*Entomologie heute 21 (2009): 101-126*

# Ein neuer Ansatz zur Erfassung der mit Insekten assoziierten bakteriellen Gemeinschaften am Beispiel der Ameisenakazien Mexikos

## A New Approach to Assess the Biodiversity of Bacterial Communities Associated to Insects as Acacias-Ants of Mexico

SASCHA EILMUS

**Zusammenfassung:** Eine Variante der tRFLP-Methode unter Nutzung des Computerprogramms TReFID wurde eingesetzt, um die Diversität der mit drei Arten der Ameisengattung *Pseudomyrmex* aus Südmexiko assoziierten Bakterien zu analysieren. Diese drei Arten repräsentieren unterschiedliche Lebensweisen: mutualistische Pflanzenameise, opportunistischer Ameisenpflanzenparasit und generalistische Ameise. Ferner wurden alternative mikrobiologische Verfahren (Klonierung und Kultivierung) mit der tRFLP-Methode verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die mit den Ameisen assoziierte Bakteriengemeinschaft sehr viel diverser war, als bisherige Untersuchungen an anderen verwandten Ameisengattungen dies hätte vermuten lassen. Dabei dominieren die α-, β- und γ-Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, Sphingobacteria, Bacilli, Clostridia, Flavobacteria und Bacteroidetes, die 90 % der Diversität der tRF-Muster darstellen. Zudem ähnelt die bakterielle Gemeinschaft sehr jener von Termiten. Da es sich bei der Biozönose des Termitendarms um eine Anpassung an defizitäre, einseitige Kost (Cellulose) handelt, kann vermutet werden, dass eine derartige Funktion auch bei den Ameisen vorliegt. Es konnten viele Mikroorganismen nachgewiesen werden, die auf fermentative Prozesse und N-Recycling im Darm der Ameisen schließen lassen.

**Schlüsselwörter:** Bakterien, tRFLP, TReFID, Ameisen, Akazien, *Pseudomyrmex*

**Summary:** *In silico* analysis of terminal restriction fragments (tRF) of fluorochrome-labelled PCR products utilising the assignment tool TReFID was used for the gross characterization of the bacterial community in workers and larvae of *Pseudomyrmex salvini* (generalist), *P. gracilis* (parasite) and *P. ferrugineus* (mutualist). The presence of members of different bacterial genera was independently confirmed via PCR and cultivation approaches. The bacterial community associated with *Pseudomyrmex* turned out to be much more diverse than expected based on earlier studies on related ants. All tree ant species were dominated by α-, β- and γ-Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, Sphingobacteria, Bacilli, Clostridia, Flavobacteria and Bacteroidetes, which display 90 % of tRF pattern diversity. The community structure is similar to the prokaryotic community of the termite hindgut which is an adaptation to a highly specialised diet. This similarity might indicate an adaptation to a deficient diet for the investigated ants. Several of the bacteria identified in the present study might play role in fermentation and N-recycling processes in the insect gut.

**Keywords:** bacteria, tRFLP, TReFID, ants, acacia, *Pseudomyrmex*

## 1. Einleitung

Der Ameisengattung *Pseudomyrmex* (Lund, 1831) gehören zahlreiche Baum bewohnende Arten an, die z. T. unabhängig voneinander enge Mutualismen mit verschiedenen myrmekophytischen Pflanzen eingegangen sind. Dabei verteidigen die Ameisen ihre Wirtspflanze gegen Fraßfeinde. Innerhalb dieser Gruppe gibt es Generalisten mit brei-

tem Nahrungsspektrum (CLEMENT et al. 2008; EILMUS 2008; KAUTZ et al. 2009) sowie hoch spezialisierte Pflanzenameisen mit rein pflanzlicher Ernährungsweise (CLEMENT et al. 2008). Oftmals liegt der Schlüssel zum Verständnis spezialisierter phytophager Insekten in ihrem Mutualismus zu Mikroorganismen, die ihnen helfen, die Nahrung zu verdauen und sie durch Syntheseleistungen mit essenziellen Nährstoffen wie Aminosäuren und Sekundärstoffen wie z. B. Vitaminen anzureichern (JANSON et al. 2008). Es ist daher möglich, dass es symbiotische Bakterien sind, die es ursprünglich räuberischen und generalistischen Ameisen ermöglicht haben, hoch spezialisierte Vegetarier zu werden. In der vorliegenden Arbeit wird die Diversität der Mikroorganismen-Population, die in Assoziation mit Ameisen der Gattung *Pseudomyrmex* im Süden Mexikos lebt, mit überwiegend molekularbiologischen Methoden untersucht.

**Interaktionen von Ameisen und Akazien**

Interaktionen zwischen Ameisen und Pflanzen, die zum indirekten Schutz der Pflanzen gegenüber Herbivoren und Pathogenen führen sind in tropischen und subtropischen Regionen verbreitet. Als echte Ameisenpflanzen (Myrmekophyten) bezeichnet man Pflanzen, die dauerhaft mit Ameisen assoziiert leben. Solche Pflanzen bieten den Ameisen spezielle Wohnkammern (Domatien) an, die bei Vertretern verschiedener Pflanzenfamilien aus ganz unterschiedlichen Organen hervorgegangen sein können. Die Myrmekophyten lassen sich wiederum in zwei Gruppen aufteilen, deren Lebensweise man als Myrmekotrophie und Myrmekophylaxis bezeichnet. Myrmekotrophe Pflanzen bieten den Ameisen Wohnraum, um aus den Wohnkammern Nährsalze und Wasser (aus Kot und anderem Unrat der Ameisen) zu resorbieren. Bei der Myrmekophylaxis handelt es sich um einen Mutualismus zwischen Ameise und Pflanze, bei dem die Pflanze Wohnraum und gegebenenfalls auch Futter liefert, um im Gegenzug permanent durch die Ameisen gegen Herbivore und/oder Konkurrenzvegetation geschützt zu sein (BROWN 1960). Die Pflanze bietet also Ressourcen und erfährt im Gegenzug durch die Ameisen eine Dienstleistung (Verteidigung). Bei den Ameisenakazien (*Acacia* spp. u. a.) sind die Stipulardornen stark vergrößert, langlebig, später verholzt und mit einem schwammigen Mark gefüllt. Nahe der Spitze des Dorns existiert eine dünnwandige Stelle, durch die die Ameisen den Dorn besiedeln können. Viele dieser Myrmekophyten weisen extraflorale Nektarien auf, an denen die Ameisen zucker- und aminosäurehaltigen Nektar ernten können. Eine Besonderheit einiger *Acacia*-Myrmekophyten (Abb. 1) stellen nahrhafte (protein- und lipidhaltige) Futterkörperchen dar, welche bei als Beltsche-Körperchen bezeichnet werden (BELT 1874; RICKSON 1971, 1980). Für die jeweils assoziierten Ameisenarten stellen diese Futterkörperchen die hauptsächliche, mitunter sogar alleinige Nahrung der Larven dar (HEIL et al. 1998; CLEMENT et al. 2008).

**Interaktionen von Ameisen und Bakterien**

Bislang sind erst wenige Symbiosen zwischen Ameisen und Bakterien untersucht worden. Dabei handelt es sich meist um sehr spezielle Interaktionen, wie etwa bei den intrazellularen Symbionten *Wolbachia* . bei *Formica* spp. (WENSELEERS et al. 2002) und Vertretern anderer Ameisengattungen (WENSELEERS et al. 1998; VAN BORM et al. 2001), den intrazellularen Symbionten *Blochmannia* bei *Camponotus* spp. (Roßameisen) (SAUER et al. 2000, 2002) und die Ektosymbiose von bestimmten Actinomyceten mit Pilz kultivierenden neotropischen Ameisen (Attini) (CURRIE et al. 1999; BOURSAUX-EUDE & GROSS 2000). *Blochmannia* sp. (Enterobacteriaceae) scheint dem Wirt vornehmlich als Stickstoff-Recycler und als Produzent essenzieller Aminosäuren zu dienen (GAUDERMANN et al. 2006; ZIENTZ et al. 2006; FELDHAAR et al. 2007). Wie Genomanalysen zeigten, hat das Bakterium die Fähigkeit ein-

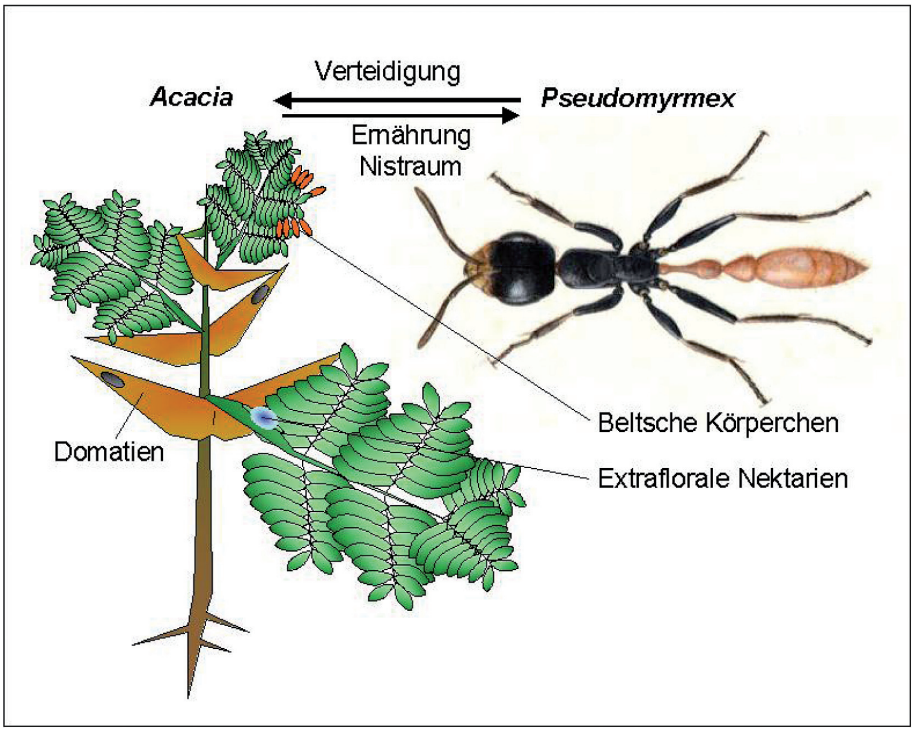


**Abb. 1:** Abb. 1: Ameise-Akazie-Mutualismus. Einige *Pseudomyrmex*-Arten bewohnen myrmekophytische Akazien als obligate Mutualisten. Die Ameisenpflanze (hier das Beispiel *Acacia*) bietet den Ameisen Wohnraum (Domatium = hohle Stipulardornen) und Futter in Form von EFN (extrafloraler Nektar an Nektardrüsen des Blattstiels) und lipid- sowie proteinreiche Futterkörperchen (Beltsche-Körperchen ). Die Ameisen verteidigen im Gegenzug „ihre" Ameisenpflanze gegen Fraßfeinde der Pflanze.

**Fig. 1:** Some *Pseudomyrmex* species obligatorily inhabit *Acacia* myrmecophytes from which they receive nesting space (hollow stipular thorns) and food rewards in exchange for defence from herbivores. These poisonous stinging ants feed exclusively on the plant-derived food rewards, extrafloral nectar and cellular food bodies (Beltian bodies). In return, the ants defend "their" ant plant against the plant's natural enemies.

gebüßt, viele (für Tiere) nicht-essenzielle Aminosäuren zu produzieren und ist im Hinblick auf diese Aminosäuren auf die Versorgung durch den Wirt angewiesen. Dementsprechend ist *Blochmannia* sp.nicht mehr in der Lage, außerhalb einer Wirtszelle zu leben, geschweige denn, sich außerhalb des Wirtes zu reproduzieren (Zientz et al. 2004, 2005). Zumindest bei *Wolbachia* sp. gibt es jedoch Hinweise für einen horizontalen Transfer des Symbionten auf neue Wirte (Wenseleers et al. 2002; Hilgenboecker et al. 2008).

In den letzten Jahren intensiver untersucht wurde der Mutualismus zwischen Pilz züchtenden Ameisen (Attini) und ektosymbiotischen Actinomyceten (Cafaro & Currie 2005). Diese Actinomyceten sollen Antimikrobia produzieren, die die Pilzkulturen der Ameisen von Kontaminationen frei halten (Currie et al. 1999; Zhang et al. 2007; Little & Currie 2007, 2008).

Die vorliegende Arbeit befasst sich insbesondere mit den schon frühzeitig beschriebenen myrmekophytischen Arten der Gattung *Acacia* aus dem Süden Mexikos und den damit

assoziierten Ameisen der Gattung *Pseudomyrmex* (Lund, 1831) (BELT 1874; JANZEN 1966, 1967, 1974). Der Schwerpunkt lag dabei auf der obligaten mutualistischen Akazienameise *P. ferrugineus* (Smith, 1877), der auf *Acacia* spp. fakultativ parasitischen *P. gracilis* (Fabricius, 1804) und der nahe verwandten, aber nicht mit Ameisenpflanzen assoziierten *P. salvini* (Forel, 1899). Diese drei Arten repräsentieren die drei wesentlichen Lebensweisen der mexikanischen *Pseudomyrmex*-Ameisen und einen scheinbaren evolutiven Trend der Vertreter der Gattung, sich von Omnivorie (generalistische Ameisen) zur hoch spezialisierten Phytophagie (Akazien-Ameisen) zu entwickeln (WARD & DOWNIE 2005).

Es stellt sich daher die Frage, wie es einer ursprünglich generalistischen Ameise, die auch tierische Kost zu sich nimmt, möglich war, sich derartig zu spezialisieren. Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Vermutung, dass Bakterien einen entscheidenden Einfluss auf die Spezialisierung der Akazienameisen hatten, führte zu einer intensiven Untersuchung der mit den Ameisen assoziierten Bakteriengemeinschaften mit z. T. neuartigen Methoden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Probennahme: Ameisen und deren Larven

Die Probenahme erfolgte von August bis einschließlich Oktober 2007 während des Feldaufenthalts in Mexiko, Bundesstaat Oaxaca in der Umgebung der Stadt Puerto Escondido. Besammelt wurden Kolonien von *Pseudomyrmex ferrugineus* (F. Smith, 1877), *P. gracilis* (Fabricius, 1804). *P. salvini* (Forel, 1899) wurde am Rande der Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (Estación de Biología Tropical de la UNAM; Volcáno San Martin; Universidad Nacional Autónoma de México), Bundesstaat Veracruz, gesammelt. Die Kultivierung im Labor erfolgte nach der für *P. salvini* beschriebenen Methode (EILMUS 2008).

### 2.2. Experimentelle Grundlagen

Die Gesamt-DNA konnte mit Hilfe handelsüblicher *Kits* aus den Proben (Ameisen und Larven) aufreinigt bzw. isoliert werden (Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit, Qiagen Str. 1, Hilden; MoBio UltraClean™ microbial DNA Isolation Kit und MoBio UltraClean™ Soil DNA Kit, Mo Bio Laboratories Inc., Carlsbad, USA). Zunächst konnten über eine PCR mittels genspezifischer Primer für 16S rDNA entsprechende Zielgene amplifiziert werden.

Zur Anwendung kam hauptsächlich eine tRFLP-Methode (terminaler Restriktionsfragmente-Längen-Polymorphismus) unter Verwendung des Programms TReFID (RÖSCH & BOTHE 2005). Mit dieser Methode ist es möglich, einen sehr großen Ausschnitt der Bakterienflora eines beliebigen Biotops binnen verhältnismäßig kurzer Zeit zur identifizieren. Hierbei wurden mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markierte Primer für eine PCR mit den jeweiligen aus dem Biotop isolierten DNA-Proben verwendet. Danach erfolgte ein Verdau mit bis zu 13 verschiedenen Restriktionsenzymen für jede Probe. Dabei blieb jeweils ein Stück (das terminale Restriktionsfragment = tRF) mit dem markierten Primer zurück, dessen Länge davon abhängt, wann nach dem Primer die erste Restriktionsstelle für das jeweils verwendete Restriktionsenzym auftritt. Da sich das 16S rRNA-Gen der verschiedenen Bakterienribotypen voneinander unterscheidet, kann angenommen werden, dass unterschiedliche Restriktionsschnittstellen (häufig kurze Palindrome) vorliegen. Beim Auftrennen im Gel oder Kapillarsequenzierer werden also diese markierten, terminalen Restriktionsfragmente detektiert, deren Länge nun anhand eines ebenfalls aufgetragenen Standards mit einem Computerprogramm innerhalb eines Bereichs von 500 bp nach dem Primer bis auf eine Base genau bestimmt werden kann. Bekannte Sequenzen vieler verschiedener Bakterien in Datenbanken konnten auf ihre Restriktionsstellen hin untersucht bzw.

abgesucht werden. Somit war es möglich, die theoretische Länge eines Restriktionsfragmentes - beispielsweise des 16S-rRNA-Gens - einer bestimmten Bakterienart unter Verwendung eines bestimmten Restriktionsenzyms rekonstruiert werden. Mit Hilfe dieser Schablonen konnten die in den Proben auftretenden Fragmentmuster den Datenbankeinträgen zugeordnet werden. Um eine gewisse Sicherheit bei der Bestimmung bis auf Gattungsniveau zu erlangen, werden 13 Restriktionsenzyme verwendet, deren Eignung empirisch und unter Berücksichtigung der bekannten Sequenzen eingeschätzt werden kann. Das Programm TReFID vergleicht die Größen aller auftretenden Fragmente mit der Datenbank und erstellt eine Ergebnistabelle, in der die identifizierten Bakteriengruppen und Trefferwerte (Wahrscheinlichkeiten) aufgeführt werden, die eine Beurteilung der Qualität der Identifikation erlauben.

## 2.3. Datenauswertung mittels Computerprogrammen

### 2.3.1. Auswertung der Sequenzdaten mit Computerprogrammen

Die Bestimmung nicht näher klassifizierte Datenbank-Sequenzen erfolgte über eine Blast-Suche bei GenBank (NCBI; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) und zusätzlich mit einem Online-Applikation, dem Database Project II (http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp) (Wang et al. 2007).

### 2.3.2. TReFID-Software

Das Ergebnis der t-RFLP-Auswertung durch das halbautomatische Programm ® 3.1.2 (Applied Biosystems) war für jedes Enzym (Restriktionsansatz) eine Tabelle, in der alle auftretenden . h. Signale, aufgeführt wurden. Dabei repräsentiert jedes Signal ein terminales Restriktionsfragment (t-RF), dessen Größe durch eine Eichgerade ermittelt wird. Diese Tabellen dienen als Datengrundlage für die Analyse mit TReFID (Terminal Restriction Fragment Identifying Program). TReFID ist ein zur automatischen Analyse von t-RFLP-Daten entwickeltes Programm (Rösch & Bothe 2005). Abbildung 2 illustriert Funktions- und Vorgehensweise der Analyse. Bei 13 verschiedenen Restriktionsenzymen hat jeder Ribotyp ein unverwechselbares t-RF-Längenmuster (vergleichbar einem "Fingerabdruck"). Daher ermöglicht das Programm eine Zuordnung der t-RF zu allen nah verwandten Datenbankeinträgen (d. h. bekannten Mikroorganismen oder Sequenzdaten aus Umweltproben der NCBI-Datenbank). Das Programm vergleicht also die auftretenden t-RF-Längen mit den virtuell geschnittenen Datenbanksequenzen. Das Programm TReFID steht in der stets aktuellen Version unter www.trefid.net zur freien Verfügung.

### 2.3.3. Bearbeitung und Aktualisierung der TReFID Referenzdatenbank

Hierbei kamen die Hilfsprogramme (in TReFID enthalten) und PrimerSearch (beide von C. Rösch, Universität zu Köln, entwickelte Hilfsprogramme) zum Einsatz. Bei der Aktualisierung und Erstellung der TReFID-Datenbank wurde folgendermaßen verfahren: Die für die Datenbank gewünschten Einträge wurden bei NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) als Genbank-file (gb) herunter geladen. Dieses Format konnte mit GBSD geöffnet und begutachtet werden. GBSD dient der Verwaltung der Datenbanken. Mit dem Programm können Einträge gelesen, bearbeitet, tRF-Längen prognostiziert und Datenbankeinträge in andere Formate (txt, FASTA oder TReFID.org) umgewandelt werden. Die Einträge wurden anschließend als TReFID-Format (eine TReFID.org-Datei) gespeichert. Nun wurde das Hilfsprogramm PimerSearch geöffnet. PimerSearch sucht selektiv nach Primerbereichen in der Sequenz des Datenbankeintrags. Neben einigen Primern, die dem Benutzer zur Auswahl stehen, kann auch jede beliebige Pimersequenz manuell einge-

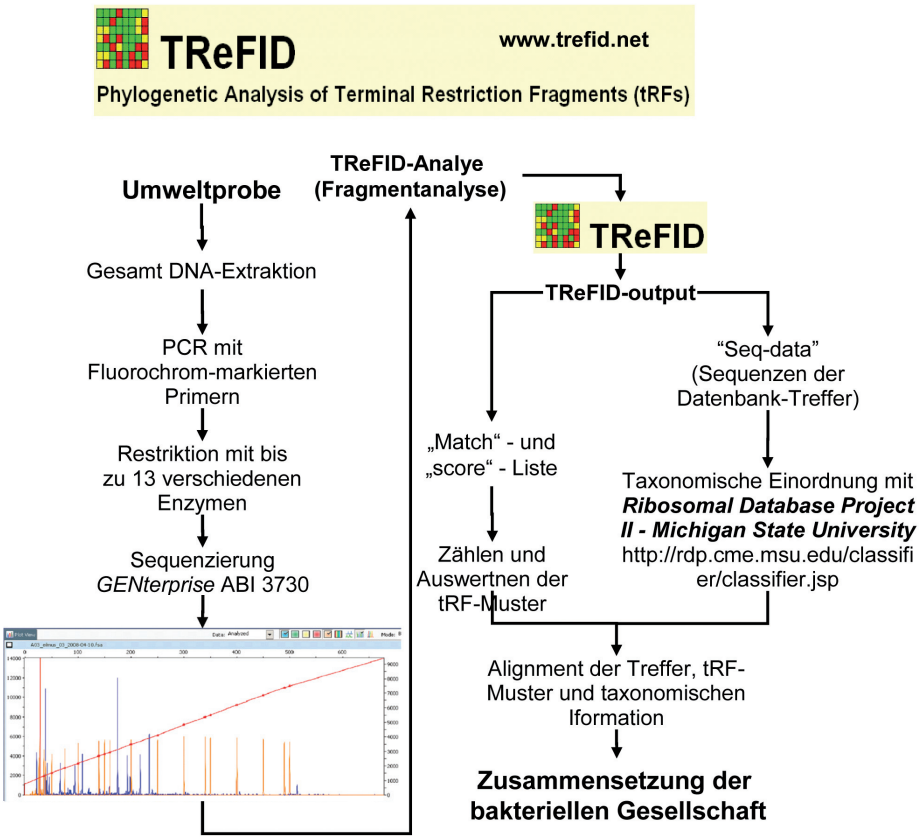


**Abb. 2**: Arbeitsschritte der tRFLP-Analyse mit TReFID. Nach der Gesamt-DNA-Extraktion und der PCR mit fluorochrom-markiertem Primern werden die Amplifikate einem Restriktionsverdau mit 13 verschiedenen Enzymen in 13 separaten Ansätzen unterzogen. Es erfolgt das „Imaging“ z. B. mit einem ABI-Sequenzierautomaten (Kapillarsequenzierer oder Gelsequenzierer) und die anschließende Bestimmung der Fragmentgrößen mit Hilfe des Größenstandards und der jeweiligen Gerätesoftware. Die Daten der Fragmentgrößenbestimmung können einer TReFID-Analyse unterzogen werden. Das Ergebnis („output“) der Analyse wird als „match- und score“-Liste und als Textdatei ausgegeben, die alle Referenzsequenzen der Treffer-Liste beinhaltet. Da stets auch viele taxonomisch nicht oder nicht richtig eingeordnete Sequenzdaten in der Datenbank (basiert auf der NCBI-Datenbank) enthalten sind, können diese mit Hilfe des Database Project II abgeglichen werden (WANG al. 2007).

**Fig 2:** tRFLP analysis with TReFID. TReFID applies *in silico* analysis of terminal restriction fragments (tRF) obtained from digestions of fluorochrome-labelled PCR products (16S rDNA) with multiple restriction enzymes and allows the gross characterization of bacterial life in any complex bacterial community. The fluorochrome labeled PCR products were purified and partitioned, and aliquots were subjected to restriction digests using up to 13 different enzymes in parallel. Fragment size analysis was performed with an ABI 3730 instrument and afterwards analysed with TReFID. All detected patterns of restriction fragments were compared to all entries of the TReFID database. Matches (available as match- and score lists) of doubtful taxonomic classification have been checked with the online tool Ribosomal Database Project II (WANG et al. 2007).

geben werden. Ferner lässt sich eine „maximum number of primer mismatches to template sequences“ zwischen 0 und 9 festlegen. Dies erlaubt eine Erhöhung oder Absenkung der Treffergenauigkeit. Nach der Festlegung des gewünschten Primers und der „primer mismatch number“ kann die zu bearbeitende Datei gesucht und der Suchvorgang gestartet werden. Dabei generierte das Programm eine txt-Tabelle, die für die weitere Bearbeitung notwendig war. Die TReFID.org-Datei wurde nun erneut mit GBSD geöffnet und über Optionen Import table wurde die zuvor von PrimerSearch erstellte txt-Tabellen-Datei geladen. Nun wurden die Datenbankeinträge mit dem Ergebnis der PrimerSearch verglichen und die resultierende Tabelle konnte erneut gespeichert werden. Diese Datei wurde nun abermals mit GBSD geöffnet und über Optionen Length konnten die tRF-Längen für die verbliebenen Datenbankeinträge kalkuliert werden. Die Tabelle wurde nun wieder als TReFID.org-Datei gespeichert und konnte nun entweder als Datenbank in TReFID geladen werden, oder an eine bestehende TReFID-Datenbank über GBSD angehangen werden.

**Begriffsdefinitionen: Referenzdatenbank (TReFID-Datenbank):** Datenbank mit derzeit 22.239 Einträgen von Bakterien- und Archaeen-16S rRNA-Gen-Sequenzen der GenBank (NCBI) mit allen dazugehörigen Informationen. Zusätzlich beinhalten die Einträge zur Kalkulation mit TReFID die ausgehend von der Sequenz kalkulierten tRF-Muster (siehe folgende Definition).

**tRF-Muster (*tRF pattern*):** Jede Datenbanksequenz lässt sich durch einen Datensatz aus Restriktionsenzymen und zugehörigen tRFs beschreiben. Diese tRF-Längen entstehen durch unterschiedliche Schnittstellen der eingesetzten Restriktionsenzyme. Dabei können ähnliche Sequenzen (relative Verwandschaft) das gleiche tRF-Muster ergeben, besonders bei der Betrachtung weniger Enzyme. Die Auswertung von TReFID-Ergebnislisten erfolgte auf der Basis von tRF-Mustern und nicht nur Treffern).

**Treffer (*hit, score*):** Eintrag in der TReFID-Ergebnisliste mit Angaben zum Übereinstimmungsgrad des detektierten Musters mit dem Datenbankeintrag, taxonomischen Daten zum Treffer sofern bekannt, Angaben zu dazugehörigen tRF-Muster und allen Informationen einschließlich Sequenz des GenBank-datenbankeintrags bei NCBI.

Weitere Informationen sind den Originalveröffentlichungen (Rösch & Bothe 2005; Eilmus et al. 2007) und der HP: http://www.trefid.net/ zu entnehmen.

### 2.4. Statistik

Für statistische Untersuchungen wurdeStatistica 6 (Statsoft) verwandt. Wegen der sehr unterschiedlichen Stichprobenzahlen wurde in erster Linie der nichtparameterischeMann-Whitney U-Test genutzt. Wurden prozentuale Werte zweier Verteilungen statistisch miteinander verglichen, wurden diese Werte arcsin-transformiert (Wert/100, dann quadratische Wurzel, anschließend arcsin-Transformation) (Hogg & Craig 1995; Zar 1996). Diese Bearbeitung erfolgte in Microsoft Excel. Die statistischen Angabe erfolgen als p-Werte, wobei $p < 0{,}05$ = schwachsignifikant, $p < 0{,}001$ = signifikant, $p < 0{,}0001$ = hochsignifikant mit Angabe der dazugehörigen Wiederholungen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Überprüfung von TReFID

Die ursprünglich 17.462 Einträge zählende 16S rDNA Datenbank (Einträge = Referenzsequenz eines bekannten Bakteriums oder Umweltbakteriums mit prognostiziertem Restriktionsmuster und allen verfügbaren Informationen der Datenbank) wurde für diese Studie auf 22.239 Einträge erweitert . Alle Einstellungen des Programms entsprachen den Grundeinstellungen (bei 13 Enzymen waren neun prognostizierte Fragmente notwendig, um einen Treffer in die Ergebnisliste aufzunehmen; es wurde nach Her-

stellerangaben von einem Fehler von ± 0,5 % bei der Größenbestimmung der Fragmente mit Scanner v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA) ausgegangen .

Insbesondere zur Überprüfung der deutlich aufgestockten Datenbank (s. o.) wurden Fragmentdatensätze einer künstlichen Mischung von *Escherichia coli*, *Azospirillum brasilense* und *Rhizobium leguminosarum* unter unterschiedlichen Programmeinstellungen analysiert. Bei der Grundeinstellung (13 Fragment-Einzeldatensätze) wurden nur solche Datenbankeinträge als nachgewiesen eingestuft, welche zumindest zehn der 13 prognostizierten terminalen Fragmente aufwiesen. Unter diesen Bedingungen konnten für die künstliche Fragmentmischung 121 tRF-Muster detektiert werden, von denen 71 Muster den Enterobacteriaceae (und zwar der nächsten Verwandtschaft von *E. coli*), 41 Muster den Rhizobiaceae (*R. leguminosarum*) und drei Muster den Rhodospirillaceae (*A. brasiliense*) zugeordnet werden konnten. Sechs Muster konnten lediglich den Rhizobiales zugerechnet werden.

Abbildung 3 illustriert die verschiedenen Resultate der TReFID-Analyse bei unterschiedlichen Programmeinstellungen (Anzahl prognostizierter tRF-Muster in Relation zur Enzymzahl). Eine Fokussierung auf zunehmend niedrigerer taxonomischer Ebene wurde mit zunehmender Enzymzahl und dadurch abnehmender Fehlidentifizierungen (Abb. 4) deutlich. Anteil der tRF-Muster, die anderen Ordnungen als denen der drei Bakterienstämmen (*A. brasiliense*, *E. coli*, *R. leguminosarum*) zugeordnet wurden, betrug bei bis vier verschiedenen Enzymen knapp 20 % der Treffer und verringerte sich auf knapp 4 % bei elf und zwölf verschiedenen Enzymen. Die Überprüfung führte dazu, dass für die weitere Auswertung aller Daten nur solche Taxa als für die Probe identifiziert galten, wenn zumindest fünf unabhängige tRF-Muster die Anwesenheit in der Probe bestätigen. Zudem wurden Datenbankeinträge von (ungewöhnlichen, seltenen) Bakteriengruppen, die nur mit wenigen Mustern repräsentiert wurden, taxonomisch überprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass z. B. auf Gattungsniveau die Enterobacteriaceae mit tRF-Daten allein nur schwer voneinander zu unterscheiden waren. So wiesen die Gattungen *Escherichia* und *Salmonella* viele identische tRF-Muster auf. Daher werden Aussagen zur Diversität nur auf tRF-Muster bezogen. Vertreter bestimmter Gattungen wurden nur dann als in der Probe vorhanden aufgefasst, wenn spezifische Muster, die auf die Gegenwart der Vertreter einer bestimmten Gattung hinweisen, wiederholt auftraten. Auf der Ebene von Ribotypen (Arten) kann keine Aussage getroffen werden.

### 3.2. Mit Ameisen assoziierte Bakterien

Es konnten mit der tRFLP-Methode und TReFID tRF-Muster von 30 mikrobiellen Klassen in den Proben nachgewiesen werden (Acidobacteria, Actinobacteria, α-Proteobacteria, Anaerolineae, Aquificae, Bacilli, Bacteroidetes, β-Proteobacteria, Chlorobia, Chloroflexi, Clostridia, Cyanobacteria, Deferribacteres, Deinococci, δ-Proteobacteria, ε-Proteobacteria, Flavobacteria, Fusobacteria, γ-Proteobacteria, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Mollicutes, Nitrospira, Planctomycetacia, Sphingobacteria, Spirochaetes, Thermoprotei, Thermotogae, TM7, Verrucomicrobiae) (EILMUS & HEIL 2009). Acht Divisionen vereinten im Durchschnitt über 90 % aller tRF-Muster auf sich (EILMUS & HEIL 2009). Diese Divisionen waren Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria und Spirochaetes. Alleine vier Divisionen Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria und Actinobacteria machten einen Anteil von durchschnittlich 83 % der Gesamtdiversität aus (Anzahl unterschiedlicher tRF-Muster).

Die quantitative Verteilung der tRF-Muster bei Larven und Arbeiterinnen aller Arten war sehr ähnlich und zeigte nur in wenigen Fällen signi-

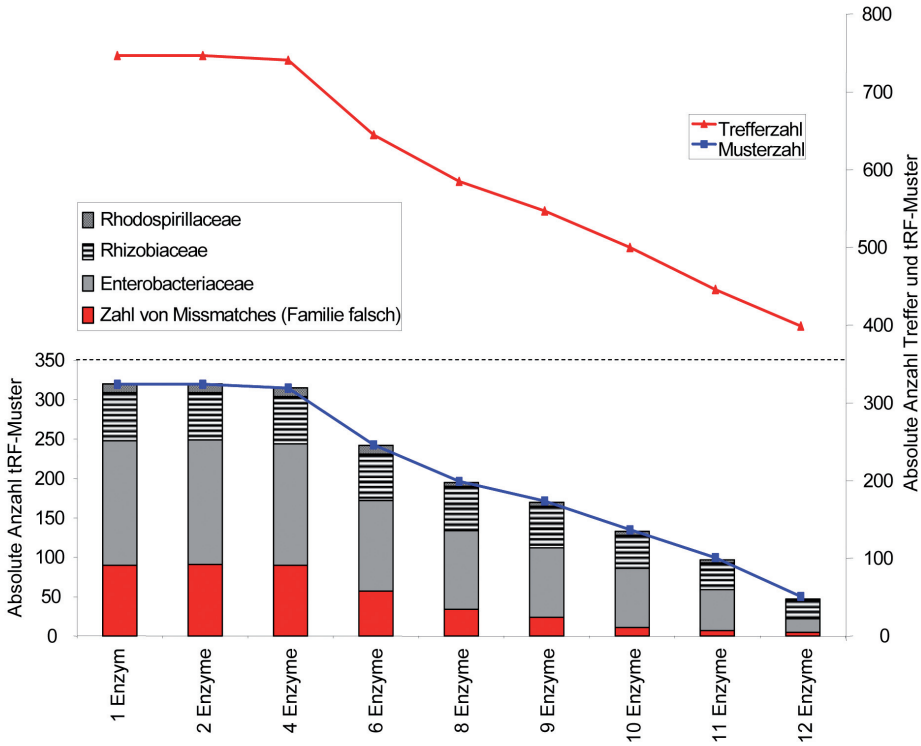


**Abb. 3:** Verhältnis von irrtümlich identifizierten Taxa zur Anzahl der verwendeten Enzyme und zur absoluten Anzahl von Treffern und tRF-Mustern. Analysiert wurde eine künstlich zusammengestellte Probe aus *Escherichia coli, Rhizobium leguminosarum* und *Azospirillum brasiliense*. Mit zunehmender Anzahl von Restriktionsenzymen, die für die Analyse eingesetzt werden, wird das Ergebnis zunehmend fokussiert; die Anzahl verschiedener Treffer (Bakterien der Datenbank, die der Probe zugeordnet werden) sowie die zu Grunde liegende tRF-Muster-Anzahl nehmen ab. Bei 12 Enzymen wurden noch 47 tRF-Muster identifiziert: 17 tRF-Muster für Enterobacteriaceae (*E. coli*), 27 tRF-Muster für Rhizobiaceae (*R. leguminosarum*), 1 tRF-Muster für Rhodospirillaceae (*A. brasiliense*).
**Fig. 3:** Proportion of erroneously detected taxa relative to the number of enzymes utilised for the analysis ant to the number of matches and tRF pattern. An artificial mixture of *Escherichia coli, Rhizobium leguminosarum* and *Azospirillum brasiliense* has been analysed. With increasing number of restriction enzymes the analysis becomes more and more focused: The number of matches and tRF pattern decreases. Using the data set of 12 enzymes, 47 tRF pattern still have been found by TReFID. 17 patterns for Enterobacteriaceae (*E. coli*), 27 tRF pattern for Rhizobiaceae (*R. leguminosarum*) and 1 tRF pattern for Rhodospirillaceae (*A. brasiliense*).

fikante Unterschiede. Deutliche Unterschiede zeigten sich in der Zahl detektierter tRF-Muster: Die durchschnittliche Musterzahl bei *P. gracilis* lag im Falle der Arbeiterinnen bei 144 (± 92) und bei den Larven um 220 (± 144). *P. salvini* kam auf durchschnittlich 463 (± 63) und 472 (± 246) für Larven und Arbeiterinnen. Die Diversität unterschiedlicher tRF-Muster war bei *P. ferrugineus* mit im Schnitt 3.379 (± 2.000) Muster bei Larven und 3260 (± 2000) Muster bei Arbeiterinnen signifikant höher als bei *P. salvini* und *P. gracilis* (Abb. 5; Mann-Whitney U-Test: *P. gracilis* gegen *P. ferrugineus*: $p<0{,}001$; *P. salvini* gegen *P. ferrugineus*: $p<0{,}05$; *P. gracilis* gegen *P. salvini*: $p< 0{,}01$; *P. salvini*: $n = 6$; *P. gracilis*: $n = 5$; *P. ferrugineus*: $n = 7$). Die

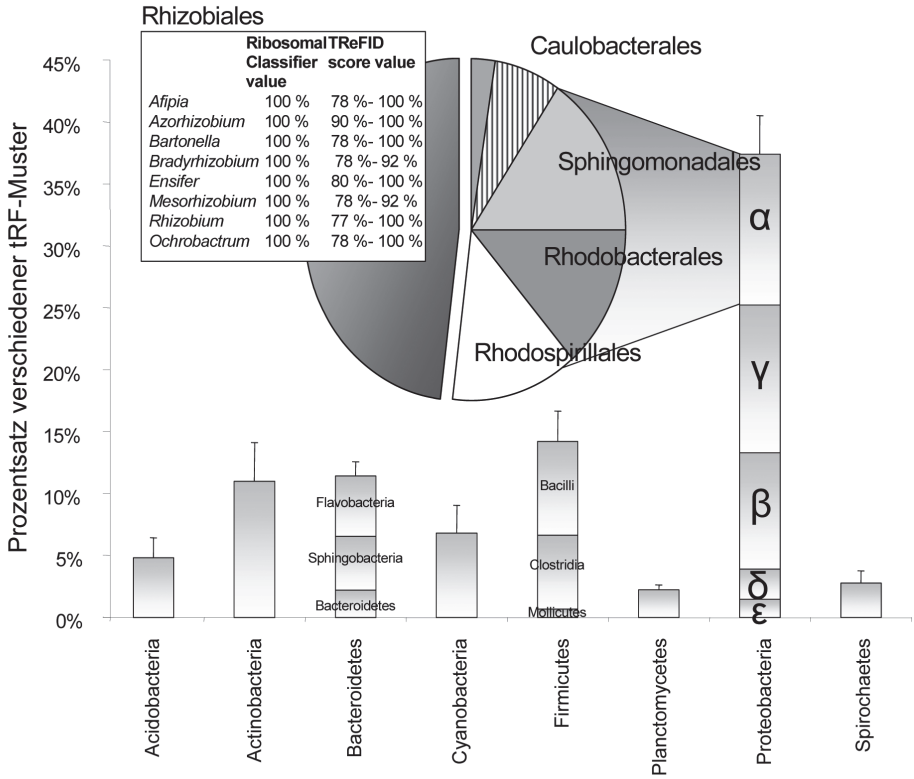


**Abb. 4:** Auswertung von tRFLP-Daten mit TReFID. Das Schema illustriert die Auswertungs- und Fokussierungsmöglichkeiten von tRFLP-Auswertungen. Von den großen taxonomischen Einheiten wie Divisonen und Klassen ausgehend, kann bis in den Bereich der Ordnungen, Familien und Gattungen fokussiert werden (es sind die angegeben, die 90 % der Gesamtdiversität ausmachen). Die Abbildung illustriert Ergebnisse der Analyse der Bakteriengemeinschaft von *P. ferrugineus* (EILMUS & HEIL 2009).

**Fig. 4:** Example of a TReFID analysis**.** With tRF-pattern data it is possible to focus on diversity from the ranks of high taxonomic levels like divisions and classes down to the ranks of orders, families and genera (only those groups are shown, which comprise 90 % of tRF pattern diversity). This example shows results of an analysis of the bacterial community of *P. ferrugineus* (EILMUS & HEIL 2009).

Diversität unterschiedlicher tRF-Muster erscheint also bei *P. ferrugineus* deutlich größer als bei *P. salvini* und *P. gracilis* (Abb. 5).

Die bakterielle Gemeinschaft der drei Ameisenarten wurde stark durch Proteobakterien geprägt, die bei *P. ferrugineus* 51 %, bei *P. gracilis* 61 % und bei *P. salvini* 73 % aller determinierbaren tRF-Muster ausmachten. Im Detail konnten bei *Pseudomyrmex* tRF-Muster von fünf Klassen der Proteobakterien (α-, β-, γ-, δ-, ε-Proteobacteria) mit insgesamt 39 Familien identifiziert werden. Bei allen Proben der untersuchten Ameisenarten waren α-, β- und γ-Proteobacteria besonders divers vertreten. Dabei wurden die α-Proteobacteria überwiegend durch Rhizobiales (*Rhizobium* sp., *Bartonella* sp.), gefolgt von Rhodospirillales, Rhodobacteriales und Sphingomonadales, die β-Proteobacteria überwiegend durch Burkholderiales und die γ-Proteobacteria durch Pseudomonadales, Oceanospirillales, Enterobacteriales repräsentiert.

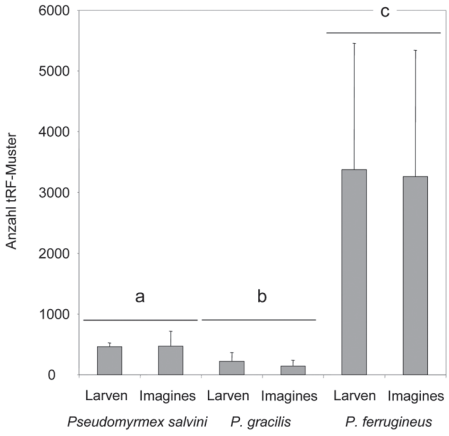


**Abb. 5:** Mittelwerte für die Anzahl unterschiedlicher tRF-Muster für *Pseudomyrmex salvini, P. gracilis* und *P. ferrugineus*. Durchschnittliche Anzahl der tRF-Muster, die mit den TReFID-Analysen gewonnen wurden. Es konnten stets signifikant mehr tRF-Muster bei *P. ferrugineus* nachgewiesen werden, als bei *P. gracilis und P. salvini* (c zu a und b). Außerdem konnten mehr tRF-Muster für *P. salvini* als für *P. gracilis* detektiert werden (a zu b; Statistica 6 (*StatSoft*); Mann-Whitney U Test: *P. gracilis* gegen *P. ferrugineus*: $p < 0{,}001$; *P. salvini* gegen *P. ferrugineus*: $p < 0{,}05$; *P. gracilis* gegen *P. salvini*: $p < 0{,}05$). (*P. salvini*: n = 6; *P. gracilis*: n = 5; *P. ferrugineus*: n = 7).

**Fig. 5:** Number of different tRF patterns of the ants *Pseudomyrmex salvini, P. gracilis* und *P. ferrugineus*. Median number of tRF pattern from TReFID analysis. Significant more tRF pattern for *P. ferrugineus* were found than from the other two species and for *P. salvini* more pattern have been detected than from *P. gracilis* samples (Mann-Whitney U Test: *P. gracilis* against *P. ferrugineus*: $p < 0{,}001$; *P. salvini* against *P. ferrugineus*: $p < 0{,}05$; *P. gracilis* against *P. salvini*: $p < 0{,}05$). (*P. salvini*: n = 6; *P. gracilis*: n = 5; *P. ferrugineus*: n =7).

### 3.3. Vergleich der Bakteriengemeinschaften

Bei den unterschiedlichen Analysen der drei verschiedenen *Pseudomyrmex*-Arten durch TReFID wurden sehr unterschiedliche durchschnittliche tRF-Musterzahlen ermittelt (Abb. 5), was auf Unterschiede in der Diversität der Bakteriengemeinschaften der Ameisenarten hindeutet. Berechnet man jedoch die prozentualen Verhältnisse der Anteile der für jedes Taxon spezifischen tRF-Muster bezogen auf die Gesamtanzahl aller Muster jeder Einzelanalyse, ergeben sich große Übereinstimmungen in der relativen Zusammensetzung der mit den drei untersuchten Ameisenarten assoziierten Bakteriengemeinschaften (Abb. 6). Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, sind γ- und α-Proteobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria, β-Proteobacteria, Spirochaetes, Sphingobacteria, Bacilli, Clostridia, Flavobacteria, Bacteroidetes und ε-Proteobacteria jene Gruppen, die mit über 90 % der tRF-Muster den größten Anteil der Bakteriendiversität bei allen drei Ameisenarten stellen. Signifikante Unterschiede im Verhältnis der Anteile einzelner Gruppen konnten für die β-Proteobacteria und im geringeren Maße für Acidobacteria, δ-Proteobacteria und Verrucomicrobiae ermittelt werden [Mann-Whitney U-Test für β- ($p<0{,}01$), δ-Proteobacteria ($p< 0{,}01$), Acidobacteria ($p<0{,}01$) und Verrucomicrobia; $p<0{,}05$)]. Tendenziell nehmen die γ-Proteobacteria bei *P. gracilis* und besonders bei *P. salvini* den größten Anteil der tRF-Muster ein, wogegen bei *P. ferrugineus* die α-Proteobacteria anteilsmäßig im Durchschnitt mit den γ-Proteobacteria gleich auf liegen. Abbildung 7 illustriert die Zusammensetzung der tRF-Muster der drei wichtigsten Proteobakteriengruppen γ, α und β bei *P. ferrugineus, P. gracilis* und *P. salvini*. Die Kreisdiagramme gehen auf die Durchschnittswerte aller Analysen für die jeweilige Art zurück. Bei dieser Betrachtung waren die diversesten Ordnungen innerhalb der γ-Proteobacteria die Oceanospirillales, Enterobacteriales, Alteromonadales und Pseudomonadales. Signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Ameisenarten waren nicht festzustellen. Auch bei der Zusammensetzung der tRF-Muster bei α- und α-Proteobakterien konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *P. gracilis* und

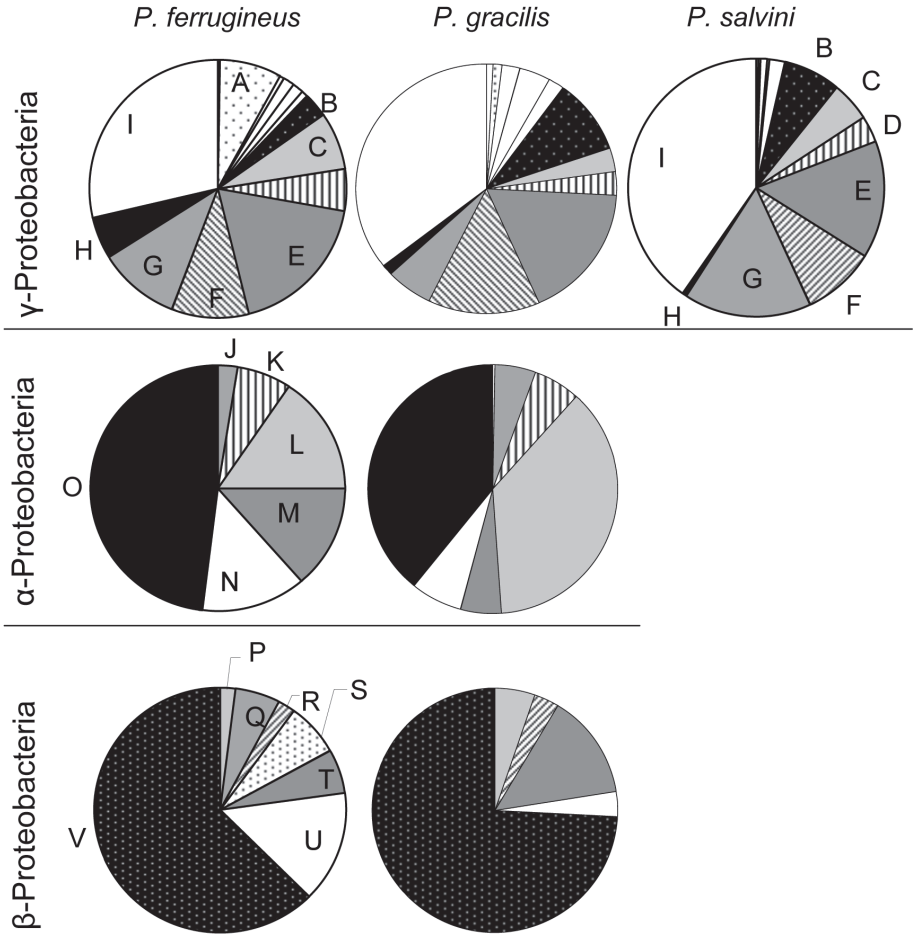


**Abb. 7:** Vergleich der drei diversesten Proteobakterienklassen zwischen *P. ferrugineus, P. gracilis* und *P. salvini*. Diversität der Proteobakterienklassen α-, β- und γ-Proteobacteria dargestellt als prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster (Durchschnittswerte aller Analysen der jeweiligen Ameisenart; *P. ferrugineus* (n = 7)*, P. gracilis* (n = 13) und *P. salvini* (n = 6) nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA Proteobakterien. Auf die Aufteilung der Ordnungen für die Klassen α- und β-Proteobacteria bei *P. salvini* wurde verzichtet, da die tRF-Musterzahl bei dieser Art für diese Gruppen sehr gering war. Zusammensetzung (in Ordnungen) der α-, β- und γ-Proteobacteria: A: Acidithiobacillales; B: Thiotrichales; C: Chromatiales; D: Xanthomonadales; E: Oceanospirillales; F: Enterobacteriales; G: Alteromonadales; H: Pasteurellales, I: Pseudomonadales; J: Rickettsales; K: Caulobacterales; L: Sphingomonadales; M: Rhodobacterales; N: Rhodospirillales; O: Rhizobiales; P: Nitrosomonadales; Q: Procabacteriales; R: Hydrogenophilales; S: Methylophilales; T: Neisseriales; U: Rhodocyclales; V: Burkholderiales.

**Fig. 7:** Comparison of the tRF composition of three major Proteobactia classes *P. ferrugineus, P. gracilis* and *P. salvini*. The major relative contribution of tRF patterns (= terminal restriction fragment fingerprints) from different bacterial taxa is depicted separately for the tree ant species and the relative composition of α-, β- and γ-Proteobacteria is presented.

*P. ferrugineus* ermittelt werden. Auf eine Darstellung der Werte für die beiden letzt genannten Gruppen bei *P. salvini* ist aufgrund sehr weniger und daher nicht aussagekräftiger tRF-Musterzahlen verzichtet worden.

## 4. Diskussion

### 4.1. Beurteilung der tRFLP-Methode

Wichtig für die Auswertung der TReFID-Ergebnisse ist, dass die Anteilsverhältnisse der verschiedenen Taxa in Form der tRF-Muster nicht das Verhältnis von individuenstark und individuenschwach (absolute Population- oder Zellzahlen) in einer Umweltprobe widerspiegeln, sondern nur zeigen, welche Gruppe diverser (also mit mehr unterschiedlichen tRF-Mustern, die auf mehr verschiedenen Ribotypen in der Probe schließen lassen) in einer Umweltprobe vertreten ist. Daher kann kein Diversitätsindex wie z. B. der Shannon-Wiener Index (Shannon 1948) bestimmt werden.

Methoden, die zur Quantifizierung anderer auf tRFLP-basierender Populationsanalysen verwendet werden, können nicht auf die TReFID-Methode übertragen werden, da diese Methoden quantitative Änderungen in der Zusammensetzung der Populationsstruktur anhand von Veränderungen der Flächengrößen der tRF-Peaks vergleichen (Gardener & Weller 2001; Bankhead et al. 2004; Benitez et al. 2007). Dagegen wurde TReFID als Applikation zur qualitativen Identifikation der Mitglieder diverser mikrobieller Gemeinschaften entwickelt (Rösch & Bothe 2005).

Zur Überprüfung der Funktion von TReFID in Kombination mit der seit der Veröffentlichung (Rösch & Bothe 2005; Rösch et al. 2006) erheblich aufgestockten Datenbank wurden Fragmentdatensätze einer künstlichen Mischung von *Escherichia coli, Azospirillum brasilense* und *Rhizobium leguminosarum* unter unterschiedlichen Programmeinstellungen analysiert (siehe TReFID-Überprüfung (siehe Abschnitt 3.1). Die Frage war hier, unter welchen Analysebedingungen (Fehlerspielraum der tRF-Peak Fragmentlängenbestimmung und Anzahl notwendiger Enzyme) möglichst exakte Ergebnisse zu erzielen sind (siehe Abb. 3). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass taxonomisch fehlerhaft eingruppierte Referenzsequenzen der GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) zu falschen Identifikationen führen, wurden die zugrunde liegenden Sequenzen mit dem Naive Bayesian Classifier taxonomisch eingeordnet (Wang et al. 2007). Die Sequenzen konnten nur bis zur Stufe Proteobacteria sicher (100 %) zugeordnet werden. Aufgrund vieler solcher taxonomisch unsicherer Sequenzen wurde entschieden, für die tRFLP-Analyse der vorliegenden Arbeit nur dann Taxa als identifiziert/detektiert gelten zu lassen, wenn zumindest fünf unabhängige tRF-Muster die Gegenwart in der Probe bestätigen. Zudem wurden Datenbankeinträge von (exotischen bzw. seltenen) Bakteriengruppen, die nur mit wenigen Mustern repräsentiert wurden, taxonomisch überprüft.

Mittlerweile sind Verfahren wie das Anlegen von Klonbibliotheken zumindest in großen Labors weitestgehend automatisiert, wodurch eine große Anzahl von Klonen erfasst werden kann. Auch Metagenomanalysen erlauben den umfassenden Einblick in artenreiche mikrobielle Gesellschaften (Turnbaugh et al. 2007; Warnecke et al. 2007; Xu et al. 2007). Der oft diskutierte Nachteil selektiver Primer (es gibt keine wirklich universellen Primer für Prokaryoten) liegt bei diesen Methoden wie auch bei den tRFLP-Verfahren vor, da beide Ansätze auf der PCR-Technologie basieren. Diese Ansätze und insbesondere die Sequenzierung der vielen Klone sind jedoch erheblich teurer als eine Fragmentanalyse. Die Vorteile der tRFLP-Methode liegen damit klar im geringeren Arbeitsaufwand und in der preiswerteren Fragmentanalyse begründet (Rösch et al. 2006; Schutte et al. 2008).

### 4.2. Bakteriengemeinschaften bei Ameisen und Termiten

Den größten Teil (bei *Pseudomyrmex ferrugineus* 93 %) aller nachgewiesenen tRF-Muster repräsentieren Vertreter acht verschiedener Bakterien-Divisionen, und zwar Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria und Spirochaetes (EILMUS & HEIL 2009). 99 % der Darmflora des Menschen setzen sich im Vergleich aus Firmicuten, Bacteroidetes, Proteobacteria und Actinobacteria zusammen (ECKBURG & RELMAN 2007). In allen von mir untersuchten *Pseudomyrmex*-Arten stellten drei große Klassen der Proteobacteria (α-, β- and γ-Proteobacteria) die diversesten Gruppen (gemessen an der Anzahl der unterschiedlichen tRF-Muster bzw. Ribotypen) dar, die viele weitverbreitete und gut bekannte Symbionten anderer Ameisen beinhalten (*Blochmannia* sp.: β-Proteobacteria; *Wolbachia* sp.: α-Proteobacteria; Darmbakterien von *Tetraponera*: α-, β- und γ-Proteobacteria). Eine ganze Reihe von Vertretern dieser Bakteriengattungen wurden bereits als Symbionten anderer Insekten beschrieben, während einige andere Gattungen als Symbionten von Pflanzen bekannt sind (*Azorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Devosia* sp., *Ensifer* sp. und *Mesorhizobium* sp. [Rhizobiales], *Swaminathania* sp. [Rhodospiralles] and *Acidovorax* sp. [Burkholderiales]). Zum Teil handelt es sich auch um bislang eher als frei lebend bekannte aquatische Bakterien oder Bodenbakterien (*Fulvimarina* sp. und *Hyphomicrobium* sp. [Rhizobiales] and *Acetobacter* sp. [Rhodospirillales]). Insgesamt wurden 15 Taxa der Eubakterien und Archaeen (Acidobacteria, Aquificae, Chlamydiae, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Gemmatimonadetes, Crenarchaeota, Euryarchaeota, [Rhodospirillales, Oceanospirillales, Xanthomonadales, Lactobacillales, Desulvovibrionales, Methanosarcinales]) hier erstmalig als Ameisen assoziiert nachgewiesen.

Komplexe Interaktionen mit Mikroorganismen könnten ein Schlüssel zum Erfolg der Ameisen sein. Jedoch gibt keine der genannten Untersuchungen einen Überblick über die Bakteriengemeinschaft der jeweils untersuchten Ameisen, sondern greift selektiv bestimmte Bakteriengattungen aus dem Gesamtkontext heraus. Die Bakteriengemeinschaft, die mit den untersuchten Arten der Gattung *Pseudomyrmex* assoziiert ist, stellte sich als weitaus artenreicher heraus, als bisherige Studien an der nächst verwandten Ameisengattung *Tetraponera* (VAN BORM et al. 2002; STOLL et al. 2007) hätten vermuten lassen. So konnten bei den Untersuchungen von *Tetraponera*-Arten insgesamt nur vier verschiedene Bakterienklassen nachgewiesen werden (VAN BORM et al. 2002; STOLL et al. 2007). Demgegenüber stehen 13 verschiedene Klassen, die in allen drei untersuchen *Pseudomyrmex*-Arten nachgewiesen werden konnten. Im Falle von *P. ferrugineus* deuten die tRFLP-Daten sogar auf das Vorhandensein von bis zu 30 Klassen hin (EILMUS & HEIL 2009). Im Vergleich zu einzelnen Arbeiten über symbiotische oder anderweitig mit Tieren assoziierte Prokaryoten und Prokaryotengemeinschaften wirkt die enorme Vielfalt unterschiedlicher tRF-Signale der Analyse, die auf das Vorhandensein vieler verschiedener Prokaryoten hindeutet, fast unwahrscheinlich. Dem kann man jedoch entgegenhalten, dass alle Isolate und bakteriellen Sequenzinformationen (16S rDNA; über PCR, Klonieren und Sequenzieren gefunden) in den Ergebnissen der tRFLP-Analyse mit TReFID wieder zu finden waren und dass tatsächlich wenig über Diversität, Zusammensetzung und Ökologie der Umweltbakteriengemeinschaften bekannt ist (PACE 1997; SCHLOSS & HANDELSMAN 2004).

Die eusozialen, hinsichtlich ihrer mikrobiellen Assoziationen einigermaßen gut untersuchten Termiten (Isoptera) sind mit Ameisen vergleichbar. Der überaus dicht mit Mikroorganismen besiedelte Hinterdarm der Termiten wird bereits seit 1973 intensiv untersucht (BENEMANN 1973; BREZNAK et al. 1973; FRENCH et al. 1976), in der immer wie-

der neue Aspekte der mikrobiellen önose durch Neubeschreibungen von Bakterien aufgedeckt wurden und werden (Bakalidou et al. 2002; Wenzel et al. 2002; Li et al. 2003; Droge et al. 2006; Frohlich et al. 2007; König et al. 2007; Shinzato et al. 2007; Droge et al. 2008; Kohler et al. 2008; Pittman et al. 2008). Tabelle 1 führt diese bisherigen Ergebnisse dieser Untersuchungen auf. Vor diesem Hintergrund erscheint die große mikrobielle Diversität der Ameisen der Gattung *Pseudomyrmex* nicht unwahrscheinlich. Wie im Termitendarm rekrutieren sich die Bakterien des Ameisendarms aus den Gruppen α-, β-, γ-, δ-Proteobakterien, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Planctomycetes, Spirochaetes, Fibrobacteres-Acidobacteria-Gruppe und Archaeen. Das tRFLP-Massenscreening mit TReFID der mit arborealen Ameisen assoziierten Bakteriengemeinschaft ist damit der erste Hinweis auf eine bislang verborgene mikrobielle Diversität.

Bei der komplexen mikrobiellen Gesellschaft im Termitendarm handelt es sich um eine außergewöhnliche Anpassung an eine besonders einseitige, nährstoffarme Nahrung, die aus Holz, verrottendem pflanzlichen Material oder Erde besteht (König et al. 1999). Tatsächlich scheint es erhebliche Gemeinsamkeiten im Bereich der Ernährung zwischen den untersuchten Baum bewohnenden Ameisen und Termiten zu geben. Die Nahrungsquellen beider sind sehr kohlenhydratreich und relativ arm an organischen Stickstoffverbindungen. Während die Nahrungsquellen der Ameisen (Honigtau, extrafloraler Nektar und Futterkörperchen) jedoch sehr leicht verdaulich, ja sogar regelrecht vorverdaut sind (Heil et al. 2005a, b), bedürfen die Termiten bei ihrer schwerverdaulichen Kost (Cellulose, Lignin u. a.) der Hilfe spezieller Mikroorganismen mit entsprechender Enzymausstattung (Itakura et al. 1995; Khademi et al. 2002; Droge et al. 2008). Die Fermentation der Monosaccharide, N-Fixierung und N-Recycling, Aminosäuren- und Kofaktorensynthese könnten jedoch ausgehend von den Profilen der Prokaryotengesellschaften in beiden Insektengruppen sehr ähnlich ablaufen.

Bei Ameisen, die sich carnivor ernähren, kann von einem C:N-Verhältnis von etwa 3,7:1 ausgegangen werden. Dieses Verhältnis bezieht sich auf die durchschnittliche Aminosäurezusammensetzung von tierischen Proteinen. Für Honigtau lies sich ein C:N-Verhältnis von durchschnittlich 66,6:1 anhand von Literaturangaben errechnen (Woodring et al. 2004). Im extrafloralen Nektar, dessen lösliche Bestandteile ebenfalls zum größten Teil Saccharide darstellen, können ähnliche Verhältnisse ermittelt werden (Heil et al. 2004b, 2005b). Für den extrafloralen Nektar von *Acacia cornigera* (Myrmekophyt) konnte ein relatives C:N-Verhältnis von 109:1, von *A. hindsii* (Myrmekophyt) ein C/N-Verhältnis von 49:1, von *A. farnesiana* (myrmekophil) ein C/N-Verhältnis von 197:1 und von *Prosopis juliflora* (myrmekophil) ein C:N-Verhältnis von 400:1 kalkuliert werden (Gonzalez-Teuber & Heil 2009) . Diese Daten belegen für myrmekophile Pflanzen zwar ein ernährungsphysiologisch ungünstigeres C/N-Verhältnis des extrafloralen Nektars von 200:1 bis 400:1, aber die Werte für die beiden untersuchen Myrmekophyten sind nur unwesentlich günstiger. Diese C/N-Verhältnisse reichen damit noch nicht oder nur knapp an Termitennahrung mit einem C/N-Verhältnis von ca. 500:1 (Benemann 1973) heran. Die Hauptnahrungsquellen EFN und Honigtau (Way 1962; Rico-Gray 1993; Federle et al. 1998; Blüthgen et al. 2000, 2004b; Blüthgen & Fiedler 2004; Cook & Davidson 2006) unterscheiden sich aber für ursprünglich räuberische Insekten immerhin um eine Größenordnung von 50:1 bis 100:1 im Vergleich zu 3,7:1 von tierischer Kost. Der extraflorae Nektar ist also eine stickstoffarme Ernährungsgrundlage. Die Zusammensetzung der Futterkörperchen (Beltsche-Körperchen) der myrmekophytischen Akazien spiegelt mit ihrem hohen Proteingehalt die Bedürfnisse karnivorer Ameisen wieder (Heil et al. 2004a). Mit diesen Futterkörperchen werden jedoch

**Tab. 1:** Termitendarmflora. Zusammenstellung der Prokaryoten, die seit den 1970er Jahren aus verschiedenen Termitenarten beschrieben wurden. *)Abbau: Vereinfachung: Abbau von komplexen Kohlenhydraten, Aromaten usw.

**Tab. 1:** Microbial community in the hindgut of termites. Compilation of prokaryotes, which have been discovered in the hindgut of various termite species since 1970. *) Degradation of complex carbohydrates, aromatic hydrocarbon etc.

| **Taxonomische Einordnung** | | **Gattung & Art** | **Funktion und Literaturquelle** | |
|---|---|---|---|---|
| **γ-Proteobacteria** | Enterobacteriaceae | *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* | N-Fixierung | POTRIKUS & BREZNAK (1977) |
| | | *Serratia rnarcescens* | Abbau* | VARMA et al. (1994), ADAMS & BOOPATHY (2005) |
| | | *Citrobacter amalonaticus* | Abbau | VARMA et al. (1994) |
| | | *Klebsiella pneumoniae* | Abbau | VARMA et al. (1994), SCHÄFER et al. (1996) |
| | Pseudomonadaceae | *Pseudomonas aeruginosa* | Abbau | VARMA et al. (1994), SCHÄFER et al. (1996) |
| | Moraxellaceae | *Acinetobacter calcoaceticus* | Abbau | VARMA et al. (1994) |
| **β-Proteobacteria** | Alcaligenaceae | *Alcaligenes* sp. | Abbau | VARMA et al. (1994) |
| | Burkholderiales Comamonadaceae | *Comamonas (Delftia) acidot, orans* | Abbau | VARMA et al. (1994) |
| | Neisseriaceae | *Stenoxybacter acetivorans* | Acetat-Oxidation | WERTZ & BREZNAK (2007) |
| **α-Proteobacteria** | Rhizobiales Brucellaceae | *Ochrobactrum anthropi* | Abbau | VARMA et al. (1994) |
| | Rhizobiales Rhizobiaceae Bradyrhizobiaceae | *Agrobacterium Afipia Rhizobium* | | WENZEl et al. (2002) |
| | Sphingo-monadaceae | *Sphingomonas Zymomonas* | | WENZEL et al.( 2002) |
| | Rhizobiaceae | *Ensifer* sp. | N-Fixierung | FROHLICH et al. (2007) |
| **δ-Proteobacteria** | Desulfovibrionaceae | *Desulfovibrio D. intestinalis* | Sulfat-Reduktion, (N-Fixierung?) | KUHNIGK et al. (1996, OHKUMA et al. (1996, DROGE et al. (2005) |
| **Actinobacteria** | Cellulomonadaceae | *Cellulomonas* sp. | Abbau | VARMA et al. (1994) |
| | Micrococcaceae | *Arthrobacter* sp. | Abbau | |
| | Micrococcaceae | *Micrococcus* | Abbau | |
| | Micromono-sporaceae | *Micromonospora* | Abbau | |
| | Streptomycetaceae | *Streptomyces* | Abbau | VARMA et al. (1994), SCHÄFER et al. (1996) |
| | Microbacteriaceae | *Aureobacterium liquefaciens* | Abbau | VARMA et al. (1994) |
| | Nocardiaceae | *Rhodococcus erythropolis* | Abbau | CHUNG et al. (1994) |
| **Firmicutes** | Clostridiaceae | *Clostridium* sp. *C. mayombei* | Fermentation, (N-Fixierung?) | KANE et al. (1991), OHKUMA et al. (1996), OHKUMA et al. (1999b) |
| | | *Sporomusa termitida* | Fermentation | BREZNAK & BLUM (1991) |
| | Bacillaceae | *Bacillus* sp. | Abbau | VARMA et al. (1994), KÖNIG (2006) |
| | | *Bacillus therrnoalkalo-philus* | Abbau | |
| | Staphylococcaceae | *Staphylococcus saprophyticus* | Abbau | |
| | Listeriaceae | *Listeria innocua* | Abbau | |
| **Planctomycetes** | | | | KOHLER et al. (2008) |

Tab 1: Fortsetzung.
Tab. 1: Continued.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Bacteroidetes** | Bacteroidaceae | *Bacteroides* sp. | Abbau | VARMA et al. (1994) |
| | | | | |
| | Sphingobacteriales; Flexibacteraceae | *Spirosoma* sp. | | WENZEL et al. (2002) |
| | Bacteroidales | *„Vestibaculum illigatum“* | | STINGL et al. (2004) |
| | | Bacteroidales-endosymbiont | N-Fixierung, N-Recycling, Synthese von Aminosäuren und CoFaktor | HONGOH et al. (2008b) |
| **Spirochaetes** | Spirochaetaceae | *Treponema* sp. *Spirochaeta coccoides* | N-Fixierung: OHKUMA et al. (1999a), IIDA et al. ( 2000), BREZNAK (2002), ADAMS & BOOPATHY (2005), DROGE et al. (2006), BERLANGA et al. (2007), KÖNIG et al. (2007), DROGE et al. (2008) | |
| **Fibrobacteres-Acidobacteria-Gruppe** | Fibrobacteres | | HONGOH et al. (2006) | |
| **Termite Group I (TG-1)** | 'Endomicrobia' | | IKEDA-OHTSUBO et al. (2007), HERLEMANN et al. (2007), OHKUMA et al. (2007), PITTMAN et al. (2008), HONGOH et al. 2008a) | |
| **Euryarchaeota:**<br><br>**Crenarchaeota** | Methano-microbiales<br>Methanosarcinales<br>Methanobacteriales<br>Thermoplasmatales | | MIYATA et al. (2007) | |
| **Euryarchaeota** | Methano-bacteriaceae | *Methanobrevi-bacter* | LEADBETTER & BREZNAK (1996) | |
| **tRFLP-Untersuchung** | | | | |
| **Cytophaga-Flexibacter-Bacteriodes, Proteobacteria, Spirochetes, TM7-OP11, Gram-positive Bacteria** | | | MACKENZIE et al. (2007) | |

nur Larven und die Königinnen gefüttert (JANZEN 1966, 1967). Mutualistische *Pseudomyrmex*-Arten (wie *P. ferrugineus*) leben allein von EFN und Futterkörperchen ihrer Wirtsakazien (JANZEN 1966, 1967; HEIL et al. 2004a; CLEMENT et al. 2008). Dagegen sammeln opportunistische Akazienparasiten wie *P. gracilis* und Baum bewohnende, nicht mit Pflanzen eng assoziierte Ameisen der Gattung wie *P. salvini* (auch) andere Nahrung wie tote Insekten und Honigtau (CLEMENT et al. 2008; EILMUS 2008). Weder Futterkörperchen noch andere Nahrungsquellen, wie z. B. tote Insekten, stellen jedoch eine kontinuierlich verfügbare Protein- und damit N-Quelle dar. Der besondere Stickstoffbedarf von Insekten wird verständlich, wenn man bedenkt, dass die meisten Insekten-Cuticulae primär aus dem stickstoffhaltigen Polymer Chitin (N-Acetylglucosamin) und dem Strukturprotein Sklerotin bestehen (DETTNER & PETERS 1999).

### 4.3. Hinweise auf N-fixierende Keime in Ameisen

Während viele Bakterientaxa, die in den Ameisen nachgewiesen werden konnten, typische Vertreter tierischer Darmflora (γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae; Firmicutes: Bacilli u. a.) sind, konnten für alle drei untersuchten Ameisenarten potenziell N-fixierende Mikroorganismen nachgewiesen werden (EILMUS & HEIL 2009). Durch Kultivierungsverfahren konnten Vertreter der Enterobakteriengattungen *Pantoea* (RUPPEL & MERBACH 1995, 1997; LADHA & REDDY 2003; LOIRET et al. 2004) und *Serratia*

(PAN et al. 2002; BALACHANDAR et al. 2006) und Vertreter der Burkholderiaceae (TRANVAN et al. 1994; MARTINEZ-AGUILAR et al. 2008; SUAREZ-MORENO et al. 2008) aus den Ameisen isoliert werden. Neben diesen Isolaten konnten weitere potenziell N-fixierende Vertreter der Rhizobiales, Rhodospirillales, verwandt mit der Gattung *Gluconacetobacter,* von der mittlerweile mehrere N-fixierende Isolate bekannt sind (FUENTES-RAMIREZ et al. 2001; EMITIAZI et al. 2003; DUTTA & GACHHUI 2006, 2007), Pseudomonadales, Spirochaeta und Cyanobacteria mittels der tRFLP-Methode nachgewiesen werden. Insbesondere das Vorkommen der potenziell N-fixierenden Enterobakterien *Pantoea* sp.und *Serratia* . in den Ameisen konnte zweifelsfrei über tRFLP-Analyse, 16S rDNA-Klonbibliothek und Kultivierungsverfahren nachgewiesen werden.

### 4.4. Weitere mögliche Funktionen der Bakterien von *Pseudomyrmex* .

Alle untersuchten Kolonien von *Pseudomyrmex ferrugineus* und *Pseudomyrmex salvini* sowie einige Kolonien von *P. gracilis* wiesen Infektionen mit zu den Rickettsiales zählenden Bakterien auf. Bislang konnten diesen intrazellularen Bakterien keine klaren Funktionen bei Ameisen zugeschrieben werden. Ihr Status als Parasit wird vielfach diskutiert (WENSELEERS et al. 1998; BOURSAUX-EUDE & GROSS 2000; WENSELEERS & BILLEN 2000; VAN BORM et al. 2001; ZIENTZ et al. 2005; STOLL et al. 2007). Für alle drei hier untersuchten Ameisenarten konnten mit der tRFLP-Methode ebenfalls Vertreter der nur als (z. T. intrazellulare) Parasiten bekannte Klasse Mollicutes (Division Firmicutes) nachgewiesen werden. Die detektierten tRF-Muster stimmten zu 85 % bis 100 % mit Vertretern der Gattungen *Entomoplasma* (TULLY et al. 1998)*, Mesoplasma* (NAVASCASTILLO et al. 1993; TULLY et al. 1994) *Phytoplasma* (LEE et al. 1998) überein, die alle aus Insekten bekannt sind.
*Burkholderia* spp. (Burkholderiales machen in fast allen Proben den größten Teil der β-Proteobacteria-tRF-Muster aus) wurden bereits aus den Pilzgärten der Blattschneideameisenart *Atta sexdens rubropilosa* als Antibiotika produzierende Keime isoliert (SANTOS et al. 2004). Auch in *Tetraponera* konnten Vertreter der Gattung *Burkholderia* nachgewiesen werden (VAN BORM et al. 2002). *Burkholderia* sp., Actinomyceten, die ebenfalls in allen Ameisenproben der vorliegenden Studie vertreten waren, und andere Mikroorganismen, die in der Lage sind, Antimikrobia und Antibiotika zu produzieren, dürften nicht nur für Pilz züchtende Ameisen, sondern auch für alle anderen eusozialen Insekten eine wichtige Rolle in der Prävention gegen pathogene Mikroorganismen spielen, da die Ausbreitung von Infektionen in Kolonien, deren Individuen einen engen Körperkontakt untereinander pflegen, ein permanentes Risiko darstellt (CURRIE et al. 2003, 2006a, b; CAFARO & CURRIE 2005; POULSEN et al. 2005; LITTLE et al. 2006; LITTLE & CURRIE 2007, 2008; TAERUM et al. 2007). Keime, die deutliche Hemmhöfe auf KB-Kulturplatten erzeugten, konnten auch in dieser Studie bei Kultivierungsexperimenten nachgewiesen werden (*Burkholderia*: EU842087, EU842097).

### 4.5. Schlussfolgerungen

Die bakteriellen Gesellschaften unterscheiden sich zwischen den untersuchten Arten qualitativ kaum, lediglich die Diversität (ausgehend von den tRF-Daten) schien bei der obligaten Akazienameise *Pseudomyrmex ferrugineus* deutlich höher zu sein. Die ursprüngliche Lebensweise von Vertretern der Gattung *Pseudomyrmex* scheint die von Generalisten zu sein (WARD 1993; KAUTZ et al. im Druck). Als Generalisten ernähren sich diese Ameisen bevorzugt von zuckrigen Lösungen (EFN, Honigtau) und „sammeln“ zusätzlich tierisches Eiweiß z. B. in Form toter Insekten (WARD 1993; CLEMENT et al. 2008; EILMUS 2008). Diese Lebensweise scheint für viele Baum bewohnende tro-

pische Ameisen zuzutreffen (Davidson & Patrell-Kim 1996; Blüthgen et al. 2000, 2004a; Blüthgen & Wesenberg 2001; Adis et al. 2002; Davidson et al. 2003). Zu diesen Generalisten werden *Pseudomyrmex salvini* und auch *Pseudomyrmex gracilis* gezählt, wobei *P. gracilis* auch als Parasit der Ameisenakazien auftreten kann (Clement et al. 2008). Ihre Darmflora scheint bereits an die limitierten Nahrungsressourcen des Lebensraums angepasst zu sein. Diese Anpassung erlaubte es vermutlich gleichsam präadaptiv den Vorläuferarten von *P. ferrugineus* leicht von der „Generalisten-Kost" auf die Akaziennahrung zu wechseln. Dies scheint eine plausible Erklärung für das Phänomen zu sein, dass sich innerhalb dieser Ameisengruppe mehrmals und wahrscheinlich unabhängig voneinander Generalisten (Clement et al. 2008; Eilmus 2008; Kautz et al. 2009) zu z. T. hoch spezialisierten Pflanzenameisen mit rein pflanzlicher Kost (Heil et al. 2005b; Clement et al. 2008) entwickeln konnten. Die ursprünglich generalistische Lebensweise der Pseudomyrmecinae entwickelte sich mindestens zehnmal – allein sechsmal in der Gattung *Pseudomyrmex* – unabhängig voneinander zu hoch spezialisierten Interaktionen mit Myrmekophyten aus verschiedenen Pflanzenfamilien (Ward 1993; Ward & Downie 2005). An diesen Spezialisierungs- und dadurch bedingten Speziationsprozessen könnte die mutualistische Darmflora der Ameisen einen großen Anteil gehabt haben. Mutualismen zwischen phytophagen Insekten und Mikroorganismen wurden jüngst als Triebfeder einer adaptiven Diversifikation beschrieben (Janson et al. 2008) und scheinen nicht nur mit den artenreichen Pflanzensaugern (Aphidoidea), sondern auch in der mit ca. 1.000 beschriebenen Arten artenreichsten Ameisengattung *Camponotus* (Hölldobler & Wilson 1990) und deren Symbionten *Blochmannia* ihre Bestätigung zu finden. Ähnliches könnte sich auch bei der Speziationsprozessen der Pseudomyrmicinae abgespielt haben.

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. M. Heil, Irapuato, Mexiko, für die Betreuung meiner Arbeit. Besonders danke ich für die vielen hilfreichen Hinweise und Kommentare zur Arbeit, für die Forschungsreise nach Mexiko. Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe Allgemeine Botanik der Universität Duisburg-Essen, vor allem S. Kautz und M. Gonzalez Teuber für Hilfe und Unterstützung. Diese Arbeit wurde durch ein DFG-Stipendium für Prof. M. Heil finanziert und unterstützt.

## Literatur

Adams, L., & Boopathy, R. (2005): Isolation and characterization of enteric bacteria from the hindgut of Formosan termite. Bioresource Technology 96: 1592-1598.

Adis, J., Zompro, O., Moombolah-Goagoses, E., & Marais, E. (2002): Gladiators: A new order of insect. Scientific American 287: 60-65.

Bakalidou, A., Kampfer, P., Berchtold, M., Kuhnigk, T., Wenzel, M., & König, H. (2002): *Cellulosimicrobium variabile* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 1185-1192.

Balachandar, D., Sandhiya, G. S., Sugitha, T. C., & Kumar, K. (2006): Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 707-712.

Bankhead, S.B., Landa, B.B., Lutton, E., Weller, D.M., & Gardener, B.B.M. (2004): Minimal changes in rhizobacterial population structure following root colonization by wild type and transgenic biocontrol strains. FEMS Microbiology Ecology 49: 307-318.

Belt, T. (1874): The naturalist in Nicaragua. J.M. Dent and Sons; London..

Benemann, J.R. (1973): Nitrogen-fixation in termites. Science 181: 164-165.

Benitez, M.S., Tustas, F.B., Rotenberg, D., Kleinhenz, M.D., Cardina, J., Stinner, D., Miller, S.A., & Gardener, B.B.M. (2007): Multiple statistical approaches of community

fingerprint data reveal bacterial populations associated with general disease suppression arising from the application of different organic field management strategies. Soil Biology & Biochemistry 39: 2289-2301.

BERLANGA, M., PASTER, B., & J.GUERRERO, R. (2007): Coevolution of symbiotic spirochete diversity in lower termites. International Microbiology 10: 133-139.

BLÜTHGEN, N., & FIEDLER, K. (2004): Competition for composition: Lessons from nectar-feeding ant communities. Ecology 85: 1479-1485.

BLÜTHGEN, N., GOTTSBERGER, G., & FIEDLER, K. (2004a): Sugar and amino acid composition of ant-attended nectar and honeydew sources from an Australian rainforest. Australian Ecology 29: 418-429.

BLÜTHGEN, N., STORK, N.E., & FIEDLER, K. (2004b): Bottom-up control and co-occurrence in complex communities: honeydew and nectar determine a rainforest ant mosaic. Oikos 106: 344-358.

BLÜTHGEN, N., VERHAAGH, M., GOITÍA, W., JAFFÉ, K., MORAWETZ, W., & BARTHLOTT, W. (2000): How plants shape the ant community in the Amazonian rainforest canopy: the key role of extrafloral nectaries and homopteran honeydew. Oecologia 125: 229-240.

BLÜTHGEN, N., & WESENBERG, J. (2001): Ants induce domatia in a rain forest tree (*Vochysia vismiaefolia*). Biotropica 33: 637-642.

BOURSAUX-EUDE, C., & GROSS, R. (2000): New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. Research In Microbiology, 151: 513-519.

BREZNAK, J.A. (2002): Phylogenetic diversity and physiology of termite gut spirochetes. Integrative and Comparative Biology, 42**,** 313-318.

BREZNAK, J.A., & BLUM, J.S. (1991): Mixotrophy in the termite gut acetogen *Sporomusa termitida*. Archives Of Microbiology 156: 105-110.

BREZNAK, J.A., BRILL, W.J., MERTINS, J.W., & COPPEL, H.C. (1973): Nitrogen-fixation in termites. Nature 244: 577-579.

BROWN, W.L.J. (1960): Ants, acacias, and browsing mammals. Ecology 41: 587-592.

CAFARO, M.J., & CURRIE, C.R. (2005): Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. Canadian Journal of Microbiology 51: 441-446.

CHUNG, S.Y., MAEDA, M., SONG, E., HORIKOSHI, K., & KUDO, T. (1994): A gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus-Erythropolis* Strain Ta421, isolated from a termite ecosystem. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 58: 2111-2113.

CLEMENT, L.W., KÖPPEN, S.C.W., BRAND, W.A., & HEIL, M. (2008): Strategies of a parasite of the ant-acacia mutualism. Behavioral Ecology and Sociobiology 62: 953-962.

COOK, S.C., & DAVIDSON, D.W. (2006): Nutritional and functional biology of exudate-feeding ants. Entomologia Experimentalis et Applicata 118: 1-10.

CURRIE, C.R., BOT, A.N. , & BOOMSMA, J. J. (2003): Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. Oikos 101: 91-102.

CURRIE, C.R., POULSEN, M., MENDENHALL, J., BOOMSMA, J.J., & BILLEN, J. (2006a): Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. Science 311: 81-83.

CURRIE, C.R., POULSEN, M., MENDENHALL, J., BOOMSMA, J. J., & BILLENS, J. (2006b): Mutualistic bacteria in fungus-growing ants coevolved crypts and exocrine glands support. Science 311: 81-83.

CURRIE, C.R., SCOTT, J.A., SUMMERBELL, R.C., & MALLOCH, D. (1999): Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. Nature 398: 701-704.

DAVIDSON, D.W., COOK, S.C., SNELLING, R.R., & CHUA, T.H. (2003): Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies. Science 300: 969-972.

DAVIDSON, D.W., & PATRELL-KIM, L. (1996): Tropical arboreal ants: why so abundant? Pp. 127-140 in: GIBSON, A.C. (ed.): Neotropical Biodiversity and Conservation. Mildred E. Mathias Botanical Garden, University of California; Los Angeles,

DETTNER, K., & PETERS, W. (1999): Lehrbuch der Entomologie. Spektrum Verlag; Stuttgart.

DROGE, S., FROHLICH, J., RADEK, R., & KÖNIG, H. (2006): *Spirochaeta coccoides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. Applied and Environmental Microbiology 72: 392-397.

DROGE, S., LIMPER, U., EMTIAZI, F., SCHONIG, I., PAVLUS, N., DRZYZGA, O., FISCHER, U., & KÖNIG, H. (2005): In vitro and in vivo sulfate

reduction in the gut contents of the termite *Mastotermes darwiniensis* and the rose-chafer *Pachnoda marginata*. The Journal of General and Applied Microbiology 51: 57-64.

Droge, S., Rachel, R., Radek, R., & König, H. (2008): *Treponema isoptericolens* sp. nov., a novel spirochaete from the hindgut of the termite *Incisitermes tabogae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 1079-1083.

Dutta, D., & Gachhui, R. (2006): Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp nov., isolated from Kombucha tea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 1899-1903.

Dutta, D., & Gachhui, R. (2007): Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp nov., isolated from Kombucha tea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 353-357.

Eckburg, P.B., & Relman, D.A. (2007): The role of microbes in Crohn's disease. Clinical Infectious Diseases 44: 256-262.

Eilmus, S., & Heil, M. (2009): Bacterial associates of arboreal ants and their putative functions in an obligate ant-plant mutualism. Applied Environmental Microbiology [Epub ahead of print].

Eilmus, S. (2008): *Pseudomyrmex salvini* (Forel, 1899) – Notes on biology and keeping in captivity (Pseudomyrmecinae). Arthropoda 16: 34-37.

Eilmus, S., Rosch, C., & Bothe, H. (2007): Prokaryotic life in a potash-polluted marsh with emphasis on N-metabolizing micro-organisms. Environmental Pollution 146: 478-491.

Emtiazi, G., Etemadifar, Z., & Tavassoli, M. (2003): A novel nitrogen-fixing cellulytic bacterium associated with root of corn is a candidate for production of single cell protein. Biomass & Bioenergy 25: 423-426.

Federle, W., Fiala, B., & Maschwitz, U. (1998): *Camponotus* (*Colobopsis*) (Mayr 1861) and *Macaranga* (Thouars 1806): a specific two-partner ant-plant system from Malaysia. Tropical Zoology 11: 83-94.

Feldhaar, H., Straka, J., Krischke, M., Berthold, K., Stoll, S., Mueller, M.J., & Gross, R. (2007): Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. BMC Biology 5, 1741-7007.

French, J.R.J., Turner, G.L., & Bradbury, J.F. (1976): Nitrogen-fixation by bacteria from hindgut of termites. Journal of General Microbiology 95: 202-206.

Frohlich, J., Koustiane, C., Kampfer, P., Rossello-Mora, R., Valens, M., Berchtold, M., Kuhnigk, T., Hertel, H., Maheshwari, D.K., & König, H. (2007): Occurrence of rhizobia in the gut of the higher termite *Nasutitermes nigriceps*. Systematic and Applied Microbiology 30: 68-74.

Fuentes-Ramirez, L.E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernandez, A., Jimenez-Salgado, T., Wang, E.T., Martinez-Romero, E., & Caballero-Mellado, J. (2001): Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov, associated with coffee plants. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 1305-1314.

Gardener, B.B.M., & Weller, D.M. (2001): Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. Applied Environmental Microbiology 67: 4414-4425.

Gaudermann, P., Vogl, I., Zientz, E., Silva, F.J., Moya, A., Gross, R., & Dandekar, T. (2006): Analysis of and function predictions for previously conserved hypothetical or putative proteins in *Blochmannia floridanus*. BMC Microbiology 6: 1471-2180.

Gonzalez-Teuber, M., & Heil, M. (2009): Role of extrafloral nectar amino acids for the preferences of facultative and oblgate ant mutualism. Journal of Chemical Ecology 35: 459-468.

Heil, M., Baumann, B., Krüger, R., & Linsenmair, K. E. (2004a): Main nutrient compounds in food bodies of Mexican *Acacia* ant-plants. Chemoecology 14: 45-52.

Heil, M., Buchler, R., & Boland, W. (2005a): Quantification of invertase activity in ants under field conditions. Journal of Chemical Ecology 31: 431-437.

Heil, M., Fiala, B., Kaiser, W., & Linsenmair, K. E. (1998): Chemical contents of *Macaranga* food bodies: adaptations to their role in ant attraction and nutrition. Functional Ecology 12: 117-122.

Heil, M., Greiner, S., Meimberg, H., Kruger, R., Noyer, J. L., Heubl, G., Linsenmair, K. E., &

BOLAND, W. (2004b): Evolutionary change from induced to constitutive expression of an indirect plant resistance. Nature 430: 205-208.

HEIL, M., RATTKE, J., & BOLAND, W. (2005b): Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism. Science 308: 560-563.

HERLEMANN, D.P.R., GEISSINGER, O., & BRUNE, A. (2007): The termite group I phylum is highly diverse and widespread in the environment. Applied Environmental Micro-biology 73: 6682-6685.

HILGENBOECKER, K., HAMMERSTEIN, P., SCHLATTMANN, P., TELSCHOW, A., & WERREN, J.H. (2008): How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. FEMS Microbiology Letters 281: 215-220.

HOGG, R.V., & CRAIG, A.T. (1995): Mathematical Statistics, 5th edition. Prentice Hall; Englewood Cliffs, New Jersey.

HÖLLDOBLER, B.WILSON, E. O. (1990): The ants. Springer; Berlin, Heidelberg, New York.

HONGOH, Y., DEEVONG, P., HATTORI, S., INOUE, T., NODA, S., NOPARATNARAPORN, N., KUDO, T., & OHKUMA, M. (2006): Phylogenetic diversity, localization, and cell morphologies of members of the candidate phylum TG3 and a subphylum in the phylum Fibrobacteres, recently discovered bacterial groups dominant in termite guts. Applied Environmental Microbiology 72: 6780-6788.

HONGOH, Y., SHARMA, V.K., PRAKASH, T., NODA, S., TAYLOR, T.D., KUDO, T., SAKAKI, Y., TOYODA, A., HATTORI, M., & OHKUMA, M. (2008a): Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 105: 5555-5560.

HONGOH, Y., SHARMA, V.K., PRAKASH, T., NODA, S., TOH, H., TAYLOR, T.D., KUDO, T., SAKAKI, Y., TOYODA, A., HATTORI, M., & OHKUMA, M. (2008b): Genome of an endosymbiont coupling N-2 fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. Science 322: 1108-1109.

IIDA, T., OHKUMA, M., OHTOKO, K., & KUDO, T. (2000): Symbiotic spirochetes in the termite hindgut: phylogenetic identification of ectosymbiotic spirochetes of oxymonad protists. FEMS Microbiology Ecology 34: 17-26.

IKEDA-OHTSUBO, W., DESAI, M., STINGLT, U., & BRUNE, A. (2007): Phylogenetic diversity of 'Endomicrobia' and their specific affiliation with termite gut flagellates. Microbiology (SGM) 153: 3458-3465.

ITAKURA, S., UESHIMA, K., TANAKA, H., & ENOKI, A. (1995): Degradation of wood components by subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. Mokuzai Gakkaishi 41: 580-586.

JANSON, E.M., STIREMAN, J.O., SINGER, M.S., & ABBOT, P. (2008): Phytophagous insect-microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. Evolution 62: 997-1012.

JANZEN, D.H. (1966): Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. Evolution 20: 249-275.

JANZEN, D.H. (1967): Interaction of the bull's-horn acacia (*Acacia cornigera* L.) with an ant inhabitant (*Pseudomyrmex ferruginea* F. Smith) in eastern Mexico. Kansas University Science Bulletin 47: 315-558.

JANZEN, D.H. (1974): Swollen-thorn acacias of Central America. Smithsonian Institution Press; Washington DC, USA

KANE, M.D., BRAUMAN, A., & BREZNAK, J.A. (1991): *Clostridium mayombei* sp.nov., an H-2/Co-2 acetogenic bacterium from the gut of the african soil-feeding termite *Cubitermes speciosus*. Archives of Microbiology 156: 99-104.

KAUTZ, S., LUMBSCH, H.T., WARD, P.S., & HEIL, M. (2009): How to prevent cheating: A digestive specialization ties mutualistic plant-ants to their ant-plant partners. Evolution 63: 839-853.

KHADEMI, S., GUARINO, L.A., WATANABE, H., TOKUDA, G., & MEYER, E.F. (2002): Structure of an endoglucanase from termite, *Nasutitermes takasagoensis*. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 58: 653-659.

KOHLER, T., STINGL, U., MEUSER, K., & BRUNE, A. (2008): Novel lineages of planctomycetes densely colonize the alkaline gut of soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). Environmental Microbiology 10: 1260-1270.

KÖNIG, H. (2006): *Bacillus* species in the intestine of termites and other soil invertebrates. Journal of Applied Microbiology 101: 620-627.

KÖNIG, H., BERCHTOLD, M., FROHLICH, J., WENZEL, M, & EMTIAZI, F. (1999): The microbiology of the termite gut. Communications of the German Society for General and Applied Entomology, 12: 219-222.

KÖNIG, H., FROHLICH, J., LI, L., WENZEL, M., BERCHTOLD, M., DROGE, S., BREUNIG, A.,

Pfeiffer, P., Radek, R., & Brugerolle, G. (2007): The flagellates of the australian termite *Mastotermes darwiniensis*: Identification of their symbiotic bacteria and cellulases. Symbiosis 44: 51-65.

Kuhnigk, T., Branke, J., Krekeler, D., Cypionka, H., & König, H. (1996): A feasible role of sulfate-reducing bacteria in the termite gut. Systematic and Applied Microbiology 19: 139-149.

Ladha, J.K., & Reddy, P.M. (2003): Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. Plant and Soil 252: 151-167.

Leadbetter, J.R., & Breznak, J.A. (1996): Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp nov and *Methanobrevibacter curvatus* sp. Nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. Applied and Environmental Microbiology 62: 3620-3631.

Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., & Bertaccini, A. (1998): Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. Phytopathology 88: 1359-1366.

Li, L., Frohlich, J., Pfeiffer, P., & König, H. (2003): Termite gut symbiotic archaezoa are becoming living metabolic fossils. Eukaryotic Cell 2: 1091-1098.

Little, A.E.F., & Currie, C.R. (2007): Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. Biology Letters 3: 501-504.

Little, A.E.F., & Currie, C.R. (2008): Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. Ecology 89: 1216-1222.

Little, A.E.F., Murakami, T., Mueller, U.G., & Currie, C. R. (2006): Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. Biology Letters 2: 12-16.

Loiret, F.G., Ortega, E., Kleiner, D., Ortega-Rodes, P., Rodes, R. & Dong, Z. (2004): A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. Journal of Applied Microbiology 97: 504-511.

Mackenzie, L.M., Muigai, A.T., Osir, E.O., Lwande, W., Keller, M., Toledo, G., & Boga, H.I. (2007): Bacterial diversity in the intestinal tract of the fungus-cultivating termite *Macrotermes michaelseni* (Sjostedt). African Journal of Biotechnology 6: 658-667.

Martinez-Aguilar, L., Diaz, R., Pena-Cabriales, J.J., Estrada-de los Santos, P., Dunn, M.F., & Caballero-Mellado, J. (2008): Multichromosomal genome structure and confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. Applied and Environmental Microbiology 74: 4574-4579.

Miyata, R., Noda, N., Tamaki, H., Kinjyo, K., Aoyagi, H., Uchiyamai, H., & Tanaka, H. (2007): Phylogenetic relationship of symbiotic archaea in the gut of the higher termite *Nasutitermes takasagoensis* fed with various carbon sources. Environmental Microbiology 22: 157-164.

Navascastillo, J., Laigret, F.Bove, J.M. (1993): 16S rDNA sequence-analysis of *Acholeplasma seiffertii*, a mollicute from plant-surfaces, and its transfer to *Mesoplasma*, a new genus in the *Spiroplasma* phylogenetic group. Nucleic Acids Research 21: 2249-2249.

Ohkuma, M., Iida, T., & Kudo, T. (1999a): Phylogenetic relationships of symbiotic spirochetes in the gut of diverse termites. FEMS Microbiology Letters 181: 123-129.

Ohkuma, M., Noda, S., & Kudo, T. (1999b): Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. Applied and Environmental Microbiology 65: 4926-4934.

Ohkuma, M., Noda, S., Usami, R., Horikoshi, K, & Kudo, T. (1996): Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *Reticulitermes speratus*. Applied and Environmental Microbiology 62: 2747-2752.

Ohkuma, M., Sato, T., Noda, S., Ui, S., Kudo, T., & Hongoh, Y. (2007): The candidate phylum 'Termite Group 1' of bacteria: phylogenetic diversity, distribution, and endosymbiont members of various gut flagellated protists. FEMS Microbiology Ecology 60: 467-476.

Pace, N.R. (1997): A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science 276: 734-740.

Pan, B., Vessey, J.K, & .Smith, D.L. (2002): Response of field-grown soybean to co-inoculation with the plant growth promoting rhizobacteria *Serratia proteamaculans* or *Serratia liquefaciens*, and *Bradyrhizobium japonicum* pre-incubated with genistein. European Journal of Agronomy 17: 143-153.

PITTMAN, G.W., BRUMBLEY, S.M., ALLSOPP, P.G., & O'NEILL, S.L. (2008): "Endomicrobia" and other bacteria associated with the hindgut of *Dermolepida albohirtum* larvae. Applied and Environmental Microbiology 74: 762-767.

POTRIKUS, C.J., & BREZNAK, J.A. (1977): Nitrogen-fixing *Enterobacter agglomerans* isolated from guts of wood-eating termites. Applied and Environmental Microbiology 33: 392-399.

POULSEN, M., CAFARO, M., BOOMSMA, J.J., & CURRIE, C.R. (2005): Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. Molecular Ecology 14: 3597-3604.

RICKSON, F.R. (1971): Glycogen plastids in Müllerian body cells of *Cecropia peltata* – a higher green plant. Science 173: 344-347.

RICKSON, F.R. (1980): Developmental anatomy and ultrastructure of the ant-food bodies (Beccariian bodies) of *Macaranga triloba* and *M. hypoleuca* (Euphorbiaceae). American Journal of Botany 67: 285-292.

RICO-GRAY, V. (1993): Use of plant-derived food resources by ants in the dry tropical lowlands of coastal Veracruz, Mexico. Biotropica 25: 301-315.

RÖSCH, C., & BOTHE, H. (2005): Improved assessment of denitrifying, N2-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. Applied and Environmental Microbiology 71: 2026-2035.

RÖSCH, C., EILMUS, S., & BOTHE, H. (2006): Approaches to assess the biodiversity of bacteria in natural habitats. Biochemical Society Transactions 34: 169-173.

RUPPEL, S., & MERBACH, W. (1995): Effects of different nitrogen sources on nitrogen fixation and bacterial growth of *Pantoea agglomerans* and *Azospirillum* sp. in bacterial pure culture: An investigation using N-15(2) incorporation and acetylene reduction measures. Microbiological Research 150: 409-418.

RUPPEL, S., & MERBACH, W. (1997): Effect of ammonium and nitrate on N-15(2)-fixation of *Azospirillum spp.* and *Pantoea agglomerans* in association with wheat plants. Microbiological Research 152: 377-383.

SANTOS, A.V., DILLON, R.J., DILLON, V.M., REYNOLDS, S.E., & SAMUELS, R.I. (2004): Ocurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. FEMS Microbiological Letters 238: 319-323.

SAUER, C., DUDACZEK, D., HÖLLDOBLER, B., & GROSS, R. (2002): Tissue localization of the endo-symbiotic bacterium "*Candidatus Blochmannia floridanus*" in adults and larvae of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. Applied and Environmental Microbiology 68: 4187-4193.

SAUER, C., STACKEBRANDT, E., GADAU, J., HÖLLDOBLER, B., & GROSS, R. (2000): Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus Blochmannia* gen. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 1877-1886.

SCHÄFER, A., KONRAD, R., KUHNIGK, T., KAMPFER, P., HERTEL, H., & KÖNIG, H. (1996): Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. Journal of Applied Bacteriology 80: 471-478.

SCHLOSS, P.D., & HANDELSMAN, J. (2004): Status of the microbial census. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68: 686-691..

SCHUTTE, U.M.E., ABDO, Z., BENT, S.J., SHYU, C., WILLIAMS, C.J., PIERSON, J.D., & FORNEY, L.J. (2008): Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 80: 365-380.

SHANNON, B.T. (1948): A mathematical theory of communication. Bell System Technical Journal, 27: 379-423.

SHINZATO, N., MURAMATSU, M., MATSUI, T., & WATANABE, Y. (2007): Phylogenetic analysis of the gut bacterial microflora of the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 71: 906-915.

STINGL, U., MAASS, A., RADEK, R., & BRUNE, A. (2004): Symbionts of the gut flagellate *Staurojoenina* sp. from *Neotermes cubanus* represent a novel, termite-associated lineage of Bacteroidales: description of '*Candidatus Vestibaculum illigatum*'. Microbiology (SGM) 150: 2229-2235.

STOLL, S., GADAU, J., GROSS, R, & .FELDHAAR, H. (2007): Bacterial microbiota associated with ants of the genus *Tetraponera*. Biological Journal of the Linnean Society 90: 399-412.

SUAREZ-MORENO, Z.R., CABALLERO-MELLADO, J., & VENTURI, V. (2008): The new group of non-

pathogenic plant-associated nitrogen-fixing *Burkholderia* spp. shares a conserved quorum-sensing system, which is tightly regulated by the RsaL repressor. Microbiology (SGM) 154: 2048-2059.

Taerum, S.J., Cafaro, M.J., Little, A.E.F., Schultz, T.R. & Currie, C.R. (2007): Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 274: 1971-1978.

Tranvan, V., Mavingui, P., Berge, O., Balandreau, J., & Heulin, T. (1994): Growth promotion of rice after inoculation with a nitrogen-fixing bacteria *Burkholderia vietnamiensis* isolated from an acid-sulfate soil in Vietnam. Agronomie 14: 697-707.

Tully, J.G., Whitcomb, R.F., Hackett, K.J., Rose, D.L., Henegar, R.B., Bove, J.M., Carle, P., Williamson, D.L., & Clark, T.B. (1994): Taxonomic descriptions of 8 new non-sterol-requiring mollicutes assigned to the genus *Mesoplasma*. International Journal of Systematic Bacteriology 44: 685-693.

Tully, J.G., Whitcomb, R.F., Hackett, K.J., Williamson, D.L., Laigret, F., Carle, P., Bove, J.M., Henegar, R.B., Ellis, N.M., Dodge, D. E., & Adams, J. (1998): *Entomoplasma freundtii* sp. nov., a new species from a green tiger beetle (Coleoptera: Cicindelidae). International Journal of Systematic Bacteriology 48: 1197-1204.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., & Gordon, J.I. (2007): The Human Microbiome Project. Nature 449: 804-810.

van Borm, S., Buschinger, A., Boomsma, J. J., & Billen, J. (2002): *Tetraponera* ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 269: 2023-2027.

van Borm, S., Wenseleers, T., Billen, J., & Boomsma, J.J. (2001): *Wolbachia* in leafcutter ants: a widespread symbiont that may induce male killing or incompatible matings. Journal of Evolutionary Biology 14: 805-814.

Varma, A., Kolli, B. K., Paul, J., Saxena, S., & König, H. (1994): Lignocellulose degradation by microorganisms from termite hills and termite guts - a survey on the present state-of-art. FEMS Microbiology Reviews 15: 9-28.

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., & Cole, J.R. (2007): Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appleid Environmental Microbiology 73: 5261-5267.

Ward, P.S. (1993): Systematic studies on *Pseudomyrmex* acacia-ants (Hymenoptera: Formicidae: Pseudomyrmecinae). Journal of Hymenopteran Research 2: 117-168.

Ward, P.S., & Downie, D.A. (2005): The ant subfamily Pseudomyrmecinae (Hymenoptera: Formicidae): phylogeny and evolution of big-eyed arboreal ants. Systematic Entomology 30: 310-335.

Warnecke, F., Luginbuhl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H., Stege, J.T., Cayouette, M., McHardy, A.C., Djordjevic, G., Aboushadi, N., Sorek, R., Tringe, S.G., Podar, M., Martin, H.G., Kunin, V., Dalevi, D., Madejska, J., Kirton, E., Platt, D., Szeto, E., Salamov, A., Barry, K., Mikhailova, N., Kyrpides, N.C., Matson, E.G., Ottesen, E.A., Zhang, X.N., Hernandez, M., Murillo, C., Acosta, L.G., Rigoutsos, I., Tamayo, G., Green, B.D., Chang, C., Rubin, E.M., Mathur, E.J., Robertson, D.E., Hugenholtz, P., & Leadbetter, J.R. (2007): Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. Nature 450: 560-565.

Way, M.J. (1962): Mutualism between ants and honeydew-producing homoptera. Annual Review of Entomology 8: 307-344.

Wenseleers, T., & Billen, J. (2000): No evidence for *Wolbachia*-induced parthenogenesis in the social Hymenoptera. Journal of Evolutionary Biology 13: 277-280.

Wenseleers, T., Ito, F., van Borm, S., Huybrechts, R., Volckaert, F., & Billen, J. (1998): Widespread occurrence of the microorganism *Wolbachia* in ants. Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences 265: 1447-1452.

Wenseleers, T., Sundstrom, L., & Billen, J. (2002): Deleterious *Wolbachia* in the ant *Formica truncorum*. Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences 269: 623-629.

Wenzel, M., Schonig, I., Berchtold, M., Kampfer, P., & König, H. (2002): Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. Journal of Applied Microbiology 92: 32-40.

Wertz, J. T., & Breznak, J. A. (2007): *Stenoxybacter acetivorans* gen. nov., sp nov., an acetate-

oxidizing obligate microaerophile among diverse O-2-consuming bacteria from termite guts. Applied and Environmental Microbiology 73: 6819-6828.

WOODRING, J., WIEDEMANN, R., FISCHER, M.K., HOFFMANN, K.H., & VOLKL, W. (2004): Honeydew amino acids in relation to sugars and their role in the establishment of ant-attendance hierarchy in eight species of aphids feeding on tansy (*Tanacetum vulgare*). Physiological Entomology 29: 311-319.

XU, J., MAHOWALD, M.A., LEY, R.E., LOZUPONE, C.A., HAMADY, M., MARTENS, E.C., HENRISSAT, B., COUTINHO, P.M., MINX, P., LATREILLE, P., CORDUM, H., VAN BRUNT, A., KIM, K., FULTON, R.S., FULTON, L.A., CLIFTON, S.W., WILSON, R.K., KNIGHT, R.D., & GORDON, J.I. (2007): Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. Plos Biology 5: 1574-1586.

ZAR, J.H. (1996): Biostatistical Analysis. Prentice Hall. Sect 13.3, 282-283.

ZHANG, M.M., POULSEN, M., & CURRIE, C.R. (2007): Symbiont recognition of mutualistic bacteria by *Acromyrmex* leaf-cutting ants. International Society for Microbial Ecology 1: 313-320.

ZIENTZ, E., BEYAERT, N., GROSS, R., & FELDHAAR, H. (2006): Relevance of the endosymbiosis of *Blochmannia floridanus* and carpenter ants at different stages of the life cycle of the host. Applied and Environmental Microbiology 72**:** 6027-6033.

ZIENTZ, E., DANDEKAR, T., & GROSS, R. (2004): Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68: 745-770.

ZIENTZ, E., FELDHAAR, H., STOLL, S., & GROSS, R. (2005): Insights into the microbial world associated with ants. Archives of Microbiology 184: 199-206.

Dipl. Biol. Sascha Eilmus
Holzweg 103,
D-40789 Monheim am Rhein
sascha@eilmus.de

# ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Entomologie heute

Jahr/Year: 2009

Band/Volume: 21

Autor(en)/Author(s): Eilmus Sascha

Artikel/Article: Ein neuer Ansatz zur Erfassung der mit Insekten assoziierten bakteriellen Gemeinschaften am Beispiel der Ameisenakazien Mexikos. A New Approach to Assess the Biodiversity of Bacterial Communities Associated to Insects as Acacias-Ants of Mexico 101-126