pri vrsti *H. riparius* se posteriorna kalcijeva telesca nahajajo na meji med 6. in 7. pereonitom kot pri drugih trichoniscidih, anteriorni par kalcijevih telesc pa se začne na meji med 5. in 6. pereonitom ter sega v anteriorni smeri

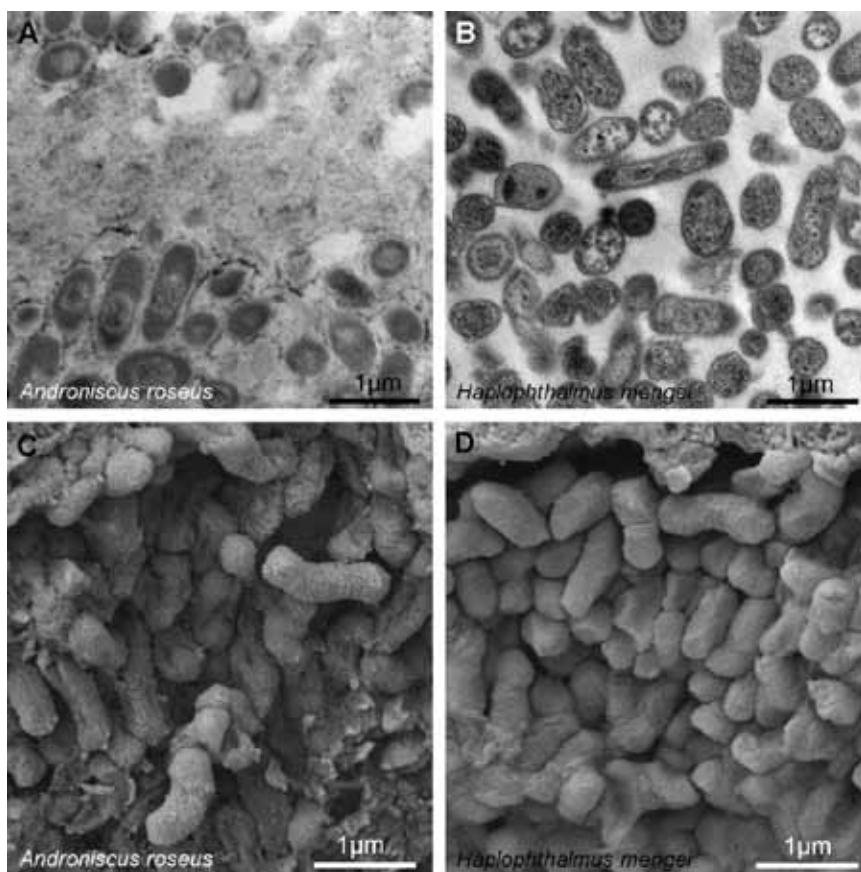
v tretji pereoniti (Vittori in sod. 2013). Pri vrsti *H. riparius* so bakterije prisotne zgolj v posteriornih kalcijevih telescih (Vittori in sod. 2013). Pri drugih

do sedaj preučeni trichoniscidih napolnjujejo bakterije oba para kalcijevih telesc.



Slika 3: Ultrastruktura kalcijevih telesc. Epitelij kalcijevega telesca pri *Androniscus roseus* (A) in *Haplophthalmus mengei* (B) ima nagubano apikalno plazmalemo (zgoraj), ki je prekrita z elektronsko gosto ovojnico (ov). Celice epitelija imajo dobro razvit zrnati endoplazemski retikulum (er), v citoplazmi pa so prisotni številni mitohondriji (mt) in elektronsko gosti vezikli (v). V lumnu (zgoraj) so vidne bakterije (ba). Pri večji povečavi apikalnega dela celice pri *A. roseus* (C) so vidni prstasti izvihki apikalne plazmaleme (puščice). V lumnu organa pri *H. mengei* (D) so vidne tanke lamine (la); je = jedro.

Figure 3: Ultrastructure of calcium bodies. The calcium body epithelium in *Androniscus roseus* (A) and *Haplophthalmus mengei* (B) has a folded apical membrane (towards the top of the image), which is covered with an electron dense envelope (ov). Epithelial cells have a well developed rough endoplasmic reticulum (er) and numerous mitochondria (mt) and electron dense vesicles (v) in their cytoplasm. Bacteria (ba) are present in the lumen. Higher magnification of the apical cell surface in *A. roseus* (C) shows the finger-like extensions of the plasma membrane (arrows). Thin lamina (la) are present in the lumen of the organ, shown here in *H. mengei* (D); je = nucleus.

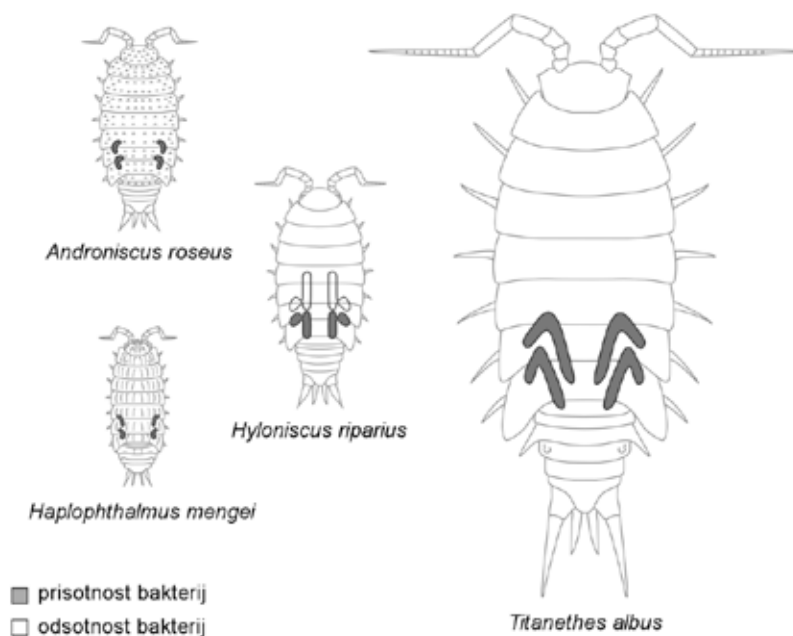


Slika 4: Bakterije v kalcijevih telescih. Presevna elektronska mikroskopija je pokazala prisotnost številnih bakterij v lumnu kalcijevih telesc pri *Androniscus roseus* (A) in *Haplophthalmus mengei* (B). Z vrstično elektronsko mikroskopijo je vidno, da gre tako pri *A. roseus* (C) kot pri *H. mengei* (D) za paličaste bakterije.

Figure 4: Bacteria in calcium bodies. Transmission electron microscopy demonstrated the presence of numerous bacteria in the lumen of calcium bodies in *Androniscus roseus* (A) and *Haplophthalmus mengei* (B). Scanning electron microscopy showed that these bacteria are rod-shaped in *A. roseus* (C) as well as in *H. mengei* (D).

Pokazali smo, da bakterije naseljujejo kalcijeva telesa tako pri poddružini Haplophthalminae kot pri poddružini Trichoniscinae. Prisotnost bakterij v kalcijevih telescih je torej v družini Trichoniscidae splošna značilnost in praviloma naseljujejo oba para teh organov. Kombinacija posteriornega para kalcijevih telesc, napoljenega z bakterijami, ter anteriornega para, v katerem bakterij ni, je bila opažena izključno pri vrsti *H. riparius*, zato gre najverjetneje za izpeljano lastnost te vrste oz.

njenega ožjega sorodstva. V prihodnosti bi bilo pomembno ugotoviti, če so kalcijeva telesa prisotna tudi pri drugih predstavnikih skupine Synocheta, ki vključuje trihoniscide (Schmidt 2008). O podobnih organih je pri kopenskih enakonožcih izven družine Trichoniscidae poročal Méhely pri rodovih *Ligidium* in *Mesoniscus* (Méhely 1932), ni pa opravil histološke analize, zato ne moremo z gotovostjo trditi, ali gre v teh primerih res za kalcijeva telesa.



Slika 5: Prisotnost bakterij v kalcijevih telescih do sedaj preučenihih trihonišcidov. Kalcijeva telesa se praviloma nahajajo posteriorno v pereonu. Pri vrstah *Androniscus roseus*, *Haplophthalmus mengei* in *Titanethes albus* so bakterije prisotne v obeh parih kalcijevih telescih (sivo polnilo). Pri *Hyloniscus riparius* so bakterije prisotne v posteriornem paru kalcijevih telescih, v anteriornem pa ne (belo polnilo).

Figure 5: The presence of bacteria in calcium bodies of trichoniscids studied to date. Calcium bodies are located posteriorly in the pereon. In *Androniscus roseus*, *Haplophthalmus mengei* and *Titanethes albus*, bacteria are present in both pairs of calcium bodies (gray fill). In *Hyloniscus riparius*, bacteria are only present in the posterior pair of calcium bodies and not in the anterior pair (white fill).

V predhodnih raziskavah smo ugotovili, da so bakterije pri vrsti *T. albus* prisotne pri vseh osebkih in s spremljanjem živali v kulturi pokazali, da te ne kažejo bolezenskih znakov in normalno zaključijo levitveni cikel, zato najverjetneje ne gre za patogene bakterije (Vittori in sod. 2012). Podatki o sestavi mineralov v kalcijevih telescih vrste *H. riparius*, pri kateri so prisotna tako kalcijeva telesa z bakterijami kot kalcijeva telesa brez njih, kažejo na udeležnost bakterij v presnovi kalcijevega fosfata. V posteriornih kalcijevih telescih vrste *H. riparius*, v katerih so prisotne bakterije, se namreč kopiči pretežno kalcijev fosfat, medtem ko se v anteriornih kalcijevih telescih, v katerih ni bakterij, kopiči kemijsko razmeroma čist kalcijev karbonat (Ziegler 2003, Vittori in sod. 2013).

O vrstni pestrosti bakterij v kalcijevih telescih *A. roseus* in *H. mengei* težko sodimo. Da je v posameznih kalcijevih telescih prisotna pestra združba bakterij, smo predhodno pokazali pri vrsti *T. albus*. Pri tej vrsti gre za različne vrste bakterij, ki so sicer prisotne v prsti in so zmožne akumulacije polifosfata (Kostanjšek in sod. 2015). To govori v prid predvidevanju, da so bakterije v kalcijevih telescih udeležene v metabolizmu fosfata.

Ultrastruktura kalcijevih telescih, ki vsebujejo bakterije, je precej podobna pri različnih predstavniških družine Trichoniscidae. Enoslojni epitelij, ki tvori steno takšnih kalcijevih telescih, ima apikalno plazmalemo nagubano v prstaste izrastke. Epitelij anteriornih kalcijevih telescih vrste *H. riparius*, ki ne vsebujejo bakterij, nima opazno nagubane apikalne plazmaleme, kar nakazuje na

možnost, da je povečana apikalna površina epitelijskih celic povezana s prisotnostjo bakterij.

Pri vseh preučenihi vrstah je apikalna površina epitelijskih celic prekrita z elektronsko gostim matriksom, ki tvori zunajcelično ovojnico debeline nekaj deset nanometrov in je ultrastrukturno podoben epikutikuli (Vittori in sod. 2013). Predhodne raziskave pri vrsti *H. riparius* so pokazale, da med pripravo na levitev epitelijskih celic goste lamine v lumnu pa so zelo verjetno ovojnice, ki so nastale v predhodnih levitvenih ciklihi (Vittori in sod. 2013).

Povzetek

Kopenski raki enakonožci kopičijo kalcijeve soli med pripravo na levitev v začasnihi depozitih mineralov. Večina kopenskih enakonožcev kopiči CaCO_3 v obliki sternalnih depozitov v prostoru med starim in nastajajočim novim eksoskeletom. Pri predstavnikih družine Trichoniscidae so prisotna kalcijeva telesa kot dodatne strukture, v katerih kopičijo mineral. Te strukture smo predhodno preučili pri jamskem enakonožcu *Titanethes albus* ter pri njegovem površinskem sorodniku *Hyloniscus riparius*. Ugotovili smo, da imata obe vrsti po dva para kalcijevih teles. Gre za epitelne vrečke, ki vsebujejo mineraliziran matriks. Pri *T. albus* so v obeh parih kalcijevih teles prisotne številne bakterije, medtem ko so pri *H. riparius* te prisotne zgolj v posteriornem paru kalcijevih teles, ki vsebuje kalcijev fosfat, ni jih pa v anteriornem paru, ki vsebuje kalcijev karbonat.

V tej raziskavi smo preučili položaj, histološke značilnosti in ultrastrukture kalcijevih teles še dveh predstavnikov družine Trichoniscidae, ki živita v prsti. *Androniscus roseus* je predstavnik poddružine Trichoniscinae, *Haplophthalmus mengei* pa poddružine Haplophthalminae. Tudi pri teh dveh vrstah sta prisotna po dva para kalcijevih teles, ki vsebujejo bakterije. Njihove histološke in ultrastrukturne značilnosti so podobne kot pri kalcijevih telesih *T. albus*. Steno kalcijevih teles tvori enoslojen kubični epitelij, z apikalno površino usmerjeno proti lumnu. Apikalna plazmalema celic epitelijskih celic je nagubana v prstaste izrastke. Apikalno je epitelij prekrit z elektronsko gostim matriksom, ki tvori ovojnico. Bakterije v kalcijevih

telesih so paličaste in napolnjujejo njihov lumen pri obeh vrstah.

Zaključimo lahko, da je prisotnost bakterij najverjetneje splošna značilnost kalcijevih teles družine Trichoniscidae. Bakterije so praviloma prisotne v obeh parih kalcijevih teles, kombinacija para kalcijevih teles z bakterijami in para brez bakterij pa je najverjetneje prisotna le pri predstavnikih rodu *Hyloniscus* ali pri njegovih ožjih sorodnikih. Morebitna funkcija bakterij v kalcijevih telesih še ni znana, verjetno pa so udeležene v metabolizmu fosfata. Epitelij kalcijevih teles, ki vsebuje bakterije, imajo podobne ultrastrukturne značilnosti in nagubano apikalno plazmalemo, kar je lahko povezano z intenzivnim transportom ali izločanjem.

Summary

Terrestrial isopods accumulate calcium minerals in transient mineral deposits during their preparation for molt. In most terrestrial isopods, minerals are accumulated as sternal CaCO_3 deposits in the space between the old exoskeleton and the newly forming one. In representatives of the family Trichoniscidae, calcium bodies are present as additional structures in which mineral is accumulated. These structures have previously been analyzed in the cavernicolous isopod *Titanethes albus* and its epigean relative *Hyloniscus riparius*. It has been established that these species possess two pairs of calcium bodies. These structures are epithelial sacs enclosing a mineralized matrix. In *T. albus*, bacteria are consistently present in both pairs of calcium bodies, whereas in *H. riparius*, they populate only the posterior pair, which contains calcium phosphate, whereas the anterior pair of calcium bodies, which lack bacteria, contains calcium carbonate.

In this work, we analyzed the position, histology and ultrastructure of calcium bodies in two further endogean representatives of the family Trichoniscidae: *Androniscus roseus* (subfamily Trichoniscinae), and *Haplophthalmus mengei* (subfamily Haplophthalminae). These two species also possess two pairs of calcium bodies, all of which contain bacteria. Histologically and ultrastructurally, these structures are similar to those found in *T. albus*. Their walls are formed

by a simple cubic epithelium, the apical side of which faces the lumen containing bacteria. The apical plasma membrane of epithelial cells is folded and forms finger-like extensions. Apically, the epithelium is lined by an electron dense envelope. Bacteria present within the calcium bodies are rod shaped in both species and fill the entire lumen of these structures.

We can conclude that the presence of bacteria is a general feature of calcium bodies in the family Trichoniscidae. Furthermore, bacteria are generally present in both pairs of calcium bodies, making the combination of bacteria-containing and bacteria-free calcium bodies a feature likely unique to *Hyloniscus* and possibly its close rela-

tives. Although the possible function of bacteria in these structures remains unclear, it is likely that they contribute to the metabolism of phosphate. The epithelia of bacteria-containing calcium bodies of all species examined to date share common ultrastructural features, such as a folded apical membrane, which may be linked to the maintenance of a large bacterial population.

Zahvale

Delo je financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije v okviru programa P1-0184.

Literatura

- Kostanjšek, R., Vittori, M., Srot, V., Bußmann, B., van Aken, P.V., Štrus, J., 2015. Phosphate-accumulating bacterial community in calcium bodies of isopod crustacean *Titanethes albus*. In: Abstracts, 12th Multinational Congress on Microscopy, Eger, Hungary, August 23-28, 2015, pp. 430-432.
- Luquet, G., 2012. Biomineralizations: insights and prospects from crustaceans. *Zookeys*, 176, 103-121.
- Méhely, L.V., 1932. Beiträge zur Anatomie der Trichonisciden. *Studia Zoologica* (Budapest), 2, 103-120.
- Richardson, K.C., Jarett, L., Finke, E.H., 1960. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Biotechnic & Histochemistry*, 35, 313-323.
- Schmidt C. 2008. Phylogeny of the terrestrial Isopoda (Oniscidea): a review. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 66, 191-226.
- Štrus J., Blejec A. 2001. Microscopic anatomy of the integument and digestive system during the molt cycle in *Ligia italica* (Oniscidea). In: Kensley, B., Brusca, R.C. (Eds.). *Crustacean Issues* 13, "Isopod systematics and evolution". Rotterdam, A.A. Balkema Publishers, pp. 343-352.
- Vittori, M., Kostanjšek, R., Židaršič, N., Štrus, J., 2012a. Molting and cuticle deposition in the subterranean trichoniscid *Titanethes albus* (Crustacea, Isopoda). *Zookeys*, 176, 23-38.
- Vittori, M., Kostanjšek, R., Žnidaršič, N., Žagar, K., Čeh, M., Štrus, J., 2012b. Calcium bodies of *Titanethes albus* (Crustacea: Isopoda): Molt-related structural dynamics and calcified matrix-associated bacteria. *Journal of Structural Biology*, 180, 216-225.
- Vittori, M., Rozman, A., Grdadolnik, J., Novak, U., Štrus, J., 2013. Mineral deposition in bacteria-filled and bacteria-free calcium bodies in the crustacean *Hyloniscus riparius* (Isopoda: Oniscidea). *PLoS One*, 8, e58968.
- Verhoeff, K.W., 1926. Ueber Isopoden der Balkanhalbinsel, gesammelt von Herrn D-r I. Buresch. Zugleich 31. Isopoden-Aufsatz. Mitteilungen der Bulgarischen Entomologischen Gesellschaft in Sofia, 3, 135-158.
- Zidar, P., Drobne, D., Štrus, J., 1998. Determination of moult stages of *Porcellio scaber* (Isopoda) for routine use. *Crustaceana*, 71, 646-654.
- Ziegler, A., 2003. Variations of calcium deposition in terrestrial isopods. In: Sfenthourakis, S., de Araujo, P.B., Hornung, E., Schmalfuss, H., Taiti, S., Szlavecz, K. (Eds.). *The Biology of Terrestrial Isopods V*. Leiden, Koninklijke Brill NV, pp. 299-309.
- Ziegler, A., Fabritius, H., Hagedorn, M., 2005. Microscopical and functional aspects of calcium-transport and deposition in terrestrial isopods. *Micron*, 36, 137-153.