

日本弓背蚁颊下囊内含物中细菌的组成研究*

张 君^{1**} 南小宁¹ 魏 琮² 王云果¹ 贺 虹^{1***}

(1. 西北农林科技大学林学院, 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学植物保护学院, 杨陵 712100)

摘 要 【目的】颊下囊是蚂蚁口前腔中一个特殊的袋状结构, 在蚂蚁取食过程中, 固体食物和其它颗粒在进入食道前被过滤在颊下囊中, 稍后被蚂蚁从口前腔排出, 这种过滤机制保证了主要利用液体食物的蚂蚁整个消化道的畅通。本文旨在揭示蚂蚁颊下囊结构及其内含物中存在的细菌类群及其可能在蚂蚁的消化、清洁以及其它方面发挥的潜在作用。【方法】利用扫描电镜确定了日本弓背蚁颊下囊在蚂蚁头部的位置及其形状, 然后采用传统的细菌分离培养与细菌 16S rRNA 基因序列分析相结合的方法进行了颊下囊内含物以及蚁巢内土壤样品细菌的分离培养研究。【结果】(1) 颊下囊位于蚂蚁口腔的后侧, 呈袋状结构, 内部含有大量的固体颗粒物质;(2) 3 个蚁巢工蚁颊下囊内含物每克样品中可培养细菌的菌落总数 (cfu/g) 数量差异较大, 并且显著大于同巢土壤样品的细菌 cfu/g 数量;(3) 从 3 个蚁巢的工蚁颊下囊内含物中共分离到 11 属的细菌, 分别隶属于厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria) 和 γ -变形菌纲 (γ -Proteobacteria) 三大类群, 其中放线菌门细菌为优势类群; 在属级水平上, 巢 1 和巢 2 工蚁颊下囊内含物中的优势菌群为微杆菌属, 分别占 47.83% 和 49.73%, 巢 3 优势菌群为不动杆菌属和微杆菌属, 分别占 37.27% 和 30%; 3 个蚁巢土壤样品优势菌均为芽孢杆菌属, 分别占各自分离总菌落数的 49.69%、56.22% 和 44.79%。(4) 蚁巢土壤中所分离出的细菌均能在同巢工蚁的颊下囊内含物中分离得到, 但同一蚁巢蚂蚁颊下囊内含物与其巢内土壤的细菌组成存在明显差异; 不同蚁巢蚂蚁颊下囊内含物的细菌组成也存在明显差异。【结论】蚂蚁的颊下囊中存在丰富的细菌种类, 在蚁巢土壤中分离到的细菌均能在颊下囊中发现, 而在颊下囊中分离到的部分细菌并没有在相应的蚁巢土壤样品中分离到。

关键词 日本弓背蚁, 颊下囊, 可培养细菌

Bacterial composition of the infrabuccal pocket of *Camponotus japonicus* Mayr

ZHANG Jun^{1**} NAN Xiao-Ning¹ WEI Cong² WANG Yun-Guo¹ HE Hong^{1***}

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract [Objectives] The infrabuccal pocket is a special pouch-like filtration device located in the preoral cavity of ants. During feeding, solid food particles and other solid materials are filtered and compacted in the infrabuccal pocket before entering the alimentary tract. Any waste is later ejected from the preoral cavity thereby helping prevent the alimentary tract from blocking. In this paper we explore the bacterial groups in the contents of the infrabuccal pocket and their potential roles in digestion, cleaning and other aspects of ant biology. [Methods] The location of the infrabuccal pocket in the head of *Camponotus japonicus* was identified with scanning microscopy, and the bacteria in the infrabuccal pocket investigated using a culture-dependent method and 16S rRNA gene sequence analysis. [Results] (1) The infrabuccal pocket is a pouch-like structure located in the posterior oral cavity containing a large number of solid particles. (2) The cfu/g of bacteria in the infrabuccal pockets of ants from three colonies varied significantly, but all were greater than in their respective nest soil. (3) Eleven bacterial genera were isolated from the infrabuccal pockets of ants from three colonies. These belonged to the

* 资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (No.31070342, No.31570388); 林业公益性行业科研专项 (201404302-4)

**第一作者 First author, E-mail: zhangjun2537@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: hehong@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-02-09, 接受日期 Accepted: 2015-08-28

Firmicutes, Actinobacteria and γ -Proteobacteria respectively. Actinobacteria was the dominant bacterial group. At the generic level, *Microbacterium* was the most dominant bacterial group in the 1st and 2nd colonies, accounting for 47.83% and 49.73% respectively of the total. *Acinetobacter* and *Microbacterium* were the two dominant bacterial groups in the 3rd colony, accounting for 37.27% and 30% of the total, respectively. However, *Bacillus* was the dominant bacteria in all three nest soil samples, accounting for 49.69%, 56.22% and 44.79% respectively. (4) All bacteria isolated from nest soil can be found in the infrabuccal pocket but the bacterial composition of the infrabuccal pocket and nest soil differs within the same colony.

[Conclusion] The bacterial composition of the infrabuccal pocket of *C. japonicus* is diverse. All bacteria isolated from a colonies' nest soil can be found in the infrabuccal pocket of ants from that colony, but several bacteria isolated from the infrabuccal pockets of ants were not found in samples of the respective colonies nest soil.

Key words *Camponotus japonicus* Mayr, infrabuccal pocket, culturable bacteria

蚂蚁是陆地生态系统中种类和数量最为丰富的动物类群,也是高度进化的社会性昆虫(Hölldober and Wilson, 1990)。大部分蚂蚁在觅食过程中,既取食液体食物(如花蜜、树汁以及蚜虫的蜜露等),又可取食固体食物(如植物的种子、其他昆虫及小动物尸体等)(吴坚和王长禄,1995)。但由于蚂蚁口前腔具有特殊的“颊下囊”结构(Infrabuccal pocket)可对固体食物颗粒进行过滤并定期排出体外,因此只有液体食物能进入觅食工蚁的食道并被暂时贮存于嗉囊中,然后再通过不同个体的相互反哺(交哺)传递给群体内的其他工蚁、幼虫和蚁后(Hölldober and Wilson, 1990)。因此,蚂蚁的消化系统结构和液体营养物质在蚂蚁群体间的传递密切相关,对于群体的生存繁衍具有重要意义。

研究表明,颊下囊是由蚂蚁口腔下咽部的内壁内陷形成的一个袋状结构,位于前咽的右前方(Eisner and Happ, 1962)。当食物在进入食道前,固体食物和其他的颗粒材料被过滤进入颊下囊中,稍后被从口前腔排出(Quinlan and Cherrett, 1978)。同时,颊下囊连接有特殊的腺体,其分泌物可能具有口腔内营养物质的消化以及促进颊下囊中物质分解的功能(Eelen *et al.*, 2004)。此外,研究也发现蚂蚁的颊下囊中存在特殊的微生物类群,并认为这些微生物可能对于蚂蚁的营养物质消化、群体清洁以及其它方面发挥着重要的作用(Hansen *et al.*, 1999; Mankowski and Morrell, 2004)。但是,截至目前颊下囊的相关研究仅限于极少数蚂蚁的零星报道。

日本弓背蚁 *Camponotus japonicus* 是我国广

泛分布的蚂蚁种类,He 等(2011)和 Li 等(2012)对其消化道的微生物组成进行了研究,发现与其他昆虫相比,其消化道微生物种类组成相对比较简单,主要以其中肠肠壁细胞特有的内共生菌 *Blochmannia* 为主,其他细菌种类较少。颊下囊作为蚂蚁消化系统的一个特殊结构,可能对一些微生物具有过滤作用,避免有害的微生物进入消化道或传递给群体内其他个体。因此,本文在日本弓背蚁消化道微生物研究的基础上,采用扫描电镜技术明确了颊下囊在蚂蚁口腔中的具体位置,并采用传统的微生物分离培养和细菌 16S rRNA 基因序列相结合的方法对其颊下囊内含物中的细菌进行了分离和鉴定,旨在为深入了解颊下囊及其所含微生物对于蚂蚁食物资源利用及其清洁行为可能发挥的作用提供有益的信息。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2013 年 8 月至 9 月,在陕西省杨凌地区选择 3 个日本弓背蚁蚁巢,分别采集若干外出觅食的工蚁,带回实验室进行颊下囊解剖及其内含物的研究,并按照 Bouhon 等(2003)的方法采集蚁巢内土壤带回实验室进行细菌的分离和培养。

1.2 蚂蚁头部扫描电镜样品的制备

将采集到的工蚁首先放置于冰箱(海尔 BCD-256H)4 条件下 10 min 左右,减弱其活动能力,然后取出分别将头部纵切和横切,露出颊下囊后放入事先准备好的 2.5%戊二醛固定液

中, 后续样品的处理参照杨群芳等(2009)的方法进行。处理好的样品置于 HITACHI S-3400N 型扫描电镜(加速电压 15 kV)下观察拍照。

1.3 颊下囊内含物及蚁巢土壤中细菌的分离培养

1.3.1 颊下囊的解剖 在超净工作台中, 利用 75% 的酒精对工蚁体表进行消毒, 然后利用灭菌的解剖刀纵切蚂蚁头部, 再用灭菌的小镊子小心解剖出颊下囊及其内含物, 放置于已称重的灭菌离心管(1.5 mL)中。由于颊下囊非常小, 且其中内含物积累程度不同, 只有积累有内含物的颊下囊才能够解剖出来。因此, 从每个蚁巢选择获得 10 头工蚁的完整颊下囊内含物进行微生物的分离培养。

1.3.2 细菌的分离培养 在解剖得到的颊下囊内含物样品中加入 1 mL 无菌水, 充分匀浆后将颊下囊内含物样品逐级稀释为不同浓度梯度的稀释液。称取 10 g 蚁巢土壤样品放入内有 30 粒经灭菌处理的玻璃珠的三角瓶中, 加入 90 mL 无菌水后用恒温振荡器振荡 30 min (25 ~ 170 r/min), 依次将土壤样品逐级稀释为不同浓度梯度的稀释液。

从准备好的颊下囊内含物和蚁巢土壤各浓度稀释液中, 各取 100 μ L 涂布接种于牛肉膏蛋白胨培养基中, 每个浓度设置 3 个重复。将培养皿倒置放于恒温培养箱中 28 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 记录每个平板上的菌落形态(包括菌落形状、大小、色泽、光泽、湿润度、透明度、隆起状况、边缘状况、表面状况等)及每种形态菌落的菌落数。根据菌落形态特征挑取单菌落, 进行划线培养, 分离纯化后置于 4 $^{\circ}$ C 保留备用。

1.3.3 细菌的菌落 PCR 鉴定 用牙签挑取少量纯化的细菌单菌落, 插入 10 μ L 无菌水中制成菌悬液作为 DNA 模板, 然后利用细菌 16S rRNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-AG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACG-ACTT-3') 进行 PCR 扩增(王鸿艳等, 2014; 朱卓琳等, 2015)。PCR 扩增反应体系包括: 5 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液(包含 Mg^{2+}), 2.5 μ L dNTP (2.5 μ mol/L), 27F 和 1492R 引物(10 μ mol/L)

各 1 μ L, 0.5 μ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L), DNA 模板 2 μ L, 用灭菌 ddH₂O 补充体积至 25 μ L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 达到测序的浓度和纯度后送上海生工生物工程股份有限公司进行双向测序。相同形态的菌落至少挑取两个进行测序分析。

1.4 数据处理及分析

利用软件 ChromasPro 1.5 和 Lasergene 7 对获得菌株的原始序列进行拼接和校对, 并切除首尾乱序。将校对后的序列在 GenBank NCBI 数据库中进行 Blast 比对, 并下载同源性最高的序列, 将菌株序列及其同源性序列输入 ClustalX 2.1 软件中进行多重比对(Larkin *et al.*, 2007), 比对结果在 MEGA 5 中选出最理想的建树模型(Tamura *et al.*, 2011)并构建最大似然系统发育树(Maximum Likelihood tree), 并结合 Ribosomal Database Project 数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/>)确定细菌的分类地位, 依据 97% 的序列相似性作为判定细菌种类的标准。

2 结果与分析

2.1 日本弓背蚁颊下囊的位置和形状

利用扫描电镜对日本弓背蚁头部的纵切面及横切面进行了观察(图 1), 结果表明: 颊下囊位于蚂蚁口腔后侧, 呈一个袋状结构, 后方与前咽相连, 一些固体颗粒和碎片被存放在颊下囊中, 使其前后径长达 720.2~916.5 μ m, 大小与内含物的多少有关。

2.2 日本弓背蚁颊下囊内含物及蚁巢内土壤可培养细菌的数量比较

从 3 个蚁巢分别解剖各获得 10 头工蚁的颊下囊内含物, 巢 1 颊下囊内含物样品的重量为 0.003 g, 巢 2 和巢 3 均为 0.002 g。

从表 1 可以看出: 3 个蚁巢颊下囊内含物细菌的 cfu 数量差异显著($P < 0.05$), 相应的蚁巢内土壤细菌 cfu/g 数量亦存在显著差异($P < 0.05$),

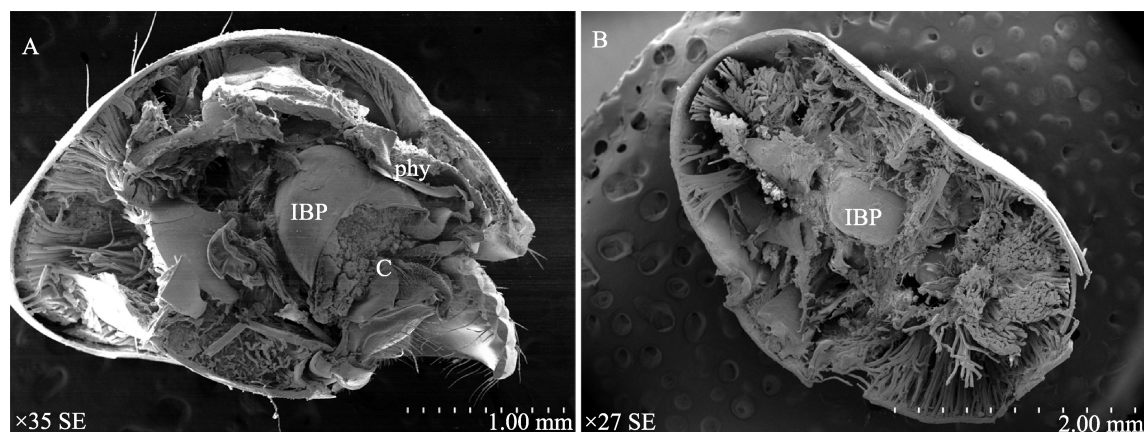


图 1 日本弓背蚁工蚁头部的纵切面和横切面

Fig. 1 Vertical section and cross section of worker's head of *Camponotus japonicus*

A. 头部纵切面; B. 头部横切面。IBP: 颊下囊; C: 颊下囊内含物; Phy: 前咽。

A. Vertical section of worker's head; B. Cross section of worker's head; IBP: Infrabuccal pocket; C. Content; Phy. Pharyngeal.

大小均为巢 1>巢 2>巢 3; 同一蚁巢中, 工蚁颊下囊内含物中细菌 cfu/g 数量均显著大于同巢的巢内土壤细菌的 cfu/g 数量 ($P<0.05$); 颊下囊内含物与蚁巢土壤细菌 cfu/g 数量的相关性系数为 0.983, 呈显著的正相关 ($P<0.01$)。

2.3 颊下囊内含物及蚁巢土壤中细菌的种类组成

从 3 个蚁巢工蚁颊下囊内含物样品中共分离到 36 个形态不同的菌株, 对其进行 16S rRNA 基因序列的 NCBI 比对, 结果显示这些菌株包括 11 个属的细菌, 隶属于 γ -变形菌纲 (γ -Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和

放线菌门 (Actinobacteria) 3 大类群 (表 2)。

从 3 个蚁巢工蚁颊下囊微生物种类组成可以看出: 芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、束丝放线菌属 (*Actinosynnema*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 在 3 个样品中均有分布; 但 3 个蚁巢工蚁颊下囊内含物中细菌种类组成和优势菌存在一定差异, 从巢 1 工蚁颊下囊内含物中分离到 9 个属的细菌, 其中优势菌群为微杆菌属, 占 47.83% (图 2: A); 从巢 2 工蚁颊下囊内含物中分离到 9 个属的细菌, 其中优

表 1 3 个蚁巢工蚁颊下囊内含物与蚁巢土壤细菌的 cfu/g 数量比较

Table 1 Comparison of bacterial cfu/g in content of infrabuccal pockets and nest soil from three colonies of *Camponotus japonicus*

蚁巢 Colony	颊下囊内含物 (10^7 cfu/g) Content of infrabuccal pockets (10^7 cfu/g)	蚁巢土壤 (10^7 cfu/g) Nest soil (10^7 cfu/g)
巢 1 1st colony	5.11±0.30Aa	1.36±0.11Ba
巢 2 2nd colony	3.12±0.19Ab	0.78±0.15Bb
巢 3 3rd colony	1.83±0.08Ac	0.45±0.03Bc

每行的标识字母 (大写字母) 表示同一蚁巢中颊下囊和蚁巢土壤中细菌数量的差异是否显著, 每列的标识字母 (小写字母) 表示颊下囊和蚁巢土壤中细菌数量在不同蚁巢中的差异是否显著; 标识字母不同表示差异显著 ($P<0.05$), 标识字母相同表示差异不显著 ($P>0.05$)。

Different letters after data of each line indicate if the cfu/g of in same colony are significant difference at the 0.05 level. Different letters after data of each column indicate the cfu/g of infrabuccal pockets and nest soil in same colony are significant difference at the 0.05 level. The same letters after data of each line and column indicate no significantly difference at the 0.05 level, different letters indicate significant difference at the 0.05 level.

表 2 日本弓背蚁颊下囊内含物中细菌的分离鉴定

Table 2 Bacterial isolation and identification from contents of infrabuccal pocket in *Camponotus japonicus*

细菌所属门 Phylum	代表菌株 Represent- ative strains	GenBank 中同源性最高的 细菌种类 Identification from closest match in GenBank	一致性 (%) Identity	菌落数 Number of bacterial colony			小计 Subtotal	总计 Total
				巢 1 1st colony	巢 2 2nd colony	巢 3 3rd colony		
厚 壁 菌 门 Firmicutes	IPC1-11	<i>Bacillus plakortidis</i> (JQ895024.1)	99%	8	0	0	8	159
	IPC1-9	<i>Bacillus lehensis</i> (NR 036940.1)	99%	9	2	2	13	
	IPC1-1	<i>Bacillus</i> sp. (JQ821382.1)	99%	47	11	15	73	
	IPC1-3	<i>Exiguobacterium</i> sp.(JQ977375.1)	99%	47	0	0	47	
	IPC1-4	<i>Paenibacillus</i> sp.(KC810827.1)	99%	3	10	5	18	
放 线 菌 门 Actinobacteria	IPC2-6	<i>Streptomyces</i> sp.(KC789736.1)	99%	40	5	2	47	446
	IPC1-5	<i>Streptomyces</i> sp.(JN969025.1)	99%	19	0	0	19	
	IPC2-7	<i>Actinosynnema mirum</i> (X84447.1)	99%	7	2	4	13	
	IPC2-8	<i>Arthrobacter</i> sp.(JX949856.1)	99%	0	3	0	3	
	IPC2-5	<i>Kocuria</i> sp.(HM172614.1)	99%	0	18	0	18	
	IPC2-3	<i>Microbacterium</i> sp.(KF923417.1)	99%	184	72	25	281	
	IPC2-9	<i>Microbacterium</i> sp.(KF054854.1)	99%	36	21	8	65	
γ - 变 形 菌 纲 γ -Proteobacteria	IPC1-8	<i>Enterobacter</i> sp.(EU331414.1)	99%	6	0	0	6	152
	IPC3-4	<i>Pseudomonas</i> sp.(JX067668.1)	99%	4	5	8	17	
	IPC3-6	<i>Acinetobacter</i> sp.(EF195353.1)	99%	50	38	41	129	
菌落总数 Total number of bacterial colony				460	187	110		757

势菌群也为微杆菌属, 占 49.73% (图 2 : C); 从巢 3 工蚁颊下囊内含物中分离到 7 个属的细菌 (图 2 : E), 优势菌群为不动杆菌属 (占 37.27%), 其次为微杆菌属, 占 30%。

从相应的 3 个蚁巢土壤样品中分别分离到 6 个属、6 个属和 5 个属的细菌 (表 3, 图 2 : B ~ F), 其优势菌均为芽孢杆菌属, 分别占 49.69%、56.22% 和 44.79%。

同一蚁巢的巢内土壤与颊下囊内含物细菌组成也存在差异 (表 3)。在巢 1 中, 类芽孢杆菌属、节杆菌属和考克氏菌属 (*Kocuria*) 仅在颊下囊样品中有分布, 而在土壤样品中未分离到; 在巢 2 中, 土壤样品中未分离到其颊下囊样品中分布的束丝放线菌属、节杆菌属和假单胞杆菌属; 在巢 3 中, 类芽孢杆菌属、链霉菌属仅在颊下囊中分离到。因此, 整体来看, 在蚁巢土壤中分离到的细菌均能在颊下囊中发现, 而在颊下

囊中分离到的节杆菌属 (*Arthrobacter*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 并没有在相应的蚁巢土壤样品中发现。

2.4 细菌的系统发育分析

将各代表菌株与在 GenBank 中比对得到的同源性最高的菌株序列在 ClustalX 2.1 软件中进行多重比对, 比对结果在 MEGA 5 中以 N-J 法构建最大似然系统发育树 (图 3), 从图 3 可以看出, 分离到的 11 个属细菌与其相似性序列分别聚为三大类, 其中 15 个菌株属于放线菌门 Actinobacteria (占 41.67%), 15 个菌株属于厚壁菌门 Firmicutes (占 41.67%), 6 个菌株属于 γ -变形菌纲 γ -Proteobacteria (占 16.67%)。在 Firmicutes 类群中, 菌株 IPC1-1、IPC1-2、IPC1-9 和 IPC1-11 与 *Bacillus* sp. 亲缘关系密切, 占到所有分离菌株的 27.78%, 是分离到菌株最多的属;

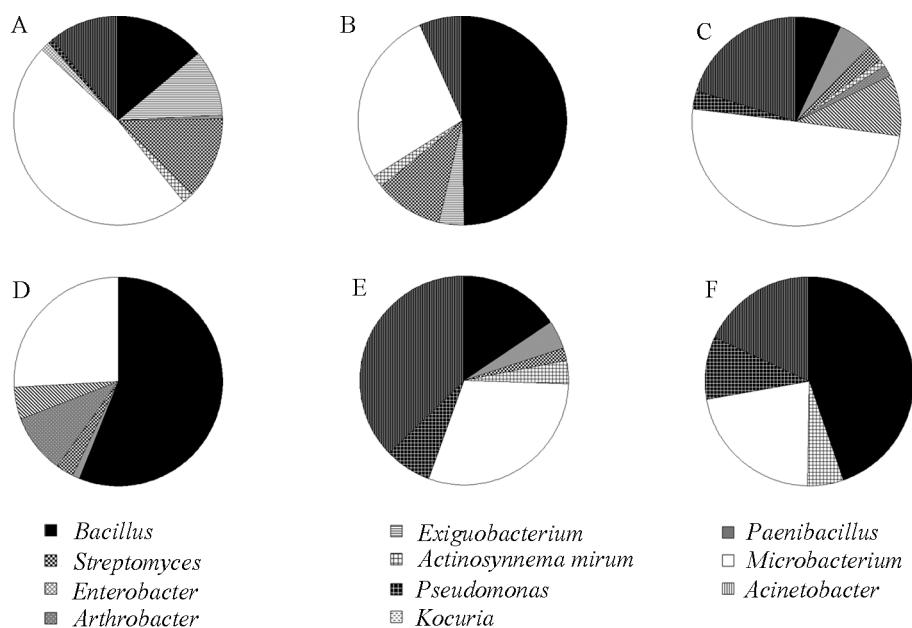


图 2 日本弓背蚁不同蚁巢工蚁颊下囊内含物及蚁巢土壤样品中可培养细菌的组成比较

Fig. 2 Composition of culturable bacterial strains isolated from the contents of infrabuccal pocket and nest soil in three colonies of *Camponotus japonicus*

A, B, C, D, E, F 分别代表巢 1 颊下囊内含物、巢 1 土壤、巢 2 颊下囊内含物、巢 2 土壤、巢 3 颊下囊内含物和巢 3 土壤的细菌组成。

A and B represent the bacterial composition isolated from the contents of infrabuccal pocket and nest soil in 1st colony; C and D represent the the bacterial composition isolated from the contents of infrabuccal pocket and nest soil in 2nd colony; E and F represent the bacterial composition isolated from the contents of infrabuccal pocket and nest soil in 3rd colony.

表 3 细菌在日本弓背蚁颊下囊内含物以及蚁巢土壤中的分布

Table 3 The distribution of bacteria in contents of infrabuccal pocket and nest soil in three colonies of *Camponotus japonicus*

细菌属 Genus	细菌分布 The distribution of bacterial strains					
	巢 1 1st colony		巢 2 2nd colony		巢 3 3rd colony	
	内含物 Contents	土壤 Soil	内含物 Contents	土壤 Soil	内含物 Contents	土壤 Soil
<i>Bacillus</i>	√	√	√	√	√	√
<i>Exiguobacterium</i>	√	√	—	—	—	—
<i>Paenibacillus</i>	√	—	√	√	√	—
<i>Streptomyces</i>	√	√	√	√	√	—
<i>Actinosynnema</i>	√	√	√	—	√	√
<i>Arthrobacter</i>	—	—	√	—	—	—
<i>Kocuria</i>	—	—	√	√	—	—
<i>Microbacterium</i>	√	√	√	√	√	√
<i>Enterobacter</i>	√	—	—	—	—	—
<i>Pseudomonas</i>	√	—	√	—	√	√
<i>Acinetobacter</i>	√	√	√	√	√	√

“√”代表在样品中出现，“—”代表在样品中没有出现。

“√” means present, “—” means absence.

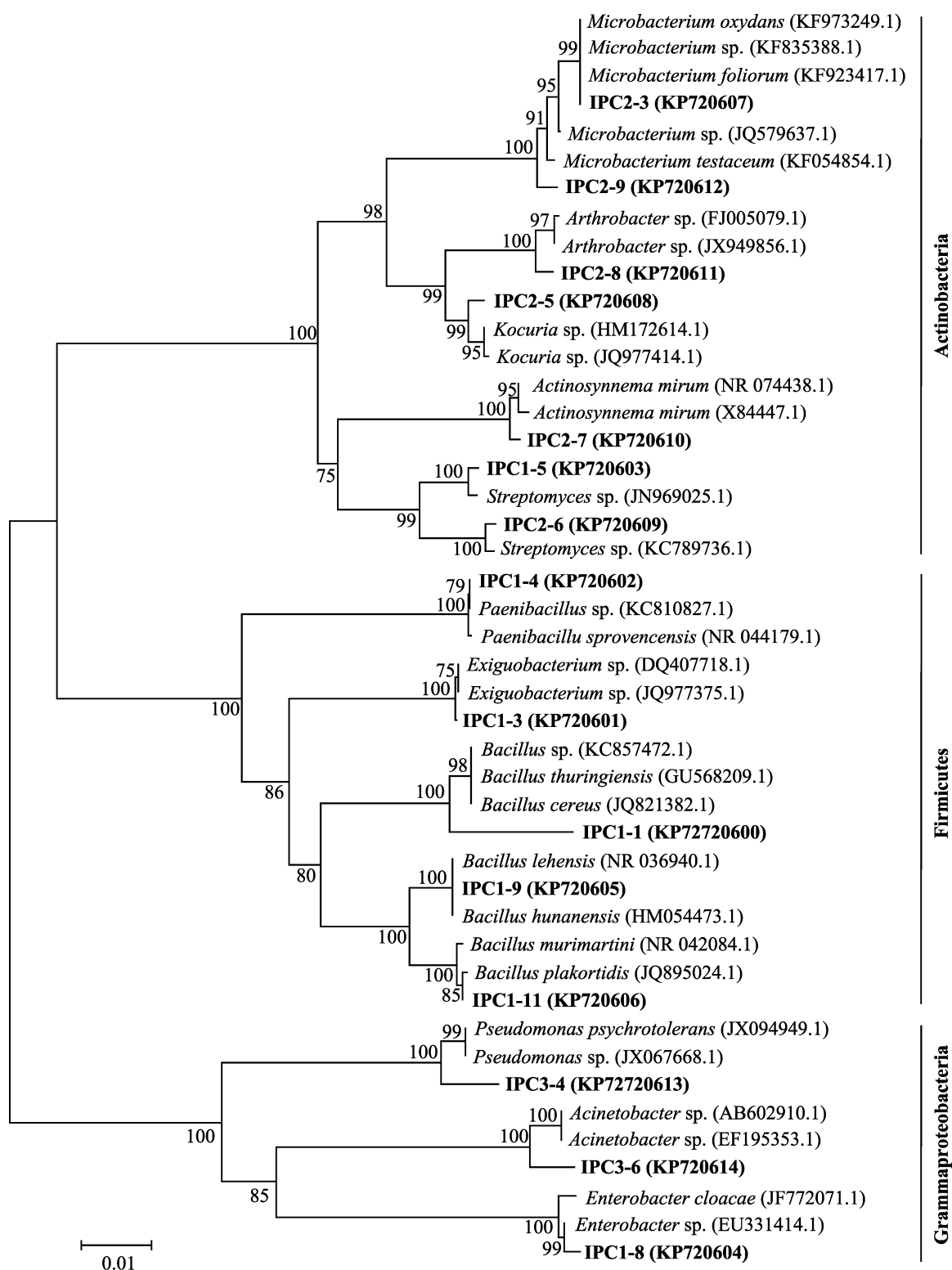


图3 日本弓背蚁颊下囊内含物样品中可培养细菌的系统发育分析

Fig.3 Phylogenetic analysis for 16S rRNA sequences of cultured bacteria isolated from contents of infrabuccal pockets in *Camponotus japonicus*

采用软件 MEGA 5 中的最大似然法构建而得的系统发育树，模型为 N-J，自展值为 1 000；

标尺 0.01 表示核苷酸位点的平均替代数。

The phylogenetic tree was generated using the Maximum Likelihood method with 1 000 bootstrap method and N-J model in MEGA5 software. The scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position.

菌株 IPC1-3 和 *Exiguobacterium* sp. 聚在一起, 支持度为 100%; 菌株 IPC1-4 虽然和 *Paenibacillus* sp. 聚在一起, 但支持度仅为 75%, 可能为一个新的细菌种类。在 Actinobacteria 类群中, 菌株 IPC2-6 和 IPC1-5 与 *Streptomyces* sp. 聚为一支, 但分属于不同的种类; 菌株 IPC2-3 和 IPC2-9 与 *Microbacterium* sp. 亲缘关系密切; 菌株 IPC2-7 和 *Actinosynnema mirum* 聚在一起, 支持度为 100%; 菌株 IPC2-8 和 *Arthrobacter* sp. 聚在一起, 支持度为 99%; 菌株 IPC2-5 和 *Kocuria* sp. 聚在一起, 但支持度仅为 84%, 应该为一个新的种类。在 γ -Proteobacteria 类群中, 菌株 IPC1-8 和 *Enterobacter* sp. 聚在一起, 菌株 IPC3-4 和 *Pseudomonas* sp. 聚在一起, 菌株 IPC3-6 和 *Acinetobacter* sp. 聚在一起, 支持度均达到 100%。

3 结论与讨论

本文利用扫描电子显微镜对日本弓背蚁颊下囊的形态结构及位置进行了观察, 结果表明颊下囊位于蚂蚁口腔的后侧, 呈袋状结构, 内部包含大量的固体颗粒。为了了解这些内含物中细菌的组成以及与周围环境的关系, 我们利用传统的细菌分离培养方法进行了日本弓背蚁颊下囊内含物中细菌的组成研究, 结果表明颊下囊内含物中细菌 cfu/g 数量明显高于其对应的蚁巢内土壤。从 3 个蚁巢工蚁颊下囊内含物中共分离到 11 个属的细菌, 其中微杆菌属、芽孢杆菌属和不动杆菌属在 3 个蚁巢的颊下囊样品中均表现出明显的数量优势。

蚂蚁的消化道结构, 尤其是特殊的前胃结构 (Eisner and Wilson, 1952), 只能容许液体食物进入嗉囊, 因此其口腔中颊下囊结构的存在, 保证了进入口腔的固体颗粒被过滤进入颊下囊中, 经过累计和挤压在其中形成一个颗粒状小球被稍后排出体外, 从而避免消化道的堵塞。由于颊下囊中的固体物质的累积和排出需要一个过程, 其内含物的大小与蚂蚁的觅食和清洁活动具有紧密的联系。在本研究中我们主要采集外出觅食的工蚁进行颊下囊内含物的研究, 解剖时无法

确定其颊下囊中内含物的多少, 但从解剖得到的 3 个蚁巢相同数量的工蚁颊下囊内含物的重量可以看出, 巢 1 蚂蚁颊下囊内含物样品重于其它两个蚁巢, 原因可能是所采集的巢 1 工蚁颊下囊内含物形成的时间较长, 所以分离到的细菌数量明显要高于另外两个蚁巢。

本文研究发现颊下囊内含物中的细菌 cfu/g 数量要明显高于相应的蚁巢内土壤, 原因可能是: (1) 颊下囊可能具有富集细菌的作用, 运用某种机制将细菌保留在颊下囊中, 阻止可能的病原菌进入消化道; (2) 颊下囊中可能存在某些常驻细菌, 这些细菌在颊下囊中能够起到某些未知的作用。此外, 日本弓背蚁为杂食性昆虫, 食物来源比较广泛, 而且觅食范围比较大, 因此从其颊下囊内含物中分离到的细菌应该主要来自于其栖息的环境及取食的食物中, 细菌的种类和数量受周围环境的影响非常大, 这也可能是不同蚁巢工蚁颊下囊内含物细菌数量和种类组成存在一定的差异的主要原因。

在颊下囊内含物中分离到的 11 个属的细菌中, 微杆菌为巢 1 和巢 2 颊下囊内含物样品中的优势菌群, 也是巢 3 的第二优势菌群, 不动杆菌是巢 3 的最大优势菌群。微杆菌是陆地环境中常见细菌, 可以从土壤、昆虫、乳制品等不同环境中分离到, 有报道称某些微杆菌可以积累一些特殊的糖脂, 用作生物表面活性剂 (Eisner and Wilson, 1952), 也可以积累一些有用的酶系用于天然产物的生物转化和环境污染物的降解 (Palme *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010)。不动杆菌广泛分布在水体、土壤和动物肠道等环境中, 易在潮湿环境中生存, 对家蚕肠道内致病菌具有一定的抑制作用 (王在贵等, 2011)。此外, 本文从 3 个蚁巢颊下囊样品中分离到的芽孢杆菌和肠杆菌也曾从莫多克弓背蚁 *Camponotus modoc* 颊下囊中分离到 (Hansen *et al.*, 1999), 被认为可以帮助寄主蚂蚁获得氨基酸和必需的维生素, 或者可能对于存留在颊下囊中的物质微粒起消化作用。

对于培养真菌的蚂蚁而言, 颊下囊变成了切

叶蚁用于阻止微生物和一些致病菌在其菌圃中侵染和传播的一个不可分割的部分(Quinlan and Cherrett, 1978; Little *et al.*, 2003), 切叶蚁工蚁在整饰菌圃的过程中, 将一些碎片和致病菌 *Escovopsis* 的孢子收集、压实到它们的颊下囊中, 形成小球, 这些小球随后被排出在蚁巢内的垃圾室或蚁巢外, 大多较低等的 attine 蚂蚁将它们的小球置于靠近它们菌圃的地方垒成大堆, 并由独立的工蚁团体致力于这些废物的建设、管理及最后的处理。Little 等(2006)的进一步研究认为, 为了防止它们的菌圃被专门的有害寄生物感染, 蚂蚁收集和压实寄生物的孢子和菌丝于它们的颊下囊中, 然后将最后形成的小球成堆存放在靠近菌圃的地方; 并在颊下囊中发现能够产生抗生素的链霉菌, 因此蚂蚁的颊下囊又具有消毒功能, 可杀死菌圃中寄生菌 *Escovopsis* 的孢子。在本研究中, 我们同样也分离到大量的放线菌, 这些放线菌是否具有类似的作用, 或者能对进入颊下囊的食物颗粒起到一定的消化或者促消化作用, 这些都还需要更多的研究数据的支持和证实。

前期的一些研究认为蚂蚁的活动可显著改变土壤中的微生物群落, 只有少数微生物以高密度存在于蚁巢中。如 Zettler 等(2002)的研究也发现红火蚁蚁巢内的微生物 cfu/g 数量是邻近蚁巢外土壤的 19 倍, 而蚁巢内的生物多样性水平却低于巢外; 陈元瑶等(2012)的研究也表明蚁巢内土壤细菌数量明显高于巢外土壤, 但微生物种类少于蚁巢外。Eelen 等(2004)首次在 *Monomorium pharaonis* 蚂蚁中发现了连接其颊下囊的腺体, 认为该腺体的分泌物可能具有口腔内的消化功能, 可促进颊下囊中物质的分解, 这说明消化作用应该在蚂蚁口腔就开始, 但腺体的分泌物是否影响颊下囊及其蚁巢中的微生物类群, 还没有相关的报道。

本文只是利用传统的细菌分离培养方法进行了日本弓背蚁颊下囊中细菌组成的初步研究, 虽然传统的分离培养法培养出的微生物只占自然环境中微生物总数的 1% 左右, 分离到的种类与选择培养基密切相关, 多达 99% 的微生物不能在实验室条件下分离和培养(Amann *et al.*, 1995; 李红等, 2003)。但是, 由于颊下囊内含物非常

小, 无法获得足够的样品并选择合适的 DNA 提取试剂盒进行微生物基因组 DNA 的提取。因此, 本研究中为了比较和计算不同蚁巢颊下囊内含物中的细菌数量和种类, 我们仅仅选择了一种培养基进行了颊下囊中细菌组成的初步探索, 为进一步深入了解颊下囊在蚂蚁清洁、取食等行为中可能发挥的潜在功能提供有益的信息, 也为进一步的深入研究奠定了基础。

参考文献 (References)

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59 (1): 143–169.
- Boulton AM, Jaffee BA, Scow KM, 2003. Effects of a common harvester ant (*Messor andrei*) on richness and abundance of soil biota. *Appl. Soil Ecol.*, 23(3): 257–265.
- Chen YY, Wei C, He H, Wang YG, 2012. Correlation of physicochemical characteristics and microbial biomass among nest soil of *Camponotus japonicus* and *Pachycondyla astute* in Qinling Mountains. *Journal of Northwest Forestry University*, 27(2): 121–126. [陈元瑶, 魏琮, 贺虹, 王云果, 2012. 秦岭地区 2 种蚂蚁巢内土壤理化性质和微生物量的相关性研究. 西北林学院学报, 27(2): 121–126.]
- Eelen D, Borgesen LW, Billen J, 2004. Morphology of a novel glandular epithelium lining the infrabuccal cavity in the ant *Monomorium pharaonis* (Hymenoptera, Formicidae). *Arthropod Struct. Dev.*, 33(4): 471–475.
- Eisner T, Happ GM, 1962. The infrabuccal pocket of a formicine ant: a social filtration device. *Psyche*, 69(3): 107–116.
- Eisner T, Wilson EO, 1952. The morphology of the proventriculus of a formicine ant. *Psyche*, 59(2): 47–60.
- Hansen LD, Spangenberg WJ, Gaver MM, 1999. Infrabuccal chamber of *Camponotus modoc* (Hymenoptera: Formicidae): ingestion, digestion, and survey of bacteria. *Proceedings of the 3rd International Conference on Urban Pests. Czech University of Agriculture, Prague, Czech Republic.* 9: 211–219.
- He H, Chen YY, Zhang YL, Wei C, 2011. Bacteria associated with gut lumen of *Camponotus japonicus* Mayr. *Environ. Entomol.*, 40(6): 1405–1409.
- Hölldober B, Wilson EO, 1990. *The Ants*. Cambridge University Press, Harvard. 1–10.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.

- Li H, Zhou YB, Chen BY, Hu JZ, 2003. Molecular techniques applied in the studies of microbial genome. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 23(4): 451–454. [李红, 周友兵, 陈炳耀, 胡锦涛, 2003. 分子生物学技术在微生物多样性研究中的应用. 河北大学学报(自然科学版), 23(4): 451–454.]
- Li XP, Nan XN, Wei C, He H, 2012. The bacteria associated with *Camponotus japonicus* Mayr with culture-dependent and DGGE methods. *Curr. Microbiol.*, 65(5): 610–616.
- Little AEF, Murakami T, Mueller UG, Currie CR, 2003. The infrabuccal pellet piles of fungus-growing ants. *Naturwissenschaften*, 90(12): 558–562.
- Little AEF, Murakami T, Mueller UG, Currie CR, 2006. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biol. Lett.*, 2: 12–16.
- Mankowski ME, Morrell JJ, 2004. Yeasts associated with the infrabuccal pocket and colonies of the carpenter ant *Camponotus vicinus*. *Mycologia*, 96(2): 226–231.
- Palme O, Moszyk A, Iphöfer D, Lang S, 2010. Selected microbial glycolipids: production, modification and characterization. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 672: 185–202.
- Quinlan RJ, Cherrett JM, 1978. Studies on role of infrabuccal pocket of leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Soc.*, 25(3): 237–245.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731–2739.
- Wang HY, Nan XN, Wang YG, Wei C, He H, 2014. Seasonal dynamics of culturable bacteria in honeydew of *Cinara tujaefilina*. *Journal of Environmental Entomology*, 36(4): 516–524. [王鸿艳, 南小宁, 王云果, 魏琮, 贺虹, 2014. 柏大蚜蜜露中可培养细菌的季节变化动态. 环境昆虫学报, 36(4): 516–524.]
- Wang ZG, Yang WJ, Liu CL, Zhu BJ, Wei GQ, Zou CR, 2011. Isolation and identification of the protease-producing bacteria from gut of silkworm (*Bombyx mori*) and its suitable fermentation condition. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 19(1): 149–156. [王在贵, 杨文静, 刘朝良, 朱保健, 魏国清, 邹昌瑞, 2011. 家蚕肠道产蛋白酶菌株的分离与鉴定及其发酵条件. 农业生物技术学报, 19(1): 149–156.]
- Wu J, Wang CL, 1995. The Ants of China. China Forestry Publishing House, Beijing, China. 10. [吴坚, 王长禄, 1995. 中国蚂蚁. 北京: 中国林业出版社. 10.]
- Yang QF, Li Q, Zhi YR, 2009. Anatomical study of the alimentary canal of *Xylosandrus germanus*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(4): 623–626. [杨群芳, 李庆, 植玉蓉, 2009. 光滑足距小蠹消化道的解剖结构. 昆虫知识, 46(4): 623–626.]
- Yu C, Xu H, Huang G, Chen T, Liu G, Chai N, Ji Y, Wang S, Dai Y, Yuan S, 2010. Permeabilization of *Microbacterium oxydans* shifts the conversion of puerarin from puerarin-7-O-glucoside to puerarin-7-O-fructoside. *Appl. Microbiol. Biot.*, 86(3): 863–870.
- Zettler JA, Mcinnis TM, Allen CR, Spira TP, 2002. Biodiversity of fungi in red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) mounds. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 107(3): 487–491.
- Zhu ZL, Nan XN, Wang YG, He H, 2015. The isolation of anaerobic bacteria from the gut of *Camponotus japonicus*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(4): 1032–1039. [朱卓琳, 南小宁, 王云果, 贺虹, 2015. 日本弓背蚁消化道厌氧细菌的分离培养. 应用昆虫学报, 52(4): 1032–1039.]