ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Dagmar Rybanská
Katedra ochrany rostlin

Bionomie a fyziologie skladištního roztoče *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridida)

Bionomic and physiology stored product mite *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridida)

Autoreferát doktorské disertační práce

P4106 Studijní program: Zemědělská specializace
4102V011Studijní obor: Zemědělská a lesnická fytopatologie a ochrana rostlin

Školitel: **prof., Ing. Pavel Ryšánek, CSc.**
Katedra ochrany rostlin
FAPPZ, ČZU, Praha
Konzultant: **RNDr. Tomáš Erban, PhD.**,
VÚRV, v.v.i. Praha

Oponenti:

Obhajoba doktorské disertační práce se koná dne:……v……..hod. na Fakultě agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů ČZU v Praze.

S doktorskou disertační prací je možno se seznámit na děkanátě FAPPZ ČZU v Praze.

Praha 2015

Obsah:

1. Úvod 1
2. Vědecké hypotézy a cíle práce 2
3. Materiál a metodika 3
4. Výsledky a diskuse 15
5. Závěr 18
6. Seznam literatury 18
7. Seznam publikovaných prací 22
8. Summary 23

1. Úvod

Skladištní roztoč *Tyrophagus putrescentiae* (Shrank, 1781) je celosvětově rozšířený druh skladištního roztoče. Skladištní roztoč *T. putrescentiae* se vyskytuje převážně ve skladech zemědělských komodit, potravin, ve spižírnách domácností i v koupelnách (Rosický *et al*., 1979). Napadá obilí a obilné výrobky, mouku, olejnatá semena, chléb, sýr, šunku, sušené mléko, sušená vejce, sušené ryby, sušené ovoce, jedlé huby i včelí produkty (Arnau & Guerrero, 1994; Chmielewski, 1999; Duek *et al*., 2001; Garcia, 2004; Kučerová & Horák, 2004; Aygun *et al*., 2007; Kheradmand *et al*., 2007; Palyvos *et al*., 2008; Mullen & OConnor, 2009; Qu *et al*., 2015). Preferuje substráty s vyšším obsahem tuků, proteinů a vlhkosti (Hughes, 1976; Aygun *et al*., 2007).

Skladištní roztoči *T. putrescentiae* a jeho exkrementy představují v domácnostech nejvýznamnější zdroje alergenů (Ortego *et al*., 2000; Tovey *et al*., 1981). Je považován za nejčastějšího škůdce suchého krmiva pro psy, a proto má značný veterinární význam (Thind, 2005; Nayak, 2006; Brazis *et al*., 2008; Saridomichelakis *et al*., 2008; Gill *et al*., 2011; Hibberson & Vogelnest, 2014).

2. Vědecké hypotézy a cíle práce

Lepší pochopení biologie skladištního roztoče *T. putrescentiae* umožní vývoj efektivnějších a účinnějších opatření v integrované ochraně před škůdci (IPM). Nové znalosti fyziologie a biologie roztočů umožní lépe predikovat výskyt a růst roztočů v různém prostředí a vyhodnotit strategie týkající se prevence kontaminace. Poznatky o trávicích enzymech jsou klíčové nejen pro pochopení fyziologie trávení, ale jsou podstatné i z alergenního hlediska. Nové poznatky také umožní vylepšit strategii prevence a kontroly výskytu skladištního roztoče u výrobců, ve skladech i v prodejnách.

Cílem práce je získat nové informace o biologii a fyziologii skladištního roztoče *T. putrescentiae*. Dílčím cílem je zjistit, zda rozdílný typ a integrita potravy mají vliv na populační růst laboratorního kmene *T. putrescentiae* a zda se bude populační růst lišit u rozdílných kmenů *T. putrescentiae*. Cílem je dále analyzovat a popsat enzymovými a proteomickými metodami proteiny v exkrementech *T. putrescentiae* chovaného na granulích pro psy. Hlavní zaměření enzymové analýzy je na proteolytické enzymy, které jsou nejvýznamnější alergeny roztočů. Předpoklad je, že potrava má vliv na trávení roztočů a významně tak ovlivňuje jejich růst a fyziologii.

Tato dizertační práce byla vypracována ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v. v. i. a byla financována z projektu MŠMT OC 10019 a z výzkumného záměru RO0415.

3. Materiál a metodika

3.1. Biologický materiál

Jako modelový organizmus pro práci byl použit medicinálně a ekonomicky významný skladištní roztoč *Tyrophagus putrescentiae* Schrank, 1781, který patří do řádu Acariformes, podřádu Acaridida a čeledi Acaridae. Pro testování byl použit laboratorní kmen *T. putrescentiae*, získaný v roce 1996 RNDr. Evou Žďárkovou, CSc., v Buštěhradě ve středních Čechách v Česku. Pro další experimenty byly použity kmeny *T. putrescentiae* z laboratorního a polního prostředí, tabulka 7. Roztoči byli chováni v chovných komůrkách IWAKI (Sterilin, Newport, Spojené království) s buněčným víčkem na laboratorní dietě designované pro prachové roztoče (HDMd). Komůrky byly umístěny v exsikátorových boxech (4.0 Secador^{TM}) ve sbírkových chovech Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i., (VÚRV, v. v. i.).

Tabulka 7. Jednotlivé kmeny *T. putrescentiae* použité v experimentu.

Kmen	Původní potrava	Místo	Sběratel	Rok
Laboratorní kmen	Obilí	Buštěhrad	Eva Žďárková	1996
Polní kmen CZ	Zbytky řepky	Zvoleněves	Marta Nesvorná	2011
Komerční kmen	Komerční dieta	Nizozemsko	firma Koppert	2012
Polní kmen USA	Sušené psí krmivo	USA	Jan Hubert	2007

Legenda: Uvedený rok označuje dobu, od kdy byly chovy roztočů uloženy ve VÚRV.

3.2. Experimentální diety

Roztoči použití v této studii pocházeli z dlouhodobých laboratorních chovů. Původní kultura byla masově chována na HDMd složené ze směsi ovesných vloček, pšeničných klíčků a sušeného droždí (Pangamin, Rapeto,

Bezdružice, Česko) v hmotnostním poměru 10:10:1, jak bylo popsáno dříve (Erban & Hubert, 2008).

Pro experimenty byly použity dvě rozdílné experimentální diety, které byly využity na testování rozdílů v populačním růstu roztoče, sledování přítomnosti alergenů a trávicích enzymů, především proteáz v exkrementech. První typ experimentální diety byl připraven z drcených psích granulí (DDFd), jejichž složení bylo: obiloviny (min. 4 % kukuřice), maso a vedlejší výrobky živočišného původu (min. 4,0 % drůbežího masa), bílkovinné extrakty rostlinného původu, oleje a tuky, vedlejší výrobky rostlinného původu, cukr, minerální látky, zelenina (min. 0,3 % mrkve), pentahydrát síranu měďnatého (měď = 13 mg/kg), antioxidanty s barvivy 100 mg/kg, vitamíny B 120 mg/kg. Deklarované jakostní znaky krmiva byly: dusíkaté látky 28,0 %, tuk 14,5 %, popel 7,0 %, vláknina 2,0 %, vápník 1,2 %, fosfor 1,0 %. Číslo partie HU17100052 a registrační číslo výrobce N12093018 0003091701 03:39 (Nestlé Purina, Bük, Maďarsko). Pro biotesty s drcenou granulí byla granule rozdrcena ručně pomocí třenky a tloučku. Druhým typem experimentální diety byla celozrnná špaldová mouka (Bioharmonie, Pro-Bio, Staré Město, Česko). Složení nutričních látek ve špaldové mouce: bílkoviny 9,4 % a tuky 2,5 % sacharidy 74,4 %.

3.3. Podmínky chovu

Připravené chovné komůrky s roztoči a dietami pro biotesty, adaptační testy, a přípravu extraktů pro enzymatickou a proteomickou analýzu byly umístěny do exsikátorových boxů s relativní vlhkostí vzduchu 85 %, která byla zajištěna nasyceným roztokem KCl (Penta, Chrudim, Česko). Exsikátory byly přemístěny do chovné místnosti VÚRV, v. v. i., kde byla udržována stálá teplota 25 °C a tma. Obdobné podmínky a postupy byly aplikovány např. ve studiích Green & Woolcock (1978) nebo dříve Cutcher

(1973). Pokusy byly ukončeny přidáním 10 ml 80% etanolu do komůrek a spočítáním roztočů pod mikroskopem (Carl Zeiss, Jena, Německo).

3.4. Experimentální postup

V experimentu 1 byl testován populační růst laboratorního kmene *T. putrescentiae* na čtyřech barevně odlišných typech granulí pro psy, které byly součástí balení krmiva pro psy. Byly použity pouze nepoškozené granule. Založeno bylo 6 komůrek vždy od jedné barvy granule obsažené v testovaném balení. Roztoči byli z chovných komůrek sbíráni jemným štětečkem a přemístěni na Petriho misku. Biotesty byly založeny umístěním 100 roztočů, dospělců obdobné velikosti a fitness do každé z 24 chovných komůrek. Dle výsledků experimentu 1 jsme použili hnědou granuli pro další testování.

V experimentu 2 byl hodnocen populační růst laboratorního kmene *T. putrescentiae* na drcených a celých granulích pro psy. Testy byly zahájeny umístěním 10 a 100 roztočů do chovných komůrek. Experimenty byly provedeny ve 24 opakováních.

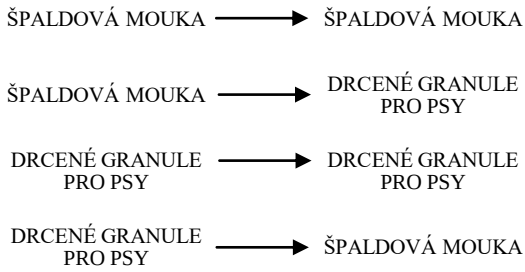
V experimentu 3 byl stanoven populační růst čtyř kmenů *T. putrescentiae*. Do 12 komůrek bylo umístěno 50 mg laboratorní diety a do dalších 12 komůrek 50 mg drcené hnědé granule. Test byl zahájen umístěním 10 roztočů do každé komůrky.

V experimentu 4 byl testován vliv počáteční populace na populační růst čtyř kmenů *T. putrescentiae* chovaného na laboratorní dietě. Test byl proveden ve 24 opakováních s 10 roztoči a 12 opakováních se 100 roztoči.

V experimentu 5 byl proveden adaptační test s laboratorním kmenem *T. putrescentiae*, který byl kultivován na dvou odlišných dietách minimálně 6 měsíců před zahájením experimentu. Téměř po dvou měsíčních intervalech byla každá populace přesunuta na čerstvou dietu, aby se zabránilo jejímu zkažení. Vzhledem k tomu, že populace roztoče *T. putrescentiae* může

dokončit svůj životní cyklus jedné generace při 85 % relativní vzdušné vlhkosti za 2–3 týdny (Sánchez-Ramos & Castañera, 2005), během adaptačního období vyvinuli roztoči na těchto dietách více než 10 generací. Experiment byl zahájen umístěním 100 roztočů do 22 chovných komůrek s 50 mg drcené psí granule a do 22 chovných komůrek se špaldovou moukou. Pro adaptační testy byli roztoči adaptovaní na granule pro psy přemístěni na špaldovou mouku a opačně, schéma 1.

Schéma 1. Znázornění postupu adaptačního testu s roztočem *T. putrescentiae*.



3.5. Statistické vyhodnocení biotestů

Výsledná data byla normalizována na hodnoty, které udávají vnitřní rychlost růstu populace, tzv. biologický potenciál (parametr *r*), který zahrnuje množství potomků vyprodukovaných rodičovskou jednotkou (Hubert *et al.*, 2011a). V jednom okamžiku mohou populaci konkrétního druhu u bezobratlých tvořit současně vajíčka, larvy různých instarů, kukly a dospělci (Šálek *et al.*, 2005). Laboratorní testy používají jednu populaci s danou počáteční hustotou, která je vystavena jedinému faktoru za časový interval v kontrolních podmínkách (Dykyjová *et al.*, 1989).

K odhadu vnitřní rychlosti růstu populace (*r*) byl použit nezávislý exponenciální model, kde e – Eulerovo číslo, označované jako základ

přirozených logaritmů, N_t značí finální hustotu roztočů, N_0 počáteční hustotu roztočů (10), a t byla doba trvání experimentu (28 dní):

$$(N_t = N_0 * e^{rt})$$

Upraveno pomocí přirozených logaritmů:

$$(ln\ N_t = ln\ N_o + rt)$$

Z níž r:

$$r = \frac{ln\ N_t - ln\ N_o}{t}$$

Pro srovnání jednotlivých faktorů byl použit Tukeyho test. Statistické analýzy byly provedeny v programu XLSTAT 2015 (Addinsoft, New York, NY, Spojené státy).

3.6. Chov roztoče *T. putrescentiae* pro proteomickou a enzymatickou analýzu

Pro enzymatickou analýzu exkrementů z roztoče *T. putrescentiae* byly použity granule pro psy stejné jako v případě biotestů. Pro získání extraktu z exkrementů roztočů byla použita početnější populace ve srovnání s biotesty, chov roztočů pro tyto účely v komůrkách trval 10 týdnů. Po celou dobu chovů byly každý týden kontrolovány fyzikální podmínky, nárůst populací a případné kontaminace chovných prostor. Komůrky byly při kontrolách otáčeny o 180°, aby došlo k pokrytí celého povrchu komůrek exkrementy.

3.7. Enzymatická analýza vzorku

Pro získání extraktu z exkrementu byli roztoči a zbytky potravy po deseti týdnech z komůrek odstraněny. Následně byly komůrky extrahovány pomocí chlazené ddH_2O o objemu 10 ml. K výrobě ddH_2O byl použit čtyřstupňový deionizační proces zkombinovaný s UV lampou, ultrafiltrem a 0,2 mikronovým filtrem (NANOpure Diamond Life science UV/UF, Barnstead, Spojené státy). Pro extrakci byla použita ddH_2O předchlazená na 4 °C. Komůrky byly třepány za chlazení na ledu na kývačce Rocker 25 (Labnet

International, Inc., Woodbridge, NJ, Spojené státy) po dobu 15 minut z každé strany. Jejich objem byl vyprázdněn do skleněné sterilní kádinky o objemu 600 ml. Extrakce byla poté dvakrát zopakována s 10 ml a 5 ml. Získaný extrakt byl rozdělen po 20 ml do 50 ml centrifugačních zkumavek (flakonů) typu Falcon (Orange Scientific, Lachnema) a odstředěn v centrifuze MR 23i (Jouan Industries, S. A. S., Francie) při 10000 g a 4 °C po dobu 15 minut.

Supernatanty z centrifugačních zkumavek byly odpipetovány do skleněné sterilní kádinky. Následně byly vzorky supernatantu rozděleny po definovaném objemu 30 ml a 1 ml do flakonů a zmraženy při -55 °C a zlyofilizovány přístrojem PowerDry LL 3000 (Thermo, Šanghaj, Čína).

3.8. Měření aktivity proteinů

Byly provedeny enzymové analýzy, které prokázaly aktivitu proteinů v extraktu z exkrementů skladištního roztoče *T. putrescentiae*. Pro změření aktivity proteinů byl připraven univerzální pufr Britton-Robinson I (BR – I). Tento pufr byl adjustován na pH metru s teplotní kompenzací za stálého míchání na magnetické míchačce. Pufr byl připraven tak, aby výsledná koncentrace v reakci byla 0,1 mol/dm^3. Kyselá složka připravená z H_3BO_3, H_3PO_4 a CH_3COOH byla titrována Pasteurovou sterilní pipetou zásaditým roztokem.

Pro zjištění pH optima obecné aktivity proteáz byl rozpuštěn azoalbumin (Kat. č. A2382; Sigma-Aldrich) 0,2% (w/V) v BR-I pufru pH od 3,5 do 8,0. Samotné měření bylo provedeno v mikrodestičce (Gama, České Budějovice, Česko) o 96 jamkách, každé měření ve třech opakováních. Do příslušné jamky bylo napipetováno 200 µl azoalbuminu a přidáno 50 µl homogenátu, který obsahoval 20 µg proteinů. Byla provedena dvojí kontrola, od které byly odečítány naměřené hodnoty kontroly substrátu a kontroly homogenátu. Do běžné kontroly bylo přidáno 50 µl ddH_2O. Pro kontrolu homogenátu bylo použito 50 µl homogenátu v 200 µl ddH_2O. Takto připravená destička byla

inkubována 60 minut při teplotě 37 °C a třepána rychlostí 500 RPM na inkubované třepačce ELMI DTS-2 (Riga, Lotyšsko). Reakce byla ukončena přidáním roztoku TCA o objemu 50 µl.

Pufry ve třech zjištěných pH optimech byly dále použity při měření proteolytických aktivit na specifických substrátech Z-Arg-Arg-p-nitroanilid (ZRRpNA), Ala-Ala-Phe p-nitroanilid (AAPpNA) a Nα-Benzoyl-DL-arginin p-nitroanilid hydrochlorid (BApNA) a inhibitorů N_{α}-Tosyl-L-lysin chlorometyl keton hydrochlorid (TLCK), N-p-Tosyl-L-fenylalanin chlorometyl keton (TPCK) a E64 (E-64) a aktivátoru Tris-(2-carboxyetyl) fosfát hydrochlorid (TCEP), pro vybrané enzymy. Kontrolní vzorky byly připraveny stejně jako pro zjištění enzymové aktivity a obsahovaly stejné látky rozpuštěné v dimetyl sulfoxidu (DMSO) (Kat. č. D8414; Sigma-Aldrich), metanolu a vzorky resuspendované v ddH_2O.

3.9. Měření aktivity specifických proteinů

3.9.1. Měření enzymové aktivity na substrátu pro Catepsin B

Do destičky bylo napipetováno ve čtyřech opakováních.

1) 10 µl ddH_2O, 10 µl E64 a 10 µl TCEP,
2) 190 µl substrátu ZRRpNA rozpuštěno v DMSO
3) Reakce byla zahájena přidáním 50 µl homogenátu do každé jamky kromě kontroly pro substrát

Mikrodestička byla třepána 15 minut při teplotě 37 °C a rychlosti 711 RPM v třepačce ELMI DTS-2. Reakce byla ukončena přidáním 50 µl TCA. Absorbance byla změřena v přístroji ELISA reader (Multiscan ASCENT, Thermo, Šanghaj, Čína) při vlnové délce λ = 595 nm. Po změření bylo z destičky odpipetováno 125 µl vzorku do nové mikrodestičky. Ke vzorku bylo připipetováno 125 µl ddH_2O a opět změřeno v přístroji ELISA reader.

3.9.2. Měření enzymové aktivity na substrátech pro Trypsin a Chymotrypsin

Do destičky bylo napipetováno ve čtyřech opakováních.

1) 10 µl inhibitoru: TPCK rozpuštěný v metanolu a TLCK rozpuštěný v DMSO
2) 190 µl příslušného substrátu BApNA nebo AAPpNA rozpuštěno v DMSO
3) Reakce byla zahájena přidáním 50 µl homogenátu do každé jamky kromě kontroly pro substrát.

Mikrodestička se substrátem pro chymotrypsin byla třepána 35 minut při teplotě 37 °C a rychlosti 711 RPM ELMI DTS-2. Na ukončení reakce bylo použito 50 µl TCA. Absorbance byla změřena v přístroji ELISA reader při vlnové délce $\lambda = 595$ nm.

Mikrodestička se substrátem pro trypsin byla třepána pouze 15 minut při teplotě 37 °C a rychlosti 711 RPM ELMI DTS-2. Pro ukončení reakce bylo přidáno 50 µl TCA. Po změření vzorku v přístroji ELISA reader bylo odpipetováno 125 µl do nové 96jamkové mikrodestičky a přidáno 125 µl DMSO a opět změřeno v přístroji ELISA reader při vlnové délce $\lambda = 595$ nm.

3.10. Stanovení obsahu proteinů

Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byla stanovena pomocí Bradfordova činidla (B6916, Sigma-Aldrich). Tato metoda je založena na kolorimetrické reakci, která proběhne po smíchání Bradfordova činidla s roztokem obsahujícím proteiny. Vzniklý komplex proteinu s Brilliant Blue G má absorbční maximum při 595 nm.

Obsah proteinů byl stanoven v lyofilizovaném vzorku o objemu 1 ml, který byl rozpuštěn 100 µl ddH_2O. Pro změření obsahu proteinů bylo smícháno 10 µl vzorku s 240 µl Bradfordova činidla a jako blank bylo

použito 10 µl ddH_2O s 240 µl Bradfordova činidla. Po inkubaci 10 minut byla 96 jamková mikrodestička změřena na ELISA readeru při vlnové délce λ = 595 nm.

3.11. Identifikace izoforem proteinů

Pro identifikaci izoforem proteinů byla použita 12% a 10% tris-glycinová elektroforéza (Bio-Rad, Hercules, CA, Spojené státy). Lyofilizovaný vzorek byl aplikován do 1,5 mm jamek o množství 10, 20 a 30 µg proteinů, kvantifikováno dle Bradforda. Elektroforéza byla puštěna na 25 V po dobu 1 hodiny. Poté bylo zvýšeno napětí na 77 V. Po skončení elektroforézy byly jednotlivé gely vizualizovány dokumentačním systémem (InGenius, Syngene, Cambridge, Spojené království) excitace byla provedena transluminátorem 360 nm, emise byla sledována filtrem 440 nm.

Pro zjištění jednotlivých proteinů byly použity substráty, od Sigma-Aldrich: Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metylcoumarin (AAPMC) (Kat. č. A3401, Sigma-Aldrich), N_α-Benzoyl-L-arginin-7-amido-4-metylcoumarin hydrochlorid (BAAMC) (Kat. č. B7260, Sigma-Aldrich), Z-Arg-Arg-7-amido-4-metylcoumarin hydrochlorid (ZRRMC) (Kat. č. C5429, Sigma-Aldrich) a inhibitory N-p-Tosyl-L-fenylalanin chlorometyl keton - ≥ 97% TLC (TPCK) (Kat. č. T4376, Sigma-Aldrich), E64 (E-64) (Kat. č. E3132, Sigma-Aldrich) a N_α-Tosyl-L-lysin chlorometyl keton hydrochlorid ≥ 96% TLC (TLCK) (Kat. č. T7254, Sigma-Aldrich).

3.12. Elektroforetické dělení proteinů

První rozměr elektroforetického dělení byl proveden metodou IEF přístrojem Ettan IPGphor 3 s kontrolním software Ettan IPGphor3, version 1,2 build 29, GE protocols version: 1,0 (Bio-Sciences, Piscataway NJ, Spojené státy).

Pro separaci bylo stanoveno 250 µg proteinů na doporučené množství 250 µl rehydratačního roztoku (18-1168-31, GE Healthcare, Uppsala, Švédsko) obsahující 0,5 % pH 3 – 10 pufru (17-6000-87, GE), který byl nanášen do 13 cm keramických holderů. Vzorky pro hmotnostní analýzu byly před samotnou IEF navíc přečištěny 2D Clean up kitem (80-6484-51, GE), který ze vzorku odstranil detergenty, soli, nukleové kyseliny, tuky, fenoly a další látky ovlivňující průběh rozdělení proteinů. Vzorek byl překryt polyakrylamidovým gelovým páskem – stripem (Immobiline DryStrip pH 3-10, 17-6001-13, GE), který váže proteiny podle příslušného izoelektrického bodu v daném pH. Následně byl na vzorek nanesen minerální olej (17-1335-01, GE), který chrání strip před vysušením v průběhu izoelektrické fokusace. Program pro separaci proteinů byl nastaven následovně: 1. 30 V, 10 hodin (aktivní dehydratace); 2. 500 V, 500Vh; 3. 1000 V, 800 Vh; 4. 6000 V, 15000 Vh; 5. 6000 V, 16000 Vh. Separace proteinů IEF probíhala 19 hodin za laboratorních podmínek.

Stripy byly po ukončení izoelektrické fokusace ekvilibrovány 15 minut v ekvilibračním roztoku (6 M urea, 2% SDS, 0,05 M Tris-HCl pH 8,8, 20% glycerol) s ditiotreitolem (DTT, 100 mg/10 ml), (43817, Sigma-Aldrich), které funguje jako redukční činidlo SH skupin a následně dalších 15 minut s iodacetamidem (IAA, 57670, Sigma-Aldrich), (400 mg/10 ml), který funguje jako alkylační činidlo pro cysteinové zbytky. Pro druhý rozměr byly stripy umístěny na vrchní část 14% polyakrylamidového gelu (SDS-PAGE) upraveného dle přiloženého protokolu k dodávanému akrylamidu (A3699, Sigma-Aldrich) a fixovány k PAGE gelu roztokem 1% agarosy (A7431, Sigma-Aldrich). 2D elektroforéza probíhala zpočátku za konstantního napětí 30 V a později byla jeho hodnota zvýšena na 300 V.

Po ukončení druhého rozměru elektroforézy byl gel převeden do fixačního roztoku a 30 minut třepán na třepačce. Poté byl fixační roztok

vyměněn za barvící roztok Coomassie Brilliant Blue (Phastgel Blue R, GE) a po 60 minutách třepání byl gel přemístěn do odbarvovacího roztoku. Pro tento typ elektroforézy je fixační a odbarvovací roztok totožný (40% metanol + 10% kyselina octová). Odbarvený gel byl dokumentován zařízením G:BOX EXTENDED (SYNGENE, Cambridge, Spojené království) za použití bílého světla a UV:06 filtru.

3.13. Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií

Z obarveného gelu byly separovány „spoty" o průměru 0,5-1 mm, které představovaly jednotlivé isoformy proteinů. Spoty byly vloženy do zkumavek eppendorf (022431064, Protein LoBind Tube 0,5 ml, USA) a pomocí hmotnostní spektrometrie 4800 Plus MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems/MDS Sciex, Spojené státy) Pro odstranění barviva Coomasie navázaného na proteiny byly spoty promyty 100 µl 50 mM amonium bikarbonátem (ABC) rozpuštěném v 50% acetonitrilu (ACN) s 50 mM DTT. Všechny vzorky byly následně sonikovány po dobu 5 minut. Po 15 minutách byl roztok odstraněn a vzorky byly promyty 100 µl 50 mM ABC/ 50 % ACN s 50 mM IAA a opět sonikovány 5 minut. Po 25 minutách byl roztok odpipetován. Pro úplné odstranění IAA byly vzorky promyty roztokem ABC/ACN/DTT o stejné koncentraci a obdobným postupem, viz výše. Po odstranění supernatantu byly vzorky sonikovány 5 minut ve 100 µl HPLC/MS-grade vodě a následně 5 minut ve 100 µl ACN. Vzorky byly ponechány 2 minuty v otevřených eppendorfkách pro úplné odstranění roztoku evaporací. Následně byly vzorky štěpeny 5 mg trypsinu rozpuštěného v 10 µl 50 mM ABC a inkubovány přes noc při teplotě 37 °C. Trypsinové štěpy byly eluovány (neutralizovány) s pomocí ultrazvukové lázně po přidání 0,5 µl 3% kyseliny trifluoroctové (TFA) rozpuštěné v ACN. Vzorky byly sonikovány po dobu 10 minut a přeneseny na měřící destičku pro MALDI. Po zaschnutí 0,5 µl vzorku na měřící destičce byl převrstven 0,5 µl matricí

CHCA (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid, 70990, Sigma-Aldrich). Vzorky byly měřeny hmotnostním spektrometrem v rozmezí 700–4000 m/z. V MALDI je molekula umístěna v matici malých organických molekul a následně ozářena zábleskem laseru Nd:YAG laser (355 nm, 200 Hz). Získaná spektra byla porovnávána s databází National Center for Biotechnology Information (NCBI) pomocí programu Mascot v 2.2 (Matrix Science, Boston, MA, Spojené státy) dle kritérií: enzyme-trypsin, taxonomy-NCBInr, fixed modification-carbamidometylation (C), variable modifications-deamidated (NQ), metionine oxidation (M), a s tolerancí pro peptidy ± 125 ppm a fragmenty peptidů ± 0,3 Da. Vzorky byly analyzovány v Laboratoři hmotnostní spektrometrie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze (PřF UK; Viničná 7, Praha 2, Česko).

3.14. Determinace bakteriálního spektra

Pro bakteriální izolaci bylo použito 6 komůrek roztoče *T. putrescentiae* chovaného na psích granulích. Před extrakcí byli z komůrek odstraněni roztoči a zbytky potravy. Komůrky byly naplněny 3 ml sterilní ddH_2O a protřepány. Extrakt byl přemístěn do 15 ml centrifugačních zkumavek (Orange Scientific). Bakterie byly izolovány několikanásobným ředěním extraktu a nanesením na agar (Difco, New Jersey, Spojené státy). Po 24 hodinách při inkubaci 25 °C byly vybrány jednotlivé kolonie bakterií a identifikovány.

DNA byla extrahována z šesti kolonií bakteriálního kmene za použití Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (Kat. č. 12224, MoBio Laboratories, Carlsbad, Spojené státy) dle pokynů výrobce. Pro analýzu 16S rRNA byl použit primer 27F (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′) A 1492r (5′-GGTACCTTGTTACGACTT-3′) (Jiang *et al.*, 2006). Pro identifikaci skupiny *Bacillus cereus* byl použit primer BCFomp1 (5′-ATCGCCTCGTTGGATGACGA-3′) a BCRomp1 (5′-

CTGCATATCCTACCGCAGCTA-3´) na motB gen (Oliwa-Stasiak *et al*., 2010). PCR amplifikace byla provedena v C1000 thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, Spojené státy) a 25 µl PCR roztoku obsahovalo následující komponenty: 2mM MgCl2, 200µM dNTPs, začínající a ukončující primer (100 mM každého), 0,5U Taq polymerasy (všechny chemikálie od Promega, Madison, WI, Spojené státy) a 1 µl DNA. Pro amplifikaci 16S rRNA byly stanoveny podmínky: 2 minuty při 94 °C a 30 cyklů po 90 s při 94 °C, 90 s při 50 °C a 60 s při 72 °C, konečná fáze trvala 10 minut při 72 °C a vzorek byl udržován při 4 °C (Barbieri *et al*., 2001). PCR podmínky pro gen motB byly: 30 cyklů po 30 s při 94 °C, 60 s při 54,5 °C a 60 s při 72 °C, 5 minut denaturační fáze a 7 minut konečná fáze (Oliwa-Stasiak *et al*., 2010). Sekvenace byly provedeny servisně v Macrogenu (Soul, Jižní Korea). Získané sekvence byly zpracovány CodonCode Aligner verze 2.0.6. (CodonCode, Corporation, Deham, MA, Spojené státy). Nukleotidová sekvence genu motB byla přepsána na proteinovou sekvenci použitítm ExPASy Translate tool (Gasteiger *et al*., 2003). Sekvence byly porovnány s existujícíme sekvencemi pomocí Basic Local Aligment Search Tool (BLAST; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) (Altschul *et al*., 1990). Všechny získané sekvence z 6 izolátů bakterie byly uloženy v databazi GenBank.

4. Výsledky a diskuse

V experimentu 1 jsme prokázali, že populace skladištního roztoče *T. putrescentiae* se může lišit v závislosti na barevně odlišné granule v testovaném krmivu pro psy. Náš výsledek je odlišný od předchozího zjištění Canfield & Wrenn (2010), kteří nezaznamenali žádné významné rozdíly v růstu roztočů ve třech odlišných testovaných krmivech pro psy (Canfield & Wrenn, 2010). Rozdíl v populačním růstu na zelené a hnědé granuli v porovnání s bílou a červenou naznačil, že tyto granule jsou pro roztoče *T. putrescentiae* nutričně výhodnější. Protože největším množstvím v

testovaném balení krmiva pro psy představovaly hnědé granule (70 %), oproti červené (9 %), bílé (12 %) a zelené 9 % barvě, mají hnědé granule největší vliv na populační růst roztoče v rámci balení.

Dále byl populační růst roztoče významně závislý ($F_{(3,48)}$=332, P<0,001), jak na integritě granule (F=44, P<0,001), tak na počáteční hustotě populace laboratorního kmenu *T. putrescentiae* (F=492, P<0,001). Interakce obou faktorů byla signifikantní na hladině významnosti α = 0,05 (F=234, P<0,001). Drcené granule pro psy byly vhodnější pro vyšší populační růst než celé granule, s počáteční populační hustotou 100 jedinců. Na rozdíl od populačního růstu populace při počáteční hustotě 10 roztočů se populační růst na drcených a celých granulích významně nelišil. White *et al*. (2003) uvádí, že *T. putrescentiae* společně s *A. siro* nejčastěji infestuje poškozené obiloviny, kde jsou snadno dostupné živiny, což vede k vyššímu růstu populace (White *et al*., 2003).

Vnitřní rychlost růstu byla významně ovlivněna ($F_{(7,184)}$=54, P<0,001) typem potravy (F=76, P<0,001) a kmenem roztoče *T. putrescentiae* (F=96, P<0,001). Vzájemné působení těchto faktorů bylo signifikantní na hladině významnosti α = 0,05 (F=5, P=0,002). Drcené granule představovali vhodnější potravu pro populační růst všech čtyř kmenů roztoče *T. putrescentiae* než laboratorní dieta. Tyto faktory vysvětlují rozdíly, které byly promítnuty do růstu populace v různých biotických nebo abiotických podmínkách během evolučního vývoje na různých stanovištích, ať už v běžném nebo laboratorním prostředí. Colloff (1987a, b) poukázal na odlišnost vývoje vajíček polního kmenu roztoče *D. pteronyssinus* oproti vajíčkům laboratorního kmene.

Počáteční hustota (F=71, P<0,001), kmen roztočů (F=28, P<0,001) a jejich vzájemné působení (F=21, P<0,001) signifikantně ovlivnili finální počet roztočů. Rozmnožování a vývoj byl především ovlivněn počáteční

hustotou roztočů. Populační růst laboratorního kmene-CZ byl nejvyšší při počáteční hustotě 10 roztočů, než při 100 jedincích, polní kmen-CZ a kmen-USA měly vyšší populační růst než komerční kmen-NL.

V experimentu 5 byl testován vliv špaldové mouky a krmiv pro psy na populační růst roztoče *T. putrescentiae*. Konečný počet roztočů byl významně ($F_{(3,84)}$=297, P<0,001) závislý na obou adaptačních dietách (F=158, P<0,001), a také na změně diety (F=728, P<0,001). Populační hustota byla významně závislá na interakci obou faktorů (F=6,8, P=0,011). Výsledky adaptačních biotestů prokázaly, že *T. putrescentiae* se výrazně rychleji množí na granulích pro psy, než na špaldové mouce. Dle několika předešlých studií je tento roztoč nejběžnějším škůdcem v krmivech pro psy a preferuje substráty bohaté na tuky a proteiny (Gill *et al*., 2010; Hibberson & Vogelnest, 2014).

Enzymovou analýzou byly popsány proteázy v exkrementech *T. putrescentiae* chovaného na granulích pro psy. Nejvýznamnější proteázy tohoto roztoče jsou trypsiny známé jako alergen Tyr p3. Identifikace proteinů/alergenů v exkrementech zvyšuje jejich význam, neboť jsou kvantitativně nejvýznamnější alergeny. Proteomická identifikace prokázala kvantitativně velkou přítomnost proteinů z *Bacillus cereus* v exkrementech *T. putrescentiae.* Bacilolysiny (neutrální a basické proteázy) měly značný podíl na proteolytické aktivitě v extraktu z exkrementů. Bacilolysiny jsou známé i esterolytickou aktivitou, tudíž je předpoklad, že trávily i tuky v potravě. Jako substrát pro exochitinázy *B. cereus* sloužily v experimentu svlečky a peritrofická membrána exkrementů. Bakterie *B. cereus* hraje významnou roli v potravní biologii *T. putrescentiae* a roztoč ji mohl využívat jak v původním půdním prostředí a může této interakce využívat i prostředí prachu domácností na využití živin z derivátů kůže.

5. Závěr

V této práci byl hodnocen populační růst skladištního roztoče *T. putrescentiae*. Bylo prokázáno, že rozmnožování a vývoj roztoče je značně ovlivněn integritou potravy i počáteční populační hustotou. Výsledky prokázaly, že pro růst roztoče *T. putrescentiae* je výhodná dieta bohatá na tuk a bílkoviny. Výsledky ukázaly, že roztoči adaptovaní na určitý typ potravy mají při přesunu na jinou dietu pomalejší populační růst. Toto znamená, že při přechodu z jednoho nutričního habitatu do druhého bude roztočům trvat určitý čas, než se adaptují na novou dietu a jejich populační růst se ustálí. Exkrementy roztočů představují nebezpečnou směs alergenů pro člověka i zvířata a výsledky práce zvyšují význam alergenů detekovaných v exkrementech. Výsledky prokázaly, že hlavní roztočovou proteázou přítomnou v exkrementech *T. putrescentiae* je trypsinový alergen Tyr p3. Značnou část proteolytické aktivity, hlavně v neutrálním a basickém prostředí tvořily bacilolysiny z bakterie *B. cereus*, která byla v psích granulích s roztočem silně asociována. Exochitinázy z *B. cereus* se podílejí na rozkladu roztočových těl a svleček a mohou uvolňovat alergeny z exkrementů. Zjištěná symbiotická interakce roztoče s *B. cereus* má velký ekologický i medicinální význam. Předpoklad je, že interakce roztoče *T. putrescentiae* s *B. cereus* má prapůvod již v půdním prostředí a je přenosná i do prachu domácností.

6. Seznam literatury

Arnau, J., Guerrero, L. 1994. Physical methods of controlling mites in dry-cured ham. Fleischwirtschaft 74 (12). 1311–1313.

Aygun, O., Yaman, M., Durmaz, H. 2007. A survey on occurrence of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae) in Surk, a traditional Turkish dairy product. Journal of Food Engineering 78 (3). 878–881.

Brazis, P., Serra, M., Sellés, A., Dethioux, F., Biourge, V., Puigdemont, A. 2008. Evaluation of storage mite contamination of commercial dry dog food. Veterinary Dermatology, 19 (4). 209–214.

Canfield, M. S., Wrenn, W. J. 2010. *Tyrophagus putrescentiae* mites grown in dog food cultures and the effect mould growth has on mite survival and reproduction. Veterinary Dermatology 21 (1). 58–63.

Colloff, M. J. 1987a. Differences in development time, mortality and water loss between eggs from laboratory and wild populations of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart, 1897) (Acari: Pyroglyphidae). Experimental and Applied Acarology 3 (3). 191–200.

Colloff, M. J. 1987b. Effects of temperature and relative humidity on development times and mortality of eggs from laboratory and wild populations of the European house-dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). Experimental and Applied Acarology 3 (4). 279–289.

Cutcher, J. 1973. The critical equilibrium activity of nonfeeding *Tyrophagus putrescentiae*. Annals of the Entomological Society of America 66 (3). 609–611.

Duek, L., Kaufman, G., Palevsky, E., Berdicevsky, I. 2001. Mites in fungal cultures. Mycoses 44 (9–10). 390–394.

Dykyjová, D., 1989. Metody studia ekosystémů. Academia. Praha. 690.

García, N. 2004. Efforts to control mites on Iberian ham by physical methods. Experimental and Applied Acarology 32 (1). 41–50.

Gill, C., McEwan, N., McGarry, J., Nuttall, T. 2010. House dust and storage mite contamination of dry dog food stored in open bags and sealed boxes in 10 domestic households. Veterinary Dermatology 22 (2). 162–172.

Green, W. F., Woolcock, A. J. 1978. *Tyrophagus putrescentiae*: an allergenically important mite. Clinical Allergy 8 (2). 135–144.

Hibberson, C. E., Vogelnest, L. J. 2014. Storage mite contamination of commercial dry dog food in south-eastern Australia. Australian Veterinary Journal 92 (6). 219–224.

Hubert, J., Nesvorná, M., Aulický, R., Plachý, J., Stejskal, V. 2011a. Certifikovaná metodika ochrany ječmene skladovaného pro sladovnické účely před riziky spojenými s kontaminací skladištními roztoči. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 35 s. ISBN: 978-80-7427-077-2.

Hughes, A. M. 1976. The mites of stored food and houses. Technical Bulletin of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Her Majesty's Stationery Office. London. p. 400.

Chmielewski, W. 1971. Morphologia, biologia i ekologia *Carpoglyphus lactis* (L., 1758) (Glycyphagidae, Acarina). Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roślin 13 (2). 63–166.

Kheradmand, K., Kamali, K., Fathipour, Y., Goltapeh, E. M. 2007. Development, life table and thermal requirement of *Tyrophagus putrescentiae* (Astigmata: Acaridae) on mushrooms. Journal of Stored Products Research 43 (3). 276–281.

Kučerová, Z., Horák, P. 2004. Arthropod infestation in samples of stored seeds in the Czech Republic. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 40 (1). 11–16.

Mullen, G. R., O´Connor, B. M. 2009. Mites (Acari). In: Mullen, G. R., Durden, L. (eds.). Medical and veterinary entomology. 2nd ed. Academic Press. London. p. 423–482. ISBN: 978-0-12-372500-4.

Nayak, M. K. 2006. Management of mould mite *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina: Acaridae): a case study in stored animal feed. International Pest Control 48 (3). 128–130.

Ortego, F., Sánchez-Ramos, I., Ruiz, M., Castañera, P. 2000. Characterization of proteases from a stored product mite, *Tyrophagus putrescentiae*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 43 (3). 116–124.

Palyvos, N. E., Emmanouel, N. G., Saitanis, C. J. 2008. Mites associated with stored products in Greece. Experimental and Applied Acarology 44 (3). 213–226.

Qu, S. X., Li, H. P., Ma, L., Song, J. D., Hou, L. J., Lin, J. S. 2015. Temperature-dependent development and reproductive traits of *Tyrophagus putrescentiae* (Sarcoptiformes: Acaridae) reared on different edible mushrooms. Environmental Entomology 44 (2). 392–399.

Sánchez-Ramos, I., Castañera, P. 2005. Effect of temperature on reproductive parameters and longevity of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). Experimental and Applied Acarology 36 (1–2). 93–105.

Saridomichelakis, M. N., Marsella, R., Lee, K. W., Esch, R. E., Farmaki, R., Koutinas, A. F. 2008. Assessment of cross-reactivity among five species of house dust and storage mites. Veterinary Dermatology 19 (2). 67–76.

Šálek, M., Růžička, J., Mandák, B. 2005. Ekologie. 1. vydání FLE ČZU. Praha & Lesnická práce. Kostelec nad Černými lesy. 121 s. ISBN: 80-86386-68-6.

Thind, B. B. 2005. A new versatile and robust mite trap for detection and monitoring of storage mites in the cereal and allied industries. Experimental and Applied Acarology 35 (1–2). 1–15.

White, N. D. G., Demianyk, C. J., Jayas, D. S. 2003. Multiplication of stored-product mites on Canadian wheat and oilseed cultivars. In: Credland, P. F., Armitage, D. M., Bell, C. H., Cogan, P. M., Highley, E. (eds.). Advances in stored product protection. Proceedings of the 8th international working conference on stored product protection, York, UK, 22–26 July 2002. CABI Publishing. Wallingford & Cambridge, MA. p. 402–405. ISBN: 978-0-85199-691-2.

7. Seznam publikovaných prací

Poster prezentace

Petrová, D., Hubert, J., Erban, T., 2012. Dynamika produkce alergenních proteinů skladištním roztočem *Tyrophagus putrescentiae*. In Zoologické dny Olomouc 2012, sborník abstraktů z konference 9. – 10. února 2012. Bryja, J., Albrechtová, J., Tkadlec, E., (eds.). Brno: Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., 1. vydání. ISBN 978-80-87189-11-5. s. 154 – 155.

Petrová, D., Erban, T., 2012. Production of allergenic proteolytic enzymes to puppy dog food by the stored product mite *Tyrophagus putrescentiae*. In Zborník abstraktov z XIX. Slovenskej a českej konferencie o ochrane rastlín, Nitra, September 5 – 7, 2012. Bokor, P., Tóthová, M., (eds.), Slovenská pol´nohospodárska univerzita Nitra, 1.vydanie. ISBN 978-80-552-0838-1. s. 66 – 67.

Publikace v časopise recenzovaném metodou peer-review s impakt faktorem publikované

Rybanská, D., Hubert, J., Markovič, M., Erban, T., 2015. Dry dog food integrity and mite strain influence the density-dependet growth of the stored-products mite *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridida). Journal of Economic Entomology Epub. Sep 11, DOI: 10.1093/jee/tov298

Erban, T., Rybanská, D., Hubert, J., 2015. Population growth of the generalist mite *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridida) followig adaption to high- or low-fat and high or low-protein diets and the effect of dietary switch. Environmenatl Entomology Epub. Aug 7, DOI: 10.1093/ee/nvv129

v recenzním řízení

Poslední článek

Erban, T., Rybanská, D., Harant, K., Hortova, B., Hubert, J., 2015. Feces derived allergens of *Tyrophagus putrescentiae* reared on dried dog food and evidence of the strong nutritional interaction between the mite and *Bacillus cereus* producing protease bacillolysins and exo-chitinases"

8. **Summary**

The infestation of foodstuffs by mites is connected to health risks and economic losses. *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781) is a cosmopolitan generalist feeder that prefers foodstuffs of high-fat and high-protein content. The stored product mite *T. putrescentiae* is an emerging and predominant pest of dry dog food. It is an emerging source of allergens in stored products and homes. Feces allergens accumulate in the environment during the life of the mite and represent quantitatively greater amounts of mite immunogens than mite bodies. The mites are carriers of microorganisms and microbial adjuvant compounds that stimulate innate signaling pathways leading to allergy.

The intrinsic growth rates of the mites were compared. The population growth was higher on the brown and green kernels than on the red and white kernels. The kernel integrity affected the population growth, and the integrity effect was highly influenced by the initial mite population density. The mites showed density-dependent growth in 3 of the 4 mite strains tested. The initial population density changed the population growth ranking among the mite strains, thereby indicating strain-specific density-dependent growth.

Dietary treatment, nutritional adaptation, and their interaction all significantly influenced population growth. The homogenous diet treatment showed 7.5 times higher growth on the dog food diet than on flour. In the dietary switch, flour-adapted mites switching to dog food experienced five times greater population growth than the flour-adapted mites remained on flour, whereas the dog food-adapted population showed a 2.8-fold decrease in population growth when transferred to the flour. A comparison of means between the two dietary switch treatments showed a 1.9-fold higher population growth after flour-adapted mites were shifted to dog food than when the dog food-adapted mites were shifted to flour.

Three peaks of protease activity at pH 5.75, 6.75 and at basic pH were observed. The highest activity was assigned to trypsin-like proteases, lower to chymopsin-like, and the cysteine protease cathepsin B-like were very low. Highest activity observed at basic pH, followed by pH 6.75 corresponded to the bacterial basic and neutral proteases while the activity at pH 5.75 was mite gut derived trypsins. The different patterns of bands in zymographic analysis demonstrated the specific protease activities towards the different substrates produced by different proteases. The 2D-E-MS/MS proteomic analysis of the feces identified *T. putrescentiae* trypsin allergens Tyr p3 and Tyr p13, putative mite allergens ferritin (Grp 30 mite allergens) and (poly)ubiquitins. The proteins of Bacillus cereus were found including

bacillolysins (neutral and alkali proteases), extracellular exo-chitinases, superoxide dismutase, extracellular solute-binding protein family 5, or cold-shock proteins. The *Bacillus cereus* group symbiont was far dominant in cultivable part of isolated bacteria from the feces.

The results of this study have important implications for predictive models of stored-product mite populations in dry dog food. High-fat and -protein food accelerated *T. putrescentiae* population growth compared with the high-carbohydrate diet.

The results increase the medical importance of the mite allergens detected in the feces. The cocktail of allergens, i.e. feces covering chitin, mite allergens and bacterial toxins, represent high risks for the mammalian immune system. The bacterium aid is to the medical importance of *T. putrescentiae*. The strong association of the mite with *Bacillus cereus* with analogy to soil environment was indicated.