

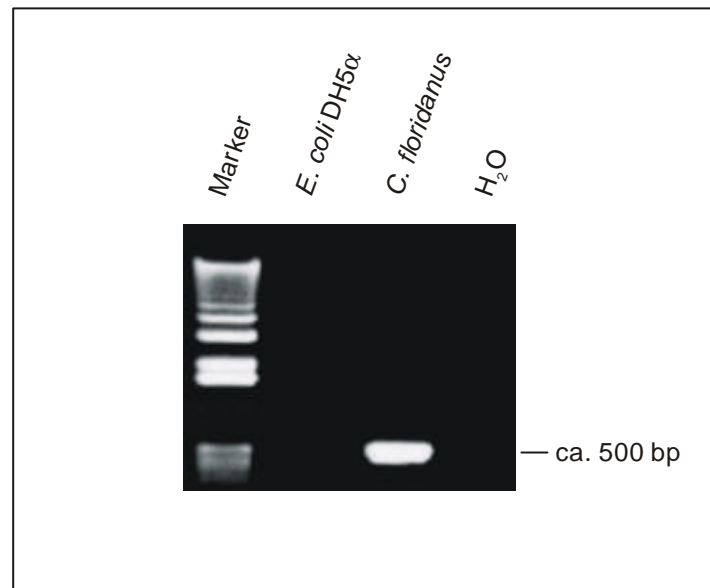
## 5.4 Isolierung und Kultivierung der Endosymbionten

Weder bei den Aphidensymbionten, noch bei anderen symbiontische Bakterien ist es bisher gelungen, mit gängigen Kultivierungsmethoden Erfolge zu erzielen. Dasch (1975) und Schröder (1996) versuchten schon früher die Ameisensymbionten zu kultivieren. Beide Male schlug dies jedoch fehl.

Bisherige Kultivierungsversuche wurden immer mit Darmlysaten gemacht (Schröder 1996). In dieser Arbeit sollten die Versuche erstmals mit, aus dem Darmgewebe isolierten, Symbionten gemacht werden. Mit diesen isolierten Symbionten wurden gängige Bakterienmedien angeimpft und Infektionsversuche an Insektenzellen durchgeführt.

### 5.4.1 Isolierung der *Camponotus*-Endosymbionten

Für die Symbiontenisolierung wurden ca. 200 Darmepithelien von *C. floridanus*-Arbeiterinnen in sterilem Insektenmedium präpariert und in Zellkulturmedium mit Gentamycin mehrmals auf Eis gewaschen. Anschließend wurden die Mitteldärme in einen Glashomogenisator mit Isolierungspuffer überführt und auf Eis vorsichtig für mehrere Minuten homogenisiert. Die Epithel-Puffer-Suspension wurde zentrifugiert (2200 Upm, 4°C, 10 min), um die Epithelteile des Darmes abzulösen. Der die Symbionten enthaltende Überstand wurde abgenommen und nochmals zentrifugiert (9700 Upm, 4°C, 10 min). Das erhaltene Pellet wurde in 2,5 ml Isolationspuffer resuspendiert. Die Symbionten wurden direkt nach der Isolierung mikroskopisch untersucht, um zu überprüfen ob es sich um intakte Symbionten handelt, die sofort weiterverarbeitet werden können. Als zusätzliche Kontrolle wurde 1 µl der Bakterien-Suspension als Template für eine PCR mit den Primern flori2 und SR benutzt. Die Primer flori2 und SR binden spezifisch an *C. floridanus*-Symbionten-DNA. Bei erfolgreicher Amplifikation erhält man ein ca. 500 bp großes PCR-Produkt (Abb. 28). Da die Primer flori2 und SR nur innerhalb der 16S rDNA der *C. floridanus*-Symbionten binden, darf man bei der Verwendung eines *E. coli*-Rohlysats als Template kein PCR-Produkt erhalten (Abb. 28).



**Abb. 28:** Spezifische Amplifikation eines 500 bp PCR-Fragments der 16S rDNA der *C. floridanus*-Symbionten durch die Primer flori2 und SR.

#### 5.4.2 Kultivierbarkeit der *Camponotus*-Endosymbionten in Flüssigkulturen

Aus Mitteldarmgewebe isolierte Endosymbionten wurden zum Animpfen verschiedener Bakterienmedien verwendet. Je 100  $\mu$ l der Isolierungspuffer-Symbionten-Suspension wurden in verschiedener aeroben und mikroaerophilen Flüssigmedien inkubiert (Tab. 5). Die Medien waren teilweise mit dem Zucker Pyruvat angereichert. Dieser Zucker entspricht in der Insektenzelle bzw. der Hämolymphe dem menschlichen Blutzucker Glukose. Die Kulturen wurden bei Raumtemperatur fünf bis zehn Wochen inkubiert. Die Kultivierungsergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

**Tab. 5:** Verwendete Flüssigkultur-Medien und die erzielten Wachstumserfolge

Medium	Wachstum (aerob)	Wachstum (mikroaerophil)	Mikroskopie	PCR (flori2/SR)
MHY-Glukose-Fruktose-Pyruvat	-	-	-	-
MHY-Glukose-Fruktose-Saccharose-Pyruvat	-	-	-	-
MHY-Saccharose-Pyruvat	-	-	-	-
Brain-Heart-Infusion	+	+	Hefen und Stäbchen	negativ
2 x YT	-	-	-	-
NB-Glukose-Fruktose-Saccharose	-	-	-	-
NB-Glukose-Fruktose	-	-	-	-
NB-Saccharose	-	-	-	-
LB	-	-	-	-
SOB	-	-	-	-
Grace's Insect	-	-	-	-
Schneider's Insect	-	-	-	-

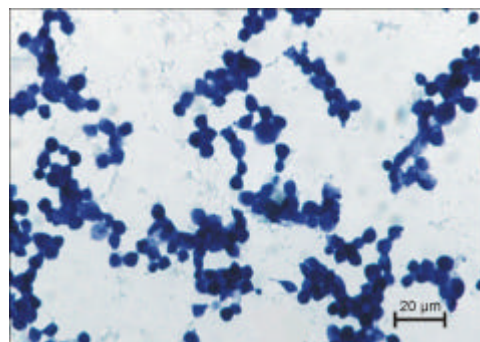
Alle Kulturen wurden mikroskopisch untersucht. Von den Kulturen, die stäbchenförmige Bakterien enthielten, wurden Rohlysate hergestellt, die als Template für einen PCR-Nachweis mit den für die *C. floridanus*-Endosymbionten spezifischen Primern flori2 / SR verwendet wurden.

Mit Ausnahme der Brain-Heart-Infusion-Kultur waren in keiner anderen Kultur Mikroorganismen zu finden. Der PCR-Nachweis mit den spezifischen Primern flori2 / SR brachte kein Produkt der erwarteten Größe (500 bp).

Diese Untersuchungen zeigen, dass es mit den hier eingesetzten mikrobiologischen Medien und Wachstumsbedingungen nicht möglich ist, die *Camponotus*-Endosymbionten *in vitro* zu kultivieren.

#### 5.4.3 Infektionsversuche mit *Camponotus*-Endosymbionten an Insektenzellen

Da die Kultivierung der Symbionten mit Hilfe von Bakterienmedien fehlschlug, wurden Infektionsversuche an Insektenzellen durchgeführt. Versuche dieser Art wurden hier erstmalig durchgeführt. Da keine spezielle Ameisen-Zelllinie zur Verfügung stand, wurden die Versuche mit Hilfe von Schneider's Drosophila-Zellen und SF9-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden auf Deckgläschen angezogene ÜN-Kulturen der Insektenzellen mit frisch isolierten *C. floridanus*-Symbionten infiziert. Von der Symbionten-Suspension wurden je 50, 100, 200, und 500 µl zu den Insektenzellen gegeben. Die Infektion erfolgte ÜN. Am nächsten Tag wurden Kontrollfärbungen mit 1:10 verdünnter Giemsalösung durchgeführt um eventuelle Interaktionen zwischen Symbionten und Insektenzellen lichtmikroskopisch zu überprüfen. Ein so erhaltenes mikroskopisches Zellpräparat ist nachfolgend dargestellt (Abb. 29). Die Insektenzellen (blau) agglomerieren sehr schnell und machen ein Auffinden der Symbionten unmöglich.



**Abb. 29:** Kontrollfärbung von Schneider's Drosophila-Zellen nach Infektion mit 500 µl Symbionten-Medium-Suspension. Zu sehen sind agglomerierte Insektenzellen. Symbionten können keine gefunden werden.

Leider konnten am Tag nach der Infektion bei allen durchgeführten Infektionen keine Bakterien mehr gefunden werden. Erschwerend kam hinzu, dass Schneider's Drosophila-Zellen nur sehr schwer adhärieren, sodass ein Auffinden der Bakterien hierdurch noch erschwert wurde.