

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: NEKO



**Bc. Lucie Novotná**

Teplotně závislá antimikrobiální aktivita bílkových proteinů u prekociálních a altriciálních  
druhů ptáků

Temperature-dependent activity of egg-white antimicrobial proteins in precocial and altricial  
birds

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Veronika Javůrková, Ph.D.

Konzultanti: Mgr. Jakub Kreisinger, Ph.D.

RNDr. Jana Beranová, Ph.D.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 8. 2015

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala zejména své školitelce Veronice Javůrkové a svým konzultantům Jakubu Kreisingerovi a Janě Beranové za vstřícnost, cenné rady a také za pomoc při statistickém zpracování dat pro moji diplomovou práci. Mé poděkování patří také paní laborantce Lucii Jánské za pomoc v laboratoři a všem dodavatelům křepelčích a holubích vajíček, panu Oldřichu Machovi, Petru Smrčkovi a Stanislavu Česnekovi. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému příteli za pomoc se zpracováním vajec a za víkendy strávené se mnou ve škole.

## Abstrakt

Mikroorganismy jsou považovány za významný selekční faktor ovlivňující reprodukční úspěch ptáků. Předpokládá se, že mezi zásadní obranné mechanismy, eliminující infekci vnitřních struktur vajec, patří deponace antimikrobiálních proteinů do bílku a inkubační chování. Současné studie naznačují, že inkubační teploty mohou antimikrobiální aktivitu bílkových proteinů zásadně ovlivňovat. Koncentrace vybraných antimikrobiálních proteinů ale i způsoby inkubace snůšky se však liší u altriciálních a prekociálních druhů ptáků. Experimentálně však vliv inkubační teploty na antimikrobiální potenciál bílku u altriciálních a prekociálních druhů ptáků doposud nebyl studován.

V této práci byl v manipulativním experimentu testován vliv částečné a plné inkubace, koncentrace lysozymu a ovotransferinu v bílku a jejich vzájemné interakce na antimikrobiální potenciál bílku u dvou modelových druhů ptáků – křepelky japonské (*Coturnix japonica*) a holuba domácího (*Columba livia*). Antimikrobiální potenciál bílku byl zjišťován metodou difúze v agaru vůči dvěma gram-positivním bakteriím - *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*, které byly detekovány jako patogeny bílku u několika druhů ptáků. Kromě toho byl sledován vliv inkubačních teplot a jejich intenzity na změny v koncentraci studovaných antimikrobiálních proteinů v bílku.

Z výsledků této studie vyplývá, že zásadní antibakteriální efekt měla u obou námi studovaných druhů ptáků koncentrace lysozymu v bílku. Efekt zvýšené koncentrace ovotransferinu nebyl prokázán. Přestože částečná ani plná inkubace neměla vliv na zvyšování antibakteriálního potenciálu bílku žádného ze studovaných druhů, byl sledován efekt inkubace na změny koncentrace obou bílkových proteinů. Zatímco koncentrace ovotransferinu vlivem inkubace rostla, u lysozymu klesala. Tento pokles koncentrace lysozymu měl pravděpodobně za následek zásadní snížení antibakteriálního potenciálu bílku vůči vybraným bakteriálním kmenům u částečně i plně inkubovaných vajec křepelky. Poměrně zásadním výsledkem této studie je, že inkubace měla druhově specifický vliv na změny pH bílku fertilních vajec, kdy u holuba se pH bílku vlivem inkubace neměnilo, zatímco u křepelky pH vlivem plné inkubace klesalo. Na antimikrobiální aktivitu křepelčích bílků vůči *M. luteus* měl vliv také objem vejce.

Tyto výsledky poukazují na zásadní efekt koncentrace lysozymu v bílku na jeho antimikrobiální potenciál i u druhů, u nichž tento protein není v bílku dominantní. Naopak antimikrobiální efekt částečné i plné inkubace snůšky je velmi pravděpodobně druhově specifický a je spojen s mechanismy na úrovni změn pH bílku či koncentrace vybraných bílkových proteinů.

**Klíčová slova:** mikroorganismy, bílek, antimikrobiální proteiny, inkubace, metoda difúze v agaru

## Abstract

Microorganisms are considered to be crucial selective factor affecting reproductive success of birds. It is hypothesized that egg-white antimicrobial proteins and incubation behavior are the most important defense mechanisms that eliminates the risk of microbial trans-shell infection. The latest studies supposed that incubation temperatures may significantly affect the antimicrobial activity of egg white proteins. The concentration of egg white antimicrobial proteins as well as incubation patterns differ among altricial and precocial species of birds. However, experimental study testing the effect of incubation temperature on the antimicrobial potential of antimicrobial egg white proteins in altricial and precocial birds is missing.

In this study we tested in manipulative experiment the effect of partial and full incubation, the concentration of lysozyme and ovotransferrin and their interactions on the antimicrobial activity of egg whites of two model species - Japanese quail (*Coturnix japonica*) and home pigeon (*Columba livia*). Antimicrobial protein activity was determined by the agar well diffusion method against two Gram-positive bacteria - *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus* that have been documented as pathogenic egg-white invaders of several birds. Moreover, we analyzed the effect of incubation temperature and their intensity on the changes in concentration of both egg white antimicrobial proteins.

We found increased concentration of lysozyme as significant antibacterial factor for both studied species. The effect of increased concentration of ovotransferrin was not found. Although partial or full incubation had no positive effect on antibacterial potential of egg whites of any model species, both types of incubation significantly affected concentrations of both egg white antimicrobial proteins. While ovotransferrin concentration increased along with incubation, concentration of lysozyme decreased with increasing dosages of incubation. Decrease in the concentration of lysozyme most likely resulted in reduction of egg white antibacterial potential of partially or fully incubated quail eggs. Crucial finding of this study is that incubation had species-specific effect on egg white pH values of fertile eggs. While pH of pigeon egg whites did not change during incubation, pH of quail egg whites significantly declined during the full incubation. We also found egg volume to affect antimicrobial activity of quail egg whites against *M. luteus*.

These results suggest underlying effect of lysozyme concentration on antimicrobial potential of egg white also for species where this protein is not dominant. Contrariwise, antimicrobial effect of partial or full incubation is most probably species-specific and is associated with the mechanisms based on the changes in egg white pH or alterations in concentration of particular egg white proteins.

**Keywords:** microorganisms, albumen, antimicrobial proteins, incubation, agar diffusion well

# Obsah

1. Úvod .....	8
1.1. Antimikrobiální proteiny v bílku .....	9
1.1.1. Lysozym .....	9
1.1.2. Ovotransferin.....	10
1.1.3. Interakce mezi lysozymem a ovotransferinem .....	11
1.2. Rozdíly ve složení vajec u altriciálních a prekociálních druhů ptáků.....	12
1.3. Bílek během vývoje embrya .....	14
1.3.1. pH bílku a aktivita antimikrobiálních proteinů.....	14
1.3.2. Absorpce antimikrobiálních proteinů během embryogeneze .....	16
1.4. Inkubace .....	16
1.4.1. Začátek plné inkubace a částečná inkubace.....	17
1.4.2. Obranný mechanismus inkubace související s infekcí vnitřních struktur vajec mikroorganismy.....	18
1.4.3. Interakce teploty a antimikrobiálních proteinů v bílku .....	19
2. Hypotézy a cíle práce.....	21
3. Metodika .....	22
3.1. Modelové druhy .....	22
3.2. Původ, způsob kompletace a přípravy experimentálních vajec.....	22
3.3. Metodika stanovení koncentrace cílových antimikrobiálních proteinů v bílku .....	23
3.3.1. Stanovení koncentrace ovotransferinu (OVTR).....	23
3.3.2. Stanovení koncentrace lysozymu .....	24
3.4. Mikrobiologické pre-experimenty.....	24
3.5. Manipulativní experiment.....	26
3.5.1. Experimentální design .....	26
3.5.2. Příprava roztoků k manipulacím.....	26
3.5.3. Aplikace roztoků proteinů a sterilního PBS do experimentálních vajec.....	27
3.5.4. Inkubace vajec v různých teplotách .....	27
3.5.5. Příprava vzorků bílku k post-experimentálním analýzám .....	27
3.6.1. Stanovení antimikrobiálního potenciálu bílku.....	28
3.6.2. Post-experimentální stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích bílku .....	29
3.7. Statistické zpracování dat.....	29
3.7.1. Analýzy antimikrobiálního potenciálu bílku .....	29

3.7.2.	Post-experimentální analýzy koncentrace bílkových proteinů .....	30
4.	Výsledky.....	32
4.1.	Testování antimikrobiální aktivity bílků experimentálních vajec vůči <i>B.subtilis</i> a <i>M.luteus</i> .	32
4.1.1.	Testování antimikrobiální aktivity KŘEPELČÍCH bílků vůči <i>B. subtilis</i> a <i>M. luteus</i> .....	32
4.1.2.	Testování antimikrobiální aktivity HOLUBÍCH bílků vůči <i>B. subtilis</i> a <i>M. luteus</i> .....	36
4.2.	Druhové rozdíly v antimikrobiální aktivitě bílku vůči vybraným bakteriím.....	39
4.3.	Post-experimentální stanovení koncentrace proteinů v bílku .....	40
4.3.1.	Post-experimentální stanovení koncentrace OVOTRANSFERINU .....	40
4.3.2.	Post-experimentální stanovení koncentrace LYSOZYMU.....	43
5.	Diskuse.....	45
5.1.	Testování antimikrobiální aktivity bílků experimentálních vajec vůči <i>B.subtilis</i> a <i>M.luteus</i> .....	45
5.1.1.	Vliv manipulativního navýšení koncentrace proteinů a jejich antimikrobiální aktivita .....	45
5.1.2.	Vliv inkubace na antimikrobiální potenciál křepelčích vajec.....	46
5.1.3.	Vliv inkubace, pH a fertility vejce na antimikrobiální potenciál holubích vajec .....	47
5.1.4.	Další faktory ovlivňující antimikrobiální potenciál bílku.....	49
5.2.	Post-experimentální stanovení koncentrace ovotransferinu.....	49
5.3.	Post-experimentální stanovení koncentrace lysozymu .....	51
6.	Souhrn .....	52
7.	Přehled použité literatury .....	53
8.	Přílohy.....	60
8.1.	Výsledky mikrobiologických pre-experimentů .....	60
8.2.	Ukázka misek s kulturou <i>B.subtilis</i> a <i>M. luteus</i> při testování antimikrobiální aktivity bílků experimentálních vajec .....	62
8.3.	Tabulky postupné eliminace nesignifikantních proměnných před selekcí minimálního adekvátního modelu.....	63

## 1. Úvod

Mikroorganismy, jako součást hnízdního habitatu ptáků, byly doposud jako jedny ze selekčních faktorů ovlivňujících reprodukční úspěch a s tím spojené reprodukční strategie ptáků opomíjeny. Současné studie naznačují, že mikroorganismy mohou pronikat do vnitřních struktur vajec skrz vaječné póry a infikovat vyvíjející se embryo (Board & Tranter 1986, Cook *et al.* 2003, 2005b; Fonseca *et al.* 2011), což může vést k potlačení životaschopnosti embrya či dokonce k jeho odumření (Pinowski *et al.* 1994; Fonseca *et al.* 2011) a s tím spojenému poklesu líhivosti (Bruce & Johnson 1978; Cook *et al.* 2003, 2005b). Jedna ze studií dokonce prokazuje, že přítomnost bakteriální infekce uvnitř vajec může vést k redukci tělesné hmotnosti mláďat (Javůrková *et al.* 2014). Riziko bakteriální infekce a schopnost jednotlivých bakterií vstupovat a přežít uvnitř vejce se může měnit v závislosti na zeměpisné šířce (Cook *et al.* 2003, 2005b; Shawkey *et al.* 2009; Wang *et al.* 2011) a dalších podmínkách prostředí, především vlhkosti (D'Alba *et al.* 2010a; Ruiz-De-Castañeda *et al.* 2011). Nicméně k bakteriální infekci vnitřních struktur vajec dochází rovněž v podmínkách mírného klimatu a to v poměrně vysoké incidenci a intenzitě (Javůrková *et al.* 2014). Usuzuje se, že v důsledku toho došlo u ptáků k vytvoření plejády obranných mechanismů, přičemž jako nejdůležitější se jeví deponace antimikrobiálních proteinů do bílku (např. Board 1966; Wellman-Labadie *et al.* 2007; Wellman-Labadie *et al.* 2008a) a inkubační chování (např. Cook *et al.* 2005a; Shawkey *et al.* 2009; D'Alba *et al.* 2010a; Ruiz-De-Castañeda *et al.* 2011; Ruiz-De-Castañeda *et al.* 2012). Koncentrace proteinů v bílku u ptáků se ale může lišit v závislosti na stupni embryonálního vývoje v době líhnutí (Saino 2007, Deeming 2002). Navíc se ukazuje, že antimikrobiální aktivita proteinů může interagovat s teplotou v raných fázích embryonálního vývoje (Cunningham 1974; Alabdeh *et al.* 2011; Fang *et al.* 2012a,b). Altriciální a prekociální druhy, které se zásadně liší svým inkubačním chováním tak mohou využívat v různé míře odlišné mechanismy obrany snůšky před mikrobiální infekcí vnitřních struktur vajec. I když samozřejmě i zde existuje variabilita v rámci altriciálních a prekociálních druhů, altriciální druhy více zasedají a plně inkubují časně nakladená vejce v rámci menších snůšek, zatímco prekociální druhy inkubují převážně větší snůšky nejprve částečně a plně inkubovat začínají až po kompletaci snůšky (Deeming 2002; Loos *et al.* 2004; Wang & Beissinger 2009). Pokud tedy inkubace a antimikrobiální proteiny v bílku plní mimo jiné funkci obranných mechanismů proti mikrobiální infekci vnitřních struktur vajec, měla by

vejce prekociálních druhů vykazovat vyšší koncentraci antimikrobiálních proteinů v bílku oproti druhům altriciálním kompenzujících tuto skutečnost dřívějším začátkem plné inkubace.

### **1.1. Antimikrobiální proteiny v bílku**

Existují nejméně dva mechanismy, jakými antimikrobiální proteiny působí na mikroorganismy. Bakteriostatické antimikrobiální proteiny inhibují bakterie limitací základních prvků nezbytných pro bakteriální růst nebo potlačením metabolismu, zatímco baktericidní antimikrobiální proteiny způsobí lyzi buňky poškozením buněčné stěny nebo její smrt narušením membránového potenciálu (Wellman-Labadie *et al.* 2007). Zkoumáním vaječného bílku různých druhů ptáků se ukázalo, že zatímco hlavní antimikrobiální proteiny, mezi něž patří lysozym a ovotransferin, jsou obvykle přítomny u všech druhů, jejich relativní zastoupení se značně liší a může být druhově závislé (Sibley and Ahlquist 1972 podle Deeming 2002; Shawkey *et al.* 2008). Například vaječný bílek nejběžněji využívaného modelového druhu kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*) obsahuje 12-13 % ovotransferinu a 3,5 % lysozymu z celkového množství proteinů přítomných v bílku (Burley & Vadehra 1989).

#### **1.1.1. Lysozym**

Lysozym je antimikrobiální protein, který se vyskytuje v živočišných tekutinách a tkáních, např. slinách, mléce nebo slzách, a je rozšířen v celé živočišné říši (Callewaert & Michiels 2010). U ptáků se lysozym mimo jiné vyskytuje ve vysokých koncentracích v bílku vajec.

Lysozym patří mezi enzymy štěpící beta-1,4-vazby mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglukosaminem v peptidoglykanových stěnách gram-positivních (G+) a v menší míře některých gram-negativních (G-) bakterií (Bera *et al.* 2005; Wellman-Labadie *et al.* 2008a). Kromě této dobře známé lytické aktivity Ibrahim *et al.* (2001) demonstrovali neenzymatickou baktericidní aktivitu lysozymu. Ta je připisována aktivaci bakteriální autolýze po interakci molekuly lysozymu s buněčnou stěnou nebo přímé interakci lysozymu s cytoplasmatickou membránou a jejímu následnému narušení. Je také možné, že lysozym vznikl spíše jako fyzická než chemická obrana vajíčka, protože v kombinaci s dalšími proteiny

tvoří vláknitou síť bílkovinného vaku, který chrání žloutek před infekcí z vaječné membrány (Trziszka 1994).

Ve vaječném bílku ptáků byly popsány především dva typy lysozymu C-typ (chicken type) a G-typ (goose-type). Ačkoli jsou jejich aminokyselinové sekvence zcela odlišné, jsou si oba typy lysozymů velmi podobné ve své terciální struktuře. Antimikrobiální potenciál obou typů lysozymu je závislý na pH (viz kapitola 1.3.1.). Dominantní typ lysozymu ve vaječném bílku druhů patřících do řádu hrabavých (Galliformes) je C-typ, zatímco v řádu vrubozobých (Anseriformes) mohou být v bílku přítomny C-typ, G-typ nebo oba typy v závislosti na druhu (Prager & Wilson 1974; Callewaert & Michiels 2010). To ve své studii ukazují také Wellman-Labadie *et al.* (2008b), kteří detekovali C-typ lysozymu v bílku kachničky karolínské (*Aix sponsa*) a morčáka chocholátého (*Lophodytes cucullatus*), zatímco u bernešky velké (*Branta canadensis*) a labuti velké (*Cygnus olor*) nebyl C-typ lysozymu v bílku identifikován. Nicméně vaječný bílek kachničky karolínské a morčáka chocholátého vykazoval také vyšší antimikrobiální aktivitu lysozymu při nízkém pH, což může znamenat přítomnost G-typu lysozymu. Mimoto G-typ lysozymu se našel také v bílku např. pštrosů (Struthiniformes), potápek (Podicipediformes), tučňáků (Sphenisciformes) a bahňáků (Charadriiformes) (Florkin & Scheer 1978; Pooart *et al.* 2004). Gen pro G-typ lysozym byl nalezen dokonce u holuba (Irwin 2014).

Obecně se deponace lysozymu do vaječného bílku považuje za významný maternální efekt, který může mít vliv na životaschopnost vajec a přežívání potomků. Tomu nasvědčuje studie, která prokázala vyšší koncentraci lysozymu v prvním vejci ve snůšce vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) oproti poslednímu vejci, které je vystaveno působení okolních podmínek, včetně mikroorganismů, kratší dobu (Saino *et al.* 2002). Podobně byla u sýkory modřinky (*Cyanistes caeruleus*) zdokumentována vyšší koncentrace lysozymu ve vejcích produkovaných po spáření s atraktivnějším samcem (D'Alba *et al.* 2010b). Mimoto se koncentrace lysozymu ve vejcích může lišit s ohledem na přítomnost samčího nebo samičího embrya (Bonisoli-Alquati 2010).

### 1.1.2. Ovotransferin

Ovotransferin (syn. conalbumin), je členem skupiny proteinů transferinů, které se nachází v různých fyziologických tekutinách, např. krevní plasmě a mléce. Ovotransferin (OVTR) vaječného bílku je syntetizován ve vejcovodech ptáků. Tento glykoprotein je složen

ze dvou globulárních laloků, které mají schopnost s vysokou afinitou reversibilně vázat železo (Wu & Acero-Lopez 2012).

Antimikrobiální aktivita OVTR spočívá právě ve vyvazování železa z média, což vede k vytvoření železo-deficitního prostředí pro růst mikroorganismů (Phelps & Antonini 1975; Baron *et al.* 2014). Další studie ale poukazují na to, že antibakteriální aktivita OVTR není jednoduše způsobena odebráním železa z média, ale pravděpodobně zahrnuje další komplexnější mechanismy. Ibrahim *et al.* (2000) získal hydrolýzou OVTR peptidový fragment (OTAP 92), který ničí bakterie poškozením biologické funkce jejich cytoplasmatické membrány. Aguilera *et al.* (2003) ukázali, že transferiny jsou schopné zapříčinit selektivní prostoupení iontů skrz cytoplasmatickou membránu bakterií a modifikovat tak její membránový elektrochemický potenciál. Zdá se, že zatímco neutrální pH podporuje mechanismus založený na nedostatku železa, membránová dysfunkce se jako mechanismus uplatňuje při zásaditém pH, což je přirozené pH vaječného bílku v rané fázi inkubace (Baron *et al.* 2014). Mimo antimikrobiální funkci ve vaječném bílku zajišťuje OVTR transport železa vyvíjejícímu se zárodku (Ibrahim 1997).

Ve vyšší koncentraci je OVTR přítomen v bílku u hrabavých (Galliformes) ve srovnání s vrubozobými (Anseriformes). To vyplývá z výsledků studie Wellman-Labadie *et al.* (2008a), ve které byla sledována antibakteriální aktivita bílku u slepice (*Gallus gallus*), krocana (*Meleagris gallopavo*), kachny (*Anas platyrhynchos*) a husy (*Anser anser*). Podobně Miguel (2005) demonstruje vyšší koncentraci OVTR u bažanta (*Phasianus colchicus*), slepice (*Gallus gallus*) a křepelky (*Coturnix coturnix*) ve srovnání s kachnou (*Anas platyrhynchos*). Mimoto Wellman-Labadie *et al.* (2008b) ukazuje malou mezidruhovou variabilitu koncentrace OVTR v bílku v rámci vrubozobých na kachničce karolínské (*Aix sponsa*), morčákovi chocholatém (*Lophodytes cucullatus*), bernešce velké (*Branta canadensis*) a labuti velké (*Cygnus olor*). Značnou mezidruhovou variabilitu koncentrace OVTR v bílku naopak vykazují zástupci pěvců (Passeriformes) (viz např. Shawkey *et al.* 2008; Horrocks *et al.* 2014).




### **1.1.3. Interakce mezi lysozymem a ovotransferinem**

Proteiny v bílku na sebe mohou navzájem působit a ovlivňovat svůj antimikrobiální potenciál. Bylo prokázáno, že ovotransferin a lysozym interagují za vzniku synergického efektu. Vejce obsahující vyšší koncentraci OVTR mohou vyžadovat méně lysozymu a naopak. Mikrobiální společenstva na povrchu vajec se mohou totiž lišit nejen svou denzitou (Cook *et*

*al.* 2003), ale také druhovým zastoupením (Shawkey *et al.* 2009; Grizard *et al.* 2015). V takovém případě mohou určité proteiny být efektivnější než jiné, s ohledem na baktericidní aktivitu lysozymu proti G+ bakteriím a širší efektivitu OVTR proti G+ i G- bakteriím. Rovnováha mezi koncentrací OVTR a lysozymu může tedy maximalizovat antimikrobiální obranu vaječného bílku minimalizací množství požadovaných proteinů, jejichž produkce je drahá nebo přijde na úkor dalších komponentů bílku, které jsou vyžadovány pro vývoj embrya (Horrocks 2012). Jak ukázali ve své studii Ko *et al.* (2009), lysozym může umocňovat aktivitu OVTR konkrétně proti *E. coli*. Širší baktericidní vliv lysozymu také na G- bakterie byl prokázán v přítomnosti lactoferinu, proteinu podobném OVTR (Ricklefs 1977; Ellison & Giehl 1991). Interakce lysozymu s ovomucinem hraje také roli při formování rosolovité struktury bílku (Kato *et al.* 1975), což může mít za následek snížení antimikrobiální aktivity lysozymu.

## **1.2. Rozdíly ve složení vajec u altriciálních a prekociálních druhů ptáků**

Ptačí mláďata vykazují rozdílnosti ve vývojovém stupni zralosti od slepých bezbranných mláďat altriciálních, až po plně aktivní a nezávislá mláďata prekociální (Nice 1962). Stupeň vývojové zralosti mláďat a nezávislosti v době líhnutí souvisí s poměrem vnitřních částí vajec (Romanoff & Romanoff 1949; Vleck & Vleck 1987; Sotherland & Rahn 1987). Proporčně vyšší obsah bílku (68-79%) ku žloutku (12-27%) najdeme u druhů s altriciálními mláďaty, naopak (51-56% a 32-41%) je to u druhů s prekociálními mláďaty. To s ohledem na bílek jako hlavní zdroj vody pro vyvíjející se embryo znamená, že altriciální druhy produkují na vodu bohatá a energeticky chudá vejce ve srovnání s na vodu chudými a energeticky bohatými vejci prekociálních druhů (Obrázek 1) (Romanoff & Romanoff 1949; Ricklefs 1977; Vleck & Vleck 1987). Takové složení je u prekociálních druhů nezbytné k zásobení embrya dostatkem živin během delší inkubace (Sotherland & Rahn 1987). Mimoto u prekociálních druhů větší velikost vajíčka znamená přítomnost většího množství energie a tím pádem lepší fitness líhnoucích se samostatných mláďat (Rahn *et al.* 1975; Blomqvist *et al.* 1997).

Obsah vajíčka			Mládě v době líhnutí	
% vody	kJ/g	% žloutku		
82	4.7	20		A
78	6.3	30		B
73	7.9	40		C

Obrázek 1: Schématické znázornění složení vajec u zástupců (A) altriciálního (*Certhia familiaris*), (B) semiprekociálního (*Sterna albifrons*) a (C) prekociálního druhu (*Oxyura jamaicensis*); převzato od Sotherland & Rahn 1987

Jak bude popsáno níže, má bílek v embryogenezi zásadní a nezastupitelný význam. Zastoupení antimikrobiálních proteinů v bílku se ale může mezi altriciálními a prekociálními druhy řádově lišit, jak je ukázáno na koncentraci lysozymu v Tabulce 1. Nicméně koncentrace proteinů mohou být značně variabilní i na vnitrodruhové úrovni (viz Horrocks *et al.* 2014; Grizard *et al.* 2015).

Tabulka 1: Koncentrace lysozymu ( $\mu\text{g/ml}$ ) v bílku u vybraných zástupců prekociálních a altriciálních druhů ptáků; a) Saino 2007, b) Bonisoli-Alquati 2010, c) Shawkey *et al.* 2008, d) Horrocks *et al.* 2014

	Koncentrace lysozymu ( $\mu\text{g/ml}$ )	zdroj
<b>Prekociální mláďata</b>		
<i>Anas platyrhynchos</i>	75,45	a
<i>Gallus gallus</i>	8719,35	a
<i>Numida meleagris</i>	50,43	a
<i>Phasianus colchicus</i>	3591,41	a
<b>Altriciální mláďata</b>		
<i>Athene noctua</i>	6,02	a
<i>Columba livia</i>	6,45	a
<i>Larus michahellis</i>	15,7	b
<i>Margarops fuscatus</i>	cca 7	c
<i>Hirundo rustica</i>	32,93	a
<i>Calandrella cinerea</i>	3,39	d

S koncentrací antimikrobiálních proteinů v bílku může také souviset nižší životaschopnost vajec ptáků s altriciálním způsobem vývoje. U prekociálních druhů může totiž větší velikost snůšky a omezení spojená se synchronním líhnutím snůšky vést k vyšší

koncentraci antimikrobiálních proteinů ve vaječném bílku než u druhů altriciálních, kteří mohou inkubovat krátce po naklazení prvního vejce (Cook *et al.* 2005b).

### **1.3. Bílek během vývoje embrya**

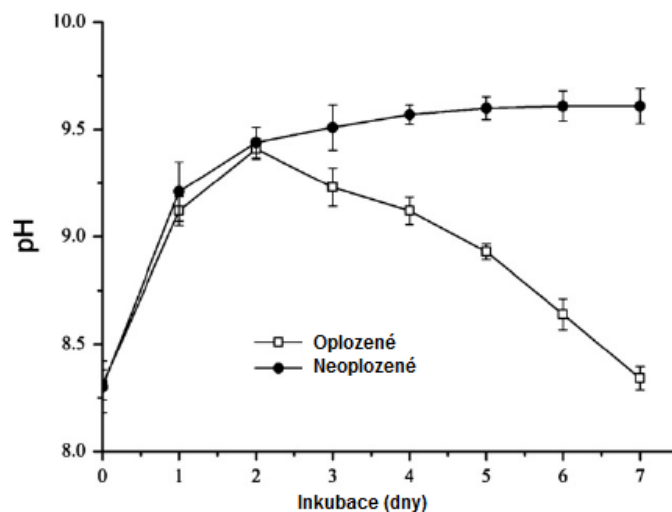
Bílek má význam v embryogenezi, jak již bylo naznačeno, jako ochrana před mikrobiální infekcí. Jeho hlavní role ale spočívá v poskytování vody, minerálních látek a proteinů vyvíjejícímu se embryu. Jelikož k významné části růstu embrya dochází u ptáků vně těla matky, musí být všechny výživové komponenty embrya přítomné ve vajíčku v době kladení. Podstatná role bílku ve vývoji embrya byla demonstrována experimentálním odebráním určitého množství bílku z vajíčka (Hill 1993; Finkler *et al.* 1998; Ferrari *et al.* 2006; Alquati *et al.* 2007). Redukce bílku významně snížila velikost mláděte při líhnutí (Hill 1993; Finkler *et al.* 1998) nebo ovlivňovala úspěšnost a zpoždění líhnutí (Ferrari *et al.* 2006; Alquati *et al.* 2007).

Formování vajíčka a začátek embryonálního vývoje se uskutečňuje při průchodu částmi vejcovodu (tj. infundibulem, magmem, isthmem), žlázou k tvorbě skořápky v děloze a vaginou. K oplození dochází v infundibulu (Fasenko 2007). Při klazení se zárodek nachází ve stádiu gastruly a k dalšímu vývoji dochází po započetí inkubace. Plně rozeznatelné ptáče se u drůbeže ve vejci nachází 12. den inkubace. Na tuto diferenciační část vývoje embrya navazuje fáze růstová, kdy dochází k zvětšování velikosti a zrání embrya. Zdá se, že časná diferenciační fáze vývoje je relativně uniformní u prekociálních i altriciálních druhů, odlišná je délka pozdní růstové fáze (Deeming 2002).

#### **1.3.1. pH bílku a aktivita antimikrobiálních proteinů**

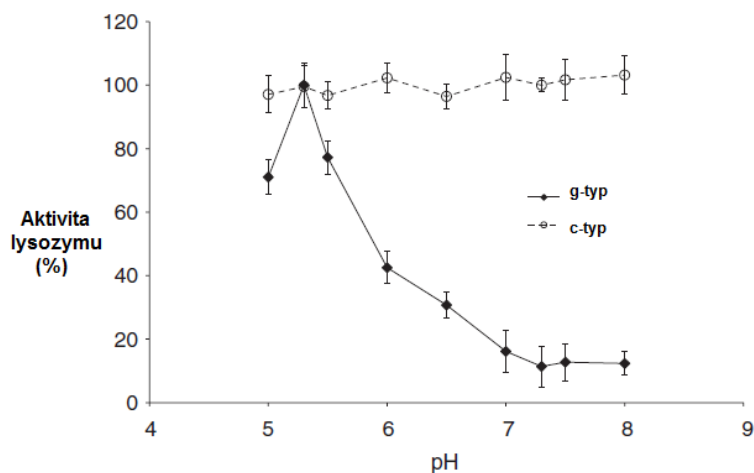
V době, kdy vejce leží v hnízdě, nebo i pokud je ihned inkubováno dochází k úniku oxidu uhličitého skrz vaječné póry vedoucímu k nárůstu pH z hodnot 7-8 k hodnotám 9,3-9,5 (Deeming 2002; Cunningham 1974; Qiu *et al.* 2012; Fang *et al.* 2012b). Jestliže dojde k inkubaci nebo je vejce inkubováno ihned po naklazení, pH klesá směrem k neutralitě a po několika dnech dosahuje původní hodnoty pH (Benton & Brake 1996; Lapão *et al.* 1999; Fang *et al.* 2012b). Nicméně Grizard *et al.* (2015) u skřivánka rudotemenného (*Calandrella cinerea*) prudký nárůst koncentrace druhý den inkubace nezaznamenali, i když k poklesu hodnot pH k neutralitě docházelo také. K návratu k původním hodnotám pH však podle Qui *et al.* (2012) dochází pouze u fertilních vajec, jak je ukázáno v grafu na Obrázku 2. To

potvrzuje, že ptačí embryo působí na fyzické a chemické složky bílku před inkubací a během počátečních hodin inkubace, jak navrhuje také Benton *et al.* (2001). Ztráta oxidu uhličitého a rapidní změny pH ve vaječném bílku jsou pravděpodobně zodpovědné za zkapalnění bílku během časných fází inkubace (Benton & Brake 1996). Zkapalnění bílku může sloužit k uvolnění makromolekul, glukózy, esenciálních iontů v bílku a umožnit jejich pohyb do blastodermu nebo redukovat bariéry plynné difúze v bílku (Burley & Vadehra 1989). Na druhou stranu zkapalnění vede ke ztrátě viskozity bílku, která se podílí na udržování žloutku v centrální pozici a zabraňuje tak kontaminaci žloutku kontaktem s vaječnou skořápkou (Board & Fuller 1974). Tyto rychlé a výrazné změny pH mohou také vést ke změnám antimikrobiálního potenciálu bílku.



Obr. 2: pH vaječného bílku oplozených a neoplozených slepičích vajec během prvního týdne inkubace v intervalu 24 hodin; Qui *et al.* 2012

Antimikrobiální aktivita C-typy lysozymu je vysoká mezi hodnotami pH 5-8, zatímco G-typ lysozymu vykazuje maximální aktivitu při pH okolo 5,3 (viz Obrázek 3) (Wellman-Labadie *et al.* 2008a). Pokles specifické lysozymální aktivity během druhého dne inkubace, která byla demonstrována ve studiích Fang *et al.* (2012a,b) a Grizard *et al.* (2015), může být tedy zapříčiněna nárůstem pH a s tím spojenou tvorbou dimerů a rozpadem S-S vazeb lysozymu (Fang *et al.* 2012b). Na rozdíl od lysozymu, ovotransferin vykazuje vyšší stabilitu během časně inkubační fáze (Fang *et al.* 2012a). Tranter & Board (1984) demonstrují, že alkalické pH (9,5) může podpořit vychytání železa ovotransferinem. Rapidní nárůst pH tak může být primární příčinou nárůstu aktivity ovotransferinu (Fang *et al.* 2012b).



Obr.3: Aktivita lysozymu slepičího (C-typ) a husího (G-typ) bílku v závislosti na pH; Wellman-Labadie *et al.* 2008a

### 1.3.2. Absorpce antimikrobiálních proteinů během embryogeneze

Během časného embryonálního vývoje dochází k formování sub-embryonální tekutiny (SET), která je zásadní pro vývoj embrya (Benton & Brake 1996, Deeming 2002). SET je vodnatý roztok nacházející se v dutině pod embryem a na vrcholu žloutku (Romanoff 1967; Deeming 2002). Při vzniku SET dochází k poklesu množství bílku kvůli potřebě transportu vody do žloutku, kde je lépe přístupná pro pozdější formování tekutin plodových obalů. U prekociálních ptáků objem SET odráží celkové množství vaječné hmoty (Romanoff 1967). Vzhledem k vyššímu obsahu bílku u altriciálních ptáků je možno předpokládat větší množství SET u těchto druhů.

Okolo dvanáctého dne inkubace dochází u drůbeže k druhé fázi utilizace bílku, přesunu bílkových proteinů do plodové vody a časem do žloutkového vaku (Deeming 2002; Yoshizaki *et al.* 2002). Carinci & Manzoli-Guidotti (1968) také demonstrovali, že nedochází v patrném množství k absorpci bílkových proteinů před dvanáctým dnem inkubace a během této doby je podíl bílkovinné složky téměř stejný jako u neinkubovaných vajec. Bílkový vak zaniká za normálních podmínek šestnáctý den inkubace (Deeming 1991).

### 1.4. Inkubace

Inkubace je zásadně důležitá pro reprodukční úspěch ptáků. Během inkubace rodiče chrání vejce před podmínkami okolního prostředí a poskytují jim relativně stabilní tepelné podmínky pro vývoj embrya (Drent 1973). Optimální teplota pro normální vývoj embrya spadá do úzkého rozmezí mezi 36 a 38 °C. Ve srovnání s tím, ptačí embryo se nevyvíjí při teplotách pod 24-27 °C. Tento práh se označuje jako fyziologická nula (Drent 1975, Webb

1987). I když inkubace hraje zásadní roli při zajišťování životaschopnosti a optimálního vývoje embrya, recentní studie poukazují také na obrannou roli inkubace před mikrobiální infekcí vnitřních struktur vajec (Cook *et al.* 2005a; Shawkey *et al.* 2009; D'Alba *et al.* 2010a; Ruiz-De-Castañeda *et al.* 2011; Ruiz-De-Castañeda *et al.* 2012) a s tím spojené patrnosti v reprodukčním chování ptáků.

Životaschopnost nakladených vajec postupně klesá při vystavení okolním podmínkám prostředí (Beissinger *et al.* 2005; Godard *et al.* 2007; Wang *et al.* 2011) pravděpodobně kvůli dvěma mechanismům: mikrobiální infekci skrz vaječné póry a prodloužené expozici nevhodným okolním teplotám. Cook *et al.* (2003) demonstruje, že vejce kura domácího (*Gallus gallus*) v podmínkách horského mlžného lesa vykazují za zvýšené přítomnosti mikroorganismů snížení líhnivosti. Podobně byl pokles líhnivosti zaznamenán u vajec drozdce karibského (*Margarops fuscatus*) ve stejných podmínkách prostředí (Cook *et al.* 2005b). Mimoto, pokud se teplota okolního prostředí pohybuje nad hodnotou fyziologické nuly, ale nedosahuje inkubačních teplot, může docházet k abnormálnímu vývoji a dokonce úmrtí embrya (Webb 1987). Na druhou stranu Fassenko (2007) hypotetizuje, že částečně vyvinutá stádia embrya jsou více resistantní k dlouhodobé expozici okolním podmínkám. Tato omezení okolního prostředí mohla vést k evoluci odlišných typů inkubace u různých druhů ptáků.

#### **1.4.1. Začátek plné inkubace a částečná inkubace**

Patrnosti začátku plné inkubace, kdy je udržována konstantní teplota do začátku líhnutí, spadají do dvou širokých kategorií. V prvním případě je začátek plné inkubace opožděn do snesení posledního vejce a tedy kompletace snůšky a mláďata se tím pádem líhnou synchronně. To znamená, že vylíhnutí prvního a posledního mláďáte proběhne v rozmezí 24 hodin nebo méně (Ricklefs 1993). Obecně je tento typ inkubace snůšky rozšířený především u prekociálních druhů ptáků. K udržení synchronního líhnutí může mimo jiné docházet, pokud okolní teploty během kladení snůšky zůstávají pod fyziologickou nulou a vývoj embrya je tedy započat zhruba ve stejnou dobu u všech vajec (Ricklefs 1993). V druhém případě je plná inkubace započata s nakladením předposledního vejce nebo dříve (Beissinger & Waltman 1991). Tento způsob inkubace je běžný spíše u druhů s altriciálními mláďaty. Časněji nakladená vejce obdrží výhodu ve vývoji a mláďata se líhnou v období delším než 24 hodin a vykazují tedy asynchronní líhnutí (Wiebe & Bortolotti 1994), které

často, ale ne vždy, vede k úmrtí posledního vylíhnutého mláděte (Stoleson & Beissinger 1999; Cook *et al.* 2003). Jak demonstruje Wang & Beissinger (2009) na zástupcích pěvců, nástup začátku plné inkubace se zrychluje s rostoucí velikostí snůšky.

Před začátkem plné inkubace může docházet k částečné inkubaci. Dochází k ní u zhruba 50 % druhů a je charakterizována jako méně pravidelná inkubace spojená s návštěvami hnízda během kladení (Wang & Beissinger 2011). Jak ukázali Loos *et al.* (2004), k částečné inkubaci dochází u zástupců prekociálních druhů, jejichž mláďata se líhnou synchronně. Ovšem i altriciální zástupci pěvců, jejichž mláďata se líhnou asynchronně, mohou také vykazovat jistou míru částečné inkubace v raných fázích kladení (Wang & Beissinger 2009).

S ohledem na výše zmíněná fakta se dá předpokládat, že k částečné inkubaci bude docházet, pokud budou okolní podmínky prostředí degradovat životaschopnost vajec. Obrana proti mikrobiální infekci vajec ve snůšce pak může být adaptivním vysvětlením částečné inkubace (Cook *et al.* 2005b). Toto tvrzení podpořil Ruiz-De-Castañeda *et al.* (2012) když ukázal, že samice lejsků černošedých (*Ficedula hypoleuca*) začínají s částečnou inkubací během dne, aby pravděpodobně zabránily množení mikroorganismů na povrchu vajec v důsledku vyšších teplot, zatímco nižší teploty během noci mohou limitovat metabolickou aktivitu většiny bakterií. U pěti druhů pěvců ve studii Wang & Beissinger (2009) byla částečná inkubace primárně pozorována také během dne. Mimoto, bez ohledu na riziko infekce vajec skrz skořápku může být částečná inkubace nezbytná k redukci růstu a nepříznivého vlivu mikroorganismů přenášených do vnitřních struktur vajec vertikálně (Cook *et al.* 2005b) tzn. při tvorbě vajec ve vejcovodu samice (Gantois *et al.* 2009). Také samice hnízdící v otevřených hnízdech by měly využívat částečnou inkubaci pravděpodobněji než samice hnízdící v dutinách, kde může samotná teplota okolního prostředí aktivovat antimikrobiální mechanismy. Ve studii provedené Godard *et al.* (2007) totiž i relativně krátká expozice slepičích vajec vyšším teplotám (>27°C) v dutinových hnízdech aktivuje antimikrobiální enzymy v bílku, ale nedochází přitom k abnormálnímu vývoji embrya.

#### **1.4.2. Obranný mechanismus inkubace související s infekcí vnitřních struktur vajec mikroorganismy**

Bylo navrženo několik mechanismů vysvětlujících pokles mikrobiální zátěže na povrchu vajec spojených s inkubací (Cook *et al.* 2003, 2005a; Shawkey *et al.* 2009; D'Alba *et*

al. 2010a). Cook *et al.* 2005b ve své studii uvažoval inkubaci jako prostředek redukce kapalné vody na skořápce. Přítomnost kapalné vody na povrchu vajec podporuje růst mikroorganismů a je médiem pro jejich transport do vnitřních struktur vajec. Může také usnadňovat interakce mikroorganismů jako je kompetice, symbióza nebo tvorba biofilmu a zvyšovat dostupnost nových zdrojů živin transportem bakterií po povrchu vaječné skořápky (D'Alba *et al.* 2010a). Jako první experimentálně demonstrovala udržování suchého povrchu vajec jako antimikrobiální mechanismus inkubace ve své studii D'Alba *et al.* (2010a). Přirozeně inkubovaná a neinkubovaná vejce vlaštovky stromové (*Tachycineta bicolor*) byla exponována okolním podmínkám nebo podmínkám se zvýšenou vlhkostí. Obě neinkubované skupiny vajec nesly vyšší mikrobiální zatížení na povrchu vajec než vejce inkubovaná. Podobně Ruiz-De-Castañeda *et al.* (2011) ukázali, že inkubace udržuje povrch vajec suchý a limituje bakteriální růst na skořápce. Shawkey *et al.* (2009) také poukazuje na to, že vejce podrobená inkubaci měla suchý povrch na rozdíl od vajec neinkubovaných. Redukce vlhkosti pak může vést ke změnám v diverzitě bakteriálních společenstev na povrchu vajec a tím k minimalizaci bakteriálních interakcí a riziku infekce vnitřních struktur vajec.

Mezi další obranné mechanismy spojené s inkubací patří potlačování patogenních bakterií na povrchu vajec podporou růstu komenzálních a symbiotických bakterií (Soler *et al.* 2010). Shawkey *et al.* (2009) ale ve své studii podporující vliv inkubace na růst komenzálních bakterií na povrchu vajec neprokázal. Naopak možnou ochrannou funkci bakterií ve společenstvu na povrchu vajec během inkubace proti vnější invazi patogenních bakterií ukázali ve studii Grizard *et al.* (2015).

#### **1.4.3. Interakce teploty a antimikrobiálních proteinů v bílku**

V případě, že bakterie proniknou skrz vaječné póry do vnitřních struktur vajec, může zvýšením teploty vajec pomocí inkubace dojít k nárůstu aktivity antimikrobiálních proteinů v bílku (Board & Tranter 1986). Hypotézu ukazující aktivační vliv teploty na antimikrobiální proteiny podpořili také Alabdeh *et al.* (2011).

Koncentrace obou antimikrobiálních proteinů (lysozymu i OVTR) se mění v čase v závislosti na inkubaci. Cunningham (1974) demonstroval ve své studii na vejcích kura domácího (*Gallus gallus*) pokles enzymatické aktivity jak OVTR, tak lysozymu. Fang *et al.* (2012b) demonstruje mírný pokles a následný nárůst koncentrace lysozymu v raných inkubačních fázích. Možná příčina dynamické změny koncentrace lysozymu v bílku může být

porušení struktury lysozym-ovomucin (Fang *et al.* 2012b). Fang *et al.* (2012a) také ukazuje, že i když koncentrace lysozymu v bílku zůstává nezměněna po dobu pěti dní inkubace, antimikrobiální aktivita klesá během prvních dvou dní inkubace a následně v pozdějších fázích roste. Jako možný důvod této variability se jeví dynamické změny pH bílku inkubovaných vajec a formování dimerů bez lytické aktivity. Navíc, zatímco Cunningham (1974) navrhuje pokles železo-vazebné aktivity OVTR, Fang *et al.* (2012a,b) ukazuje na nárůst koncentrace OVTR u inkubovaných slepičích vajec, který může být způsoben posunem vody mezi vaječnými komponenty během inkubace. Mimoto rozpad vitelinní membrány obsahující OVTR během inkubace může také zapříčinit zvýšení koncentrace OVTR v bílku (Fang *et al.* 2012b). U OVTR je nárůst koncentrace vždy spojen se vzrůstající antimikrobiální aktivitou proteinu (Fang *et al.* 2012a,b). Stejný trend, tedy pokles koncentrace lysozymu a nárůst koncentrace OVTR během inkubace, demonstrovali u skřivánka rudotemenného (*Calandrella cinerea*) s altriciálními mláďaty Grizard *et al.* (2015). Vliv teploty na antimikrobiální proteiny v bílku je shrnut v Tabulce 2.

**Tabulka 2: Vliv inkubační teploty na antimikrobiální proteiny v bílku; koncentrace proteinu s inkubační teplotou klesá (↓), stoupá(↑), nemění se (0), klesá a následně roste (↕)**

Lysozym	Ovotransferrin	Modelový druh	Zdroj
↓	↓	<i>Gallus gallus</i>	Cunningham 1974
0	↑	<i>Gallus gallus</i>	Fang <i>et al.</i> 2012a
↕	↑	<i>Gallus gallus</i>	Fang <i>et al.</i> 2012b
↓	↑	<i>Calandrella cinerea</i>	Grizard <i>et al.</i> 2015

Koncentraci a následnou antimikrobiální aktivitu proteinů může ovlivňovat i teplota okolního prostředí. Horrocks *et al.* 2014 testoval hypotézu, že koncentrace antimikrobiálních proteinů se mění s podmínkami prostředí, které predikují riziko mikrobiální infekce. Na rozdíl od očekávání našel vyšší lysozymální aktivitu ve vejcích skřivanů (*Alaudidae*) z teplejších, sušších lokalit, kde je předpokládáno nižší riziko mikrobiální infekce. Navíc lysozym a OVTR vykazovaly slabý protichůdný efekt ve vztahu k teplotě.

Ve studiích zabývajících se vhodnou skladovací teplotou vajec před inkubací se koncentrace OVTR během sedmi dnů v teplotách 5 °C, 20 °C ani 30 °C výrazně neměnila (Schäfer *et al.* 1999), stejně tak při pokojové teplotě (20 °C) ve studii Liu *et al.* (2013). Navíc koncentrace lysozymu se také při skladovacích teplotách výrazně nemění (Schäfer *et al.* 1999).

## 2. Hypotézy a cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo experimentálně testovat vliv částečné a plné inkubace, koncentrace vybraných antimikrobiálních proteinů v bílku a jejich vzájemné interakce na antimikrobiální potenciál bílku *in vitro* u dvou modelových druhů ptáků, lišících se v koncentraci testovaných antimikrobiálních proteinů v bílku, velikostí a způsoby inkubace snůšky. Konkrétně byly testovány tyto hypotézy:

- Manipulativní zvýšení koncentrace vybraných antimikrobiálních proteinů v bílku se projeví vyšší antimikrobiální aktivitou vůči vybraným bakteriálním kmenům, avšak rozdílně u obou modelových druhů v závislosti na typu manipulovaného proteinu.
  - U holuba, jehož dominantním antimikrobiálním proteinem obsaženým v bílku je ovotransferin, lze očekávat intenzivnější antimikrobiální působení bílků obohacených ovotranferinem, zatímco u křepelky budou vyšší antimikrobiální aktivitu vykazovat vejce obohacená o lysozym.
- Efekt plné a částečné inkubace na zvyšování antimikrobiálního potenciálu bílku se bude u obou modelových druhů lišit.
  - V kontextu předpokladu antimikrobiálního efektu částečné inkubace především u prekociálních druhů s velkými snůškami, bude mít částečná inkubace silnější vliv na zvyšování antimikrobiálního potenciálu bílku u křepelčích vajec v porovnání s vejci holubími
  - Efekt plné inkubace na zvyšování antimikrobiálního potenciálu bílku bude větší u holuba, který plně inkubuje většinou již prvně snesené vejce
- Plná i částečná inkubace bude ovlivňovat koncentraci vybraných proteinů v bílku obou druhů.
  - U ovotransferinu lze, na základě vlivu teploty na chemicko-fyzikální změny v bílku, předpokládat nárůst koncentrace spolu s intenzitou inkubace, zatímco koncentrace lysozymu bude s intenzitou inkubace klesat. Výraznější efekty na změny koncentrace obou proteinů vlivem inkubačních teplot lze očekávat u bílků s manipulovanou koncentrací lysozymu a ovotransferinu

## 3. Metodika

### 3.1. Modelové druhy

Pro výzkum teplotní závislosti antimikrobiální aktivity bílkových proteinů byli vybráni dva běžně chovaní zástupci altriciálních i prekociálních druhů ptáků – holub domácí (*Columba livia*) a křepelka japonská (*Coturnix japonica*), které se liší svými reprodukčními strategiemi a koncentrací antimikrobiálních komponent bílku. Pro křepelku jsou charakteristické větší snůšky (8-10 vajec), částečná inkubace v době kladení a začátek plné inkubace až po kompletaci snůšky (Mills *et al.* 1997). Naproti tomu holub klade pouze 2 vajíčka a zasedá většinou po snesení prvního vejce (Levi, Wendell 1977). Doba inkubace vybraných modelových druhů se výrazně neliší (křepelka – 16 dní, holub – 18 dní v závislosti na počasí). Odlišné je ale složení a poměr žloutku a bílku ve vejcích, které úzce souvisí s embryonálním a postembryonálním vývojem (Ricklefs 1977b). Tyto rozdíly v reprodukčních strategiích obou druhů mohou souviset, mimo jiné, s odlišnými obrannými mechanismy, které limitují riziko infekce vaječného obsahu mikroorganismy (Grenier & Beissinger 1999; Cook *et al.* 2003, 2005b).

### 3.2. Původ, způsob kompletace a přípravy experimentálních vajec

Křepelčí vejce byla poskytnuta panem Oldřichem Machem z Výzkumného ústavu živočišné výroby v Praze – Uhřetěvesi. Holubí vejce byla získána od chovatelů plemene poštovní holub pana Petra Smrčka a pana Stanislava Česneka (kraj Vysočina, okres Třebíč). Od jednotlivých chovatelů byla odebírána maximálně 3 dny stará fertilní vejce, která byla náhodně rovnoměrně rozdělena do dvanácti skupin podle způsobů následné manipulace (viz Obr. 4). Poté byla pomocí posuvného měřítka změřena délka a šířka označených vajec. Primární mikrocenózy byla vejce zbavena otřením 70% etanolem. Následně byla vejce skladována ve stabilních podmínkách (21 °C, 50-60% vlhkost) ve sterilních plastických boxech do doby dalšího zpracování v rámci provedení experimentů (max. 1-2 dny). Pro stanovení koncentrace cílových proteinů v bílku bylo v pre-experimentu analyzováno osmnáct vajec každého druhu, v případě holubích vajec paralelně od obou chovatelů. Dále bylo provedeno 6 setů manipulativního experimentu, přičemž v každém setu bylo manipulováno s šedesáti křepelčími vejci a třiceti holubími vejci. Nerovnoměrný počet

holubích a křepelčích vajec v experimentu byl způsoben problematickým získáváním většího počtu vajec od chovatelů holubů.

### **3.3. Metodika stanovení koncentrace cílových antimikrobiálních proteinů v bílku**

Před manipulací s jednotlivými cílovými proteiny, byla nejprve stanovena jejich koncentrace v bílku modelových druhů v pre-experimentu.

#### **3.3.1. Stanovení koncentrace ovotransferinu (OVTR)**

Koncentrace OVTR, proteinu schopného s vysokou afinitou vázat železo, byla stanovena pomocí měření maximálního množství železa nezbytného k nasycení veškerého OVTR přítomného ve vzorku. Yamanishi *et al.* (2002) ukázali, že toto stanovení velmi dobře koreluje s koncentrací OVTR. V principu se jedná o tři reakce, během nichž jsou sledovány změny absorbance. Tato metodika je detailně popsána ve studii Horrocks *et al.* (2011).

Analyzované vzorky bílku byly zvortexovány a poté nanášeny v množství 25  $\mu$ l do jamek mikrotitrační destičky (p-LAB, destičky s jamkami s plochým dnem, 781602) ve čtyřech opakováních vedle sebe. Do dvou posledních řádků byly umístěny standardní roztoky OVTR (C0755, Sigma-Aldrich v rozmezí koncentrací: 30 mg/ml - 0,1 mg/ml; zásobní roztok OVTR  $c = 40$  mg/ml ředěn roztokem 1 (50 ml ddH<sub>2</sub>O, 7,3 g Tris, 6,4 g uhličitan sodný, 0,84 g Triton-X)) pro vytvoření kalibrační křivky. Přidáním prvního roztoku (150 ml ddH<sub>2</sub>O, 7,3 g Tris, 6,4 g uhličitan sodný, 0,84 g Triton-X, 600  $\mu$ l Iron standard solution) ke vzorkům došlo k saturaci OVTR železitými ionty. Pro zjištění hodnoty pozadí byla ihned změřena absorbance při vlnových délkách 570 nm a 660 nm na spektrofotometru (Tecan). Následovala inkubace při 37 °C po dobu 5 minut. Poté byly nenavázané přebytky železa redukovány přidáním roztoku obsahující kyselinu askorbovou (100 ml ddH<sub>2</sub>O, 0,49 g FerroZine<sup>™</sup>, 0,6 g Tris, 0,574 g kyselina L-askorbová) na železnaté ionty. Následně při inkubaci vzorků s chromogenem FerroZine<sup>™</sup> (5 minut, 37 °C) došlo k jejich vazbě s chromogenem za vzniku barevných komplexů. Nakonec byly železité ionty navázané na OVTR disociovány přidáním roztoku obsahující kyselinu citronovou (200 ml ddH<sub>2</sub>O, 25,2 g kyselina citronová, 0,38 g Thiomočovina), což vedlo k tvorbě dalších barevných komplexů železnatých iontů s FerroZinem. S tím spojený nárůst absorbance reakční směsi byl monitorován v čase. První měření absorbance při vlnových délkách 570 nm a 660 nm bylo provedeno ihned po přidání roztoku s kyselinou citronovou. Po 6 minutách inkubace při 37°C bylo měření při obou vlnových délkách zopakováno.

Výsledné množství železa schopného nasytit veškerý OVTR ve vzorcích byl určen rozdílem naměřených hodnot při obou vlnových délkách na začátku a na konci šesti minutové periody po odečtení hodnoty pozadí.

### 3.3.2. Stanovení koncentrace lysozymu

Koncentrace lysozymu ve vzorcích bílku byla měřena metodou radiální difuze (viz Osserman & Lawlor 1966). Nejprve bylo v 1% agaru (200 ml Britton-Robinsonova pufru, 2 g agaru) rozpuštěno konkrétní množství (100 mg) lyofilizovaných buněk *Micrococcus luteus* syn. *lysodeikticus*). Tato gram pozitivní bakterie je vysoce citlivá na aktivitu lysozymu (Salton 1957). Poté byly v zatuhlém agaru na Petriho miskách vysekány malým korkvrtem jamky, do kterých bylo nanášeno v duplikátech 10 µl daných vzorků bílku a standardy. Vzorky bílku byly ředěny v poměru 1:1 Britton-Robinsonovým pufrům. Jako standard byl použit purifikovaný, lyofilizovaný lysozym ze slepičích bílků (62971, Fluka) v koncentracích 20, 15, 7, 4, 2 a 0,5 mg/ml v Britton-Robinsonově pufru. Následně byly misky inkubovány 23 hodin při stabilní teplotě (21 °C, 50-60% vlhkost). Vytvořené zóny lýze buněk okolo jamek byly vyfotografovány digitálním fotoaparátem na stativu (Canon EOS450D s makroobjektivem 50mm F2,8) a jejich plochy stanoveny pomocí programu pro analýzu obrazu ImageJ (freeware). Výsledná koncentrace lysozymu (mg/ml) byla určena interpolací hodnot z kalibrační křivky vytvořené v programu GraphPad Prism 6.

### 3.4. Mikrobiologické pre-experimenty

Před samotným manipulativním experimentem byla zjišťována citlivost vybraných gram-positivních (G+) a gram-negativních (G-) bakterií k antimikrobiálnímu působení vaječného bílku. Bakterie byly vybrány na základě studií sledujících diverzitu bakterií pronikajících do vnitřních struktur vajec (Tabulka 3).

**Tabulka 3: Vybrané bakterie pronikající do vnitřních struktur vajec; gram-negativní (G-) a gram-positivní (G+)**

rod		studie
<i>Bacillus</i>	G +	Wang <i>et al.</i> 2011; Cook <i>et al.</i> 2003, Bruce & Johnson 1978, Pinowski <i>et al.</i> 1994
<i>Pseudomonas</i>	G –	Cook <i>et al.</i> 2003,2005b, Bruce & Johnson 1978
<i>Micrococcus</i>	G +	Wang <i>et al.</i> 2011, Bruce & Johnson 1978
<i>Proteus</i>	G –	Cook <i>et al.</i> 2003
<i>Enterococcus</i>	G +	Bruce & Johnson 1978, Pinowski <i>et al.</i> 1994, Javůrková <i>et al.</i> 2014
<i>Escherichia</i>	G –	Pinowski <i>et al.</i> 1994, Cook <i>et al.</i> 2003

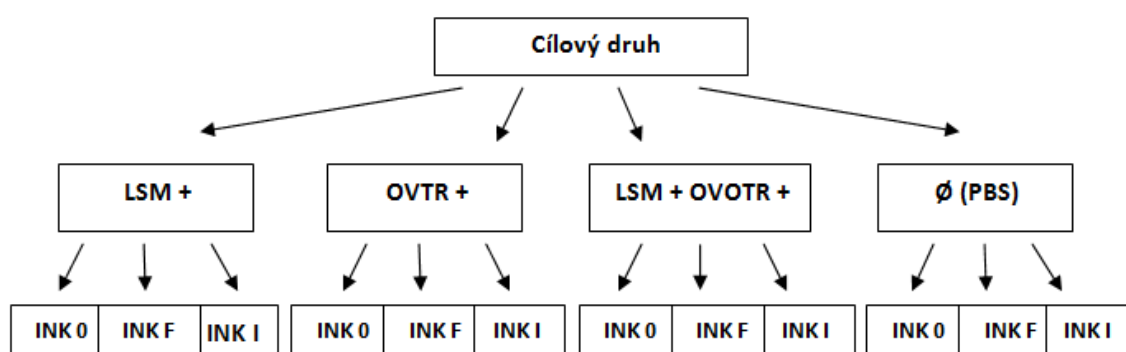
Lyofilizované bakteriální kmeny (*Pseudomonas aeruginosa* 5537, *Enterococcus faecalis* 5766) byly obdrženy z České národní sbírky typových kultur CNCTC. Ostatní kmeny (*Bacillus subtilis* 168, *Micrococcus luteus* syn. *lysodeikticus* CCM169, *Escherichia coli* K-12, *Proteus mirabilis* CCM7188) byly získány ze sbírek Katedry genetiky a mikrobiologie PŘF UK. Nejprve muselo být asepticky provedeno oživení lyofilizovaných bakteriálních kultur. Sušina lyofilizovaných bakterií byla rozpuštěna v 300  $\mu$ l živného média (Nutrient broth (Difco) – *P. aeruginosa.*, *P. mirabilis*; Brain heart infusion – *E. faecalis*). Poté bylo 50  $\mu$ l vzniklé suspence zaočkováno na plotny a do odpovídajícího tekutého média. Vše bylo inkubováno při teplotě 37 °C v termostatu a na třepačce přes noc. Druhý den bylo provedeno přeočkování 1 kolonie z plotny znovu na plotnu a přeočkování do tekutého média. Následovala další inkubace přes noc v 37 °C. Třetí den byly z bakterií na plotnách vytvořeny konzervy na šikmých agarech, které byly uloženy při teplotě 5 °C a později využity při testování citlivosti na vaječný bílek.

Pro testování citlivosti bakterií k bílku byla zvolena běžně využívaná metoda difúze v agaru (viz níže). Kultury vybraných bakterií byly jednotlivě zaočkovány z konzerv na šikmém agaru do LB (Luria-Bertani) média a 17 hodin inkubovány v třepačce (180 rpm) při teplotě 37°C. Toto noční inokulum bylo druhý den zředěno na cca OD = 5,0. Příprava misek ve třech opakováních byla pak shodná s postupem popsáním níže (3.5.1. Stanovení antimikrobiálního potenciálu bílku), pouze u *E. faecalis* byl do misek naléván Brain heart agar (2%). Do jamek na miskách byly v množství 20  $\mu$ l nanášeny vzorky bílku, jako negativní kontrola PBS (phosphate buffered saline) a jako pozitivní kontroly lysozym (62971, Fluka; 10 mg/ml v PBS) a OVTR (C0755, Sigma-Aldrich; 40 mg/ml v PBS). Pro zvýšení antimikrobiální aktivity OVTR vůči *E. coli*, demonstrovanou v několika studiích (Valenti *et al.* 1981; Ko *et al.* 2008; Wellman-Labadie *et al.* 2008a), byl do dvou ploten experimentálně přidán hydrogenuhličitan sodný ( $\text{NaHCO}_3$ ), který podporuje navázání železa na OVTR (Valenti *et al.* 1981). Všechny misky byly poté ponechány 24 hodin v termostatu při 37 °C. Po skončení inkubace byly misky vyfotografovány digitálním fotoaparátem a vyhodnoceny. Na základě vyhodnocení byly pro zjišťování antimikrobiálního potenciálu bílku manipulovaných vajec vybrány dvě G+ bakterie *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*, které vykazovaly nejvyšší citlivost vůči bílkům obou modelových druhů (viz Přílohy: Výsledky mikrobiologického pre-experimentu).

### 3.5. Manipulativní experiment

#### 3.5.1. Experimentální design

Křepelčí (n = 60) a holubí (n = 30) vejce byla paralelně manipulována zvyšováním koncentrace vybraných proteinů (LSM a OVTR) a různými způsoby inkubace v jednotlivých experimentálních setech. Schéma setu, podle kterého byla vejce rozdělena, je ukázáno na Obrázku 4. Celkem bylo provedeno 6 setů experimentu.



**Obr. 4:** Popis experimentálního designu; zvyšování koncentrace lysozymu (LSM+), ovotransferrinu (OVTR+), lysozymu i ovotransferrinu (LSM+OVTR+), bez zvyšování koncentrace proteinů (∅ (PBS)); bez inkubace (INK 0), plná inkubace (INK F), částečná inkubace (INK I)

#### 3.5.2. Příprava roztoků k manipulacím

Manipulované množství OVTR a lysozymu vycházelo z výsledků pre-experimentu (3.2.1. Stanovení koncentrace ovotransferinu, 3.2.2. Stanovení koncentrace lysozymu), v němž byla zjišťována průměrná koncentrace těchto proteinů ve vejcích modelových druhů (n=18) (viz Tabulka 4). Toto množství odpovídá 20 % z průměru zjištěné koncentrace ve vejci daného druhu a do vejce bylo vpravováno v 50 µl sterilního PBS (phosphate buffered saline).

**Tabulka 4:** Výsledky pre-experimentu - stanovení koncentrace antimikrobiálních proteinů v bílku

	Křepelka		Holub	
	LSM	OVTR	LSM	OVTR
Průměrná koncentrace v 1 ml bílku (mg)	6,4	0,88	2,65	3,28
Průměrná koncentrace ve vejci (mg)	81,92	11,3	47,7	59,04
<b>Manipulované množství 20% z průměru (mg)</b>	16,38	2,26	9,54	11,808

### **3.5.3. Aplikace roztoků proteinů a sterilního PBS do experimentálních vajec**

Aplikace proteinů do připravených vajec otřených 70% etanolem a změřených posuvným měřítkem byla prováděna ve sterilních podmínkách (flowbox). Po náhodném rozdělení vajec do daných experimentálních skupin (viz Obr. 4), byla jednotlivá vejce nejprve v místě vpichu otřena 70% ethanolem a poté perforována injekční jehlou (Medoject 0,7x40 mm). Následně bylo do každého vejce z příslušné skupiny vpraveno pomocí inzulinové stříkačky s jehlou 50  $\mu$ l roztoku lysozymu (LSM+), ovotransferinu (OVTR+), lysozymu a ovotransferinu (LSM+OVTR+) nebo sterilního PBS ( $\emptyset$  (PBS)). Místo vpichu bylo zákápnuto malým množstvím gelového sekundového lepidla (Herlitz Superglue). Aby bylo zabráněno kontaminaci obsahu vejce, byla pro vnesení roztoku použita vždy nová sterilní jehla i inzulinová stříkačka. Tento postup byl použit např. ve studii Andersson & Åhlund (2001) či Javůrková *et al.* (2015).

### **3.5.4. Inkubace vajec v různých teplotách**

Manipulovaná vejce byla poté podle schématu podrobena třem typům inkubace. Vejce vystavena plné inkubaci (INK F) byla inkubována 4 dny (celkem 96 hodin) v inkubátoru (Brinsea Ova Easy 190) při teplotě 37,8 °C a relativní vlhkosti 60 %. Vejce podléhající částečné inkubaci (INK I) strávila v inkubátoru 4 x 4 hodiny denně (celkem 16 hodin) při teplotě 37,8 °C a relativní vlhkosti 60 % a 80 hodin ve vinotéce (Fagor Vintage) při teplotě 10°C. Poslední skupinu tvořila vejce, která byla ponechána 4 dny (celkem 96 hodin) bez inkubace (INK 0) ve vinotéce při stabilní teplotě 10°C, což je přibližný denní průměr teplot v době hnízdění modelových druhů v přirozených podmínkách.

### **3.5.5. Příprava vzorků bílku k post-experimentálním analýzám**

Po uplynutí doby, kdy byla vejce vystavena různým způsobům inkubace, byla všechna vejce ve sterilních podmínkách pomocí skalpelu otevřena. Následně byl asepticky co nej přesněji oddělen bílek od žloutku a pokud to bylo patrné, stanovena fertilita vejce dle přítomnosti či nepřítomnosti embrya ve žloutkovém vaku. U křepelky bylo možné takto post-experimentálně stanovovat fertilitu pouze pro plně inkubovaná vejce. Pro vejce inkubovaná částečně byla fertilita zaznamenána pouze ve dvou případech. U holuba bylo možno fertilitu stanovovat u vajec inkubovaných plně, ale i částečně a pouze u osmi vajec neinkubovaných, což bylo zřejmě způsobeno částečnou nasezeností vajec již před jejich dodáním. Bílky byly

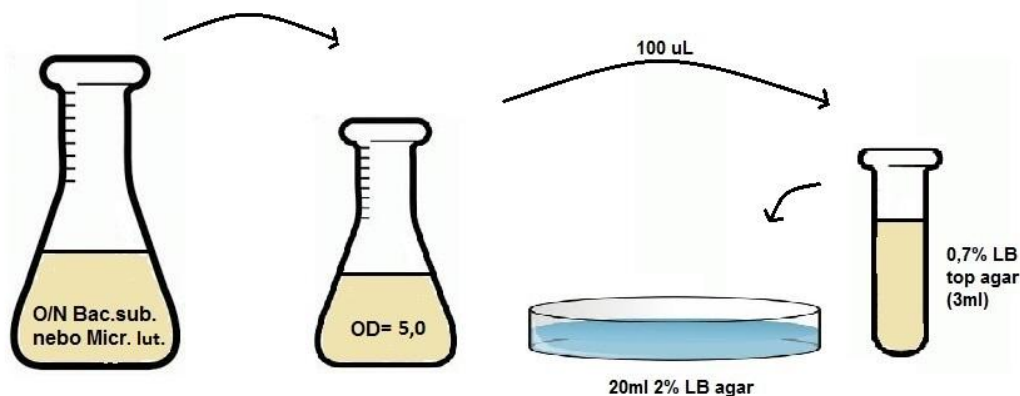
bezprostředně po jejich oddělení od žloutku podrobeny post-experimentálnímu stanovení antimikrobiální aktivity (viz 3.6.1. Stanovení antimikrobiálního potenciálu bílku) a koncentrace lysozymu a pomocí pH metru se sondou (Votcraft, PH-100 ATC) byla stanovena jejich hodnota pH. Po stanovení antimikrobiální aktivity byly veškeré experimentální bílky zamrazeny v -20 °C. Tyto zmražené bílky pak byly použity k post-experimentálnímu stanovení koncentrace OVTR.

### 3.6. Post-experimentální analýzy

#### 3.6.1. Stanovení antimikrobiálního potenciálu bílku

Antimikrobiální potenciál bílku byl testován metodou difúze v agaru (agar diffusion well), která se běžně využívá ke zjišťování antimikrobiálních účinků přírodních látek, především antibiotik (viz např. Voidarou *et al.* 2011, Bonev *et al.* 2008, Moon *et al.* 2012). Metoda je založena na schopnosti testovaných látek potlačovat bakteriální růst nebo bakterie přímo zabít, což vede k vytvoření průhledných zón bez bakteriálního nárůstu v okolí zdroje látky. Aktivita bílku byla testována vůči dvěma, v pre-experimentu vybraným, bakteriálním kmenům - *Micrococcus luteus* (CCM 169) a *Bacillus subtilis* (168). Tyto bakterie byly detekovány jak na povrchu tak ve vnitřních strukturách vejce (Bruce & Johnson 1978, Cook *et al.* 2003, Wang *et al.* 2011). Mimoto *Micrococcus* spp. může být spojen přímo s úmrtím embrya (Deeming 2002, Cook *et al.* 2003).

Kultury *B. subtilis* a *M. luteus* byly jednotlivě zaočkovány do LB (Luria-Bertani) média a 17 hodin inkubovány v třepačce (180 rpm) při teplotě 37 °C. Toto noční inokulum bylo druhý den zředěno na OD = 5,0. 100 µl této bakteriální suspence bylo následně přidáno do 3 ml sterilního top agaru (0,7% LB agar), kterým byly přelity připravené standardní Petriho misky (20 ml Luria-Bertani 2% agar) (Obrázek 5).



Obr.5: Postup přípravy standardních misek

Po zatuhnutí ploten v nich byly malým korkovrtem o průměru 5 mm sterilně vysekány jamky. Do jamek bylo asepticky nanášeno v duplikátech 20 µl vzorků bílku. Jako negativní kontrola bylo do jamek každé misky pipetováno 20 µl sterilního PBS a jako pozitivní kontrola sloužil lysozym ze slepičích bílků (62971, Fluka) v koncentraci 10 mg/ml v PBS. Misky byly poté inkubovány 24 hodin v termostatu při 37°C. Po skončení inkubace byly misky vyfotografovány digitálním fotoaparátem a plochy zón bez bakteriálního nárůstu v okolí příslušné jamky, odpovídající antimikrobiální aktivitě bílku, byly stanoveny v programu ImageJ.

### **3.6.2. Post-experimentální stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích bílku**

Pro stanovení koncentrace ovotransferinu ve vzorcích bílku manipulovaných vajec byla použita stejná metoda jako v pre-experimentu (viz 3.2.1. Stanovení koncentrace ovotransferinu). Analýza byla provedena na 90 vejcích každého modelového druhu vybraných náhodně ze skupin OVTR+ a Ø (PBS) podléhajících plné inkubaci (n=15), částečné inkubaci (n=15) a vajec ponechaných bez inkubace (n=15).

Stanovení koncentrace lysozymu proběhlo paralelně se zjišťováním antimikrobiálního potenciálu vzorků bílku tak, že na standardně připravené plotny byla v každém setu nanášena rovněž řada standardů lysozymu (62971, Fluka) o šesti koncentracích 20, 15, 7, 4, 2 a 0,5 mg/ml v PBS. Koncentrace lysozymu (mg/ml) byla stanovena interpolací hodnot z kalibrační křivky vytvořené v programu GraphPad Prism 6.

## **3.7. Statistické zpracování dat**

### **3.7.1. Analýzy antimikrobiálního potenciálu bílku**

Pro jednotlivé analýzy antimikrobiálního potenciálu bílku holubích a křepelčích vajec bylo využito zobecněných lineárních modelů. Pro každý druh (křepelka, holub) existovaly 2 samostatné modely.

V prvním modelu byla zahrnuta průměrná antimikrobiální aktivita bílku vůči *B. subtilis* jako závislá proměnná a typ inkubace (nulová, částečná, plná), manipulace lysozymem (manipulováno, nemanipulováno), manipulace ovotransferinem (manipulováno, nemanipulováno) jako kategorické vysvětlující proměnné a pH bílku a objem vejce jako spojité vysvětlující proměnné. Do modelu byly rovněž zahrnuty dvojnásobné interakce těchto

vysvětlujících proměnných a trojná interakce typu inkubace, manipulace lysozymem a manipulace ovotransferinem.

V druhém modelu byla zahrnuta průměrná antimikrobiální aktivita bílku vůči *M. luteus* jako závislá proměnná a typ inkubace (nulová, částečná, plná), manipulace lysozymem (manipulováno, nemanipulováno), manipulace ovotransferinem (manipulováno, nemanipulováno) jako kategorické vysvětlující proměnné a pH bílku a objem vejce jako spojitě vysvětlující proměnné. Do modelu byly rovněž zahrnuty dvojně interakce těchto vysvětlujících proměnných a trojná interakce typu inkubace, manipulace lysozymem a manipulace ovotransferinem.

Před zařazením do modelů byly hodnoty průměrné antimikrobiální aktivity bílku vůči *B. subtilis* transformovány pomocí dekadického logaritmu a hodnoty průměrné antimikrobiální aktivity bílku vůči *M. luteus* transformovány pomocí Box-Cox transformace pro dosažení normality dat. Hodnoty pH bílku a objemu vejce byly před zařazením do modelů škálovány a centrovány.

Minimálního adekvátního modelu bylo dosaženo postupnou zpětnou eliminací nesignifikantních proměnných, jejich dvojných interakcí a trojné interakce ze základního modelu. Hodnoty  $p$  postupně eliminovaných nesignifikantních proměnných je možné najít v Přílohách (Tabulka P1, P2, P3, P4)

### **3.7.2. Post-experimentální analýzy koncentrace bílkových proteinů**

Pro analýzy post-experimentálního stanovení koncentrací lysozymu a OVTR v bílku obou druhů bylo rovněž použito zobecněných lineárních modelů.

Pro každý druh byly vytvořeny dva samostatné modely zvlášť pro každý protein, kde byly v jednotlivých modelech průměrná post-experimentální koncentrace lysozymu a průměrná post-experimentální koncentrace ovotransferinu závislé proměnné a typ inkubace (nulová, částečná, plná) a manipulace (manipulováno vs. nemanipulováno) a jejich dvojně interakce jako kategorické vysvětlující proměnné.

Je nutno podotknout, že pro holuba nebyla k dispozici data udávající post-experimentální koncentrace lysozymu v nemanipulovaných kontrolních vejcích z důvodů nízkých hodnot koncentrace v těchto vzorcích bílku, které byly pod hranicí detekce námi vytvořené kalibrační křivky. V modelu pro holuba byl proto jako jediná vysvětlující proměnná zařazen pouze typ inkubace.

Pro dosažení normality dat byly před zařazením do modelu hodnoty průměrné post experimentální koncentrace lysozymu zlogaritmovány přirozeným a průměrné post experimentální koncentrace ovotransferinu dekadickým logaritmem.

Veškeré analýzy byly dělány pomocí programu R 3.2.1 (R Development Core Team 2015).

## 4. Výsledky

### 4.1. Testování antimikrobiální aktivity bílků experimentálních vajec vůči *B.subtilis* a *M.luteus*

#### 4.1.1. Testování antimikrobiální aktivity KŘEPELČÍCH bílků vůči *B. subtilis* a *M. luteus*

Analýzy antimikrobiálního působení bílků křepelčích vajec vůči dvěma G+ bakteriím *B. subtilis* a *M. luteus* prokázaly u obou bakteriálních kmenů významný efekt typu inkubace a manipulace lysozymem na antimikrobiální potenciál bílku (Tabulky 5 a 6). U *M. luteus* byl prokázán také signifikantní efekt objemu vejce na antimikrobiální aktivitu křepelčích bílků (Tabulka 6). Faktory pH bílku a manipulace ovotransferinem neměly na antimikrobiální aktivitu křepelčích vajec vůči oběma bakteriálním kmenům vliv. Podobně nesignifikantní byly i interakce mezi všemi sledovanými proměnnými kromě marginálně nesignifikantní interakce objemu vejce a manipulace lysozymem na antimikrobiální aktivitu vůči *M. luteus* (viz Přílohy, Tabulka P1, P2).

Tabulka 5: Summary tabulka koeficientů pro minimální adekvátní model testující antimikrobiální aktivitu křepelčích bílků vůči *B. subtilis*; ( $\alpha = 0.05$ )

	Estimate	Std.error	t value	p	
intercept	0,013329	0,010559	1,262	0,2078	
nulová INK	0,016587	0,012344	1,344	0,18	
částečná INK	-0,021031	0,012299	-1,710	0,0883	.
manipulace LSM	0,054161	0,009646	5,615	>0,0001	***

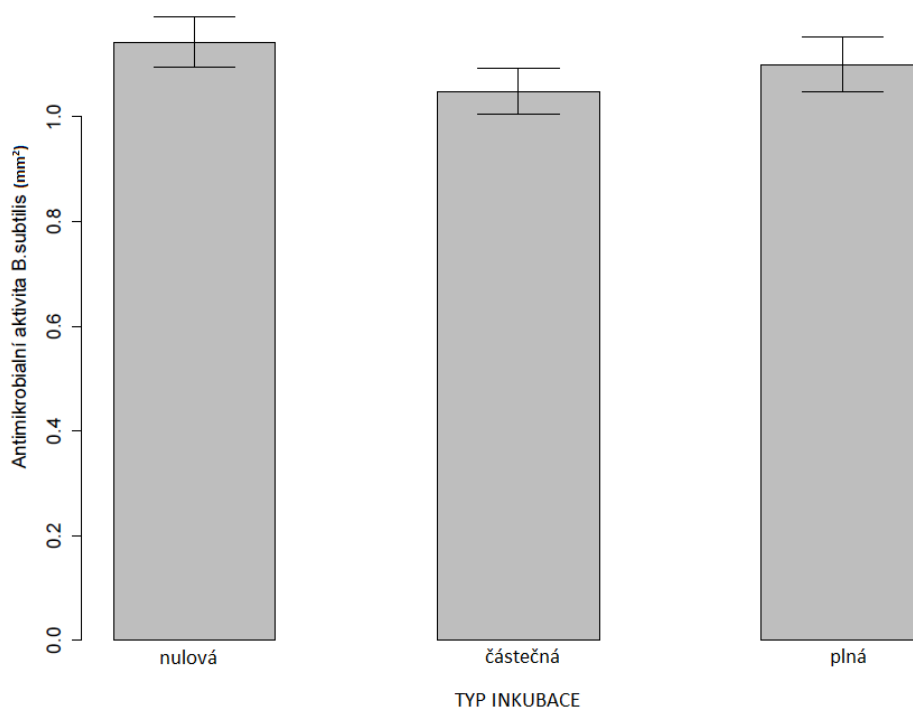
F-statistic(3,313): 14,35; R-squared: 0,1209;  $p < 0.0001$

Tabulka 6: Summary tabulka koeficientů pro minimální adekvátní model testující antimikrobiální aktivitu křepelčích bílků vůči *M. luteus*; ( $\alpha = 0.05$ )

	Estimate	Std.error	t value	p	
intercept	-0,262864	0,004046	-64,974	>0,0001	***
objem vejce	0,003870	0,001859	2,082	0,0382	*
nulová INK	0,028083	0,004735	5,931	>0,0001	***
částečná INK	0,023564	0,004732	4,98	>0,0001	***
manipulace LSM	0,062464	0,003719	16,794	>0,0001	***

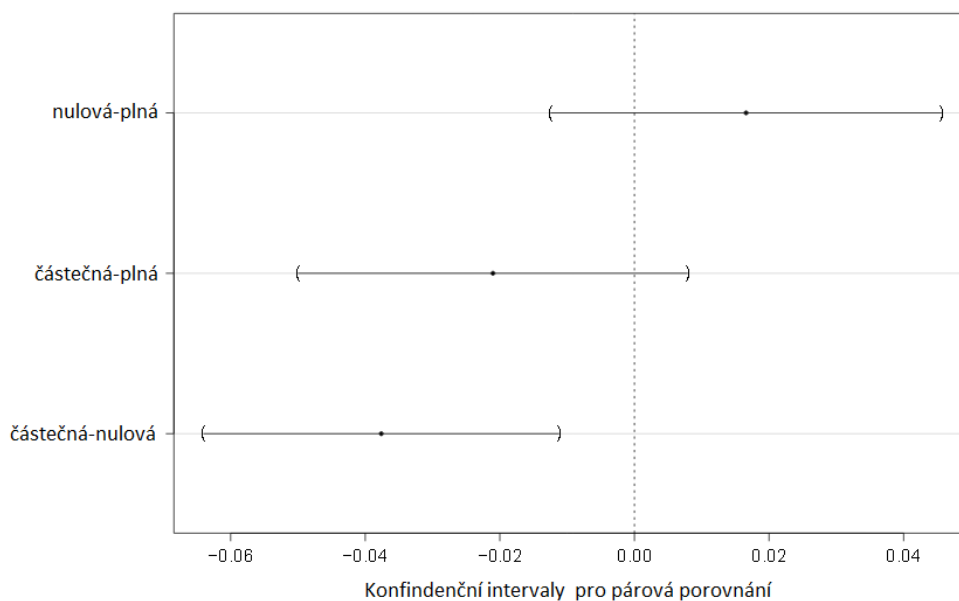
F-statistic(4,309): 84,7; R-squared: 0,523,  $p < 0.0001$

Antimikrobiální aktivita křepelčích bílků vůči *B. subtilis* byla nejvyšší u neinkubovaných vajec a nejnižší u částečně inkubovaných vajec (Obrázek 6).



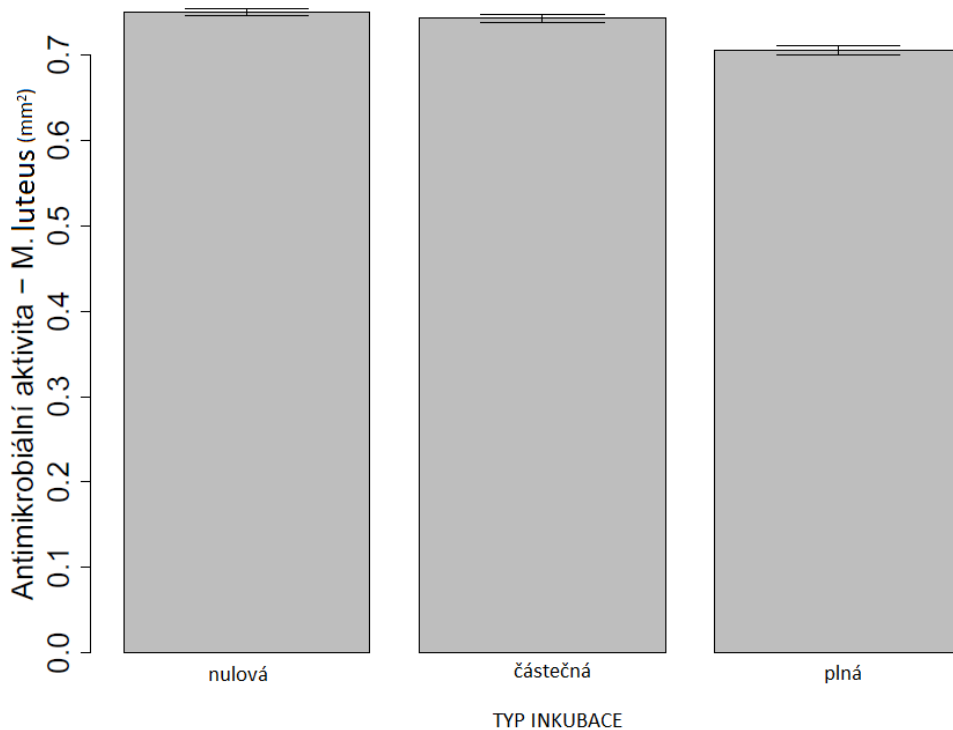
**Obr. 6:** Vliv typů inkubace na antimikrobiální aktivitu křepelčích bílků vůči *B.subtilis*; chybové úsečky vyjadřují průměr a 95% konfidenční intervaly

Neinkubovaná vejce vykazovala prokazatelně vyšší antimikrobiální působení oproti vejcům částečně inkubovaným. Rozdíly mezi plně inkubovanými a neinkubovanými a plně a částečně inkubovanými vejci nebyly průkazné (Obrázek 7).

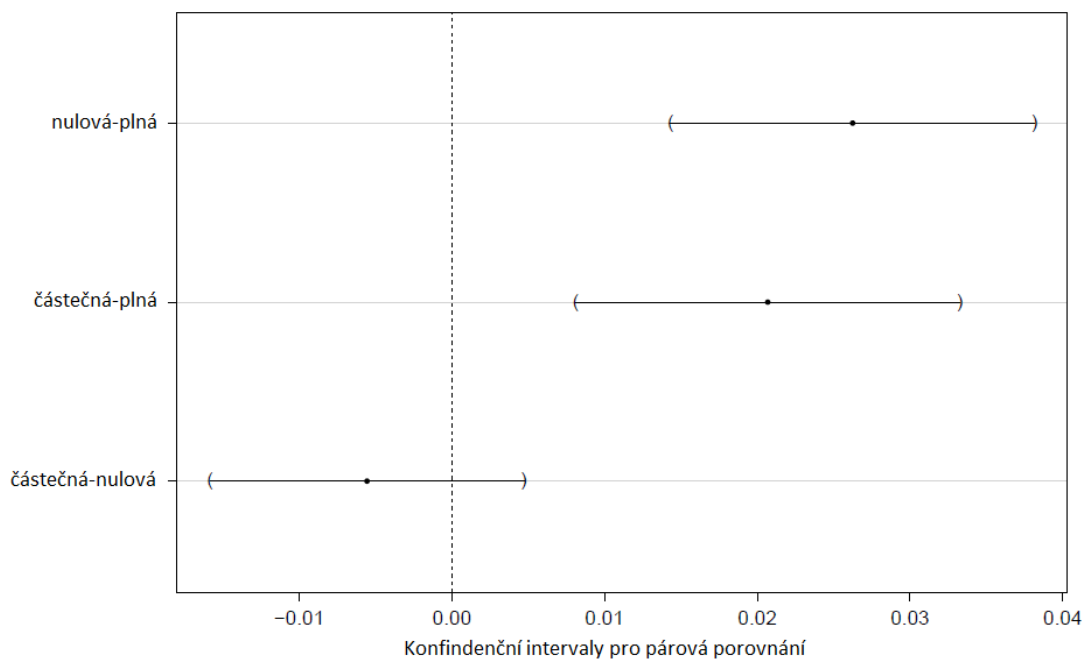


**Obr. 7:** Post-hoc Tukey test vlivu typů inkubace na antimikrobiální aktivitu křepelčích bílků vůči *B.subtilis*

Pro *M. luteus* byl patrný jiný trend v efektu inkubace, kdy prokazatelně vyšší antimikrobiální aktivitu vykazovala kromě vajec neinkubovaných také vejce inkubovaná částečně v porovnání s vejci plně inkubovanými (Obrázek 8 a 9).

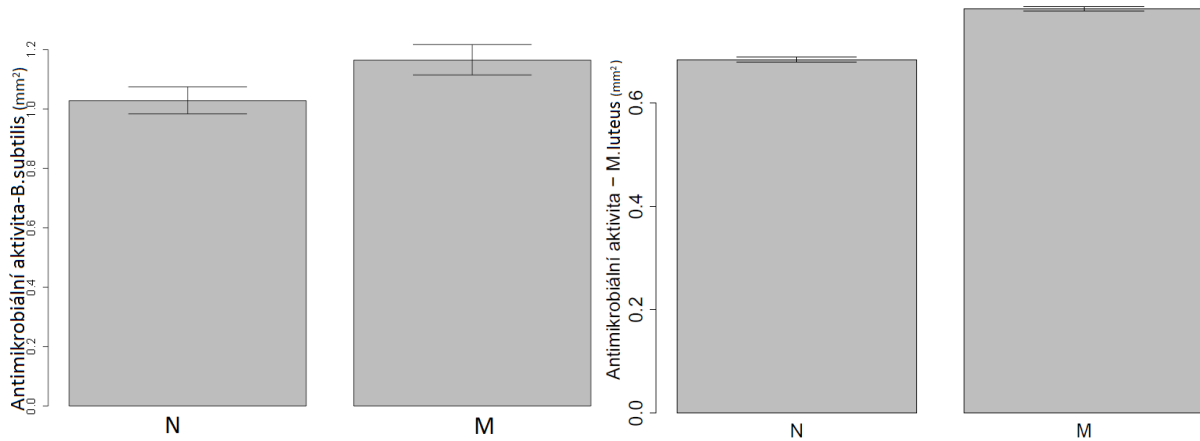


Obr. 8: Vliv typů inkubace na antimikrobiální aktivitu křepelčích bílků vůči *M. luteus*; chybové úsečky vyjadřují průměr a 95% konfidenční intervaly



Obr. 9 : Post-hoc Tukey test vlivu typů inkubace na antimikrobiální aktivitu křepelčích bílků vůči *M. luteus*

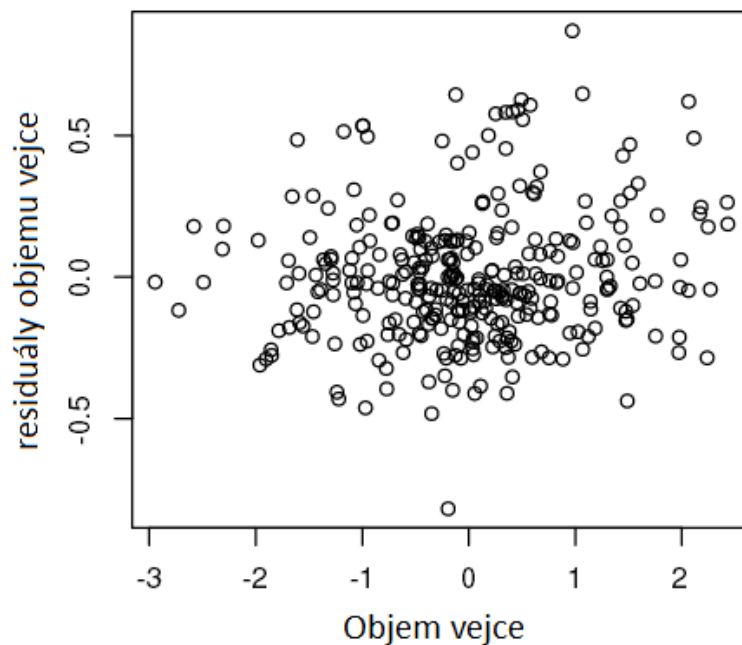
U typu manipulace byl prokázán signifikantní efekt manipulace lysozymem na antimikrobiální aktivitu jak vůči *B.subtilis*, tak vůči *M.luteus*. Vejce s experimentálně zvýšenou koncentrací lysozymu vykazovala vyšší antimikrobiální aktivitu vůči oběma bakteriálním kmenům v porovnání s vejci kontrolními nemanipulovanými (Obrázek 10 a 11).



Obr.10: Vliv manipulace lysozymem na antimikrobiální aktivitu křepelčích bílků vůči *B.subtilis*; chybové úsečky vyjadřují průměr a 95% konfidenční intervaly; manipulovaná (M) a nemanipulovaná (N) vejce

Obr.11: Vliv manipulace lysozymem na antimikrobiální aktivitu křepelčích bílků vůči *M.luteus*; chybové úsečky vyjadřují průměr a 95% konfidenční intervaly; manipulovaná (M) a nemanipulovaná (N) vejce

Byl prokázán rovněž pozitivní vliv objemu vejce na zvyšování antimikrobiální aktivity bílku vůči *M.luteus* (Obrázek 12).



Obr. 12: Signifikantní vztah mezi objemem vejce a antimikrobiální aktivitou vůči *M. luteus*

#### 4.1.2. Testování antimikrobiální aktivity HOLUBÍCH bílků vůči *B. subtilis* a *M. luteus*

Analýza testování antimikrobiální aktivity holubích bílků vůči *B. subtilis* odhalila z hlavních efektů průkazný vliv pH bílku (Tabulka 7). Se vzrůstajícím pH se zvyšovala antimikrobiální aktivita vůči *B. subtilis* (Pearson's product-moment correlation;  $t = 2.908$ ,  $df = 134$ , kor. koeficient = 0.24,  $p = 0.0042$ ). Kromě tohoto hlavního efektu pH byla jak pro *B. subtilis* tak pro *M. luteus* prokázána signifikantní interakce pH bílku s typem inkubace na antimikrobiální aktivitu holubích bílků (Tabulka 7 a 8).

**Tabulka 7: Summary tabulka koeficientů pro minimální adekvátní model testující antimikrobiální aktivitu holubích bílků vůči *B. subtilis*; ( $\alpha = 0.05$ )**

	Estimate	Std.error	t value	p	
intercept	-0,064059	0,017932	-3,572	0,0005	***
pH bílku	0,074573	0,022380	3,332	0,00113	**
částečná INK	0,016999	0,021465	0,792	0,42985	
plná INK	0,001722	0,023516	0,073	0,94173	
manipulace OVTR	-0,020187	0,018331	-1,101	0,27286	
pH bílku:manipulace OVTR	-0,032809	0,018473	-1,776	0,07811	.
pH bílku:částečná INK	-0,050684	0,024091	-2,104	0,03734	*
pH bílku:plná INK	-0,007096	0,025027	-0,284	0,77724	

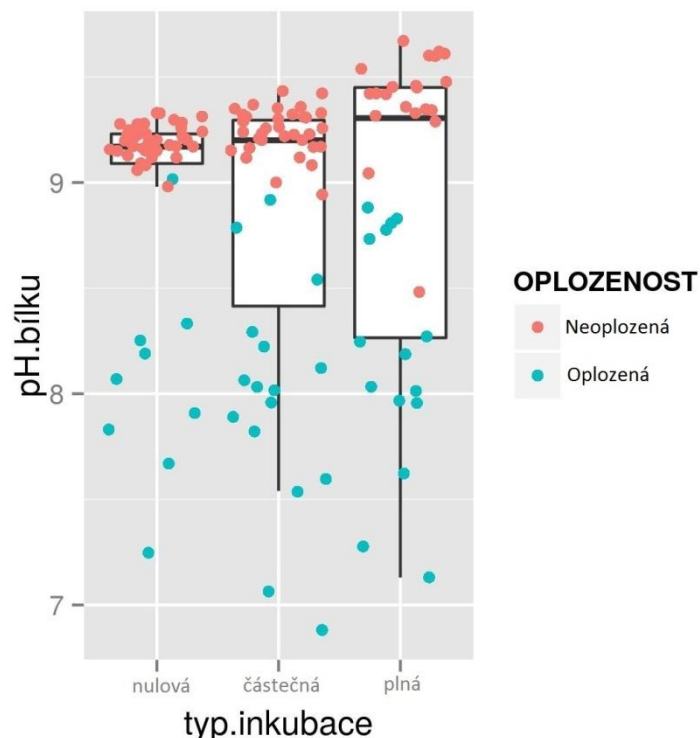
F-statistic (7,128): 3,54; R-squared: 0,1622; p: 0,001646

**Tabulka 8: Summary tabulka koeficientů pro minimální adekvátní model testující antimikrobiální aktivitu holubích bílků vůči *M. luteus*; ( $\alpha = 0.05$ )**

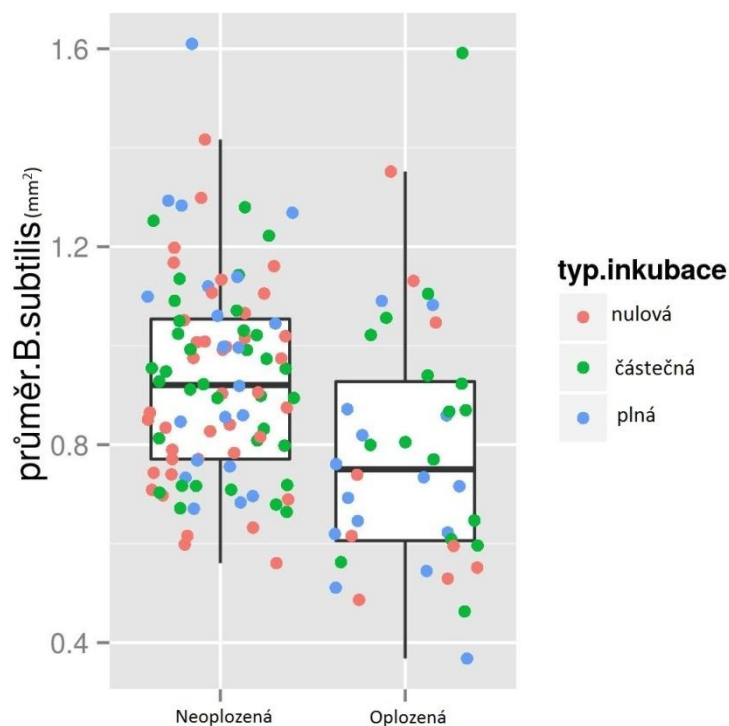
	Estimate	Std.error	t value	p	
intercept	6592,71	203,07	32,466	>0,0001	***
pH bílku	-38,12	291,51	-0,131	0,8962	
Manipulace LSM	2364,87	279,41	8,464	>0,0001	***
pH bílku:částečná INK	-82,89	361,66	-0,229	0,8191	
pH bílku:plná INK	704,4	370,61	1,901	0,0595	.

F-statistic(4,131): 18,88; R-squared: 0,3656; p < 0.0001

Jelikož na základě předchozích studií byl prokázán poměrně zásadní efekt fertility vajec na změny pH vlivem inkubace a u holuba byla k dispozici poměrně rozsáhlá data zahrnující také informaci o fertilitě konkrétních experimentálních vajec, byly pro holuba provedeny ještě dodatečné analýzy vlivu inkubace na pH bílku a vlivu samotného pH bílku na antimikrobiální potenciál bílku vůči oběma bakteriálním kmenům s ohledem na fertilitu vejce. Tyto analýzy odhalily poměrně zásadní vliv oplozenosti vejce na pH bílku (Wilcoxon rank sum test with continuity correction;  $W = 3828$ ,  $p \ll 0.0001$ ). Zatímco pH bílku se vlivem inkubace bez ohledu na fertilitu vejce neměnilo (Kruskal-Wallis test;  $\chi = 2.4952$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.2872$ ), k výraznému nárůstu pH vlivem inkubace docházelo pouze u neoplozených vajec, zatímco vejce oplozená své pH vlivem inkubace neměnila (Obrázek 13). Stejně tak se s fertilitou vajec měnila antimikrobiální aktivita vůči *B. subtilis* (Wilcoxon rank sum test with continuity correction;  $W = 2662$ ,  $p = 0.0004$ ), kdy vyšší antimikrobiální aktivitu vykazovala vejce neoplozená v porovnání s vejci oplozenými (Obrázek 14). Fertilita vajec však neměla žádný vliv na antimikrobiální aktivitu bílku vůči *M. luteus* (Wilcoxon rank sum test with continuity correction;  $W = 1712$ ,  $p\text{-value} = 0.3217$ ).



Obr.13: Vliv typu inkubace na pH bílku u oplozených a neoplozených vajec



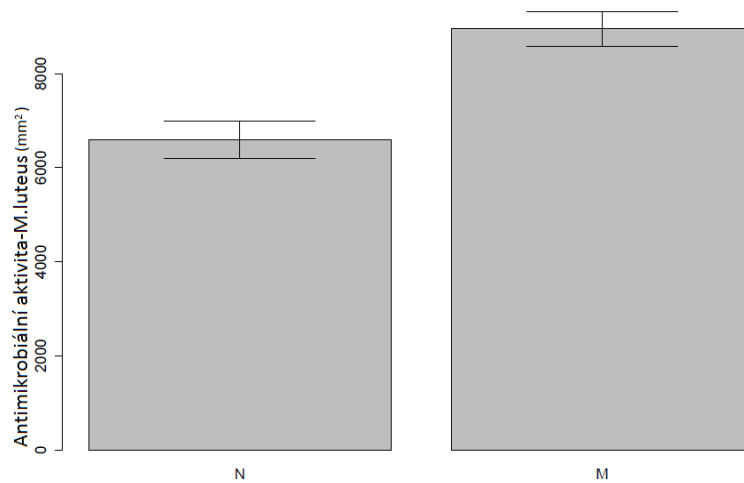
Obr.14: Vliv oplozenosti vajec na antimikrobiální aktivitu vůči B.subtilis

Analýza experimentálních dat obsahujících pouze fertilmí holubí vejce (N = 65) odhalila pouze signifikantní efekt manipulace lysozymem na zvyšování antimikrobiální aktivity vůči *M. luteus* (Tabulka 9). Stejně tomu bylo u dat zahrnujících jak vejce fertilmí tak nefertilmí (Tabulka 8, Obrázek 15). Samostatný efekt inkubace, manipulace OVTR, objemu vejce a jejich interakce na antimikrobiální aktivitu holubích bílků vůči oběma bakteriálním kmenům se nepodařilo prokázat (viz Přílohy, Tabulka P3, P4).

Tabulka 9: Summary tabulka koeficientů pro minimální adekvátní model testující antimikrobiální aktivitu holubích bílků oplozených vajec vůči *M. luteus*; ( $\alpha = 0.05$ )

	Estimate	Std.error	t value	p	
intercept	0,37724	0,01621	23,268	>0,0001	***
manipulace LSM	0,13509	0,02011	6,718	>0,0001	***

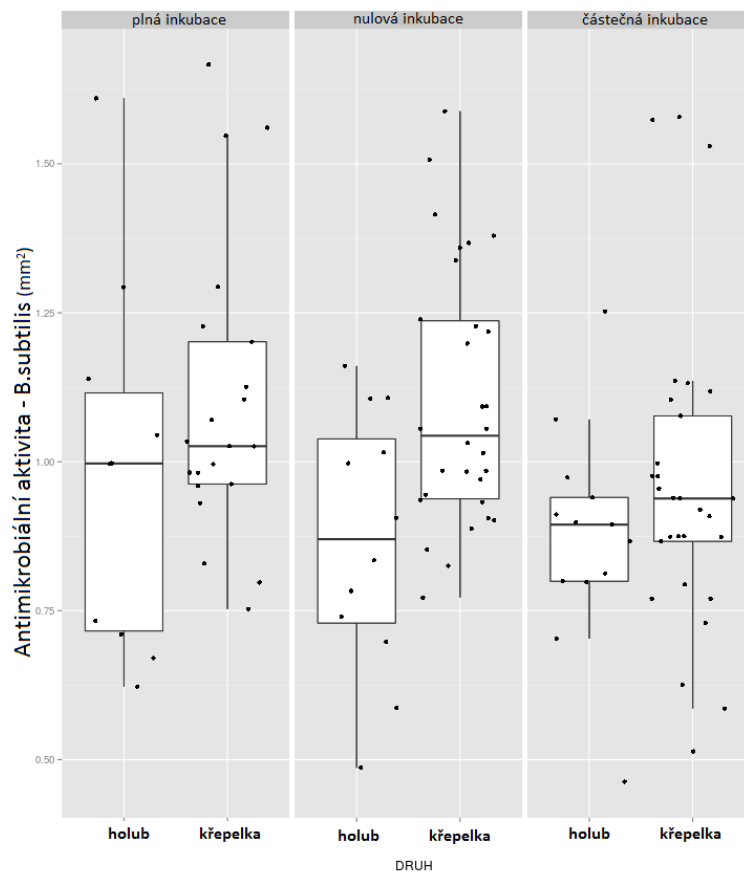
F-statistic(1,38): 45,13; R-squared: 0,5429;  $p < 0.0001$



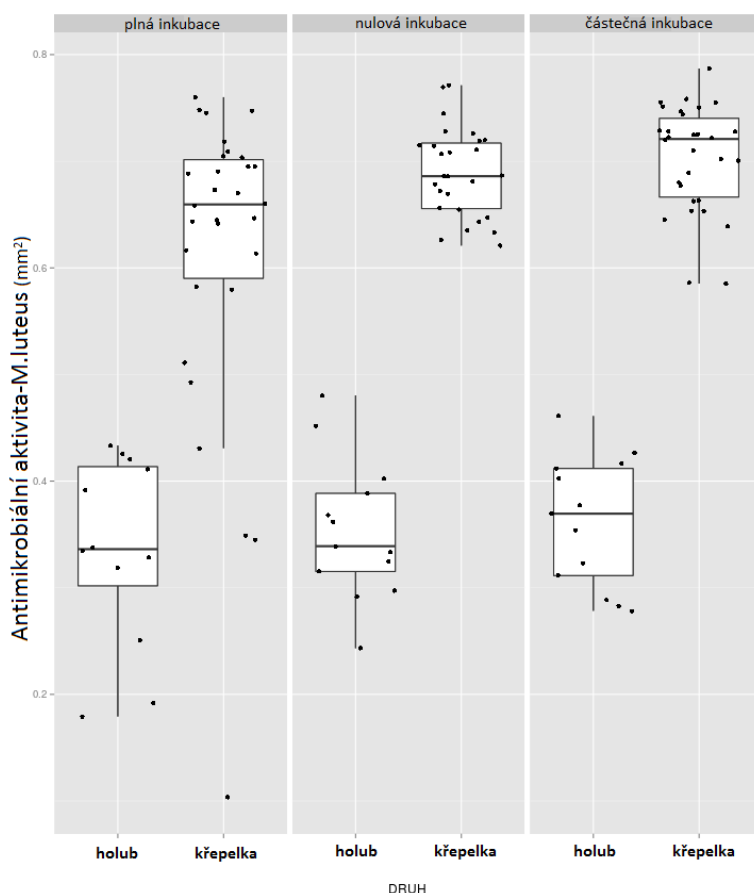
**Obr.15:** Vliv manipulace lysozymem na antimikrobiální aktivitu holubích bílků vůči *M.luteus*; chybové úsečky vyjadřují průměr a 95% konfidenční intervaly; manipulovaná (M) a nemanipulovaná (N) vejce

#### 4.2. Druhé rozdíly v antimikrobiální aktivitě bílku vůči vybraným bakteriím

Testování antimikrobiální aktivity bílků ukázalo odlišnou citlivost vybraných bakteriálních kmenů na působení bílků obou modelových druhů. Větší lyzační zóny byly bez ohledu na způsob inkubace pozorovány u nemanipulovaných křepelčích bílků vůči *B. subtilis* i *M. luteus* v porovnání se vzorky bílku z nemanipulovaných holubích vajec (Obrázek 16,17).



**Obr. 16:** Antimikrobiální aktivita bílku modelových druhů vůči *B. subtilis*



Obr.17:Antimikrobiální aktivita bílku modelových druhů vůči *M.luteus*

### 4.3. Post-experimentální stanovení koncentrace proteinů v bílku

#### 4.3.1. Post-experimentální stanovení koncentrace OVOTRANSFERINU

Analýzy post-experimentálního stanovení koncentrace ovotransferinu ve vejcích obou modelových druhů prokázaly významný efekt typu inkubace, manipulace a vzájemnou interakci těchto faktorů (Tabulka 9 a 10).

Tabulka 9: Summary tabulka koeficientů pro minimální adekvátní model testující koncentraci OVTR v křepelčích vejcích; ( $\alpha = 0.05$ )

	Estimate	Std.error	t value	p	
manipulovaná	0,57980	0,16799	3,451	0,000985	***
nemanipulovaná	-0,01433	0,14055	-0,102	0,919084	
nulová INK	-1,74617	0,21490	-8,126	>0,0001	***
částečná INK	-0,69366	0,20575	-3,371	0,001263	**
nemanipulovaná:nulováINK	1,12959	0,28293	3,933	0,000169	***
nemanipulovaná:částečnáINK	0,27998	0,27433	1,021	0,311224	

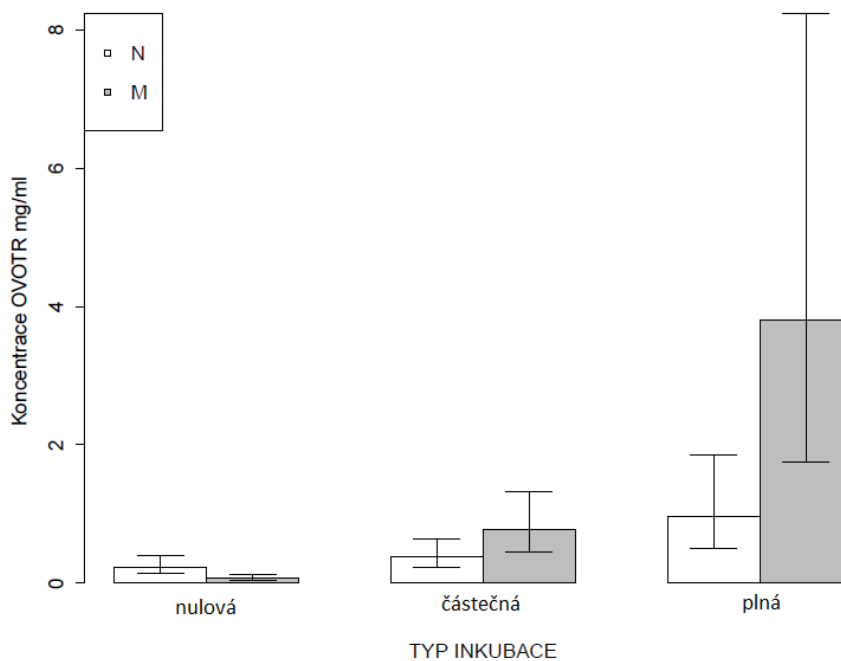
F-statistic(6,65): 21,78; R-squared: 0,6679; p < 0.0001

**Tabulka 10: Summary tabulka koeficientů pro minimální adekvátní model testující koncentraci OVTR v holubích vejcích; ( $\alpha = 0.05$ )**

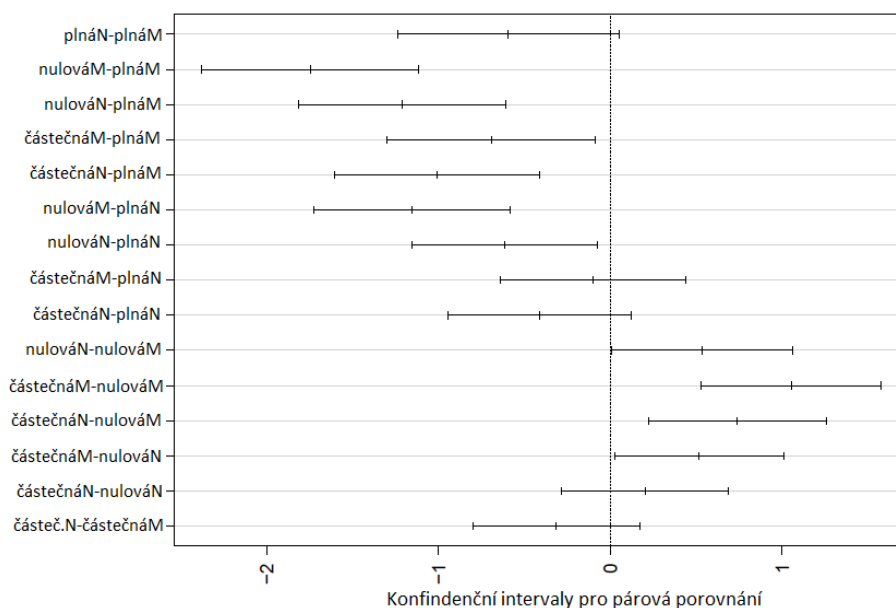
	Estimate	Std.error	t value	p	
manipulovaná	-0,1524	0,1651	-0,923	0,360368	
nemanipulovaná	-0,3155	0,1348	-2,341	0,023236	*
nulová INK	-0,4526	0,2214	-2,044	0,046266	*
částečná INK	-0,8240	0,2268	-3,632	0,000661	***
nemanipulovaná:nulováINK	-0,5562	0,2983	-1,864	0,068146	.
nemanipulovaná:částečnáINK	1,0912	0,3174	3,438	0,001191	**

F-statistic(6,50): 23,84; R-squared: 0,741; p < 0.0001

V křepelčích vejcích docházelo vlivem inkubace k prokazatelnému nárůstu koncentrace OVTR. Nejvyšší post-experimentální koncentrace OVTR vykazovala plně inkubovaná vejce, pak částečně inkubovaná a nejnižší koncentrace OVTR byly ve vejcích neinkubovaných (Obrázek 18). Nicméně, tento efekt byl průkazný u všech třech typů inkubace pouze pro vejce manipulovaná na množství OVTR, zatímco pro nemanipulovaná vejce byl tento efekt průkazný pouze u vajec neinkubovaných a plně inkubovaných (Obrázek 18 a 19).

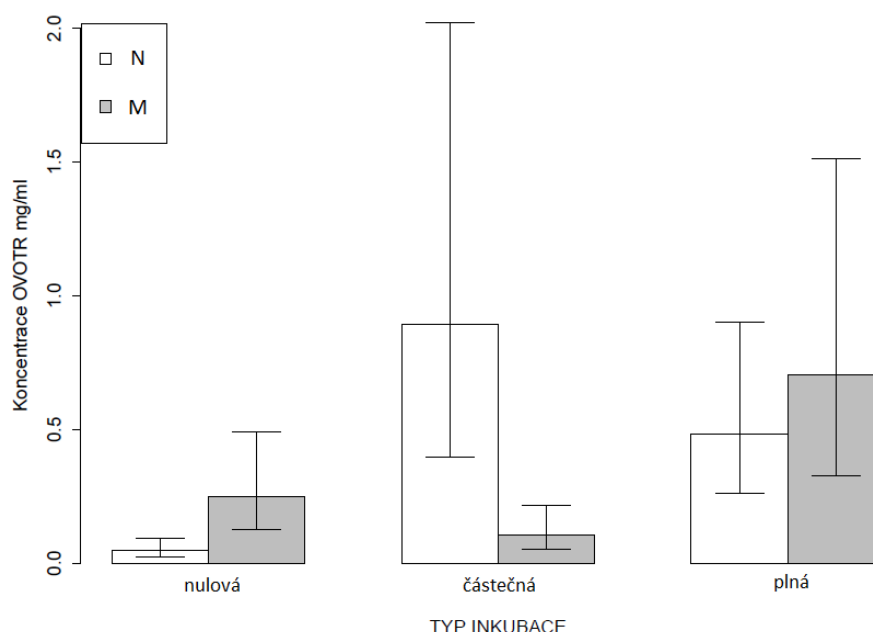


**Obr. 18: Efekt inkubace a manipulace na koncentraci OVTR v bílku křepelky; chybové úsečky vyjadřují průměr a 95% konfidenční intervaly; manipulovaná (M) a nemanipulovaná (N) vejce**

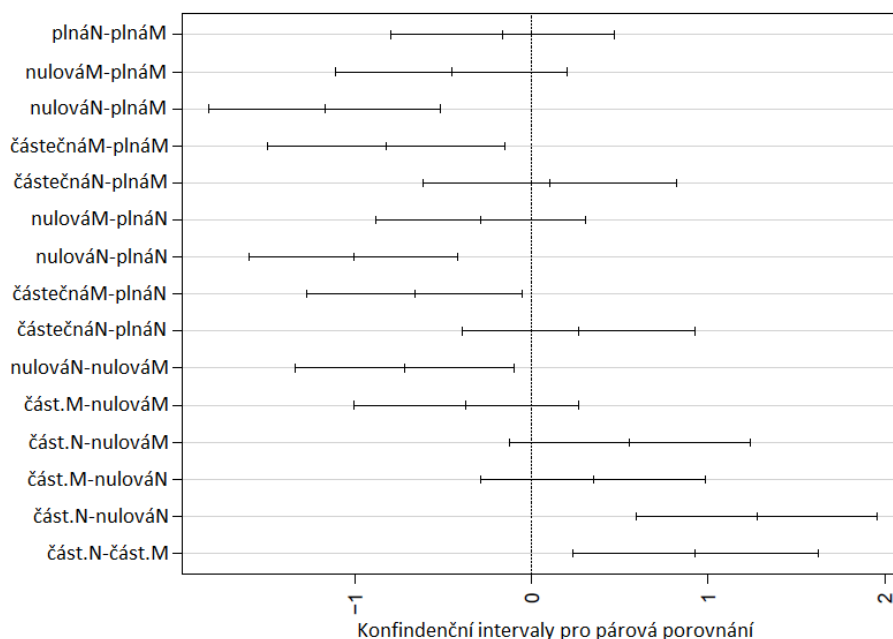


**Obr. 19:** Post-hoc Tukey test interakce manipulace a typu inkubace na koncentraci OVTR v křepelčích vejcích; manipulovaná (M) a nemanipulovaná (N) vejce

Pro holubí vejce byly naopak zjištěny prokazatelné rozdíly v koncentraci ovotransferinu vlivem všech třech typů inkubace pouze u vajec nemanipulovaných na množství OVTR, kdy nejvyšší koncentrace dosahovala vejce částečně inkubovaná oproti neinkubovaným a plně inkubovaným (Obrázek 20, Obrázek 21). Průkazný byl také rozdíl v koncentraci OVTR mezi vejci nemanipulovanými neinkubovanými a plně inkubovanými manipulovanými na OVTR, s prokazatelně vyšší koncentrací OVTR v plně inkubovaných a manipulovaných vejcích.



**Obr. 20:** Efekt inkubace a manipulace na koncentraci OVTR v bílku holuba; chybové úsečky vyjadřují průměr a 95% konfidenční intervaly; manipulovaná (M) a nemanipulovaná (N) vejce



Obr. 21: Post-hoc Tukey test interakce manipulace a typu inkubace na koncentraci OVTR v holubích vejcích; manipulovaná (M) a nemanipulovaná (N) vejce

#### 4.3.2. Post-experimentální stanovení koncentrace LYSOZYMU

Analýzy post-experimentálního stanovení koncentrace lysozymu ve vejcích obou modelových druhů prokázaly významný efekt inkubace a manipulace lysozymem pouze u křepelčích vajec (Tabulka 11). V holubích vejcích k žádným změnám koncentrace vlivem inkubace nedocházelo (Tabulka 12). Vliv manipulace a vzájemné interakce s inkubací nebyl u holubích vajec testován (viz 3.7.2 Post-experimentální analýzy koncentrace bílkových proteinů).

Tabulka 11: Summary tabulka koeficientů pro minimální adekvátní model testující koncentraci lysozymu v křepelčích vejcích; ( $\alpha = 0.05$ )

	Estimate	Std.error	t value	p	
intercept	1,57154	0,07513	20,917	>0,0001	***
manipulovaná	0,68186	0,07666	8,894	>0,0001	***
částečná INK	0,04455	0,09046	0,493	0,623	
plná INK	-0,20657	0,09545	-2,164	0,032	*

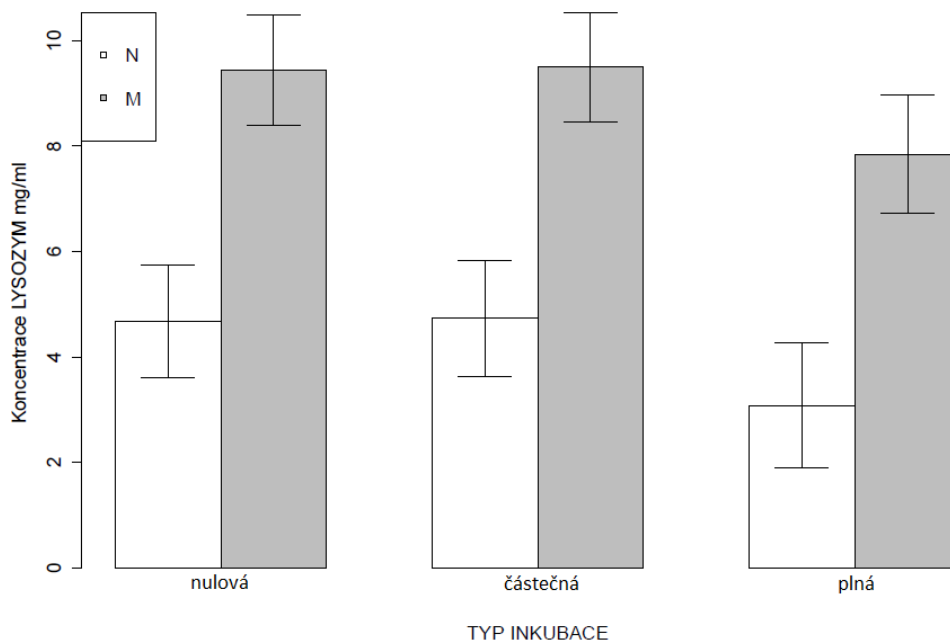
F-statistic(3,153): 28,66; R-squared: 0,3598;  $p < 0.0001$

Tabulka 12: Summary tabulka koeficientů pro minimální adekvátní model testující koncentraci lysozymu v holubích vejcích; ( $\alpha = 0.05$ )

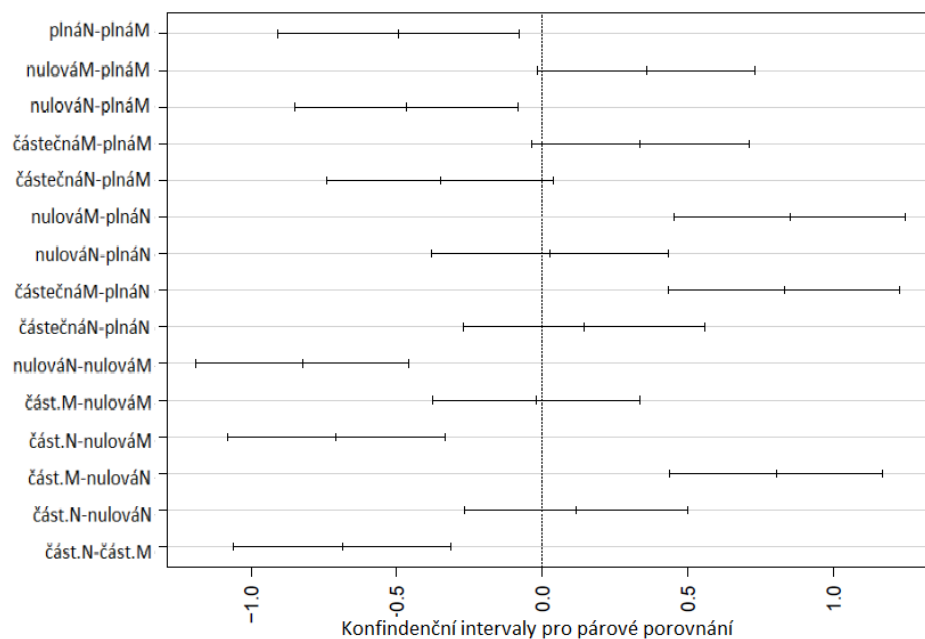
	Estimate	Std.error	t value	p	
intercept	5,3946	1,1705	4,609	0,00025	***
částečná INK	1,6036	1,9586	0,819	0,42426	
plná INK	-0,1723	1,8507	-0,093	0,92691	

F-statistic(2,17): 0,4297; R-squared: 0,04812;  $p = 0,6576$

V křepelčích vejcích docházelo vlivem inkubace k prokazatelnému snížení koncentrace lysozymu. Plně inkubovaná nemanipulovaná vejce vykazovala významně nižší koncentrace lysozymu oproti vejcům neinkubovaným a inkubovaným jen částečně. Vejce manipulovaná na množství lysozymu vykazovala vyšší post-experimentální koncentrace lysozymu (Obrázek 22). Prokazatelné rozdíly v koncentraci lysozymu byly rovněž u manipulovaných vs. nemanipulovaných vajec u všech způsobů inkubace (Obrázek 23).



**Obr. 22 :** Efekt inkubace a manipulace na koncentraci lysozymu v křepelčích vejcích; chybové úsečky vyjadřují průměr a 95% konfidenční intervaly; manipulovaná (M) a nemanipulovaná vejce (N)



**Obr. 23:** Post-hoc Tukey test interakce manipulace lysozymem a typu inkubace na koncentraci lysozymu v křepelčích vejcích; manipulovaná (M) a nemanipulovaná (N) vejce

## 5. Diskuse

### 5.1. Testování antimikrobiální aktivity bílků experimentálních vajec vůči *B.subtilis* a *M.luteus*

#### 5.1.1. Vliv manipulativního navýšení koncentrace proteinů a jejich antimikrobiální aktivity

V naší studii se podařilo prokázat signifikantní vliv manipulativního zvýšení koncentrace lysozymu na antimikrobiální aktivitu bílku obou modelových druhů (u křepelky jak vůči *B. subtilis*, tak vůči *M. luteus*, u holuba vůči *M. luteus*). Tento výsledek je v souladu s předpokladem, že samice, které adaptivně modifikují složení vajec různým ukládáním lysozymu do bílku, tak mohou poskytovat embryu vyšší antimikrobiální ochranu. Průkazný pozitivní efekt zvýšené koncentrace lysozymu na antimikrobiální aktivitu bílku obou druhů tak podporuje výsledky předchozích studií, které prokázaly vyšší koncentrace lysozymu u časně nakladených vajec snůšky (Saino *et al.* 2002) či u vajec vzniklých po spárování samic s kvalitnějším samcem (D'Alba *et al.* 2010b), v obou případech dáváno do souvislosti se zvýšenou obranou vajec altriciálních druhů ptáků před infekcí jejich vnitřních struktur.

Naopak se nepodařilo prokázat vliv manipulativního zvýšení koncentrace OVTR na antimikrobiální aktivitu vůči vybraným G+ bakteriálním kmenům. Dokonce ani u holuba, jehož dominantním proteinem v bílku je právě OVTR, nebyl detekován průkazný efekt manipulace. Zdá se tedy, že lysozym působí na tyto konkrétní bakterie efektivněji, zatímco OVTR může ve větší míře ovlivňovat růst a množení jiných zástupců G+ i G- bakterií, které jsou schopny infikovat vaječný obsah. To podporuje výsledky mnoha studií, které ukazují odlišnou citlivost různých bakterií na konkrétní antimikrobiální proteiny v bílku (Burley & Vadehra 1989; Wellman-Labadie *et al.* 2008a; Alabdeh *et al.* 2011; Moon *et al.* 2012; Bedrani *et al.* 2013; Grizard *et al.* 2015). S určitou pravděpodobností tedy existuje rovnováha mezi množstvím lysozymu a OVTR deponovaného do bílku v závislosti na druhovém zastoupení invadujících bakterií a efektivitě antimikrobiálních proteinů proti nim, což navrhuje již Horrocks (2012). Na souvislost mezi přítomností odlišných společenstev bakterií na povrchu vajec a specifickou deponací antimikrobiálních proteinů do bílku poukazují také Grizard *et al.* (2015) nebo Bedrani *et al.* (2013).

Dominantní zastoupení OVTR v bílku holuba a lysozymu v bílku křepelky může tedy být důsledkem tlaku odlišných bakteriálních společenstev na udržení životaschopnosti

nakladených vajec. Intenzita antimikrobiálního působení bílkových proteinů pak není závislá na jejich dominanci v bílku ale na efektivitě proti konkrétní bakterii.

Efekt zvýšené koncentrace OVTR, který se nám odhalit nepodařilo, je nutné dále testovat na senzitivnějších bakteriálních kmenech či pomocí jiné metodiky vzhledem k jeho primárně bakteriostatickému působení.

### **5.1.2. Vliv inkubace na antimikrobiální potenciál křepelčích vajec**

Pro křepelčí vejce se podařilo prokázat signifikantní vliv inkubace na antimikrobiální potenciál bílku jak vůči *B. subtilis*, tak *M. luteus* avšak opačný, než byl náš předpoklad. Oba typy inkubace antimikrobiální aktivitu bílku snižovaly v porovnání s vejci ponechanými bez inkubace. Navíc se lišil vliv jednotlivých typů inkubace na snižování antimikrobiální aktivity vůči jednotlivým bakteriálním kmenům, kdy nejnižší antimikrobiální aktivitu v porovnání s vejci neinkubovanými a plně inkubovanými vykazovala vůči *B. subtilis* vejce inkubovaná částečně, zatímco vůči *M. luteus* byla nejnižší antimikrobiální aktivita pozorována pro vejce inkubovaná plně. Vejce inkubovaná částečně vykazovala sice průkazně nižší, ale velmi podobou antimikrobiální aktivitu vůči *M. luteus* jako vejce neinkubovaná.

Jak bylo naznačeno výše, zdá se, že na *B. subtilis* a *M. luteus* působí efektivně především lysozym. Vzhledem k tomu, že antimikrobiální aktivitu lysozymu ovlivňuje pH bílku (Wellman-Labadie *et al.* 2008a; Fang *et al.* 2012a,b; Cunningham 1974), které se mění během raných fází inkubace, je pozorovaná rozdílná aktivita bílku vajec podléhajících různé intenzitě inkubace intuitivní. Nicméně, interakci pH bílku a typu inkubace se u křepelky potvrdit nepodařilo. Jedním z důvodů mohla být krátká doba trvání experimentálních způsobů inkubace. Ke snížení pH na hodnoty optimální (pH 5-8) pro aktivitu C-typu lysozymu totiž dochází ve fertálních slepičích vejcích až po sedmi dnech plné inkubace (Benton and Brake 1996; Lapao 1999; Fang *et al.* 2012b). Jelikož v naší studii byla vejce ponechána plně inkubována pouze čtyři dny, nedošlo k tak výraznému snížení pH (průměrné hodnoty pH pro částečně a plně inkubovaná vejce byly 9,5 respektive 9) a rozdíly jeho hodnot při různých typech inkubace tak nebyly průkazné. Kromě toho, za předpokladu vysoké senzitivity námi testovaných bakteriálních kmenů na lysozym, pozorovaný efekt plné inkubace na snižování antimikrobiálního potenciálu bílku vůči *M. luteus* mohl souviset se snižováním koncentrace lysozymu v bílku vlivem inkubace, který jsme v naší studii prokázaly (viz níže 5.3. Post-experimentální stanovení koncentrace lysozymu). Mimoto bylo v několika studiích

prokázáno, že během inkubace může v bílku docházet k rozpadu S-S vazeb lysozymu a formování dimerů bez lytické aktivity (Fang *et al.* 2012a) či mohou vznikat komplexy lysozymu (Qiu *et al.* 2012). Snížení lytické aktivity lysozymu v raných fázích inkubace tak může vyplývat z jeho fyzické nedostupnosti kvůli vazbě na další proteiny, např. ovomucin (Kato *et al.* 1975). Absence efektu částečné inkubace na antimikrobiální potenciál bílku je navíc v souladu s předchozí, doposud jedinou experimentální studií, ve které se vliv částečné inkubace na riziko a intenzitu bakteriální infekce bílku kachních vajec nepodařilo prokázat (Javůrková *et al.* 2014).

Nejvyšší antimikrobiální aktivitu vůči oběma bakteriálním kmenům vykazovala v naší studii vejce neinkubovaná. To s velkou pravděpodobností bylo zapříčiněno zvýšením hodnoty pH z 6-8 na 9-10, ke kterému dochází již druhý den po naklazení vejce (průměrné pH neinkubovaných vajec v naší studii bylo 9,4). Prostředí bílku se totiž v tuto dobu mění z bakteriostatického na baktericidní, čímž se efektivně bílek sterilizuje (Horrocks 2012). Navíc některé studie navrhují, že alkalické pH může zásadně podporovat antimikrobiální aktivitu ostatních proteinů v bílku (Tranter & Board 1984; Adalbedh *et al.* 2011). Wang & Shelef (1991) demonstrují antimikrobiální aktivitu lysozymu vůči G+ bakterii *Listeria* podpořenou alkalickým pH bílku. Podobně Levashov *et al.* (2010) poukazují na vliv vysokého pH na podporu antimikrobiální aktivity lysozymu vůči gram-negativní *E.coli*.

Z našich výsledku vyplývá, že pokud částečná inkubace k obraně před mikrobiální infekcí vajec ve snůšce prekociálních druhů nějak přispívá, je to velmi pravděpodobně jinými mechanismy, jako je např. redukce vlhkosti a vody na povrchu vejce (D'Alba *et al.* 2010a; Ruiz-De-Castañeda *et al.* 2011) či změnami ve složení mikrocenózy na povrchu vejce (viz např. Grizard *et al.* 2015), než přímým ovlivněním antimikrobiálního působení bílku.

### **5.1.3. Vliv inkubace, pH a fertility vajec na antimikrobiální potenciál holubích vajec**

Na rozdíl od křepelky byl u holuba prokázán jak významný vliv samotného pH bílku na jeho antimikrobiální potenciál vůči *B. subtilis*, tak také marginálně signifikantní vliv pH bílku v interakci s typem inkubace na antimikrobiální potenciál vůči *B. subtilis* i *M. luteus*.

Změna pH bílku během inkubace souvisí s fertilitou vajec (Qui *et al.* 2012). I když jsme předpokládali, že všechna dodaná vejce jsou fertilní, po skončení manipulativního experimentu a otevření vajec byla pozorována neoplozenost některých vajec, která byla u holubích vajec poměrně značná (99 neoplozených vs. 65 oplozených experimentálních

vajec). Z analýz testujících vliv oplozenosti vejce na pH holubích bílků bylo patrné, že neoplozená holubí vejce měla průkazně vyšší průměrné pH bílku v porovnání s vejci oplozenými. Podobně se vlivem fertility vejce měnil i efekt typu inkubace na pH bílku holubích vajec, kdy pH s inkubací rostlo avšak pouze u nefertilních vajec, zatímco pH fertilních vajec se vlivem inkubace neměnilo. Tento trend byl popsán ve studii Grizard *et al.* (2015), kde bylo demonstrováno, že u altriciálního skřivánka rudotemenného (*Calandrella cinerea*) nedocházelo k strmému nárůstu pH druhý den inkubace popsanému na slepičích vejcích (Cunningham 1974; Qiu *et al.* 2012; Fang *et al.* 2012b), ale pH vajec klesalo pomalu a konstantně směrem k neutralitě. Podobně byly hodnoty pH nízké (kolem 7,5) u vajec skřivanovitých (*Alaudidae*), která byla méně jak čtyři dny stará (Horrocks *et al.* 2014). Zdá se tedy, že změna pH během inkubace může být druhově specifická a poměrně zásadně ovlivněná fertilitou vejce.

Fertilita holubích vajec měla rovněž vliv na antimikrobiální aktivitu bílku vůči *B. subtilis*, přičemž intenzivnější antimikrobiální aktivitu vykazovala neoplozená vejce. Tento jev mohl být důsledkem vyššího pH u neoplozených vajec bez ohledu na typ inkubace a tedy výše popsaného pozitivního vlivu alkalického prostředí bílku na jeho antimikrobiální potenciál (Tranter & Board 1984; Alabdeh *et al.* 2011). Navíc jak ukazuje ve své práci Petráčková (2001) *B. subtilis* je schopen suboptimálního růstu i při pH 8,5, které odpovídá hodnotám pH oplozených holubích vajec. Nicméně, je nutno podotknout, že samotné pH bez přítomnosti antimikrobiálních proteinů v bílku inhibici bakteriálního růstu nezpůsobí, jak ukázal Baron *et al.* (2014), když srovnával antimikrobiální aktivitu frakce bílku bez proteinů a přirozený bílek při stejném pH (9,3). To poukazuje na zásadní roli přítomnosti proteinů a jejich interakci s pH bílku na antimikrobiální potenciál bílku.

Na druhou stranu fertilita vajec nehrála zásadní roli při inhibici růstu *M. luteus*. *M. luteus* je schopen slabě růst i při vysokých hodnotách pH (10) (Wieser *et al.* 2002), hlavní roli při potlačení růstu v naší studii hrálo tedy pravděpodobně působení lysozymu, ke kterému je *M. luteus* vysoce citlivý (Wellman-Labadie *et al.* 2008). Nicméně fertilní ani nefertilní vejce nevykazovala optimální pH pro aktivitu lysozymu a nevýznamná role fertility je tak intuitivní.

Jediný efekt, který se u holuba podařilo vůči *M. luteus* prokázat, bylo manipulativní navýšení koncentrace lysozymu. I když lysozym není dominantním antimikrobiálním proteinem v bílku holubů, zdá se, že právě zvýšená deponace lysozymu, zásadně ovlivňuje

antimikrobiální potenciál holubích bílků vůči *M. luteus*, což potvrzuje již zmíněnou rozdílnou efektivitu antimikrobiálních proteinů v bílku ke konkrétním bakteriím, které se mohou svým zastoupením v hnízním prostředí ptáků lišit (Bedrani *et al.* 2013; Grizard *et al.* 2015).

#### **5.1.4. Další faktory ovlivňující antimikrobiální potenciál bílku**

Další faktor, který vykazoval signifikantní efekt na zvyšování antimikrobiální aktivity křepelčích bílků vůči *M. luteus*, byl objem vejce. Velikost vajec prekociálních druhů ovlivňuje velikost mláďat v době líhnutí a jejich následné přežívání. Ptáčata z větších vajec jsou často těžší, rostou rychleji a přežívají lépe (Blomqvist *et al.* 1997). Se vzrůstající velikostí vejce se zvyšuje také množství bílku ve vejci (Willems 2014), kde může být přítomno také více antimikrobiálních proteinů. Úspěšnější přežívání mláďat z větších vajec tak může být spojeno s efektivnější obranou proti infekci vajec mikroorganismy. Navíc existuje tendence větší proporce bílku v prvním vejci ve snůšce (Romanoff & Romanoff 1949), což může být mimo jiné důsledek zvýšeného rizika mikrobiální infekce prvně nakladených vajec vystavených déle okolním podmínkám prostředí.

## **5.2. Post-experimentální stanovení koncentrace ovotransferinu**

Na základě našich dat se podařilo prokázat, že během inkubace křepelčích vajec docházelo k nárůstu koncentrace ovotransferinu ve vaječném bílku. Mimoto významný efekt mělo manipulativní navýšení koncentrace OVTR, přičemž se vliv navyšování koncentrace projevil nejvíce při plné inkubaci.

Nejnižší koncentraci OVTR vykazovala vejce neinkubovaná, která byla ponechána 96 hodin v 10 °C. Koncentrace OVTR se při různých teplotách skladování (5, 20, 30 °C) výrazně neměnila ve studii Schäfer *et al.* (1999), ani při pokojové teplotě (20 °C) ve studii Liu *et al.* (2013), což podporuje stabilitu OVTR ve vejcích nevystavených inkubačním teplotám.

Plně inkubovaná vejce obsahovala nejvyšší koncentraci OVTR. Trend růstu koncentrace OVTR během raných fází inkubace je podpořen několika studiemi (Fang *et al.* 2012a,b; Grizard *et al.* 2015). Také Alabdeh *et al.* (2011) podporují hypotézu, že teplota má výrazný vliv na aktivaci antimikrobiálních proteinů v bílku. Nicméně částečná inkubace také zvyšovala koncentraci OVTR, ale v menší míře než plná inkubace. Zdá se tedy, že intenzita inkubačních teplot přijímaných vajíčkem je hlavním determinantem způsobujícím nárůst koncentrace OVTR v bílku našeho modelového prekociálního druhu, křepelky japonské.

Navíc v případě, že samice deponuje do vajec větší množství OVTR, jeho koncentrace vlivem částečné i plné inkubace také roste. Přestože v naší studii nebyla nalezena podpora pro efekt zvýšené koncentrace OVTR na antimikrobiální potenciál bílku, není vyloučeno, že jeho antibakteriální, primárně bakteriostatický efekt bude působit výrazněji na jiné senzitivnější bakteriální kmeny.

U holuba se objevil jiný trend růstu koncentrace. Nejvyšší koncentrace OVTR byla detekována u vajec s částečnou inkubací, ale pouze u nemanipulovaných na koncentraci OVTR. Zdá se, že altriciální druhy s přirozeně vyššími koncentracemi OVTR v bílku jako má holub (viz Tabulka 4: Výsledky pre-experimentu - stanovení koncentrace antimikrobiálních proteinů v bílku) reagují citlivěji na samotnou inkubační teplotu a další intenzivnější inkubací se již proteiny neaktivují tak rapidně. Částečná inkubace tak může být jedním z důležitých obranným mechanismů altriciálních druhů s většími snůškami, které běžně částečně inkubují během kladení (Wang & Bessinger 2009). Kromě toho může tento prudký nárůst koncentrace OVTR již při nižších intenzitách inkubace být důvodem limitace vertikálně přenášených bakterií infikujících vaječný obsah (Cook *et al.* 2005b; Gantois *et al.* 2009).

Výsledky pre-experimentu stanovující koncentrace OVTR v čerstvých vejcích ukazují, že křepelčí vejce obsahují přirozeně méně OVTR než vejce holubí. Následkem navýšení koncentrace OVTR v křepelčích vejcích může pak být intenzivnější působení inkubace na zvyšování koncentrace OVTR, kterou pozorujeme u manipulovaných křepelčích vajec. Na druhou stranu manipulativní navýšení koncentrace OVTR u holuba vedlo k jinému trendu, než byl pozorován u vajec nemanipulovaných. U vajec částečně inkubovaných nedocházelo k výraznému nárůstu koncentrace OVTR. Ten byl sledován až u vajec podléhajících plné inkubaci. To může být následkem změn hodnot pH vlivem inkubace a fertility holubích vajec.

Působení teploty na změny v koncentraci OVTR v bílku se tedy liší u altriciálních a prekociálních druhů s různými způsoby inkubace, za což je pravděpodobně zodpovědná změna pH bílku vlivem inkubace snůšky. Nicméně je nutno podotknout, že určité množství tepla zvyšuje koncentraci OVTR ve vejcích obou druhů. Zdá se ale, že u prekociálních druhů růst koncentrace OVTR více ovlivňuje plná, zatímco u altriciálních druhů již částečná inkubace.

### 5.3. Post-experimentální stanovení koncentrace lysozymu

Předchozí studie potvrdily, že koncentrace lysozymu v raných fázích inkubace značně kolísá (Fang *et al.* 2012a,b; Grizard *et al.* 2015). V naší studii docházelo u nemanipulovaných křepelčích vajec vlivem plné inkubace k prokazatelnému snižování koncentrace lysozymu, zatímco nejvyšší koncentrace lysozymu byla detekována u neinkubovaných a částečně inkubovaných vajec. Jelikož antimikrobiální aktivita lysozymu by měla velmi pravděpodobně korelovat s množstvím lysozymu v bílku (viz ale Fang *et al.* 2012a), potvrzuje tento trend koncentrace naše výsledky antimikrobiální aktivity křepelčích bílků vůči *M. luteus*.

Mimoto křepelčí vejce manipulovaná na množství lysozymu obsahovala vyšší koncentrace lysozymu a při daných typech inkubace vykazovala stejný trend jako vejce nemanipulovaná. Rostoucí aktivitu antimikrobiálních proteinů v souvislosti se zvyšováním jejich koncentrace ukazují také Horrocks *et al.* (2014). Vzhledem k tomu, že samice ptáků mohou ovlivňovat složení vajec různou deponací proteinů do bílku mimo jiné s pořadím kladení, vyšší koncentrace lysozymu u prvně nakladených vajec může zefektivnit eliminaci většího rizika mikrobiální infekce u prvně nakladených vajec ve snůšce. Bohužel studií poukazujících na variabilitu antimikrobiálních proteinů v rámci snůšky u prekociálních ale také altriciálních druhů existuje velmi málo (viz ale Saino *et al.* 2002, D'Alba *et al.* 2010, Shawkey *et al.* 2008).

Ve vzorcích bílku holubích vajec k žádným významným změnám koncentrace lysozymu vlivem inkubace nedocházelo. Tento výsledek mohl být způsoben tím, že inkubace zásadně neovlivňovala pH a jeho hodnoty se tedy při různých typech inkubace výrazně nelišily, zároveň neměly různé způsoby inkubace na antimikrobiální aktivitu výrazný vliv, což se odrazilo v podobném antimikrobiálním potenciálu bílku podléhajícím všem daným typům inkubace.

## 6. Souhrn

Cílem práce bylo testovat vliv částečné a plné inkubace, koncentrace lysozymu a ovotransferinu v bílku a jejich vzájemnou interakci na antimikrobiální potenciál bílku zástupců altriciálních a prekociálních druhů ptáků.

- Intenzita antimikrobiálního působení bílkových proteinů není závislá na jejich dominantním zastoupení v bílku ale spíše na efektivitě proti konkrétním bakteriálním kmenům. Zdá se, že proti *B. subtilis* a *M. luteus* působí efektivněji lysozym, což bylo v této studii prokázáno zvýšenou antimikrobiální aktivitou bílků vůči oběma bakteriím s manipulativně navýšenou koncentrací lysozymu.
- Antimikrobiální efekt částečné ani plné inkubace nebyl u prekociální křepelky prokázán. Naopak oba typy inkubace antimikrobiální aktivitu bílku vůči vybraným bakteriím snižovaly. Pokud tedy částečná inkubace k obraně před mikrobiální infekcí vajec ve snůšce prekociálních druhů nějak přispívá, je to velmi pravděpodobně jinými mechanismy spojenými například se změnou pH nebo eliminací kapalné vody na skořápce, než přímým ovlivněním antimikrobiálního potenciálu bílku.
- Podobně u altriciálního holuba nebyl efekt částečné ani plné inkubace na antimikrobiální potenciál bílku prokázán. Antimikrobiální aktivita vůči *B. subtilis* byla ale ovlivněna pH bílku, které souviselo s oplozeností vajec. pH oplozených vajec se během inkubace neměnilo, což s ohledem na jiné studie značí druhově specifický vliv inkubace na změny pH a s tím spojený antimikrobiální potenciál
- U obou modelových druhů byl pozorován nárůst koncentrace ovotransferinu při částečné i plné inkubaci. Zdá se, že u prekociálních druhů růst koncentrace ovotransferinu více ovlivňuje plná, zatímco u altriciálních druhů již částečná inkubace. Koncentrace lysozymu v křepelčích vejcích klesala vlivem plné inkubace, zatímco v holubích vejcích nebyla inkubací ovlivněna. Navýšení koncentrace obou proteinů způsobilo výraznější změny koncentrace vlivem inkubačních teplot se stejným trendem jako u vajec nemanipulovaných, s výjimkou částečně inkubovaných holubích vajec s manipulativně navýšenou koncentrací ovotransferinu.

## 7. Přehled použité literatury

(\*sekundární citace)

**Aguilera, O., Quiros, L.M. & Fierro, J.F. (2003).** Transferrins selectively cause ion efflux through bacterial and artificial membranes. *FEBS Lett.*, 548, 5–10.

**Alabdeh, M., Lechevalier, V., Nau, F., Gautier, M., Cochet, M.-F., Gonnet, F., et al. (2011).** Role of incubation conditions and protein fraction on the antimicrobial activity of egg white against *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli*. *J. Food Prot.*, 74, 24–31.

**Alquati, A.B., Rubolini, D., Romano, M., Boncoraglio, G., Fasola, M. & Saino, N. (2007).** Effects of egg albumen removal on yellow-legged gull chick phenotype. *Funct. Ecol.*, 21, 310–316.

**Andersson, M. & Åhlund, M. (2001).** Protein fingerprinting: a new technique reveals extensive conspecific brood parasitism. *Ecology*, 82, 1433–1442.

**Baron, F., Jan, S., Gonnet, F., Pasco, M., Jardin, J., Giudici, B., et al. (2014).** Ovotransferrin plays a major role in the strong bactericidal effect of egg white against the *Bacillus cereus* group. *J. Food Prot.*, 77, 955–962.

**Bedrani, L., Helloin, E., Guyot, N., Réhault-Godbert, S. & Nys, Y. (2013).** Passive maternal exposure to environmental microbes selectively modulates the innate defences of chicken egg white by increasing some of its antibacterial activities. *BMC Microbiol.*, 13, 128.

**Beissinger, S.R., Cook, M.I. & Arendt, W.J. (2005).** The Shelf Life Of Bird Eggs: Testing Egg Viability Using A Tropical Climate Gradient. *Ecology*, 86, 2164–2175.

**Beissinger, S.R. & Waltman, J.R. (1991).** Extraordinary clutch size and hatching asynchrony of a Neotropical parrot. *The Auk*, 108, 863–71.

**Benton, C.E. & Brake, J. (1996).** The effect of broiler breeder flock age and length of egg storage on egg albumen during early incubation. *Poult. Sci.*, 75, 1069–1075.

**Benton, C.E., Walsh, T.J. & Brake, J. (2001).** Effects of presence of a blastoderm on albumen height and pH of broiler hatching eggs. *Poult. Sci.*, 80, 955–957.

**Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W. & Götz, F. (2005).** Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, 55, 778–787.

**Blomqvist, D., Johansson, O.C. & Götmark, F. (1997).** Parental quality and egg size affect chick survival in a precocial bird, the lapwing *Vanellus vanellus*. *Oecologia*, 110, 18–24.

**Board, R.G. (1966).** The Course of Microbial Infection of the Hen's Egg. *J. Appl. Microbiol.*, 29, 319–341.

**Board, R.G. & Fuller, R. (1974).** Non-specific antimicrobial defences of the avian egg, embryo, and neonate. *Biological Reviews*, 49, 15–49.

**Board, R.G. & Tranter, H.S. (1986).** The Microbiology of Eggs. In: *Egg Science and Technology*, 3rd edn. (eds Stadelman, W.J. & Cotterill, O.J.). AVI Publishing Co, Westport, pp. 75–96.

- Bonev, B., Hooper, J. & Parisot, J. (2008).** Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J. Antimicrob. Chemother.*, 61, 1295–1301.
- Bonisoli-Alquati, D.R. (2010).** Egg antimicrobials, embryo sex and chick phenotype in the yellow-legged gull. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 64, 845–855.
- Bruce, J. & Johnson, A.L. (1978).** The bacterial flora of unhatched eggs. *Br. Poult. Sci.*, 19, 681–689.
- Burley, R.W. & Vadehra, D.V. (1989).** The Avian Egg: Chemistry and Biology. *John Wiley & Sons*, New York.
- Callewaert, L. & Michiels, C.W. (2010).** Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.*, 35, 127–160.
- Carinci, P. & Manzoli-Guidotti, L. (1968).** Albumen absorption during chick embryogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 20, 107–118.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A., Rodriguez, R.A. & Arendt, W.J. (2003).** Trans-shell infection by pathogenic micro-organisms reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 270, 2233–2240.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A. & Arendt, W.J. (2005a).** Incubation reduces microbial growth on eggshells and the opportunity for trans-shell infection. *Ecol. Lett.*, 8, 532–537.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A., Rodriguez, R.A. & Arendt, W.J. (2005b).** Microbial infection affects egg viability and incubation behavior in a tropical passerine. *Behav. Ecol.*, 16, 30–36.
- Cunningham, F.E. (1974).** Changes in egg white during incubation of the fertile egg. *Poult. Sci.*, 53, 1561–1565.
- D'Alba, L., Oborn, A. & Shawkey, M.D. (2010a).** Experimental evidence that keeping eggs dry is a mechanism for the antimicrobial effects of avian incubation. *Naturwissenschaften*, 97, 1089–1095.
- D'Alba, L., Shawkey, M.D., Korsten, P., Vedder, O., Kingma, S.A., Komdeur, J., et al. (2010b).** Differential deposition of antimicrobial proteins in blue tit (*Cyanistes caeruleus*) clutches by laying order and male attractiveness. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 64, 1037–1045.
- Deeming, D.C. (1991).** Reasons for the dichotomy in the need for egg turning in birds and reptiles. In: *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*. Cambridge University Press, 307-324.
- Deeming, D.C. (2002).** Embryonic development and utilisation of egg components. In: *Avian Incubation, Behaviour, Environment, and Evolution*. (ed. Deeming, D.C.). Oxford University Press, Oxford, 43-53
- Drent, R.H. (1973).** The natural history of incubation. In: *Breeding biology of birds*. National academy of science, 262-322.
- Drent, R.H. (1975).** Incubation. In: *Avian biology*. Academic Press, 5, 333-420.
- Ellison, R.T. & Giehl, T.J. (1991).** Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.*, 88, 1080–1091.

**Fang, J., Ma, M., Jin, Y., Qiu, N., Ren, G., Huang, X., et al. (2012a).** Changes in the antimicrobial potential of egg albumen during the early stages of incubation and its impact on the growth and virulence response of *Salmonella Enteritidis*. *Ital. J. Anim. Sci.*, 11.

**Fang, J., Ma, M., Jin, Y., Qiu, N., Huang, Q., Sun, S., et al. (2012b).** Liquefaction of albumen during the early incubational stages of the avian embryo and its impact on the antimicrobial activity of albumen. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 10, 423–427.

**Fasenko, G.M. (2007).** Egg Storage and the Embryo. *Poult. Sci.*, 86, 1020–1024.

**Ferrari, R.P., Martinelli, R. & Saino, N. (2006).** Differential effects of egg albumen content on barn swallow nestlings in relation to hatch order. *J. Evol. Biol.*, 19, 981–993.

**Finkler, M.S., Van Orman, J.B. & Sotherland, P.R. (1998).** Experimental manipulation of egg quality in chickens: influence of albumen and yolk on the size and body composition of near-term embryos in a precocial bird. *J. Comp. Physiol. [B]*, 168, 17–24.

**Florkin, M. & Scheer, B.T. (1978).** Chemical Zoology. Volume X. Aves. New York, Academic Press.

**Fonseca, B.B., Beletti, M.E., Melo, R.T., Mendonça, E.P., Vieira, C.U., Levenhagen, M.A., et al. (2011).** Transfer, viability and colonisation of *Campylobacter jejuni* in the chicken vitellus and in embryos. *Br. Poult. Sci.*, 52, 279–286.

**Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T.J., et al. (2009).** Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 33, 718–738.

**Godard, R.D., Morgan Wilson, C., Frick, J.W., Siegel, P.B. & Bowers, B.B. (2007).** The effects of exposure and microbes on hatchability of eggs in open-cup and cavity nests. *J. Avian Biol.*, 38, 709–716.

**Grenier, J.L. & Beissinger, S.R. (1999).** Variation in the Onset of Incubation in a Neotropical Parrot. *The Condor*, 101, 752–761.

**Grizard, S., Versteegh, M.A., Ndithia, H.K., Salles, J.F. & Tieleman, B.I. (2015).** Shifts in Bacterial Communities of Eggshells and Antimicrobial Activities in Eggs during Incubation in a Ground-Nesting Passerine. *PLoS ONE*, 10, e0121716.

**Hill, W.L. (1993).** Importance of prenatal nutrition to the development of a precocial chick. *Dev. Psychobiol.*, 26, 237–249.

**Horrocks, N.P.C., Irene Tieleman, B. & Matson, K.D. (2011).** A simple assay for measurement of ovotransferrin – a marker of inflammation and infection in birds. *Methods Ecol. Evol.*, 2, 518–526.

**Horrocks, N.P.C. (2012).** The role of disease risk and life history in the immune function of larks in different environments. The Netherlands. PhD thesis. University of Groningen. Centre for Ecological and Evolutionary Studies (CEES). Animal Ecology Group.

**Horrocks, N.P., Hine, K., Hegemann, A., Ndithia, H.K., Shobrak, M., Ostrowski, S., et al. (2014).** Are antimicrobial defences in bird eggs related to climatic conditions associated with risk of trans-shell microbial infection? *Front. Zool.*, 11, 49.

- Ibrahim, H.R. (1997).** Insights into the structure-function relationships of ovalbumin, ovotransferrin, and lysozyme. In: *Hen Eggs: Basic and Applied Science*, 4, 37-56.
- Ibrahim, H.R., Sugimoto, Y. & Aoki, T. (2000).** Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1523, 196–205.
- Ibrahim, H.R., Matsuzaki, T. & Aoki, T. (2001).** Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Lett.*, 506, 27–32.
- Irwin, D.M. (2014).** Evolution of the vertebrate goose-type lysozyme gene family. *BMC Evol. Biol.*, 14, 1–15.
- Javůrková, V., Albrecht, T., Mrázek, J. & Kreisinger, J. (2014).** Effect of intermittent incubation and clutch covering on the probability of bacterial trans-shell infection. *Ibis*, 156, 374–386.
- Javůrková, V., Krkavcová, E., Kreisinger, J., Hyršl, P. & Hyánková, L. (2015).** Effects of experimentally increased in ovo lysozyme on egg hatchability, chicks immune response and phenotype in a precocial bird, xx.
- Kato, A., Imoto, T. & Yagishita, K. (1975).** The Binding Groups in Ovomucin-lysozyme Interaction. *Agric. Biol. Chem.*, 39, 541–544.
- Ko, K.Y., Mendonca, A.F. & Ahn, D.U. (2008).** Influence of zinc, sodium bicarbonate, and citric acid on the antibacterial activity of ovotransferrin against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in model systems and ham. *Poult. Sci.*, 87, 2660–2670.
- Ko, K.Y., Mendoncam, A.F., Ismail, H. & Ahn, D.U. (2009).** Ethylenediaminetetraacetate and lysozyme improves antimicrobial activities of ovotransferrin against *Escherichia coli* O157:H7. *Poult. Sci.*, 88, 406–414.
- Lapão, C., Gama, L.T. & Soares, M.C. (1999).** Effects of broiler breeder age and length of egg storage on albumen characteristics and hatchability. *Poult. Sci.*, 78, 640–645.
- Levashov, P.A., Sedov, S.A., Shipovskov, S., Belogurova, N.G. & Levashov, A.V. (2010).** Quantitative Turbidimetric Assay of Enzymatic Gram-Negative Bacteria Lysis. *Anal. Chem.*, 82, 2161–2163.
- Levi, Wendell (1977).** *The Pigeon*. Sumter, S.C.: Levi Publishing Co, Inc.
- Liu, Y., Qiu, N. & Ma, M. (2013).** Comparative proteomic analysis of hen egg white proteins during early phase of embryonic development by combinatorial peptide ligand library and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight. *Poult. Sci.*, 92, 1897–1904.
- Loos, E.R., Rohwer, F.C. & Haukos, D.A. (2004).** Laying-Stage Nest Attendance and Onset of Incubation in Prairie Nesting Ducks. *Auk Am. Ornithol. Union*, 121, 587–599.
- Miguel, M.A.M. (2005).** Comparative study of egg white proteins from different species by chromatographic and electrophoretic methods. *Eur. Food Res. Technol.*, 221, 542–546.
- Mills, A.D., Crawford, L.L., Domjan, M. & Faure, J.M. (1997).** The behavior of the Japanese or domestic quail *Coturnix japonica*. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 21, 261–281.

- Moon, S.-H., Lee, J.-H., Lee, Y.-J., Paik, J.-Y., Ahn, D.-U. & Paik, H.-D. (2012).** Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxic Activities of Ovotransferrin from Egg White. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, 32, 612–617.
- Nice, M.M. (1962).** Development of behavior in precocial birds. *Transactions of the Linnean Society of N.Y.*, 8, 1-211.
- Osserman, E.F. & Lawlor, D.P. (1966).** Serum and Urinary Lysozyme (muramidase) in Monocytic and Monomyelocytic Leukemia. *J. Exp. Med.*, 124, 921–952.
- Petráčková, D. (2001).** Adaptation of cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis* 168trp2- to environmental pH. The Czech Republic. M.Sc. Theses. Charles University in Prague. Department of Genetics and Microbiology.
- Phelps, C.F. & Antonini, E. (1975).** A study of the kinetics of iron and copper binding to hen ovotransferrin. *Biochem. J.*, 147, 385–391.
- Pinowski, J., Barkowska, M., Kruszewicz, A.H. & Kruszewicz, A.G. (1994).** The causes of the mortality of eggs and nestlings of Passer sp. *J. Biosci.*, 19, 441–451.
- Pooart, J., Torikata, T. & Araki, T. (2004).** The Primary Structure of a Novel Goose-type Lysozyme from Rhea Egg White. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 159–169.
- Prager, E.M. & Wilson, A.C. (1974).** Widespread distribution of lysozyme g in egg white of birds. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7295-7297.
- Qiu, N., Ma, M., Cai, Z., Jin, Y., Huang, X., Huang, Q., et al. (2012).** Proteomic analysis of egg white proteins during the early phase of embryonic development. *J. Proteomics*, 75, 1895–1905.
- Rahn, H., Paganelli, C.V., Ar, A. (1975).** Relation of avian egg weight to body weight. *The Auk*, 92, 750±765.
- Ricklefs, R.E. (1977).** Composition of Eggs of Several Bird Species. *The Auk*, 94, 350–356.
- Ricklefs, R.E. (1993).** Sibling competition, hatching asynchrony, incubation period, and lifespan in altricial birds. *Current Ornithology*, 11, 199-276.
- Romanoff, A.L. & Romanoff, A.J. (1949).** The avian egg. *John Wiley & Sons*, New York, p. 61.
- Romanoff, A.L. (1967).** Biochemistry of the Avian Embryo. *John Wiley & Sons*, New York.
- Ruiz-De-Castañeda, R., Vela, A.I., González-Braojos, S., Briones, V. & Moreno, J. (2011).** Drying eggs to inhibit bacteria: Incubation during laying in a cavity nesting passerine. *Behav. Processes*, 88, 142–148.
- Ruiz-De-Castañeda, R., Vela, A.I., Lobato, E., Briones, V. & Moreno, J. (2012).** Early Onset of Incubation and Eggshell Bacterial Loads in a Temperate-Zone Cavity-Nesting Passerine. *The Condor*, 114, 203–211.
- Saino, N., Dall'ara, P., Martinelli, R. & Møller, A.P. (2002).** Early maternal effects and antibacterial immune factors in the eggs, nestlings and adults of the barn swallow. *J. Evol. Biol.*, 15, 735–743.

- Saino, R.M. (2007).** Maternal immune factors and the evolution of secondary sexual characters. *Behav. Ecol.*, 18, 513–520.
- Salton, M.R.J. (1957).** The Properties Of Lysozyme And Its Action On Microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, 21, 82–100.
- Schäfer, A., Drewes, W. & Schwägele, F. (1999).** Effect of storage temperature and time on egg white protein. *Food Nahr.*, 43, 86–89.
- Shawkey, M.D., Kosciuch, K.L., Liu, M., Rohwer, F.C., Loos, E.R., Wang, J.M., et al. (2008).** Do birds differentially distribute antimicrobial proteins within clutches of eggs? *Behav. Ecol.*, 19, 920–927.
- Shawkey, M.D., Firestone, M.K., Brodie, E.L. & Beissinger, S.R. (2009).** Avian Incubation Inhibits Growth and Diversification of Bacterial Assemblages on Eggs. *PLoS ONE*, 4.
- \*Sibley, C.G. & Ahlquist, J.E. (1972).** A Comparative Study of the Egg-White Protein of Passerine Birds. Peabody Museum of Natural History (Yale University), New Haven
- Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Peralta-Sánchez, J.M. & Ruiz-Rodríguez, M. (2010).** Antibiotic-producing bacteria as a possible defence of birds against pathogenic microorganisms. *Open Ornithol J*, 3, 93–100.
- Sotherland, P.R. & Rahn, H. (1987).** On the Composition of Bird Eggs. *The Condor*, 89, 48–65.
- Stoleson, S.H. & Beissinger, S.R. (1999).** Egg viability as a constraint on hatching synchrony at high ambient temperatures. *J. Anim. Ecol.*, 68, 951–962.
- Tranter, H.S. & Board, R.G. (1984).** The influence of incubation temperature and pH on the antimicrobial properties of hen egg albumen. *J Appl Bacteriol*, 56, 53–61.
- Trziszka, T. (1994).** Lysozyme and its functions in the egg. *Arch.Geflugelk.*, 58, 49–54
- Valenti, P., de Stasio, A., Mastromerino, P., Seganti, L., Sinibaldi, L. & Orsi, N. (1981).** Influence of bicarbonate and citrate on the bacteriostatic action of ovotransferrin towards staphylococci. *FEMS Microbiol. Lett.*, 10, 77–79.
- Vleck, C.M. & Vleck, D. (1987).** Metabolism and energetics of avian embryos. *Journal of Experimental Zoology*, Supplement 1, 111-25.
- Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., et al. (2011).** Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe*, Cruising in the Amazing World of Microbial Ecosystems, 17, 375–379.
- Wang, C. & Shelef, L.A. (1991).** Factors Contributing to Antilisterial Effects of Raw Egg Albumen. *J. Food Sci.*, 56, 1251–1254.
- Wang, J.M. & Beissinger, S.R. (2009).** Variation in the onset of incubation and its influence on avian hatching success and asynchrony. *Anim. Behav.*, 78, 601–613.

**Wang, J.M. & Beissinger, S.R. (2011).** Partial Incubation in Birds: Its Occurrence, Function, and Quantification. *The Auk*, 128, 454–466.

**Wang, J.M., Firestone, M.K. & Beissinger, S.R. (2011).** Microbial and environmental effects on avian egg viability: Do tropical mechanisms act in a temperate environment? *Ecology*, 92, 1137–1145.

**Webb, D. (1987).** Thermal Tolerance of Avian Embryos - a Review. *Condor*, 89, 874–898.

**Wellman-Labadie, O., Picman, J. & Hincke, M.T. (2007).** Avian antimicrobial proteins: structure, distribution and activity. *Worlds Poult. Sci. J.*, 63, 421–438.

**Wellman-Labadie, O., Picman, J. & Hincke, M.T. (2008a).** Comparative antibacterial activity of avian egg white protein extracts. *Br. Poult. Sci.*, 49, 125–132.

**Wellman-Labadie, O., Picman, J. & Hincke, M.T. (2008b).** Enhanced C-type lysozyme content of wood duck (*Aix sponsa*) egg white: an adaptation to cavity nesting? *Physiol. Biochem. Zool. PBZ*, 81, 235–245.

**Wiebe, K.L. & Bortolotti, G.R. (1994).** Food supply and hatching spans of birds: energy constraints or facultative manipulation? *Ecology*, 75, 813–23.

**Wieser, M., Denner, E.B.M., Kampfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., et al. (2002).** Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 629–637

**Willems, E.D. (2014).** Importance of albumen during embryonic development in avian species, with emphasis on domestic chicken. *Worlds Poult. Sci. J.*, 70, 503–517.

**Wu, J. & Acero-Lopez, A. (2012).** Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation. *Food Res. Int.*, Functional Foods and Nutraceuticals, 46, 480–487.

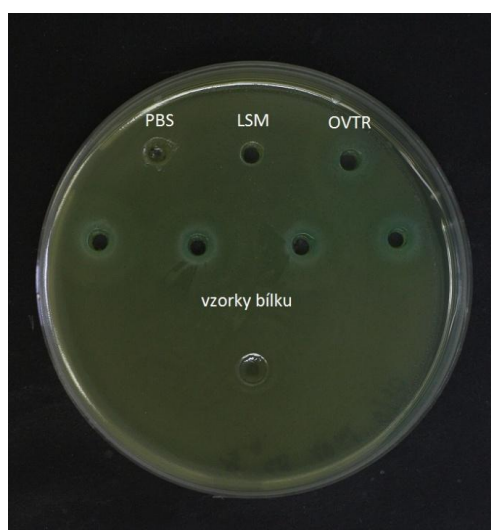
**Yamanishi, H., Iyama, S., Yamaguchi, Y., Kanakura, Y. & Iwatani, Y. (2002).** Modification of Fully Automated Total Iron-binding Capacity (TIBC) Assay in Serum and Comparison with Dimension TIBC Method. *Clin. Chem.*, 48, 1565–1570.

**Yoshizaki, N., Ito, Y., Hori, H., Saito, H. & Iwasawa, A. (2002).** Absorption, transportation and digestion of egg white in quail embryos. *Dev. Growth Differ.*, 44, 11–22.

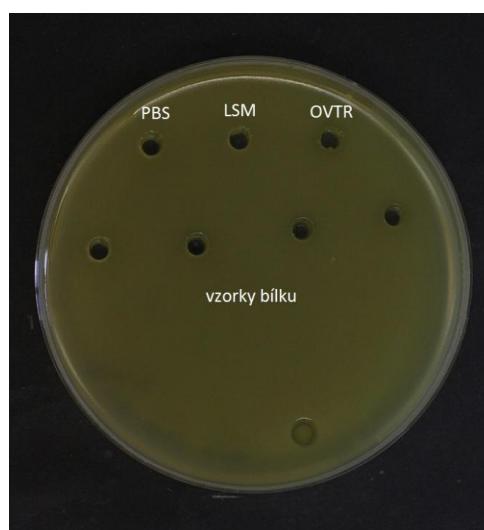
## 8. Přílohy

### 8.1. Výsledky mikrobiologických pre-experimentů

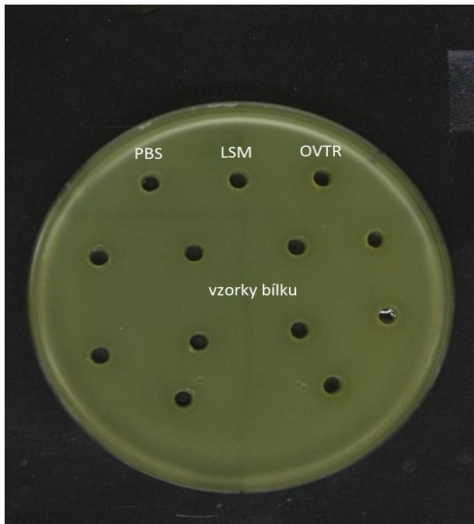
Na antimikrobiální působení bílku nebo roztoků lysozymu a OVTR ve vysokých koncentracích nebyla citlivá žádná testovaná G– bakterie (Obrázek P1, P2, P3), naopak došlo k nárůstu kolonií v těsné blízkosti jamky (Obrázek P1). K tomuto jevu mohlo docházet mimo jiné kvůli lepší dostupnosti živin z podkladového LB agaru v místě vyseknuté jamky. Lyzační zóny nebyly vytvořeny ani po přidání 150  $\mu$ l hydrogenuhličitanu sodného ( $\text{NaHCO}_3$ ) do top agaru ploten s *E. coli*, i když ve studii Wellman-Labadie *et al.* (2008a) docházelo k inhibici růstu *E.coli* i *P. aeruginosa*. Tato rozdílnost mohla být způsobena odlišnou metodikou, kdy v naší studii byl  $\text{NaHCO}_3$  přidáván do 0,7% top agaru, zatímco ve studii Wellman-Labadie *et al.* (2008a) do tekutého média. Positivní výsledek nebyl dokonce zaznamenán ani při navýšení množství pozitivní kontroly v jamkách na 30  $\mu$ l (Obrázek P4). Podobně, Gram-positivní *Enterococcus faecalis* také nebyl inhibován (Obrázek P5). Lyzační zóny byly vytvořeny pouze na miskách s kulturou *Micrococcus luteus* a *Bacillus subtilis* (Obrázek P6,P7), což potvrdilo jejich vysokou citlivost na antimikrobiální působení bílku demonstrovanou např. Burley & Vadehra (1989) a Wellman-Labadie *et al.* (2008a). Tyto dvě G+ bakterie byly proto vybrány pro zjišťování antimikrobiálního potenciálu bílku experimentálních vajec.



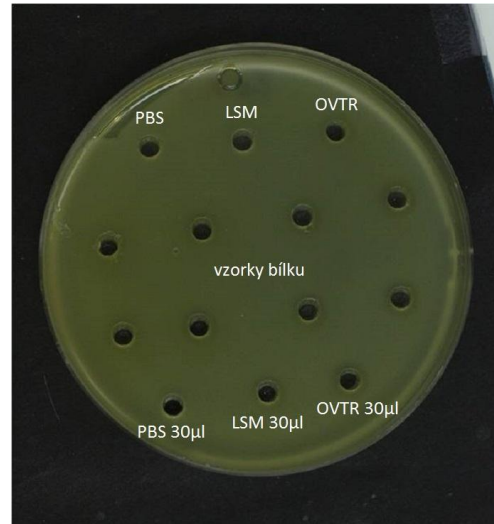
Obrázek P1: Miska s kulturou *P. aeruginosa*



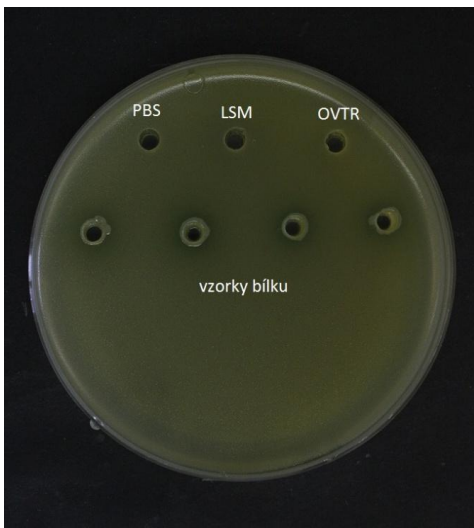
Obrázek P2: Miska s kulturou *P. mirabilis*



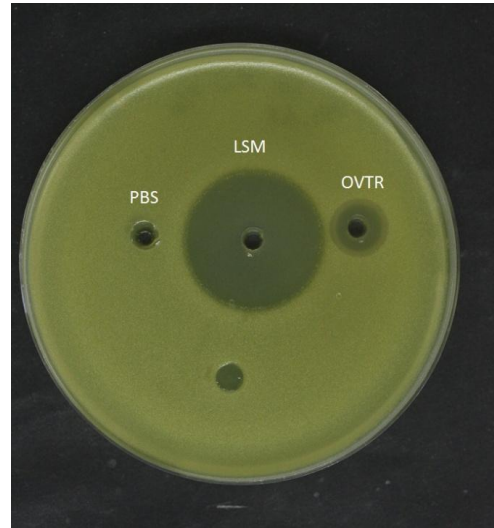
Obrázek P3: Miska s kulturou *E. coli*



Obrázek P4: Miska s kulturou *E. coli* po přidání  $\text{NaHCO}_3$



Obrázek P5: Miska s kulturou *E. faecalis*

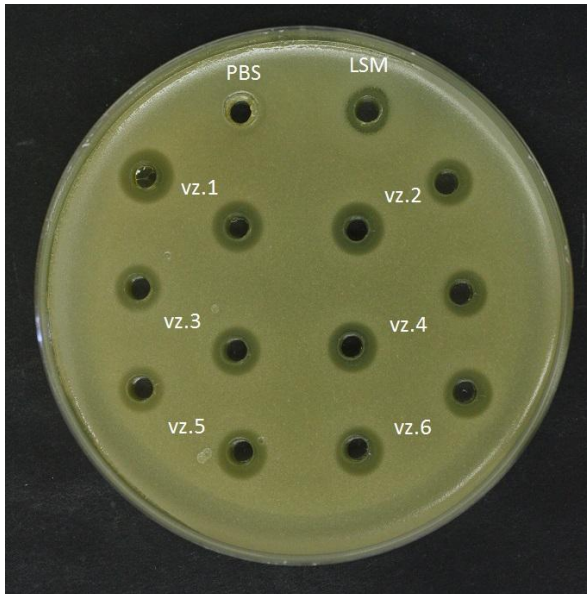


Obrázek P6: Miska s kulturou *M. luteus*

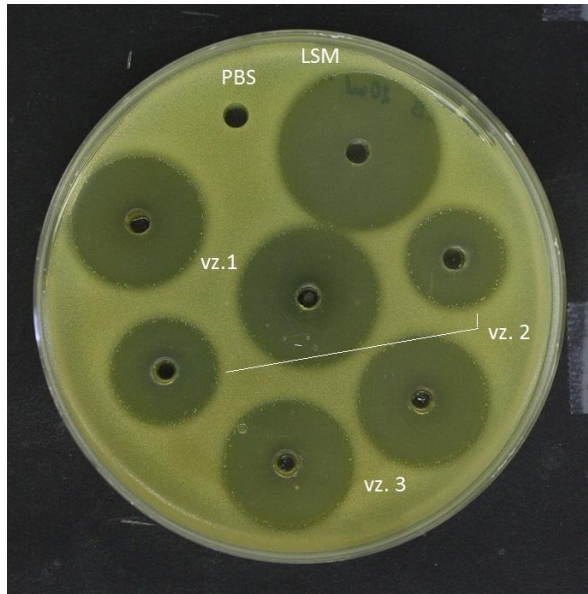


Obrázek P7: Miska s kulturou *B. subtilis*

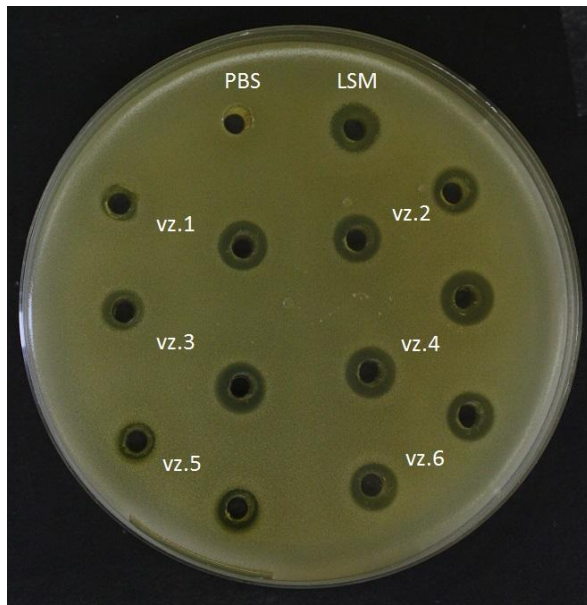
## 8.2. Ukázka misek s kulturou *B.subtilis* a *M. luteus* při testování antimikrobiální aktivity bílků experimentálních vajec



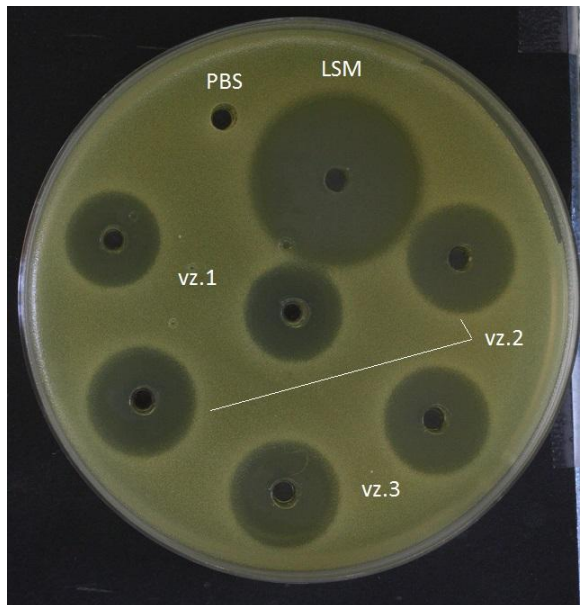
Obrázek P8: Miska s kulturou *B.subtilis*, vzorky křepelčích bílků



Obrázek P9: Miska s kulturou *M. luteus*, vzorky křepelčích bílků



Obrázek P10: Miska s kulturou *B.subtilis*, vzorky holubích bílků



Obrázek P11: Miska s kulturou *M.luteus*, vzorky holubích bílků

### 8.3. Tabulky postupné eliminace nesignifikantních proměnných před selekcí minimálního adekvátního modelu

**Tabulka P1: Hodnoty p (pro  $\alpha = 0.05$ ) při postupné eliminaci nesignifikantních proměnných před selekcí minimálního adekvátního modelu - Model pro antimikrobiální působení bílku vůči *B.subtilis* - KŘEPELKA**

Vysvětlující proměnná	Df	Sum.Sq.	F value	Pr(>F)
typ inkubace:manipulace LSM:manipulace OVTR	297	-0,02101	1,4245	0,2423
typ inkubace:manipulace OVTR	299	-0,00184	0,1243	0,8831
objem vejce:manipulace LSM	300	-0,00036	0,0493	0,8244
typ inkubace:manipulace LSM	302	-0,00648	0,4419	0,6433
pH bílku:typ inkubace	304	-0,0102	0,6985	0,4982
objem vejce:manipulace OVTR	305	-0,00376	0,5154	0,4734
pH bílku:manipulace LSM	306	-0,00555	0,7633	0,383
pH bílku:manipulace OVTR	307	-0,00798	1,0971	0,2957
objem vejce:typ inkubace	309	-0,03742	2,572	0,07803
pH bílku	310	-1,23e <sup>05</sup>	0,0017	0,9674
objem vejce	311	-0,02489	3,3975	0,06625
manipulace LSM:manipulace OVTR	312	-0,01008	1,3661	0,2434
manipulace OVTR	313	-0,00127	0,1713	0,6793

**Tabulka P2: Hodnoty p (pro  $\alpha = 0.05$ ) při postupné eliminaci nesignifikantních proměnných před selekcí minimálního adekvátního modelu - Model pro antimikrobiální působení bílku vůči *M.luteus* - KŘEPELKA**

Vysvětlující proměnná	Df	Sum.Sq.	F value	Pr(>F)
typ inkubace:manipulace LSM:manipulace OVTR	294	-0,00489	2,3915	0,09329
manipulace LSM:manipulace OVTR	295	-0,0003	0,2932	0,5886
objem vejce:typ inkubace	297	-0,00098	0,4765	0,6214
pH bílku:manipulace LSM	298	-0,00316	3,0766	0,08046
objem vejce:manipulace OVTR	299	-0,00107	1,0314	0,3106
typ inkubace:manipulace OVTR	301	-0,00367	1,777	0,1709
typ inkubace:manipulace LSM	303	-0,00412	1,9825	0,1395
pH bílku:manipulace OVTR	304	-0,00283	2,7053	0,101
manipulace OVTR	305	-0,00153	1,452	0,2292
pH bílku:typ inkubace	307	-0,00612	2,9079	0,0561
pH bílku	308	-0,00097	0,9087	0,3412
Objem vejce:manipulace LSM	309	-0,00393	3,6941	0,05553

**Tabulka P3: Hodnoty p (pro  $\alpha = 0.05$ ) při postupné eliminaci nesignifikantních proměnných před selekcí minimálního adekvátního modelu - Model pro antimikrobiální působení bílku vůči *B.subtilis* - HOLUB**

Vysvětlující proměnná	Df	Sum.Sq.	F value	Pr(>F)
typ inkubace:manipulace LSM:manipulace OVTR	116	-0,00956	0,4092	0,6651
typ inkubace:manipulace LSM	118	-0,00718	0,3104	0,7337
objem vejce:typ inkubace	120	-0,00404	0,1766	0,8384
objem vejce:manipulace LSM	121	-0,00351	0,3115	0,5778
pH bílku:manipulace LSM	122	-0,00081	0,0725	0,7882
manipulace LSM:manipulace OVTR	123	-0,02785	2,504	0,1161
typ inkubace:manipulace OVTR	125	-0,04101	1,8213	0,1662
objem vejce:manipulace OVTR	126	-0,00821	0,7197	0,3979
manipulace LSM	127	-0,00047	0,0416	0,8387
objem vejce	128	-1,41e <sup>-02</sup>	1,246	0,2664

**Tabulka P4: Hodnoty p (pro  $\alpha = 0.05$ ) při postupné eliminaci nesignifikantních proměnných před selekcí minimálního adekvátního modelu - Model pro antimikrobiální působení bílku vůči *M.luteus* - HOLUB**

Vysvětlující proměnná	Df	Sum.Sq.	F value	Pr(>F)
typ inkubace:manipulace LSM:manipulace OVTR	116	-8801047	1,6967	0,1879
typ inkubace:manipulace LSM	118	-3395347	0,6468	0,5256
typ inkubace:manipulace OVTR	120	-1293162	0,2478	0,7809
objem vejce:typ inkubace	122	-2417073	0,4691	0,6267
pH bílku:manipulace OVTR	123	-341131	0,1336	0,7154
manipulace LSM:manipulace OVTR	124	-3400555	1,341	0,2491
pH bílku:manipulace LSM	125	-735367	0,2892	0,5917
objem vejce:manipulace OVTR	126	-4950745	1,958	0,1642
objem vejce:manipulace LSM	127	-4146153	1,6274	0,2044
manipulace OVTR	128	-8,96e <sup>-05</sup>	0,3499	0,5552
objem vejce	129	-1317422	0,5172	0,4734
typ inkubace	131	-3811742	0,751	0,4739