

### 5.3 Fütterversuche mit Antibiotika

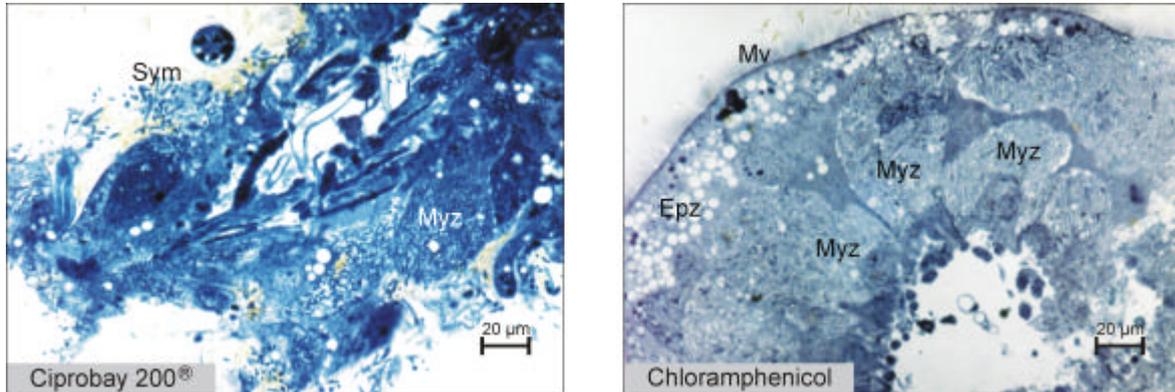
Durch Untersuchungen an Blattläusen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der Tiere mit Antibiotika zum teilweisen bzw. vollständigen Verlust ihrer intrazellulären Bakterien führt. Aphiden reagieren auf Antibiotikafütterungen mit vermindertem Wachstum und einer erhöhten Sterberate (Campbell 1990; Ohtaka und Ishikawa 1991; Wilkinson 1998).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Bedeutung welche die symbiontischen Bakterien für ihre Ameisenwirte haben. Dazu wurden Antibiotikafütterungen durchgeführt die aposymbiontische Ameisen erzeugen sollten, um somit Effekte die durch die Abwesenheit der Symbionten hervorgerufen werden, näher untersuchen zu können. An Hymenopteren wurden Antibiotikabehandlungen schon bei den Wespenarten *Nasonia* und *Trichogramma* durchgeführt (Wilkinson 1998). Diese Fütterversuche sind jedoch nicht automatisch auf Ameisen übertragbar, da diese Tiere besonders sensibel auf die Fütterungen reagieren (M. Obermayer, pers. Mitteilung). Bei früher durchgeführten Fütterversuchen mit 6% Tetrazyklin, gelang die Eliminierung der Symbionten nicht (Schröder 1996; M. Obermayer, pers. Mitteilung). Daher wurden Versuche mit vier unterschiedlichen Antibiotika bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Als Versuchstiere dienten Arbeiterinnen von *Camponotus floridanus*.

#### 5.3.1 Kontrollversuch mit der Ameisenart *Camponotus floridanus*

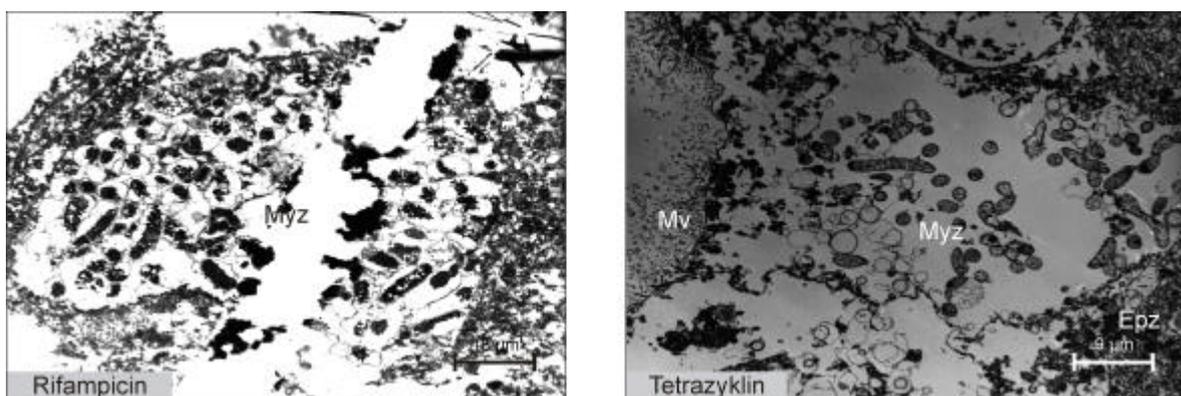
Standardisierte Testgruppen dieser Ameisenart wurden über einen Zeitraum von fünf Wochen regelmäßig mit den Antibiotika-Honig-Gemischen gefüttert. Die verwendeten Antibiotika waren Rifampicin und Chloramphenicol in Endkonzentrationen von 1 bzw. 5% (w/v), Tetrazyklin (Endkonz.: 1, 5, 10%; w/v) und Ciprobay 200<sup>®</sup> (Endkonz.: 0,5 bzw. 1%; w/v). Um die Wirkung dieser Antibiotika zu analysieren, wurden wöchentlich Quetschpräparate der Mitteldärme von je zwei Arbeiterinnen pro Testgruppe angefertigt und mikroskopisch untersucht. Als sich nach fünf Wochen Behandlung die erste Antibiotikawirkung zeigte, wurden Mitteldärme von je fünf Arbeiterinnen aus den Testgruppen eingebettet und licht- bzw. elektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 22 und 23). Die verbleibenden Tiere wurden von diesem Zeitpunkt an mit sterilisiertem Honigwasser und sterilisierten Heimchen weitergefüttert.

Die Antibiotika Chloramphenicol und Ciprobay 200<sup>®</sup> zeigten, auch in ihrer höchsten Dosierung, nach 5 Wochen Behandlung keinerlei Wirkung. Die Darmepithelien der untersuchten Tiere waren völlig intakt und ihre Myzetozyten prall mit Bakterien gefüllt (Abb. 22).



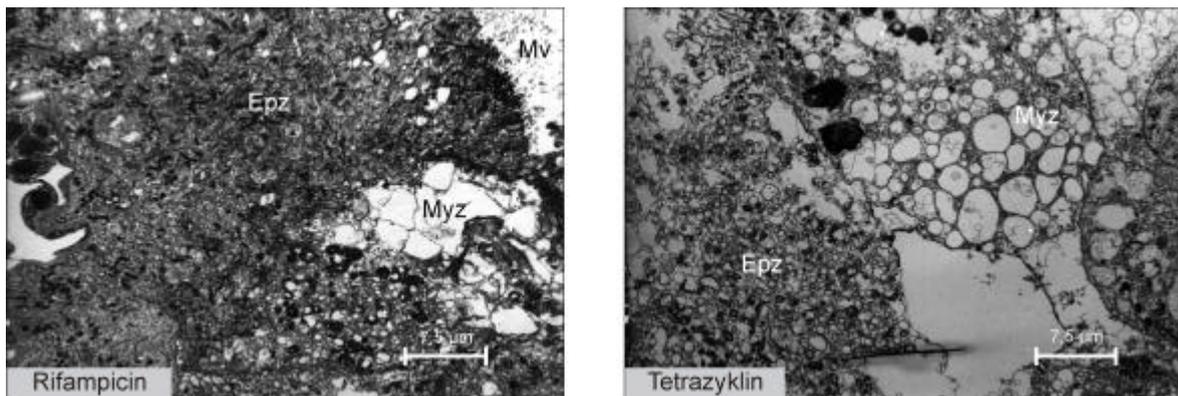
**Abb. 22:** Schnitte durch die Mitteldarmepithelien von *C. floridanus* Arbeiterinnen. Die Tiere stammten aus Testgruppen, die jeweils 5 Wochen mit den Antibiotika Ciprobay 200<sup>®</sup> (1% Endkonz.) und Chloramphenicol (5% Endkonz.) behandelt wurden. Man sieht Myzetozyten (Myz), die voll mit Symbionten (Sym) gefüllt sind. Mv: Mikrovillisaum, Epz: Epithelzelle.

Die Testgruppen, die mit Tetrazyklin bzw. Rifampicin gefüttert wurden (Abb. 23) waren nach fünf Wochen Behandlung praktisch symbiontenfrei. Die Arbeiterinnen dieser Testgruppen hatten alle Symbionten verloren oder trugen nur noch degenerierte, abgestorbene Bakterien in ihren Myzetozyten (Abb. 23). Dabei genügte bereits die jeweils geringste verwendete Antibiotikakonzentration von 1% um die Symbionten innerhalb der Myzetozyten zu eliminieren.



**Abb. 23:** Ultradünnschnitte durch die Mitteldarmepithelien von *C. floridanus* Arbeiterinnen. Die Tiere stammten aus Testgruppen, die jeweils 5 Wochen mit den Antibiotika Rifampicin (1% Endkonz.) und Tetrazyklin (1% Endkonz.) behandelt wurden. Man sieht Myzetozyten (Myz), die im Fall von Rifampicin (links) stark degenerierte Symbionten enthalten. Im Fall von Tetrazyklin (rechts) findet man nur noch vereinzelt Symbionten. Mv: Mikrovillisaum, Epz: Epithelzelle.

Um zu überprüfen, ob sich die Symbionten innerhalb der Ameisen regenerieren können, wurden die Testgruppen nach der 5-wöchigen Antibiotikabehandlung 13 Wochen mit sterilem Futter weitergefüttert und dann nochmals mikroskopisch untersucht (Abb. 24). Die mit Ciprobay 200® bzw. Chloramphenicol behandelten Tiere besaßen nach wie vor prall gefüllte Myzetozyten (ohne Abb.). In den mit 1% Rifampicin bzw. Tetrazyklin behandelten Testgruppen waren nach 18 Wochen keine Arbeiterinnen mehr mit gefüllten Myzetozyten zu finden (Abb. 24).



**Abb. 24:** Ultradünnschnitte durch die Mitteldarmepithelien von *C. floridanus* Arbeiterinnen. Die Tiere stammten aus Testgruppen, die 5 Wochen mit den Antibiotika Rifampicin (1% Endkonz.) bzw. Tetrazyklin (1% Endkonz.) behandelt und anschließend 13 Wochen mit sterilem Futter weitergefüttert wurden. Es konnten keine symbiontengefüllten Myzetozyten (Myz) mehr gefunden werden. Mv: Mikrovillisaum, Epz: Epithelzelle.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der durchgeführten Fütterungen zusammengefasst.

**Tab. 4:** Verwendete Antibiotika und deren Wirkungsweise auf die *Camponotus*-Symbionten

| Antibiotikum    | Endkonzentration | Eliminierung<br>(nach 5 Wochen) | Eliminierung<br>(nach 18 Wochen) |
|-----------------|------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Rifampicin      | 1%               | +                               | +                                |
|                 | 5%               | +                               | +                                |
| Chloramphenicol | 1%               | -                               | -                                |
|                 | 5%               | -                               | -                                |
| Tetrazyklin     | 1%               | +                               | +                                |
|                 | 5%               | +                               | +                                |
|                 | 10%              | +                               | +                                |
| Ciprobay 200®   | 0,5%             | -                               | -                                |
|                 | 1%               | -                               | -                                |

Die Testfütterungen zeigten, dass es möglich ist durch 5-wöchige Antibiotikabehandlung mit 1%igem Rifampicin bzw. Tetrazyklin symbiontenfreie *C. floridanus*-Ameisen zu erzeugen.

Behandlungen mit diesen Antibiotika brachten jedoch erhebliche Nebenwirkungen mit sich. Dies zeigte sich bei einer vergleichenden Betrachtung der Tetrazyklin-Testgruppe mit einer nur mit sterilem Honig gefütterten Kontrollgruppe (Abb. 25). Die Tiere reagierten auf die Behandlung mit starkem Durchfall (Abb. 25; rechts). Darüber hinaus änderten sie im Vergleich zur Kontrollgruppe ihr Verhalten dahingehend, dass ihre Aktivität abnahm. Auswirkungen auf das Wachstum der Ameisen oder eine erhöhte Sterberate wurden allerdings nicht beobachtet.



**Abb. 25:** *C. floridanus* Kontrollgruppe (links), im Vergleich mit einer *C. floridanus* Testgruppe (rechts), die mit Tetrazyklin (1% Endkonzentration) gefüttert wurde. Die Tiere der Testgruppe (rechts) reagierten mit starkem Durchfall (siehe Pfeile) auf die Antibiotikumbehandlung.

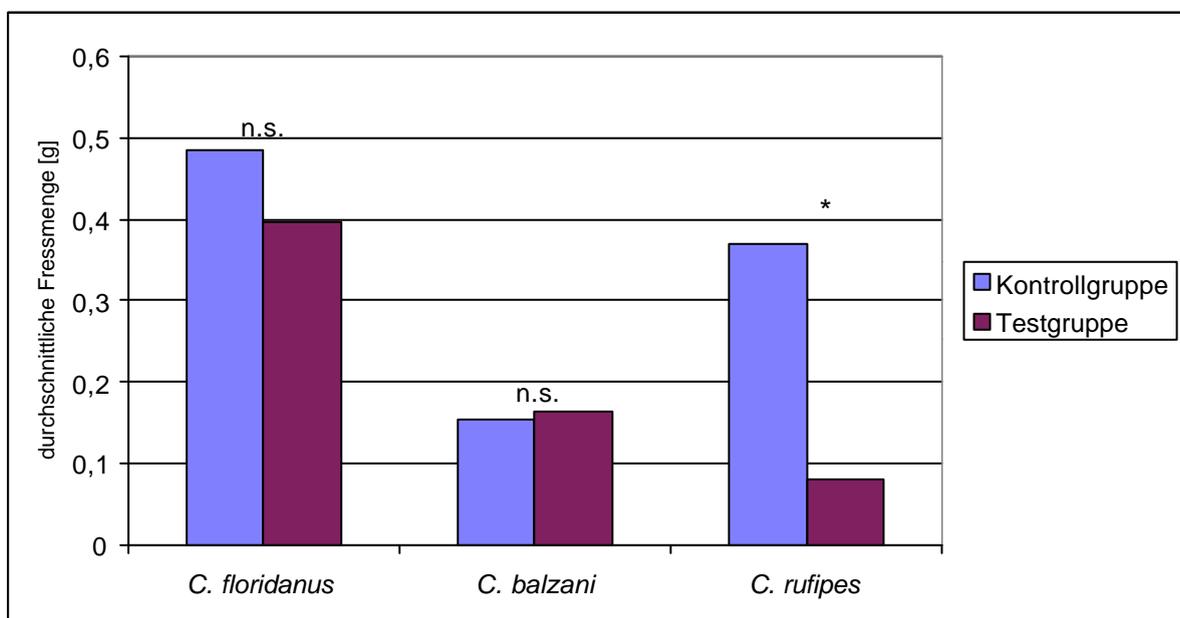
Bei den hier durchgeführten Fütterversuchen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte größtenteils auf die Wirkung der aggressiven Antibiotika zurückzuführen sind, da sich der Durchfall und die Verhaltensauffälligkeiten nach Absetzen der Antibiotikabehandlung wieder legte. Die Tiere der Testgruppe unterschieden sich in ihrer Aktivität nicht mehr von den Tieren der Kontrollgruppe.

Auffällig war, dass die mit 1% Tetrazyklin gefütterten Tiere erhebliche Gewebeschädigungen im Darm aufwiesen (Abb. 24; rechts). Die mit 1% Rifampicin gefütterten dagegen hatten wesentlich geringere Schäden (Abb. 24; links). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Fütterversuche mit 1% Rifampicin durchgeführt.

### 5.3.2 Gefressene Antibiotikamengen bei drei unterschiedlichen *Camponotus*-Arten

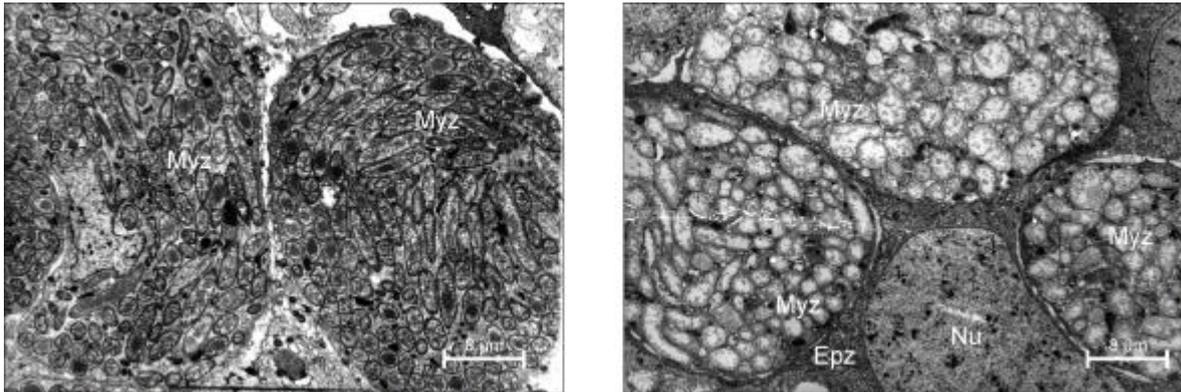
Aposymbiotische *C. floridanus*-Arbeiterinnen können nach der Antibiotikabehandlung über einen langen Zeitraum hinweg ohne ersichtliche Beeinträchtigungen weiterleben. Die für diese Art erhaltenen Ergebnisse sollten nun ebenfalls bei anderen *Camponotus*-Arten getestet werden. Deshalb wurden die Ameisenarten *C. rufipes* und *C. balzani*, nach dem für *C. floridanus* erstellten Fütterprotokoll, über einen Zeitraum von 5 Wochen in regelmäßigen Abständen mit einem Rifampicin-Honig-Gemisch (Endkonz.: 1%) gefüttert. Interessanterweise reagierten die beiden Arten, obwohl der gleichen Gattung angehörig, völlig anders als *C. floridanus* auf die Fütterungen.

Betrachtet man die durchschnittlich gefressene Honigmenge der drei untersuchten Arten (Abb. 26) so fällt auf, dass die Testgruppen von *C. floridanus* und *C. balzani* im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen das 1%ige Rifampicin-Honig-Gemisch problemlos fraßen (Abb. 26). Die beiden Arten unterscheiden sich allerdings in der Futtermenge die sie benötigen. Während *C. floridanus* durchschnittlich 0,4-0,5 g fraß, brauchte *C. balzani* nur zwischen 0,1 und 0,2 g Honig. Darüber hinaus reagierte *C. balzani* auf die Behandlung mit dem Antibiotikum mit einer sehr hohen Sterberate.



**Abb. 26:** Durchschnittliche gefressene Honigmengen von 3 verschiedenen *Camponotus*-Arten, während ihrer 5wöchigen Antibiotikumbehandlung. Die Kontrollgruppen wurden während der Fütterversuche mit sterilisiertem Honig gefüttert, wohingegen die Testkolonien ein Rifampicin-Honig-Gemisch mit 1%iger Rifampicin-Endkonzentration erhielten. (t-Test: *C. floridanus*:  $t = 1,28$ , ns; *C. balzani*:  $t = -0,18$ , ns; *C. rufipes*:  $t = 2,42$ ,  $p \leq 0,05$ ).

Die Arbeiterinnen der Art *C. rufipes* reagierten auf die Rifampicin-Fütterung extrem sensibel und ließen das Antibiotikum-Honig-Gemisch fast unberührt. Die Testgruppe fraß hier mit durchschnittlich 0,08 g signifikant weniger ( $t = 2,42$ ;  $p < 0,05$ ) als die Kontrollgruppe (durchschnittliche Fressmenge: 0,37 g) (Abb. 26). Aufgrund dieser geringen Fressmenge konnten keine symbiontenfreien *C. rufipes*-Arbeiterinnen erzeugt werden (Abb. 27).



**Abb. 27:** *C. rufipes* Kontrollgruppe (links), im Vergleich mit einer Testgruppe (rechts), die mit 1% Rifampicin gefüttert wurde. Die Tiere der Testgruppe (rechts) besitzen genauso viele symbiontengefüllte Myzetozyten (Myz), wie die Kontrollgruppe (links). Auch Gewebeschädigungen sind nicht zu erkennen. Epz: Epithelzelle; Nu: Nukleus.

Das Mitteldarmepithel der mit Antibiotika gefütterten *C. rufipes*-Arbeiterin unterschied sich nicht von dem Epithel einer unbehandelten Arbeiterin aus der Kontrollgruppe. Das Darmgewebe war intakt, und die Myzetozyten der Arbeiterin aus der Testgruppe waren prall gefüllt mit Symbionten (Abb. 27; links). Um die Symbionten erfolgreich zu eliminieren, wurde von den *C. rufipes*-Testgruppen zu wenig Rifampicin-Honig gefressen.