

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



**Bc. Vít Molva**

**Mikroorganismy asociované s prachovými roztoči**

**Microorganisms associated to house dust mites**

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Jan Hubert, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.

Praha, 2019



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 31. července 2019

Podpis

**Poděkování:**

Chtěl bych zde poděkovat svému školiteli doc. Mgr. Janu Hubertovi, Ph.D., za trpělivost a obětavost při řešení mé diplomové práce, Ing. Martě Nesvorné za seznámení s používanými metodami, mému konzultantovi doc. RNDr. Jan Votýpkovi, Ph.D., za poskytnuté rady při zpracování diplomové práce a Martinu Markovičovi za dohledání původních článků a technickou pomoc při psaní práce. Dále bych chtěl poděkovat rodině za podporu během studia. Projekt byl financován Grantovou agenturou ČR (17-12068S)

# Abstrakt

Prachoví roztoči (*Dermatophagoides farinae* a *Dermatophagoides pteronyssinus*) jsou adaptováni na získávání potravy ze zbytků kůže, vlasů a nehtů z těla člověka a zvířat. Tyto zbytky kožních derivátů jsou však rovněž pokryty mikroorganismy, které hrají zásadní roli ve výživě potravní biologií těchto prachových roztočů.

V této práci byly prováděny experimenty se zbytkovým růstovým médiem (SPGM), což je směs zbytků experimentální diety, svleček, mrtvých těl a exkrementů roztočů po laboratorní kultivaci roztočů. Byl připraven extrakt z SPGM a testován jako zdroj mikroorganismů pro rekolonizaci prostředí roztočů. Modelové druhy *D. farinae* a *D. pteronyssinus* byly chovány na kontrolní dietě a dietě obohacené extraktem z SPGM z jednoho a tři měsíce starých kultur roztočů.

Houbový i bakteriální mikrobiom se mezi druhy roztočů lišil, ale přidání SPGM do diety roztočů významně ovlivnilo zastoupení bakterií v profilu *D. farinae*. Změny v profilu spočívaly ve snížení zastoupení bakterie *Lactobacillus* spp., zatímco u bakterií rodů *Cardinium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* a *Sphingomonas* došlo k nárůstu jejich zastoupení u jedinců na SPGM obohacené dietě. Přidání SPGM do diety roztočů mělo za následek pokles respirace mikrokosmu s výjimkou mikrokosmu s *D. pteronyssinus* po přidání jeden měsíc starého SPGM. Populační růst *D. farinae* nebyl přidáním SPGM ovlivněn, zatímco u *D. pteronyssinus* byl vliv závislý na stáří SPGM.

Tato práce ukazuje, že rekolonizace prostředí roztočů mikroorganismy z SPGM ovlivňuje mikrobiom a potravní biologii prachových roztoče pouze okrajově.

## **Klíčová slova:**

*Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, zbytkové růstové médium, mikroorganismy

# Abstract

The house dust mites (HDM; *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*) obtain nutrients from the debris of the skin, hairs and nails, that get off the human and animal body. These debris are covered by microorganisms and the microorganisms are the key factor in the survival of HDM in human-made environments.

In this study we made manipulative experiments with the extract from spent growth medium (SPGM). SPGM is the medium after mite cultivation, composed from mite feces, debris of the diet, dead mite bodies and microorganisms. The extract from SPGM (one and three-month-old mite cultures) was used as the source of microorganism to transfer them into diet of *D. farinae* and *D. pteronyssinus*.

The composition of the bacterial and fungal microbiomes differed between the HDM species, but the SPGM extract addition into diet influenced only the bacterial profile of *D. farinae*. In the *D. farinae* microbiome of specimens on SPGM-treated diets compared to those of the control situation, the *Lactobacillus* spp. profile decreased, while the *Cardinium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, and *Sphingomonas* profiles increased. The addition of SPGM extract decreased the microbial respiration in the microcosms with and without mites in almost all cases. Adding SPGM did not influence the population growth of *D. farinae*, but it had a variable effect on *D. pteronyssinus*. The results indicated that the HDM are marginally influenced by the microorganisms in their feces.

## Key words

*Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, spent growth medium, microorganisms

## Obsah

1. ÚVOD .....	1
2. Prachoví roztoči .....	2
2.1. Biologie a ekologie prachových roztočů .....	2
2.2. Mikroorganismy a prachoví roztoči .....	3
2.3. Prachoví roztoči: původci alergenních onemocnění .....	5
2.4. Vakcíny a produkce roztočů pro imunomodulace .....	6
3. Materiál a metody .....	7
3.1. Roztoči .....	7
3.2. Příprava extraktu ze zbytkového růstového média .....	8
3.3. Populační růst .....	10
3.4. Respirace .....	12
3.5. Extrakce DNA .....	15
3.6. Amplifikace DNA .....	16
3.7. Gelové elektroforéza .....	16
3.8. Zpracování sekvencí .....	17
3.9. Analýza dat .....	17
4. Výsledky .....	18
4.1. Mikrobiom .....	18
4.2. Vliv SPGM na mikrobiom .....	19
4.3. Respirace .....	23
4.4. Populační růst .....	23
5. Diskuse .....	24
6. Závěr .....	26
7. Seznam literatury .....	27
8. Přílohy .....	32

# 1. ÚVOD

Předmětem této práce jsou prachoví roztoči, a to konkrétně prachovka americká (*Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961) a prachovka prachová (*Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart, 1897)). Tito roztoči jsou celosvětově rozšířenými obyvateli lidských domácností. Nachází se v prachu, kobercích, postelích a křeslech, kde žijí komenzálním způsobem života s člověkem. Roztoči se živí na zbytcích kůže, nehtů a vlasů. Zároveň se v poslední době ukazuje, že důležitou složkou potravy roztočů jsou mikroorganismy, které se nachází právě na odpadající kůži (van Bronswijk & Sinha 1973). Prachoví roztoči člověku přímo neškodí na rozdíl od jim fylogeneticky příbuzným skupin organismům, jako je např. zákožka svrabová (*Sarcoptes scabiei* (De Geer, 1778)), která žije ve svrchních vrstvách kůže, kde si tvoří chodbičky, do kterých klade vajíčka. Zákožka svrabová se živí tkáňovým mokem a rohovinou hostitele (Van Neste & Lachapelle 1981). Hlavní medicínální význam prachových roztočů spočívá v produkci alergenů, které se vyskytují v jejich tělech a exkrementech. Alergeny se poté hromadí ve zbytcích mrtvých těl, exkrementech a v jimi osidlovaném prostředí, odkud se již lehce dostávají do ovzduší a tím i do kontaktu s člověkem. Alergická reakce na všechny alergeny včetně alergenů roztočů je přehnaná odpověď imunitního systému na cizorodou látku. Může se projevat atopickým ekzémem, alergickou rýmou nebo astmatem, případně až anafylaktickým šokem. U alergie na roztoče se nejčastěji setkáváme s astmatickými problémy. Astmatickými problémy trpí okolo 10 % lidské populace a z toho je senzitivních na alergeny roztočů až 85 % jedinců (Platts-Mills & de Weck 1989). V poslední době se ukazuje, že za alergické reakce nejsou zodpovědné pouze alergeny přímo z roztoče, ale i lipopolysacharidy a chitin, které jsou důsledkem přítomnosti bakterií a hub v roztoči (Gregory & Lloyd 2011; Jacquet 2011; Hubert et al. 2019a).

Na základě fylogenetické analýzy se předpokládá, že prachoví roztoči přešli v evoluci z parazitického způsobu života ke komenzalismu (Klimov & OConnor 2013). V současnosti se objevují názory, že za touto změnou jsou velkou měrou podepsané mikroorganismy, které napomohly přeorientovat se roztočům z potravy bohaté na cukry a další výživově bohaté látky na hůře stravitelnou potravu, kterou jsou zbytky kůže, vlasy a nehty (Klimov & OConnor 2013). Cílem této práce je charakteristika vztahů mezi mikroorganismy a prachovými roztoči. Práce byla zaměřena na vliv zbytkového



růstového média (SPGM; spent growth medium) jako zdroje mikroorganismů, které znovu osídlují laboratorní kulturu roztočů. SPGM se skládá ze zbylé diety, svleček roztočů, odumřelých těl roztočů a exkrementů (Stewart et al. 1986). Byly charakterizovány mikroorganismy, které jsou přenášeny roztoči, a současně byl studován vliv těchto mikroorganismů na roztoče. V této práci byly provedeny manipulativní pokusy se složením diety, která byla obohacována o zbytkové růstové médium z různě staré kultury (jeden a tři měsíce).

Vstupní otázky byly následující:

- (a) zda je mikrobiom roztoče ovlivněn mikroorganismy přenesenými prostřednictvím SPGM do pasterizované diety roztočů;
- (b) jestli je populační růst roztočů ovlivněn mikroorganismy obsaženými v SPGM a přenesených do pasterizované diety;
- (c) jaký vliv má přidání mikroorganismů do pasterizované diety roztočů prostřednictvím SPGM na celkovou respiraci mikroorganismů v mikrokosmu.

## 2. Prachoví roztoči

### 2.1. Biologie a ekologie prachových roztočů

Prachoví roztoči (obrázek 1) jsou zástupci rodu *Dermatophagoides* (čeleď Pyroglyphidae, řád Astigmata, třída Arachnida) (BioLib 2019). Prachoví roztoči jsou volně žijící organismy, které se živí komenzálním způsobem. Komensalismus je interakce mezi dvěma organismy, kde jeden organismus má z tohoto soužití prospěch, zatímco druhý není prospěchem prvního organismu ovlivněn (Mitchell et al. 1969; Walshaw & Evans 1987). Zároveň jsou prachoví roztoči považováni za jediné, kteří v evoluci přešli zpět od parazitismu ke komenzálnímu způsobu života. Podporou této teorie je fylogenetická analýza pomocí morfologických a molekulárních znaků, ze které vychází, že všechny nejbližší příbuzné skupiny (např. Onychalginae, Psoroptidae atd.) jsou parazitické (Klimov & OConnor 2013). Prachoví roztoči se vyskytují celosvětově a žijí v těsné blízkosti člověka. Nejčastěji je můžeme najít v postelích, čalouněném nábytku a koberecích. Zásadní problém v přežití v tomto prostředí bylo hospodaření s vodou. V matracích dochází často k velkým změnám ve vlhkosti. Vlhkost závisí na teplotě okolí, pocení člověka a i na stlání peřin. Na tyto změny jsou prachoví roztoči připraveni díky žlázám na bázi prvního páru nohou (Wharton et al. 1979). Žlázy jsou plné roztoku

chloridu sodného a chloridu hořečnatého. Díky nim dochází k vycytávání vlhkosti ze vzduchu a při poklesu vzdušné vlhkosti vytvoří chloridy krystaly a tím zabrání ztrátě vody (Colloff 2009). Životní cyklus roztočů zahrnuje vajíčko, larvu, nymfální stádia a dospělé. Délka jejich vývojového cyklu je silně závislá na teplotě (Gamal-Eddin et al. 1983; Colloff 2009) a vlhkosti ovzduší (Hart et al. 2007). Při 25 °C a 75% relativní vlhkosti jsou schopni dospět za 3 až 4 týdny. Dospělci poté přežívají až 6 týdnů, během nichž samice vyprodukuje 40–60 vajíček. Vývojový cyklus jedince je ale velmi odlišný od vývoje a populačního růstu v komůrkách v laboratorních podmínkách.



Obrázek 1 Samice *Dermatophagoides farinae*

V přirozeném prostředí poskytují výživu roztočům zbytky kůže, vlasy a nehty (Colloff 1998). Nicméně přesná potravní strategie prachových roztočů stále není objasněna. Z lidské kůže se během dne odlupují miliony pokožkových buněk, na kterých jsou široká spektra mikroorganismů (Brandwein et al. 2016). O důležitosti bakterií v potravě svědčí i fakt, že roztoči nejsou schopni přežít na sterilní kůži (van Bronswijk & Sinha 1973).

## 2.2. Mikroorganismy a prachoví roztoči

Mikrobiální profil jednotlivých druhů prachových roztočů se liší (Kim et al. 2018; Hubert et al. 2019b). Odlišnosti lze pozorovat i v rámci jednoho druhu v závislosti na stáří populace nebo na úrovni různých kultur jednoho druhu (Hubert et al. 2019b). Nejasnosti jsou stále i ve stylu přenosu bakterií a osidlování zažívacího traktu bakteriemi. Symbiotické bakterie jsou často přenášeny vertikálně z matky na potomka přes vajíčko. U bakterií v zažívacím traktu se tento přenos nepředpokládá. U členovců často dochází k přenosu těchto bakterií tzv. koprofágií (Sudakaran et al. 2012; Rahman et al. 2015).

Koprofágie je potravní strategie, kdy se juvenilní stádia živí na nestrávených zbytcích potravy a exkrementech a díky tomu dochází k osídlení zažívacího traktu mikroorganismy od dospělců (Weiss 2006). Symbiotické bakterie žijící v zažívacím traktu saprofytických roztočů byly zkoumány pro svojí schopnost trávit celulózu (Stefaniak & Seniczak. 1976). V práci Barabanova & Želtikova (1985) se tvrdí, že za celulázovou aktivitou prachových roztočů stojí právě střevní symbiotické bakterie. Navíc byly popsány i bakterie se schopností trávit keratin z peří ptáků (Lucas et al. 2003). V předchozích pracích se podařilo z těla roztočů vyizolovat bakterie rodu *Bacillus*, *Micrococcus* a *Staphylococcus* (Valerio et al. 2005; Lee et al. 2019).

Na rozdíl od *D. pteronyssinus* je *D. farinae* osídlen endosymbiotickou bakterií *Cardinium* (Hubert et al. 2019b). *Candidatus Cardinium* je bakterie z třídy Bacteroidetes, která je zodpovědná za změny pohlaví u členovců. Nachází se v reprodukční soustavě a u infikovaných jedinců způsobuje cytoplazmatickou inkompatibilitu, partenogenezi a feminizaci (Zchori-Fein & Perlman 2004). Ačkoliv jsou tyto procesy podrobně popsány u jiných členovců, vliv bakterie *Cardinium* na roztoče nebyl doposud pozorován.

Častým obyvatelem prostředí v těsné blízkosti člověka jsou mikroskopické houby (tj. vláknité houby a kvasinky). Předchozí studie ukazují na důležitost kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v potravě roztoče (Andersen 1991). Kvasinka *S. cerevisiae* se stala základní složkou diety pro laboratorní účely. Další hojně zastoupenou kvasinkou, kterou můžeme v roztočích najít, je rod *Candida* (Hubert et al. 2019b). Nové studie ukazují, že se v prachových roztočích vyskytuje i kvasinka rodu *Malassezia* (Molva et al. 2019). Kvasinka *Malassezia* žije v kůži člověka a dalších teplokrevných živočichů. Je tak součástí společenstva mikroorganismů, které se nacházejí na odumírající pokožce. *Malassezia* může u člověka způsobovat kožní problémy a v extrémních případech až systémové infekce (Prohic et al. 2016).

Vláknité houby rovněž přichází do kontaktu s roztoči. Houby poskytují roztočům vitamíny a steroly (de Saint Georges-Grédelet 1987). Bylo pozorováno, že některé houby mají pozitivní vliv na populační růst roztočů. Patří mezi ně *Eurotium amstelodami* (syn. *Aspergillus amstelodami*), *Aspergillus penicillioides* a *Wallemia sebi* (van Bronswijk & Sinha 1973; Lustgraaf 1978a). *Alternaria alternata*, *Cladosporium sphaerospermum* a *Wallemia sebi* byly navíc roztoči preferovány v preferenčních testech a jsou považovány za chutné houby pro prachové roztoče. Naopak *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus*

*versicolor* a *Stachybotrys chartarum* byly na základě těchto testů posouzeny jako odpudivé pro roztoče (Naegele et al. 2013).

Existují ovšem i mikroorganismy, u kterých pozitivní vliv nebyl pozorován a jsou potencionálně akaropatogenní, např. *Lysinibacillus (Bacillus) sphaericus* prodloužil dobu dospívání u *D. pteronyssinus* (van Bronswijk & Sinha 1973; Saleh et al. 1991; Hay et al. 1992a). Nejběžnějšími mikroorganismy v roztočích jsou bakterie rodu *Staphylococcus*, *Kocuria*, kvasinky *Candida* a *Saccharomyces*, která je zároveň součástí diety roztočů, a vláknité houby *Aspergillus*, *Peniciloides*, *Cladosporium* a *Mucorales* (Davies 1960; Galikejev 1965; Lustgraaf 1978b; Hay et al. 1992b; Hubert et al. 2019b).

Potravní strategie prachových roztočů není doposud zcela prozkoumána. Dříve uznávaná představa, že se roztoči živí kůží, vlasy a nehty, není úplně správná. V posledních výzkumech se do popředí z hlediska výživy roztočů dostávají stále častěji mikroorganismy, které na kůži žijí a následně se jejich zbytky vyskytují i v exkrementech. Proto je tato práce zaměřena na vztahy prachových roztočů a mikroorganismů.

### 2.3. Prachoví roztoči: původci alergenních onemocnění

Význam prachových roztočů pro člověka spočívá v produkci alergenů. Alergeny jsou biologicky aktivní látky, ve většině případů bílkovinné povahy. Míra reakce na tyto látky závisí na typu látky, množství látky a době a místu expozice. Alergie vzniká v důsledku poruchy imunitního systému. Při kontaktu s alergenem dojde k přehnané reakci imunitního systému. Alergenní látky mohou být rozděleny do několika skupin na základě jejich biochemické aktivity. Nejvýznamnější skupinou jsou hydrolytické enzymy. Mezi hydrolytické enzymy patří například proteázy, které jsou klinicky nejčastější příčinou alergií (Stewart & Thompson 1996). Další skupiny zahrnují inhibitory enzymů a transportní proteiny a regulační proteiny. Jen u *D. farinae* bylo v červenci 2019 charakterizováno 35 alergenních látek se známou funkcí a u *D. pteronyssinus* je v červenci 2019 známo 30 alergenních látek se známou funkcí (WHO/IUIS 2019).

Alergenní látky z těl prachových roztočů se kumulují v trusu roztočů a trus se následně nachází ve velkém množství v roztoči kontaminovaném prostředí (Stewart & Thompson 1996). Roztoči tvoří ve své zažívací soustavě potravní balíčky, které následně vylučují. Tyto balíčky se začínají vytvářet ve středním střevu, kde se zbytky potravy vlivem dehydratace a odumírání živých buněk začínají shlukovat. Následně dojde k obalení balíčku peritrofickou matrix a vyloučení z těla. V takto vytvořeném trusu je

nashromážděno velké množství enzymů a biologicky aktivních látek, které se po vyloučení a rozpadu balíčku dostávají do prostředí, a poté mohou aktivovat imunitní odpověď člověka. Nejznámějším enzymem vyskytujícím se v trusu je cysteinová proteáza Der p 1 (Colloff 2009).

Příčinou alergie na roztoče nicméně nejsou pouze enzymy, které produkují roztoči přímo. Ukazuje se, že alergickou reakci vyvolávají i lipopolysacharidy a beta-glukany, které se vyskytují v trusu roztočů jakožto pozůstatek po bakteriích a houbách v jejich potravě (Jacquet 2011). Další látkou vyvolávající alergické reakce u senzitivních lidí je chitin, který lze nalézt jak v těle roztoče jakožto součást kutikuly, tak i v exkrementech, kam se dostává buď jako zbytek peritrofitické membrány nebo zbytek buněčné stěny hub (Gregory & Lloyd 2011). Z tohoto důvodu jsou významným zdrojem alergenů i mrtvá těla roztočů.

## 2.4. Vakcíny a produkce roztočů pro imunomodulace

Prachoví roztoči jsou chováni v laboratorních podmínkách na produkci vakcín sloužících k zmírnění alergické reakce na prachové roztoče. V současné době existuje několik komerčních producentů (např. ALK, Hørsholm, Dánsko nebo Stallergenes, Antony, Francie). Vakcíny jsou vyráběny z živých i mrtvých těl roztočů a exkrementů, kde je koncentrace alergenu nejvyšší. Zde se nachází také mikroorganismy, které jsou schopny u člověka rovněž vyvolávat alergické reakce. Alergeny jsou poté využívány v imunoterapii na tzv. imunologické desenzibilizaci (Batard et al. 2006; Chang et al. 2009). Desenzibilizace je proces, kdy se citlivý člověk vystavuje alergenu a postupně si na něj zvyká, až dojde k omezení přehnané imunitní reakce na potřebnou míru (Larche 2000).

Při produkci roztočů v laboratorních podmínkách dochází v komůrkách s prachovými roztoči ke třem základním růstovým fázím populace roztočů. Během první dochází k mírnému nárůstu populace, v druhé je růst výrazně rychlejší a během třetí dochází k postupnému odumírání populace roztočů (Eraso et al. 1998). Během těchto fází dochází také k různé intenzitě produkce alergenů. Nejvyšší produkce je během růstové fáze (Eraso et al. 1997b). Odumírání roztočů by mohlo být způsobeno akaropatogenní bakterií, nicméně během předchozích pokusů nebyla žádná taková bakterie charakterizována. Doposud nebylo zjištěno, z jakého důvodu dochází k odumírání roztočů po určité době.

Předchozí práce uvádí rozdílné zastoupení a skladbu proteinů v rámci různých růstových fází (Eraso et al. 1997a). Odlišnosti v různě staré dietě jsou patrné i vizuálně (obrázek 2).



Obrázek 2 Komůrka s jeden měsíc starým (nahore) a tři měsíce starým (dole) chovem roztoče *D. pteronyssinus*.

Tato práce byla zaměřena na mikroorganismy obsažené v zbytkovém růstovém médiu (SPGM), které by mohly mít vliv na životaschopnost roztoče. Z tohoto důvodu bylo SPGM odebráno ve dvou různých časech, které zachycují růstovou a odumírající fázi.

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Roztoči

*Dermatophagoides pteronyssinus* a *Dermatophagoides farinae* byli uchováváni v komůrkách o objemu 70 ml (IWAKI flasks; katalogové číslo 3100-025; Sterilin, Newport, Spojené království). Komůrky byly uloženy v exikátoru při teplotě  $25 \pm 1$  °C a relativní vlhkosti 75 %. Vlhkost byla udržována pomocí nasyceného roztoku NaCl. K pokusům byl použit laboratorní chov *D. farinae*, který byl získán ze Slezské univerzity v Katovicích v roce 2005 od prof. Krzysztofa Solarze. Chov *D. pteronyssinus* byl získán v roce 2012 z firmy v Třeboni od RNDr. Alexandra Zgarbovského. Tato firma se zaměřuje na imunodiagnostiku a produkci alergenů a vakcín. K obnově chovů dochází

měsíčně tak, že je vybráno okolo 5 000 jedinců ze starého chovu, který se nachází v exponenciální fázi růstu, a přeneseno do nové komůrky s 0,5 g nové diety.

Roztoči byli krmeni potravou (HDMd), která je složena z krmiva pro psy, pšeničných klíčků, sušeného krmiva pro ryby, sušeného droždí – mauripan a želatiny, dle receptu z tabulky 1. Potrava byla rozmixována a vystavena teplotě 70 °C na půl hodiny (Erban & Hubert 2008).

*Tabulka 1* Složení kontrolní diety

Složka	Hmotnost (g)
Krmivo pro psy	30
Pšeničné klíčky	30
Rybí potrava	10
Sušené droždí (mauripan)	6
Želatina	3

### 3.2. Příprava extraktu ze zbytkového růstového média

Pro přípravu SPGM bylo založeno 12 komůrek pro každý druh z dlouhodobých chovů. Do každé komůrky bylo vloženo okolo 5000 roztočů a 0,5 g diety. Z šesti komůrek bylo odebráno SPGM po jednom měsíci a šest komůrek bylo necháno tři měsíce a poté bylo odebráno SPGM. SPGM z 6 komůrek bylo smícháno a přeneseno do sterilní kádinky.

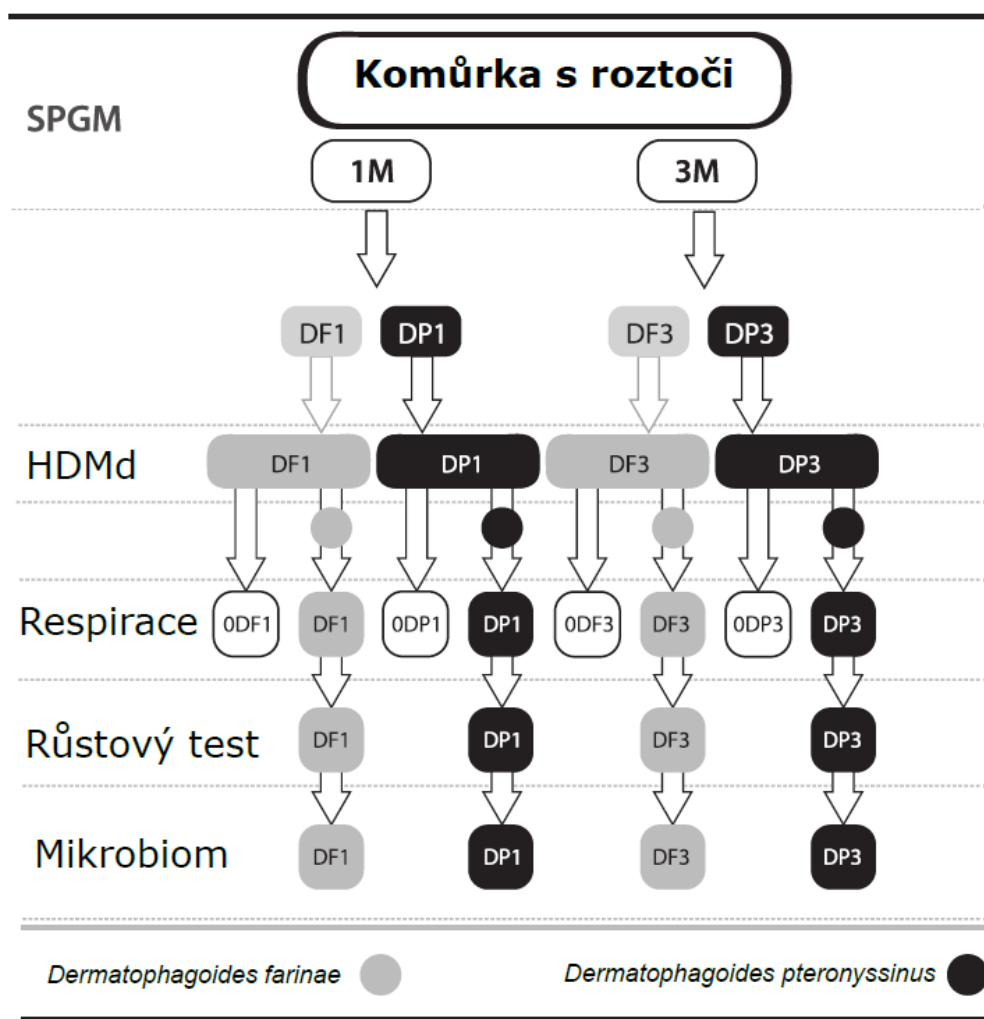
Do kádinky bylo přidáno 50 ml sterilizovaného fosfátového pufru (PBST). Fosfátový pufr byl připraven podle tabulky 2. Poté byl obsah kádinky přefiltrován přes 40 µm síto (Falcon® 40 µm Cell Strainer) a centrifugován 5 minut při 845 g. Pelet byl znovu rozmíchán v PBST a centrifugován stejně, jako v předchozím kroku. Vyčištěný sediment byl rozpuštěn v 10 ml PBST a použit pro přípravu obohacené diety extrakci DNA.

Tabulka 2 Složení fosfátového pufru (PBST)

Chemikálie	Množství
NaCl	8,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
KCl	0,2 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml
Tween 20 <sup>®</sup> detergent	0,5 ml

Diety se zbytkovým růstovým médiem byly připraveny ze standardní diety (HDMd) (10 g) a 4 ml extraktu. Tato směs byla opět promíchána a usušena ve vakuu. Následně byly s dietou prováděny experimenty dle schématu (obrázek 3).





Obrázek 3 Design experimentu.

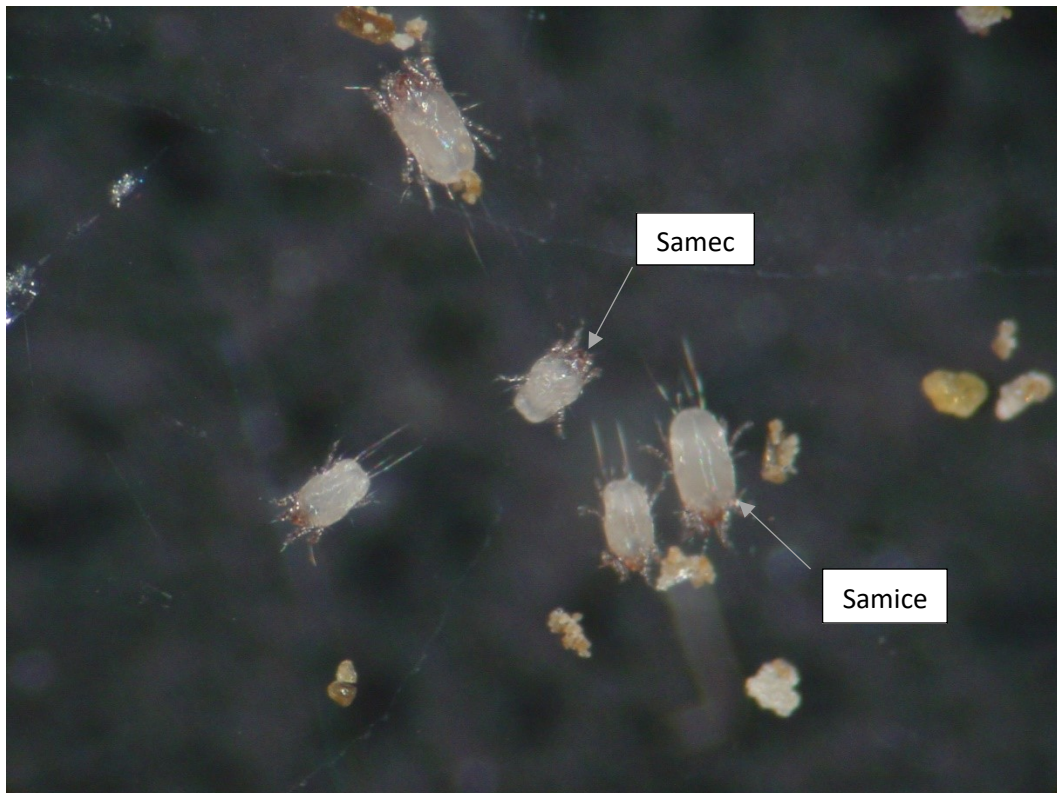
Do takto připravené diety byli vloženi prachoví roztoči. Na všech kulturách byla změřena respirace, která měla za cíl určit stabilitu mikroorganismů v kultuře a aktivitu roztočů na těchto dietách. Následně byl stanoven populační růst, který byl zaměřen na vhodnost diety pro rychlost vývoje a reprodukci roztočů, a byla provedena detekce mikrobiomu roztočů, která zjistila spektrum mikroorganismů v prachových roztočích a změny v rámci různě starého SPGM. Pokusy byly prováděny nejdříve bez roztočů, poté s roztoči na kontrolní dietě a až následně s obohacenou dietou za přítomnosti roztočů (viz obrázek 3).

### 3.3. Populační růst

Nárůst populace za konkrétní čas byl sledován na všech typech diety. Předpokládá se, že na vhodnější dietě se bude roztoči lépe dařit a bude se více a rychleji množit, a proto za

časový úsek bude na vhodnější dietě vyšší počet roztočů (Matsumoto 1965). Naopak v případě, že by byla do diety přidána nevhodná složka potravy nebo by byla tato složka patogenní pro roztoče, nárůst populace roztoče by byl nižší či minimální. Počet roztočů po ukončení experimentu vyjadřuje vhodnost dané diety s přidaným mikroorganismem pro populaci prachových roztočů.

Do komůrky s obohacenou dietou (hmotnost diety  $0,01 \text{ g} \pm 0,005 \text{ g}$  (MS Mettler-Toledo, Greifensee, Švýcarsko)) bylo vloženo 50 jedinců (40 samic a 10 samců (viz obrázek 4)) a ponecháno 21 dní v exikátoru růst a množit se (při  $25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$  za relativní vlhkosti 75 %). Po této době byl obsah komůrky zalit 10 ml Oudemansova roztoku (tabulka 3).

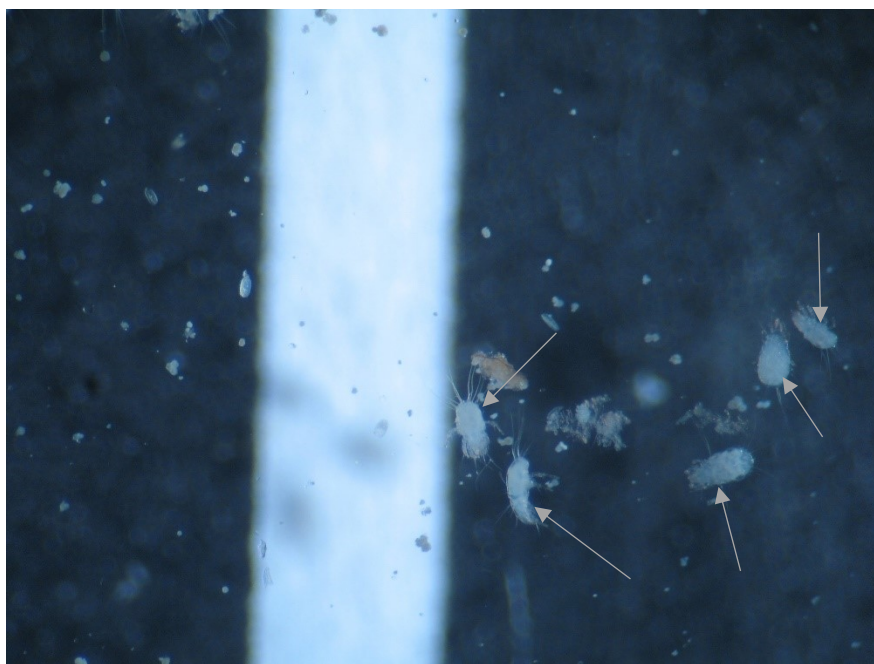


Obrázek 4 Vybírání prachových roztočů z komůrky. Šipky ukazují samce a samice *D. farinae*

Tabulka 3 Složení Oudemansova roztoku (Green 2001)

Složka	Poměr jednotlivých složek
70% Ethanol	87 mL
Kyselina octová	8 mL
Glycerol	5 mL

Dospělci a nymfální stádia roztočů z každé komůrky byli spočítáni třikrát v objemu 1 ml. Mililitr obsahu komůrky byl přenesen pomocí pipety na Petriho misku a roztoči byli počítáni pod binokulárním stereomikroskopem (obrázek 5). Z těchto tří technických opakování byl učiněn průměr. Pro každý druh roztoče s příslušnou dietou bylo založeno 12 komůrek, tzn. 12 opakování pro každý pokus.



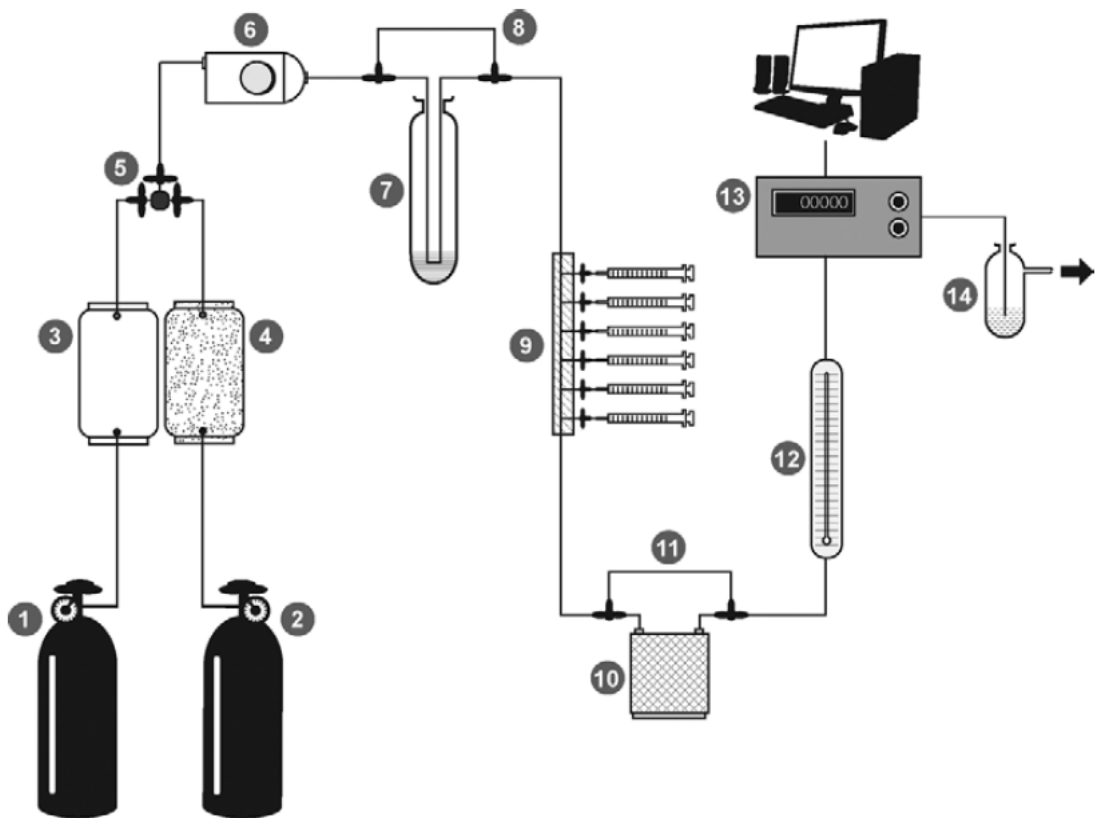
Obrázek 5 Počítání roztočů pod binokulárním stereomikroskopem. Jednotliví roztoči jsou označeni šipkou.

### 3.4. Respirace

Respirace byla měřena jako množství  $\text{CO}_2$ , které systém vyprodukuje za určitý čas. K detekci  $\text{CO}_2$  v systému byl použit plynový analyzátor IRGA, který detekuje plyn pomocí infračerveného záření a aparatura (katalogové číslo RP1LP, Qubit Systems, Kingston, ON, Kanada).

Do komůrky s příslušnou dietou (hmotnost  $0,01\text{g}\pm 0,005\text{ g}$  (MS Mettler-Toledo, Greifensee, Švýcarsko)) bylo vloženo 50 roztočů (40 samců a 10 samic) a komůrky byly

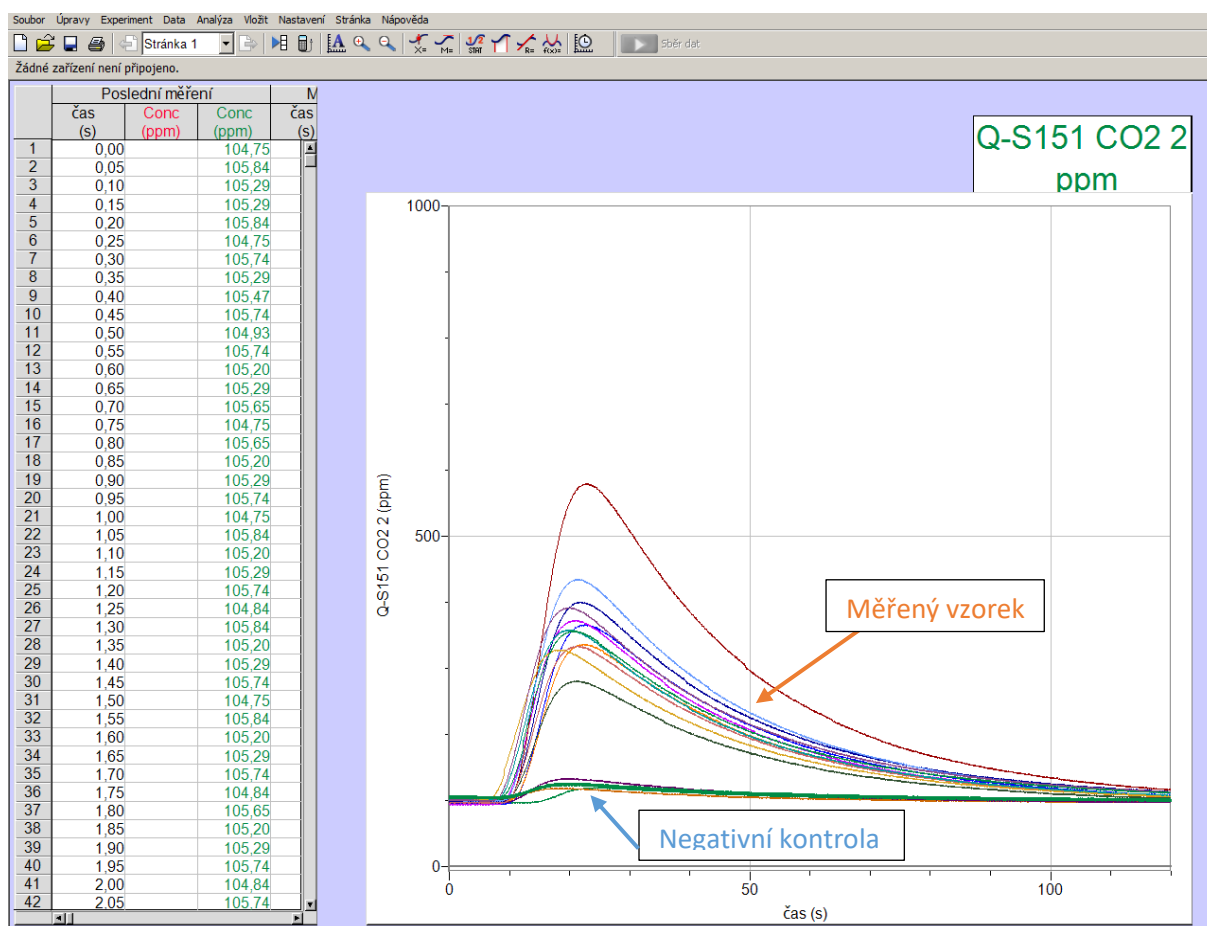
inkubovány 7 dní v exikátoru (relativní vlhkost 75 %,  $25 \pm 1$  °C). Stříkačka (B. Braun, Omnifix®-F objem 1 ml, kód 9161406V) byla ze spodu uzavřena kouskem navlhčeného srolovaného filtračního papíru, aby nedošlo k proniknutí roztočů a diety do aparatury a zároveň se ve stříkačce udržela vlhkost na přijatelné úrovni pro roztoče. Dieta s roztoči byla vysypána na navažovací lodičku a zvážena na analytických vahách. Následně byla dieta s roztoči přenesena z lodičky do stříkačky pomocí štětečku a trychtýře, aby nedocházelo ke ztrátám při přesypání. Stříkačka byla uzavřena na objemu 0,2 ml. Takto připravené stříkačky byly zapojeny do respirometru pomocí trojcestného ventilu (katalogové číslo S7521, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Spojené státy), který lze uzavřít vždy pro jeden směr. Způsob zapojení je zobrazen na obrázku 6.



Obrázek 6 Schéma respirometru (Hubert et al. 2010). 1 – stlačený CO<sub>2</sub>; 2 – stlačený syntetický vzduch; 3 – nádoba na CO<sub>2</sub> ke kalibraci; 4 – nádoba na syntetický vzduch; 5 – trojsměrný ventil; 6 – vzduchová pumpa; 7 – promývačka; 8 – odklon od promývačky; 9 – zapojené stříkačky; 10 – sušička vzduchu; 11 – odklon od sušičky vzduchu; 12 – průtokový měřič; 13 – IRGA-CO<sub>2</sub> senzor; 14 – výstupní promývačka se silikonovým olejem.

K respirometru bylo zapojeno vždy 16 stříkaček, z toho bylo 12 se sledovanou dietou a 4 prázdné, které sloužily jako negativní kontrola. Negativní kontrola byla umístěna vždy před a za šestici stříkaček se sledovanou dietou. Po ustanovení stabilní

koncentrace CO<sub>2</sub> v systému se začalo s výměnou vzduchu ve stříkačkách a to tak, že píst u první stříkačky byl otočen ve směru příchodu syntetického vzduchu (Linde, 80 % N<sub>2</sub>, 20 % O<sub>2</sub>) a nasán na objem 1 ml. Poté byl vzduch vytlačen ve směru k analyzáru až na hodnotu 0,1 ml. Poté znovu nasán syntetický vzduch na 1 ml a na závěr byl vytlačen vzduch ze stříkačky na objem 0,6 ml (inkubační objem). Takto připravené stříkačky byly vloženy na dvě hodiny do termostatu (26 °C±0,5 °C). Následně byly opět připojeny na respirometr. Vždy bylo nutné vyčkat až se hladina CO<sub>2</sub> v respirometru ustálí. Otevřením systému z důvodu zapojení stříkaček k respirometru dochází k nasání vzduchu, a tudíž se musí zajistit nejprve návrat hladiny CO<sub>2</sub> na původní hladinu. Následně byl trojcestný ventil otevřen a píst stlačen na 0,1 ml. Měřený objem by tedy 0,5 ml. Zapnutý analyzář změřil koncentraci procházejícího CO<sub>2</sub> za 120 s. Tento postup byl opakován postupně pro všechny stříkačky. Po 120 s klesla ve všech případech koncentrace CO<sub>2</sub> v systému na počáteční úroveň (obrázek 7). Měření bylo prováděno pomocí softwaru LoggerPro3 (Vernier, Beaverton, OR, Spojené státy). Od naměřených hodnot byla odečtena průměrná hodnota z dvou negativních kontrol. Výsledná koncentrace byla přepočítána na μL CO<sub>2</sub> za hodinu na miligram testované diety. Během předchozího měření bylo zjištěno, že produkce CO<sub>2</sub> samotných roztočů bez diety za 2 hodiny je zanedbatelná, proto tento pokus vypovídá o stavu diety a aktivitě mikroorganismů v ní (Hubert et al. 2010).



Obrázek 7 Měření průtoku CO<sub>2</sub> přes senzor. Graf vyneseny programem LoggerPro3.

### 3.5. Extrakce DNA

Roztoči byly odebrány pomocí štětečku z povrchu a víčka komůrky. Na štětečku byli přeneseni do Eppendorf zkumavky (1,5 ml), povrchově omyti etanolem a následně byl etanol vyměněn za destilovanou vodu. Roztoči byli ve zkumavce zhomogenizováni pomocí plastového tloučku zapojeného na elektrické vrtačce ve 100  $\mu$ l destilované vody. Po homogenizaci byla přidána malá kopistka Chelexu 100 (katalogové číslo C7901, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Spojené státy). Směs byla následně zahřáta na 100  $^{\circ}$ C po dobu deseti minut. Poté byly zkumavky centrifugovány 1 minutu při 8 000 g (centrifuga CL31R, ThermoScientific). K získání DNA byl v dalších pokusech použit supernatant.

### 3.6. Amplifikace DNA

Bakteriální DNA byla zmnožena pomocí primerů CS1\_515F (5'-ACACTGACGACATGGTTCTACAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') a CS2\_806R (5'-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), které byly zaměřeny na V4 oblast 16S rRNA genu (Caporaso et al. 2012). Pro zmnožení DNA z hub byly použity primery CS1\_FF390 (5'-ACACTGACGACATGGTTCTACACGWTAACGAACGAGACCT-3') a CS2\_FR1 (5'-ACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA/I/CCATTCAATCGGTA/I/T-3') (Chemidlin Prévost-Bouré et al. 2011), které cílily na 18S rRNA genu. DNA byla namnožena polymerázou Takara Ex Taq DNA a připravenou směsí (katalogové číslo RR001A, Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, Francie). Reakce byla prováděna v 25 $\mu$ L. Reakční směs na jeden vzorek zahrnovala 1  $\mu$ L F primeru (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L R primeru (10  $\mu$ M), 17,375  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ L nukleotidů, 0,125  $\mu$ L polymerázy a 2,5  $\mu$ L pufru. Do reakce byl přidán 1  $\mu$ L supernatantu z homogenátu. Negativní kontrola byla provedena reakcí s 1  $\mu$ L destilované vody místo DNA z roztočů. Připravená směs byla promíchána a vložena do cykleru (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad).

Samotná polymerázová řetězová byla pro bakteriální DNA zahájena iniciační fází (5 minut při 95 °C. Následovalo 30 cyklů amplifikační fáze (30 sekund při 95 °C, 45 sekund při 55 °C, 30 sekund při 72 °C) a celá reakce byla ukončena terminační fází (7 minut při 72 °C). Pro houbovou DNA byla polymerázová řetězová reakce provedena následovně: Iniciační fáze (8 minut při 95 °C), 30 cyklů amplifikační fáze (30 vteřin při 95 °C, 45 vteřin při 50 °C, 2 minuty při 68 °C) a terminační fáze (10 minut při 72 °C)

### 3.7. Gelové elektroforéza

Produkty byly vizualizovány na gelové elektroforéze. Gel byl připraven z 0,8 g agarózy (Lonza SeaKem®LE agaróza 500g (katalogové číslo 50004, Lonza, Spojené státy)) a 80 ml pufru na elektroforézu (ROTIPHORESE® Pufr 50 $\times$ TAE, (katalogové číslo R.CL86.2, CARL ROTH, Německo)). Směs byla zahřáta a rozmíchána v roztoku. Následně bylo přidáno 5  $\mu$ L SYBR® Safe DNA Gel Stain (katalogové číslo S33102, Invitrogen, Spojené státy). Směs byla nalita do vany na elektroforézu (horizontální Mini Gel systém B1A, (katalogové číslo B1A, Thermo Scientific™, Spojené státy)). Prvním vzorkem byl vždy standard (ZipRuler™ Express DNA Ladder Set (katalogové číslo SM1373, Thermo Scientific™, Spojené státy)). Z našich vzorků byly odebrány vždy 4  $\mu$ L a smíchány s 1  $\mu$ L barvičky (PCR vkládací pufr Yellow load (katalogové číslo P065, Top-Bio, Česká republika)). Takto připravené vzorky byly nanесeny na gel. Elektroforéza probíhala 20

min při 100 V (zdroj: Thermo Scientific™). Zbytek z každého vzorku byl uchován při 20 °C.

### 3.8. Zpracování sekvencí

Amplifikované vzorky byly odeslány do laboratoře v Chicagu (Research Resources Center, Univerzita Illinois), kde byly sekvenovány na přístroji Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, Spojené státy). Antiparalelní vlákna byla spojena a upravena pomocí programů MOTHUR 1.39.5 a UPARSE 10. Použity byly metody a programové příkazy popsané v pracích Kozich et al. (2013) a Sagova-Mareckova et al. (2017). Tento algoritmus vylučoval chiméry a mitochondriální a plastidovou DNA. Operačně taxonomické jednotky (OTUs) byly charakterizovány na základě 97% podobnosti sekvencí. Identifikace operačně taxonomických jednotek (OTUs) byl proveden podle Ribosomal Database Project s předpřipravenou databází číslo 15 a Silva128 (Quast et al. 2013). Navíc pro každou operačně taxonomickou jednotku byla reprezentativní sekvence porovnána s databází sekvencí v GenBanku pomocí BLASTn (NCBI 2019). Bakteriální sekvence zastoupené méně než 1 000 Illumina čteními (reads) v celkovém souboru byly odstraněny. Tím bylo odebráno cca méně než 3 % sekvencí. Houbové sekvence byly ponechány všechny, které se podařilo taxonomicky zařadit. Následně byla data standardizována pomocí přepočtení na 5 000 čtení na vzorek a operačně taxonomické jednotky byly znázorněny pomocí Krona zobrazení (Ondov et al. 2011).

Originální sekvence byly uloženy do GenBanku, jako SRA bioprojekt PRJNA449428 (SRP139166). Přehled jednotlivých sekvencí je uveden v příloze 1.

### 3.9. Analýza dat

Získaná standardizovaná data byla analyzována v programu PAST (Hammer et al. 2001) a XLSTAT (Addinsoft, New York, NY, Spojené státy). Jako testované proměnné byly druhy roztočů (*D. farinae* a *D. pteronyssinus*) a experimentální dieta (kontrolní diety, dieta s 1 měsíc starým SPGM a dieta s tři měsíce starým SPGM). Data byla programem převedena do Brayovy–Curtisovy matice (Bray & Curtis 1957) podle vzorce na obrázku 8. Vliv těchto faktorů na beta diverzitu byl sledován pomocí permutační analýzy variance (PERMANOVA) pro data v Brayově–Curtisově matici s využitím 10 000 permutací. Byla využita dvoufaktorová PERMANOVA (Anderson 2001) a v dalším kroku byla data rozdělena pro jednotlivé druhy zvláště s využitím jednofaktorové PERMANOVA. Následně byla provedena párová porovnání (pairwise-test) s využitím Bonferroniho



korekce. Poté byla podobnost vzorků zobrazena pomocí mnohorozměrného nemetrického škálování (NMDS). Podobnost je znázorněna v příloze 3. Gama diverzita byla vyhodnocována pomocí analýzy METSATATS (White et al. 2009) v programu MOTHUR pro data rozdělená pro jednotlivé druhy a stejné proměnné jako v předchozí analýze.

$$d_{jk} = 1 - \frac{\sum_i |x_{ji} - x_{ki}|}{\sum_i (x_{ji} + x_{ki})}$$

Obrázek 8 Vzorec Brayovy–Curtisovy matice.  $d_{jk}$  – rozdílnost j a k, i- index proměnných

Výsledná data z respirace a populačního růstu byla dekadicky zlogaritmována a analyzována pomocí neparametrického Kruskalova–Wallisova testu s Dunnettovým párovým (pairwise) porovnáním po Bonferroniho korekci. Tyto operace byly provedeny v programu PAST.

## 4. Výsledky

### 4.1. Mikrobiom

Mikrobiální složení vzorků prachových roztočů na všech dietách i mikrobiální složení SPGM bylo zjištěno na základě sekvenace a následně vizualizováno pomocí KRONA zobrazení (příloha 2). Standardizovaná data použitá pro další analýzy zahrnovala 14 OTU bakterií a 12 OTU hub. Mikroorganismy byly určeny na základě referenčních sekvencí bakterií a hub v databázi GenBank s výjimkou rodu *Cardinium*, který bylo určeno porovnáním s celou 16S RNA sekvencí genu z tohoto roztoče. Přehled OTU společně s jejich podobnostmi se sekvencemi v GenBank jsou uvedeny v tabulce 4 a 5. Nižší podobnost sekvence s referenčními sekvencemi v GenBanku než 99 % byla dosažena pouze u OTU 5 a FOTU13. OTU byla označena za *Serratia marcescens* s podobností 94 %. Tuto OTU lze zařadit do čeledi Enterobacteriaceae. Zařazení do nižších taxonů je již problematické. FOTU 13 bylo určeno jako *Torulaspora delbrueckii* s podobností 96 % vůči referenční sekvenci v GenBanku.

Tabulka 4 Identifikované bakterie s kódy referenčních sekvencí v GenBanku.

OTU	Nejblíže podobný druh	Přístupové číslo	Podobnost
OTU1	<i>Staphylococcus arlettae</i>	NR_024664	100
OTU2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	NR_104927	100
OTU3	<i>Kocuria koreensis</i>	NR_116745	100
OTU4	<i>Cardinium</i> sp.	JN236360	100
OTU7	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	NR_114074	100
OTU6	<i>Pantoea rwandensis</i>	NR_118121	100
OTU5	<i>Serratia marcescens</i>	NR_114043	94
OTU9	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	NR_117064	100
OTU8	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	NR_074663	100
OTU12	<i>Sphingomonas alpina</i>	NR_117230	100
OTU11	<i>Bradyrhizobium manausense</i>	NR_133986	100
OTU13	<i>Lactobacillus aviarius</i>	NR_104979	100
OTU183	<i>Staphylococcus capitis</i>	NR_117006	100
OTU208	<i>Acinetobacter seifertii</i>	NR_134684	99

Tabulka 5 Identifikované mikroskopické houby s kódy referenčních sekvencí v GenBanku.

OTU	Nejblíže podobný druh	Přístupové číslo	Podobnost
FOTU2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MG101837	100
FOTU3	<i>Candida glucosophila</i>	AB013519	99
FOTU4	<i>Aspergillus penicillioides</i>	DQ985959	99
FOTU5	<i>Candida allociferrii</i>	AB536784	99
FOTU8	<i>Cladosporium</i> sp.	KU512834	99
FOTU13	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	XR_002431969	96
FOTU23	<i>Sporobolomyces jilinensis</i>	KJ708450	100
FOTU25	<i>Pleospora herbarum</i>	AY741244	99
FOTU33	<i>Cryptococcus</i> sp.	KM586996	99
FOTU35	<i>Cryptococcus</i> sp.	KT279435	99
FOTU36	<i>Phoma herbarum</i>	GU004245	100
FOTU37	<i>Fusarium oxysporum</i>	MF522223	100

## 4.2. Vliv SPGM na mikrobiom

Přidání SPGM do diety mělo různý vliv na mikrobiom jednotlivých druhů roztočů a lišilo se pro bakterie a houby. Složení bakteriálního mikrobiomu bylo ovlivněno druhem roztoče a stářím SPGM. Statisticky byl tento fakt testován dvoucestnou permutační analýzou (PERMANOVA). Statistické zhodnocení tohoto pokusu je uvedeno v tabulce 6. Pro každý druh zvlášť byla použita jednocestná PERMANOVA, a i zde byl vliv SPGM signifikantní (tabulka 6). Párové testy ukázaly, že u *D. farinae* se signifikantně liší

mikrobiom po přidání měsíc starého SPGM i tři měsíce starého SPGM od kontrolní situace. Avšak neliší se mikrobiom po přidání měsíc starého SPGM od mikrobiomu po přidání tři měsíce starého SPGM. Ačkoliv vliv SPGM dle jednofaktorového PERMANOVA testu signifikantně ovlivňovalo složení mikrobiomu u *D. pteronyssinus* (tabulka 6), párové testy tyto rozdíly nepoukázaly (tabulka 7).

Houbový profil mikrobiomu prachových roztočů nebyl přidáním SPGM do potravy statisticky významně pozměněn. Lze tedy pouze tvrdit, že se liší houbový profil *D. farinae* od *D. pteronyssinus* (viz tabulku 6), ale SPGM nemá na houbový profil statisticky signifikantní vliv.

*Tabulka 6* Porovnání vlivu SPGM na mikrobiom domácích prachových roztočů založené na jednocestné a dvoucestné permutační analýze (PERMANOVA). Testované proměnné byly druh roztoče a stáří SPGM. Analýza byla počítána v Brayově–Curtisově vzdálenosti. Statisticky významné hodnoty jsou tučně zvýrazněny.

Data set	Faktor	Df	F	P
Bakterie	Druh	1	<b>1,56</b>	<b>0,001</b>
	SPGM	2	<b>0,705</b>	<b>0,001</b>
	interakce	2	<b>0,007</b>	<b>0,02</b>
Bakterie-DF	SPGM	1	<b>5,021</b>	<b>0,002</b>
Bakterie-DP	SPGM	1	<b>4,171</b>	<b>0,024</b>
Houby	Druh	1	2,261	<b>0,023</b>
	SPGM	2	1,153	0,21
	Interakce	2	-0,62	0,15

**Legenda:** DF – *D. farinae*, DP – *D. pteronyssinus*; SPGM – roztoči z diety obohacené o extrakt ze zbytkového růstového média.

*Tabulka 7* Párové (pairwise) testování po Bonferroniho korekci mikrobiomu roztočů rostoucích na obohacené dietě o SPGM a na kontrolní dietě. F hodnota je uvedena nad diagonálou, P hodnota je ve spodní části. Statisticky významné hodnoty jsou vyznačeny tučně.

DF	DF3	DF1	DFC
DF3		1,995	<b>4,338</b>
DF1	0,3204		<b>10,92</b>
DFC	<b>0,0486</b>	<b>0,018</b>	
DP	DP3	DP1	DPC
DP3		2,675	2,387
DP1	0,3381		7,242
DPC	0,357	0,052	

**Legenda:** DF – *D. farinae*, DP – *D. pteronyssinus*; C – roztoči z kontrolní diety bez přidání SPGM, 1 – roztoči žijící na dietě obohacené o měsíc staré SPGM, 3 – roztoči žijící na dietě obohacené o SPGM staré tři měsíce.

V mikrobiomu obou prachových roztočů žijících na kontrolní dietě je vysoké zastoupení bakterie rodu *Lactobacillus* (OTU2). U *D. farinae* obohacením diety o SPGM došlo k redukci zastoupení této bakterie v mikrobiomu. U ostatních operačně taxonomických jednotek došlo k nárůstu zastoupení v mikrobiomu v důsledku obohacení diety o SPGM. K výraznému nárůstu došlo u bakterií rodu *Staphylococcus* (OTU1), *Sphingomonas* (OTU12) a *Acinetobacter* (OTU7). Rozdíly jsou patrné z tabulky 8, kde je uvedeno průměrné zastoupení bakterie ve vzorku a statistické porovnání kontrolní diety s obohacenou.

Z hlediska osídlení houbovými organismy se jednotliví roztoči liší, nicméně přidáním SPGM nedošlo k změně zastoupení hub v mikrobiomu (tabulka 6). Nejčastěji zastoupeným mikroorganismem byl *S. cerevisiae* (FOTU2). Rozdíly mezi jednotlivými druhy byly způsobeny *A. penicillioides* (FOTU4). Houbové složení mikrobiomu SPGM se liší od houbového profilu roztoče. V SPGM roztoče *D. farinae* je řídko zastoupen druh *S. cerevisiae* a početně výrazně zastoupen rod *Candida* (FOTU3). Složení SPGM *D. pteronyssinus* je charakteristické opět vysokým zastoupením *Candida* (FOTU5) a zároveň *A. penicillioides* (FOTU4) (příloha 2).

Tabulka 8 Výsledky analýzy METASTATS mikrobiomu *D. farinae*. Statisticky významné hodnoty jsou vyznačeny tučně.

OTU	Druh	DFC		DF1		DF3		DFC/DF1	DFC/DF3
		průměr	stderr	průměr	stderr	průměr	stderr	p-hodnota	p-hodnota
Otu1	<i>Staphylococcus arlettae</i>	0,022	0,011	0,102	0,012	0,089	0,026	<b>0,001</b>	<b>0,014</b>
Otu2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0,809	0,101	0,143	0,081	0,315	0,101	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>
Otu3	<i>Kocuria korensis</i>	0,016	0,015	0,010	0,007	0,013	0,007	0,821	0,895
Otu4	<i>Cardinium</i> sp.	0,090	0,059	0,303	0,091	0,041	0,013	<b>0,037</b>	0,524
Otu7	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	0,004	0,001	0,108	0,054	0,158	0,079	<b>0,041</b>	<b>0,048</b>
Otu6	<i>Pantoea rwandensis</i>	0,017	0,006	0,054	0,009	0,105	0,060	<b>0,003</b>	0,135
Otu5	<i>Serratia marcescens</i>	0,000	0,000	0,068	0,051	0,069	0,069	0,188	0,386
Otu9	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	0,013	0,003	0,050	0,038	0,088	0,036	0,383	<b>0,034</b>
Otu8	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002	0,812	0,739
Otu12	<i>Sphingomonas alpina</i>	0,003	0,001	0,071	0,032	0,021	0,006	<b>0,026</b>	<b>0,004</b>
Otu11	<i>Bradyrhizobium manausense</i>	0,017	0,006	0,049	0,012	0,037	0,017	<b>0,017</b>	0,311
Otu13	<i>Lactobacillus aviarius</i>	0,004	0,003	0,026	0,018	0,029	0,011	0,237	<b>0,019</b>
Otu183	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,001	0,001	0,003	0,001	0,006	0,003	0,104	0,178
Otu208	<i>Acinetobacter seifertii</i>	0,001	0,001	0,010	0,005	0,026	0,019	0,100	0,191

**Legenda:** **DFC** – *D. farinae* žijící na kontrolní dietě. **DF1** – *D. farinae* žijící na dietě obohacené o jeden měsíc staré SPGM. **DF3** – *D. farinae* žijící na dietě obohacené o tři měsíce staré SPGM. **Stderr** – střední chyba průměru.

### 4.3. Respirace

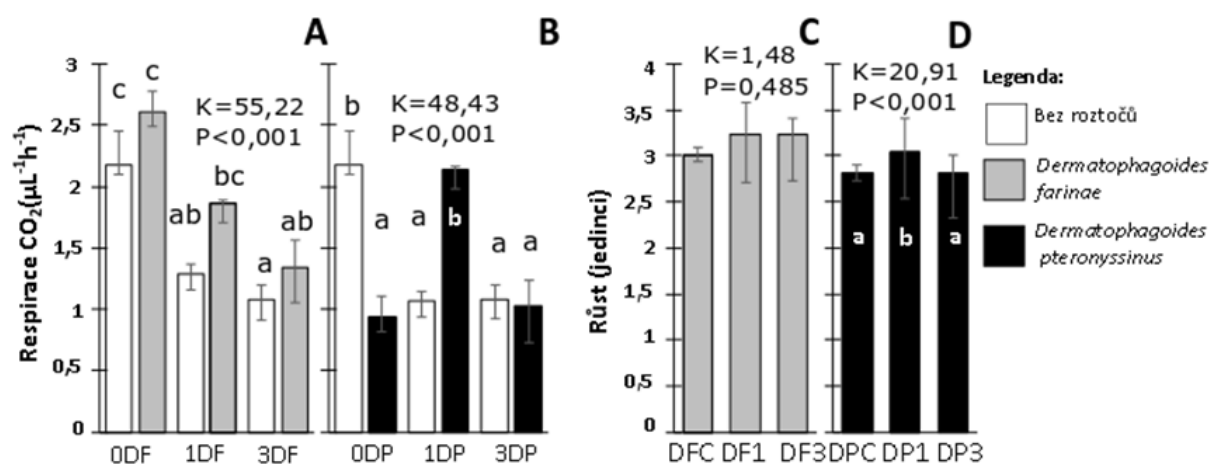
**Situace v mikrokosmu bez roztočů:** Přidáním SPGM do diety došlo k poklesu respirace mikrokosmu oproti respiraci kontrolní diety (obrázek 9A a 9B). Ke snížení respirace došlo u SPGM získaným od obou druhů prachových roztočů. Stáří SPGM nemělo na respiraci mikrokosmu signifikantní vliv.

**Situace v přítomnosti roztočů v mikrokosmu:** Respirace byla ovlivněna přítomností prachových roztočů v mikrokosmu pouze u *D. pteronyssinus*. Jeho přítomnost způsobila snížení respirace kontrolní diety desetkrát (obrázek 9B). Naopak u diety obohacené o 1 měsíc staré SPGM došlo k nárůstu respirace mikrokosmu s *D. pteronyssinus* v porovnání se situací bez přítomnosti roztoče.

Přítomnost *D. farinae* neměla na respiraci mikrokosmu žádný vliv (obrázek 9A). Respirace mikrokosmu po přidání SPGM vykazuje stejný klesající trend bez *D. farinae* i s jeho přítomností.

### 4.4. Populační růst

V úvodním pokusu, kde prachoví roztoči žili na kontrolní dietě bez SPGM, byl populační růst dvakrát vyšší u *D. farinae* než u *D. pteronyssinus*. Populační růst *D. farinae* nebyl přidáním SPGM ovlivněn. Odlišnost v populačním růstu lze pozorovat pouze u *D. pteronyssinus* na dietě obohacené o 1 měsíc staré SPGM. Zde došlo k rychlejšímu růstu oproti ostatním situacím (obrázek 9C a 9D).



Obrázek 9 Respirace a růst prachových roztočů na experimentálních dietách. Data analyzována pomocí Kruskalova–Wallisova testu. P hodnota značí signifikanci a K hodnota znázorňuje hodnotu testovaného kritéria. Písmenka a, b, c značí signifikantně odlišné hodnoty

## 5. Diskuse

Výsledek této práce podporuje předchozí studie, které uvádí mikroorganismy jako významnou složku potravy pro prachové roztoče (de Saint Georges-Grیدهlet 1987; Douglas & Hart 1989; Naegele et al. 2013). Tato strategie se zdá být výhodná ve vnějším prostředí, kde se nachází celé společenstva mikroorganismů žijících na kožních derivátech, které jsou zdrojem potravy roztočů. Zejména v těsném kontaktu s člověkem, kde se vyskytují zbytky kůže. Ty jsou pokryty mikroorganismy (Brandwein et al. 2016) a mohou tak sloužit jako zdroj potravy pro prachové roztoče. V této studii byla napodobena situace z běžného prostředí, kde se kumulují exkrementy a zbytky těl roztočů a kontaminují tak prostředí a zároveň potravu roztoče. Přidání SPGM do diety ovlivnilo mikrobiom *D. farinae*. U tohoto roztoče došlo ke změně bakteriálního profilu, kde je patrný pokles zastoupení bakterií rodu *Lactobacillus* a naopak dochází k vyššímu zastoupení bakterií rodů *Acinetobacter* a *Staphylococcus*. Zvýšený výskyt *Staphylococcus* je způsobený jeho zastoupením v SPGM, a tudíž byl v obohacené dietě zastoupen více než v kontrolní dietě. Houbový profil obou prachových roztočů ovlivněn nebyl. Tento fakt je nejspíše způsoben výběrem *S. cerevisiae* jako preferované složky potravy, která je navíc uměle dodávána do všech diet. Houbový profil obou roztočů je málo pestrý a převládá zde vždy jeden druh mikroskopické houby, který zaujímá standardně přes 90 % všech houbových sekvencí.

Respirace diety bez roztočů byla snížena přidáním SPGM. Dieta bez SPGM obsahuje pouze několik mikroorganismů, které se navzájem neovlivňují. Mají tak prostor k rozmnožování a vývoji. Jejich produkce CO<sub>2</sub> je tím pádem vysoká. SPGM obsahuje širší spektrum mikroorganismů a po přidání SPGM do diety se rovnováha mikroorganismů naruší a dojde tak k poklesu růstu mikroorganismů a tím i jejich respirace. Tento efekt byl pozorován již dříve u jiných typů diet a jiných druhů bezobratlých živočichů (Hanlon 1981; Seastedt 1984; Lussenhop 1992; A'Bear et al. 2014). Přidáním prachových roztočů do diety došlo vždy k mírnému nárůstu respirace diety, ať už dieta byla s SPGM nebo bez něj. Samotná respirace prachových roztočů je ovšem zanedbatelná, tudíž nárůst musel být způsoben interakcí roztoče s mikroorganismy. Roztoči svým pohybem roznášejí mikroorganismy na nová místa, kde mohou růst a tím dochází k nárůstu celkového metabolismu (Hanlon & Anderson 1979). Zároveň roztoči okusují mikroorganismy v dietě a tím aktivují metabolismus mikroorganismů (Hanlon & Anderson 1979; Bengtsson & Rundgren 1983; Siepel & Maaskamp 1994).

Ačkoliv již dříve byl pozorován negativní vliv mikroorganismů na délku vývojového cyklu roztoče (Saleh et al. 1991) i na celkový růst roztočí populace (van Bronswijk & Sinha

1973), přidáním SPGM do diety nedošlo k zásadní změně v rychlosti populačního růstu. Mikroorganismy jsou schopné populační růst roztočů jak zrychlovat (např. u *D. farinae* zrychluje populační růst *Micrococcus lysodeikticus* (Erban & Hubert 2008)), tak i zpomalovat (např. *A. penicillioides* (van Bronswijk & Sinha 1973)). V této studii došlo ke změně dynamiky populačního růstu pouze u *D. pteronyssinus*, který rostl na dietě s měsíc starým SPGM. V tomto čase byl populační růst urychlen oproti ostatním případům. Zároveň je v tomto případě nápadně zvýšená respirace mikrokosmu (obrázek 9A a 9C). U *D. pteronyssinus* na dietě s jeden měsíc starým SPGM se navíc vyskytuje v mikrobiomu roztoče nejvyšší zastoupení bakterie *Staphylococcus arlettae*. Zastoupení této bakterie v mikrobiomu po přidání tři měsíce starého SPGM klesá, ačkoliv je přítomno v extraktu z SPGM ve stejné míře v obou časech. Přestože se v laboratorních kulturách typicky projevují tři růstové fáze u experimentu s tři měsíce starým SPGM, nepodařilo se nám navodit odumírající růstovou fází. Důvodem může být nízká koncentrace SPGM a tudíž nízké zastoupení mikroorganismů zapříčiňující tuto fázi vývoje, nebo fakt, že tato fáze je způsobena jiným vlivem než mikroorganismy (např. hromadícími se chemickými látkami atd.). Dalším možným vysvětlením může být skutečnost, že se v dietě vyskytuje velké množství jiných bakterií, které roztoči preferují a živili se výhradně na nich. Přestože se v mikrobiomu vyskytuje velké množství sekvencí identických s *S. cerevisiae*, v exkrementech se tyto houby vyskytují minimálně. To naznačuje, že *S. cerevisiae* je stráven kompletně a je využíván jako potrava.

V SPGM *D. farinae* se vyskytuje symbiotická bakterie rodu *Cardinium*. Vzhledem ke své lokalizaci v reprodukční soustavě není možné, aby bylo *Cardinium* vylučováno z těla v exkrementech. Tento fakt indikuje, že se v SPGM kromě exkrementů a zbytků potravy vyskytují i rozpadající se zbytky těl mrtvých roztočů.

Tato práce ukazuje, že přidání zbytkového růstového média do diety prachových roztočů má pouze malý vliv na životaschopnost populace roztočů. Z toho vyplývá, že se zde nenachází žádný akaropatogenní mikroorganismus, který by měl vliv na vývoj populace roztočů. Přidáním SPGM do diety se nám nepodařilo simulovat odumírající fázi populace, ke které standardně po třech měsících v laboratorních populacích dochází.



## 6. Závěr

- Mikrobiom roztoče je ovlivněn mikroorganismy přenesenými prostřednictvím SPGM do pasterizované diety roztočů, avšak pouze v případě bakterií u druhu *Dermatophagoides farinae*. Nepodařilo se prokázat vliv SPGM na složení mikrobiomu roztoče *Dermatophagoides pteronyssinus*. Nebyl rovněž prokázán vliv přenosu hub v SPGM na složení mikrobiomu hub u obou druhů roztočů.
- Populační růst prachových roztočů nebyl ovlivněn mikroorganismy obsaženými v SPGM a přenesených do pasterizované diety s výjimkou dodání SPGM z jeden měsíc staré kultury, která vedla ke zvýšení populačního růstu *D. pteronyssinus*.
- Přidání mikroorganismů do pasterizované diety roztočů prostřednictvím SPGM snižuje celkovou respiraci mikroorganismů v mikrokosmu, pokud nejsou roztoči přítomni. Přítomnost roztočů částečně zvyšuje respiraci, která je však stále nižší než v mikrokosmech bez SPGM.
- Mikrobiom byl více ovlivněn u druhu *D. farinae*, avšak populační růst a respirace mikrokosmu se měnila signifikantněji u druhu *D. pteronyssinus*.
- Výsledky byly publikovány jako článek **Molva, V.**, Nesvorna, M., Pekar, S., Shcherbachenko, E., Erban, T., Klimov, P., Hubert, J. 2019. Dynamics of the microbial community during growth of the house dust mite *Dermatophagoides farinae* in culture. FEMS Microbiology Ecology. Článek byl přiložen jako příloha.

## 7. Seznam literatury

- A'Bear, A. D., Jones, T. H., Boddy, L. 2014. Size matters: what have we learnt from microcosm studies of decomposer fungus–invertebrate interactions? *Soil Biology and Biochemistry* 78:274–283.
- Andersen, A. 1991. Nutritional value of yeast for *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Epidermoptidae) and the antigenic and allergenic composition of extracts during extended culturing. *Journal of Medical Entomology* 28(4):487–491.
- Anderson, M. J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26(1):32–46.
- Barabanova, V. V., Želtikova, T. M. 1985. Piščevaritělnyje ferměnty kleščeje domašnej pyli *Dermatophagoides pteronyssinus* Trouessart, 1897 i *D. farinae* Hughes, 1961 (Acariformes: Pyroglyphidae). *Doklady AN SSSR* 283(1):225–227.
- Batard, T., Hrabina, A., Bi, X. Z., Chabre, H., Lemoine, P., Couret, M. N., Faccenda, D., Villet, B., Harzic, P., André, F., Goh, S. Y., André, C., Chew, F. T., Moingeon, P. 2006. Production and proteomic characterization of pharmaceutical-grade *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* extracts for allergy vaccines. *International Archives of Allergy and Immunology* 140(4):295–305.
- Bengtsson, G., Rundgren, S. 1983. Respiration and growth of a fungus, *Mortierella isabellina*, in response to grazing by *Onychiurus armatus* (Collembola). *Soil Biology and Biochemistry* 15(4):469–473.
- BioLib. 2019. Roztoč (*Dermatophagoides* Bogdanov, 1864). Biological Library (BioLib.cz). Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id77144/> [cit. 2019-7-14].
- Brandwein, M., Steinberg, D., Meshner, S. 2016. Microbial biofilms and the human skin microbiome. *npj Biofilms and Microbiomes* 2:3. DOI: 10.1038/s41522-016-0004-z.
- Bray, J. R., Curtis, J. T. 1957. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27(4):325–349.
- Caporaso, J. G., Lauber, Ch. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., Knight, R. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal* 6(8):1621–1624.
- Colloff, M. J. 1998. Distribution and abundance of dust mites within homes. *Allergy* 53(Supplement 48):24–27.
- Colloff, M. J. 2009. Dust mites. CSIRO Publishing, Collingwood, VIC.
- Davies, R. R. 1960. Viable moulds in a house dust. *Transactions of the British Mycological Society* 43(4):617–630.
- de Saint Georges-Grèdelet, D. 1987. Vitamin requirements of the European house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae), in relation to its fungal association. *Journal of Medical Entomology* 24(4):408–411.

- Douglas, A. E., Hart, B.J. 1989. The significance of the fungus *Aspergillus penicillioides* to the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Symbiosis* 7:105–116.
- Eraso, E., Guisantes, J. A., Martínez, J., Sáenz-de-Santamaría, M., Martínez, A., Palacios, R., Cisterna, R. 1997a. Kinetics of allergen expression in cultures of house dust mites, *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae* (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of Medical Entomology* 34(6):684–689.
- Eraso, E., Martínez, J., García-Ortega, P., Martínez, A., Palacios, R., Cisterna, R., Guisantes, J. A. 1998. Influence of mite growth culture phases on the biological standardization of allergenic extracts. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 8(4):201–206.
- Eraso, E., Martínez, J., Martínez, A., Palacios, R., Guisantes, J. A. 1997b. Quality parameters for the production of mite extracts. *Allergologia et Immunopathologia* 25(3):113–117.
- Erban, T., Hubert, J. 2008. Digestive function of lysozyme in synanthropic acaridid mites enables utilization of bacteria as a food source. *Experimental and Applied Acarology* 44(3):199–212.
- Galikejev, Ch. L. 1965. A study on the allergic characteristic fungi in the dust of rooms. *Gigijena i Sanitarija* 30:93–94.
- Gamal-Eddin, F. M., Abou-Sinna, F. M., Tayel, S. E., Aboul-Atta, A. M., Seif, A. M., Gaafar, S. M. 1983. Duration of the developmental stages of house dust mites *Dermatophagoides farinae* and DP under controlled temperatures and relative humidities to pave the way in from of the workers in the field of house dust mite bronchial asthma. 1. Pre-imaginal period. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 13:319–334
- Green, O. R. 2001. A manual of practical laboratory and field techniques in palaeobiology. Kluwer Academic Publishers, London.
- Gregory, L. G., Lloyd, C. M. 2011. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends in Immunology* 32(9):402–411.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. 2001. PAST - PAleontological STATistics. Dostupné z: [https://www.uv.es/~pardomv/pe/2001\\_1/past/pastprog/past](https://www.uv.es/~pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past) [cit. 2019-7-14].
- Hanlon, R. D. G. 1981. Influence of grazing by Collembola on the activity of senescent fungal colonies grown on media of different nutrient concentration. *Oikos* 36(3):362–367.
- Hanlon, R. D. G., Anderson, J. M. 1979. The effects of collembola grazing on microbial activity in decomposing leaf litter. *Oecologia* 38(1):93–99.
- Hart, B. J., Crowther, D., Wilkinson, T., Biddulph, P., Ucci, M., Pretlove, S., Ridley, I., Oreszczyn, T. 2007. Reproduction and development of laboratory and wild house dust mites (Acari: Pyroglyphidae) and their relationship to the natural dust ecosystem. *Journal of Medical Entomology* 44(4):568–574.
- Hay, D. B., Hart, B. J., Douglas, A. E. 1992a. Evidence refuting the contribution of the fungus *Aspergillus penicillioides* to the allergenicity of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *International Archives of Allergy and Immunology* 97(1):86–88.
- Hay, D. B., Hart, B. J., Pearce, R. B., Kozakiewicz, Z., Douglas, A. E. 1992b. How relevant are house dust mite-fungal interactions in laboratory culture to the natural dust system? *Experimental and Applied Acarology* 16(1–2):37–47.

- Hubert, J., Nesvorna, M., Klimov, P., Dowd, S. E., Sopko, B., Erban, T. 2019a. Differential allergen expression in three *Tyrophagus putrescentiae* strains inhabited by distinct microbiome. *Allergy (in press)*. DOI: 10.1111/all.13921.
- Hubert, J., Nesvorna, M., Kopecky, J., Erban, T., Klimov, P. 2019b. Population and culture age influence the microbiome profiles of house dust mites. *Microbial Ecology* 77(4):1048–1066.
- Hubert, J., Pekár, S., Nesvorná, M., Šustr, V. 2010. Temperature preference and respiration of acaridid mites. *Journal of Economic Entomology* 103(6):2249–2257.
- Chang, H., Han, D. H., Mo, J.-h., Kim, J.-W., Kim, D.-Y., Lee, Ch. H., Min, Y.-G., Rhee, Ch.-S. 2009. Early compliance and efficacy of sublingual immunotherapy in patients with allergic rhinitis for house dust mites. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology* 2(3):136–140.
- Chemidlin Prévost-Bouré, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougél, Ch., Lelièvre, M., Jolivet, C., Shahbazkia, H. R., Guillou, L., Arrouays, D., Ranjard, L. 2011. Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS One* 6(9):e24166. DOI: 10.1371/journal.pone.0024166.
- Jacquet, A. 2011. The role of innate immunity activation in house dust mite allergy. *Trends in Molecular Medicine* 17(10):604–611.
- Kim, J.-Y., Yi, M.-H., Hwang, Y., Lee, J.Y., Lee, I.-Y., Yong, D., Yong, T.-S. 2018. 16S rRNA profiling of the *Dermatophagoides farinae* core microbiome: *Enterococcus* and *Bartonella*. *Clinical and Experimental Allergy* 48(5):607–610.
- Klimov, P. B., OConnor, B. 2013. Is permanent parasitism reversible?—critical evidence from early evolution of house dust mites. *Systematic Biology* 62(3):411–423.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., Schloss, P. D. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology* 79(17):5112–5120.
- Larche, M. 2000. Specific immunotherapy. *British Medical Bulletin* 56(4):1019–1036.
- Lee, J., Kim, J. Y., Yi, M.-h., Hwang, Y., Lee, I.-Y., Nam, S.-H., Yong, D., Yong, T.-S. 2019. Comparative microbiome analysis of *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and *Tyrophagus putrescentiae*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143(4):1620–1623.
- Lucas, F. S., Broennimann, O., Febbraro, I., Heeb, P. 2003. High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. *Microbial Ecology* 45(3):282–290.
- Lussenhop, J. 1992. Mechanisms of microarthropod–microbial interactions in soil. *Advances in Ecological Research* 23:1–33.
- Lustgraaf B. v. d. 1978a. Ecological relationships between xerophilic fungi and house-dust mites (Acarida: Pyroglyphidae). *Oecologia* 33(3):351–359.
- Lustgraaf, B v. d. 1978b. Seasonal abundance of xerophilic fungi and house-dust mites (Acarida: Pyroglyphidae) in mattress dust. *Oecologia* 36(1):81–91.

- Matsumoto, K. 1965. Studies on environmental factors for breeding of grain mites VII. Relationship between reproduction of mites and kind of carbohydrates in the diet. *Medical Entomology and Zoology* 16(2):118–122.
- Mitchell, W. F., Wharton, G. W., Larson, D. G., Modic, R. 1969. House dust, mites, and insects. *Annals of Allergy* 27(3):93–99.
- Molva, V.**, Nesvorna, M., Pekar, S., Shcherbachenko, E., Erban, T., Klimov, P., Hubert, J. 2019. Dynamics of the microbial community during growth of the house dust mite *Dermatophagoides farinae* in culture. *FEMS Microbiology Ecology* (submitted after major revision).
- Naegele, A., Reboux, G., Scherer, E., Roussel, S., Millon, L. 2013. Fungal food choices of *Dermatophagoides farinae* affect indoor fungi selection and dispersal. *International Journal of Environmental Health Research* 23(2):91–95.
- NCBI. 2019. Standard Nucleotide BLAST. National Center for Biotechnology Information, USA. Dostupné z: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=&LINK\\_LOC=blasttab&LAST\\_PAGE=tblastn](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=tblastn) [cit. 2019-7-14].
- Ondov, B. D., Bergman, N. H., Phillippy, A. M. 2011. Interactive metagenomic visualization in a web browser. *BMC Bioinformatics* 12:385. DOI: 10.1186/1471-2105-12-385.
- Platts-Mills, T. A. E., de Weck, A. L. 1989. Dust mite allergens and asthma—a worldwide problem. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 83(2):416–427.
- Prohic, A., Jovovic Sadikovic, T., Krupalija-Fazlic, M., Kuskunovic-Vlahovljak, S. 2016. *Malassezia* species in healthy skin and in dermatological conditions. *International Journal of Dermatology* 55(5):494–504.
- Quast, Ch., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41(Database issue):D590–D596.
- Rahman, N. A., Parks, D. H., Willner, D. L., Engelbrektson, A. L., Goffredi, S. K., Warnecke, F., Scheffrahn, R. H., Hugenholtz, P. 2015. A molecular survey of Australian and North American termite genera indicates that vertical inheritance is the primary force shaping termite gut microbiomes. *Microbiome* 3:5. DOI: 10.1186/s40168-015-0067-8.
- Sagova-Mareckova, M., Omelka, M., Kopecky, J. 2017. Sequential analysis of soil factors related to common scab of potatoes. *FEMS Microbiology Ecology* 93(1):fiw201. DOI: 10.1093/femsec/fiw201.
- Saleh, S. M., Kelada, N. L., Shaker, N. 1991. Control of European house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) with *Bacillus* spp. *Acarologia* 32(3):257–260.
- Seastedt, T. R. 1984. The role of microarthropods in decomposition and mineralization processes. *Annual Review of Entomology* 29:25–46.
- Siepel, H., Maaskamp, F. 1994. Mites of different feeding guilds affect decomposition of organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 26(10):1389–1394.
- Stefaniak, O., Seniczak, S. 1976. The microflora of the alimentary canal of *Achipteria coleoptrata* (Acarina, Oribatei). *Pedobiologia* 16(3):185–194.

- Stewart, G. A., Butcher, A., Lees, K., Ackland, J. 1986. Immunochemical and enzymatic analyses of extracts of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 77(1):14–24.
- Stewart G. A., Thompson P. J. 1996. The biochemistry of common aeroallergens. *Clinical and Experimental Allergy* 26(9):1020–1044.
- Sudakaran, S., Salem, H. Kost, Ch., Kaltenpoth, M. 2012. Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Molecular Ecology* 21(24):6134–6151.
- Valerio, Ch. R., Murray, P., Arlian, L. G., Slater, J. E. 2005. Bacterial 16S ribosomal DNA in house dust mite cultures. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116(6):1296–1300.
- van Bronswijk, J. E. M. H., Sinha, R. N. 1973. Role of fungi in the survival of *Dermatophagoides* (Acarina: Pyroglyphidae) in house-dust environment. *Environmental Entomology* 2(1):142–145.
- Van Neste, D., Lachapelle, J. M. 1981. Host–parasite relationships in hyperkeratotic (Norwegian) scabies: pathological and immunological findings. *British Journal of Dermatology* 105(6):667–678.
- Walshaw, M. J., Evans, C. C. 1987. The effect of seasonal and domestic factors on the distribution of *Euroglyphus maynei* in the homes of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergic patients. *Clinical Allergy* 17(1):7–14.
- Weiss, M. R. 2006. Defecation behavior and ecology of insects. *Annual Review of Entomology* 51:635–661.
- Wharton, G. W., Duke, K. M., Epstein, H. M. 1979. Water and the physiology of house dust mites. *In: Rodriguez, J. G. (ed.) Recent advances in acarology, volume 1.* Academic Press, London.
- White, J. R., Nagarajan, N., Pop, M. 2009. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLoS Computational Biology* 5(4):e1000352. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000352.
- WHO/IUIS. 2019. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. Dostupné z <http://www.allergen.org/treeview.php> [cit. 2019-7-14].
- Zchori-Fein, E., Perlman, S. J. 2004. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular Ecology* 13(7):2009–2016.

## **8. Přílohy**

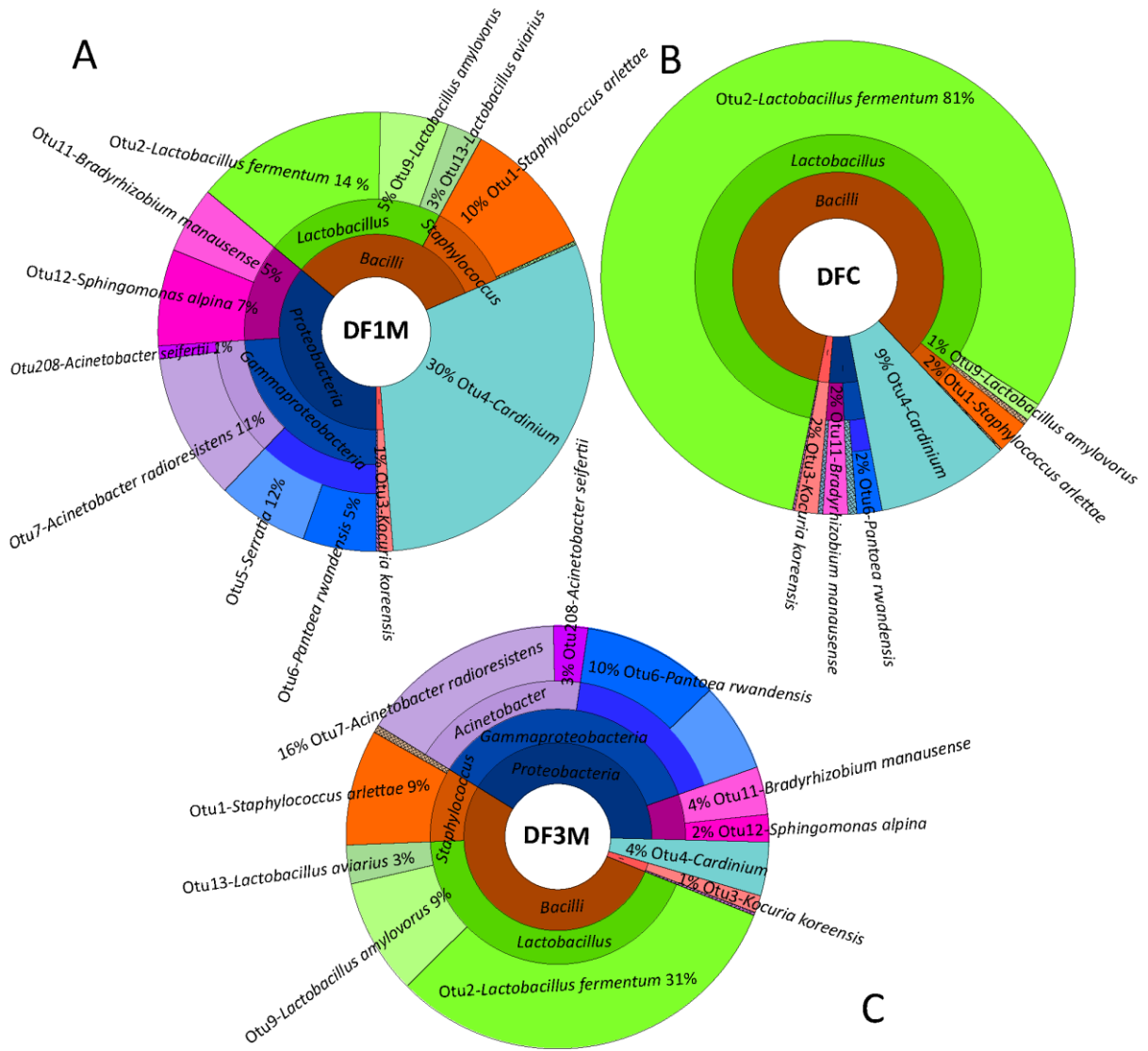
**Příloha 1** Sekvence mikrobiomu *Dermatophagoides farinae* a *Dermatophagoides pteronyssinus* za různých experimentálních podmínek. Bakteriální a houbový mikrobiom byl popsán na základě fragmetů genu 16S rRNA a 18S rRNA. Sekvence byly uloženy do GenBanku jako SRA bioprojekt PRJNA449428 (SRP139166).

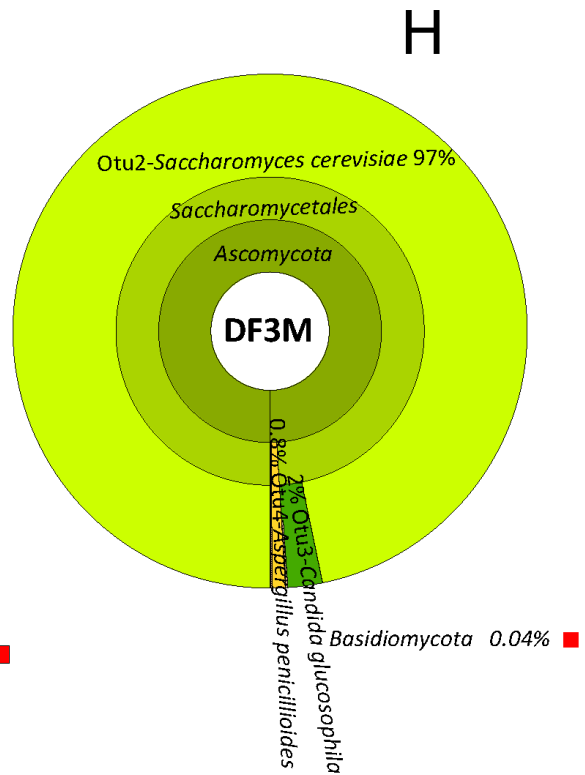
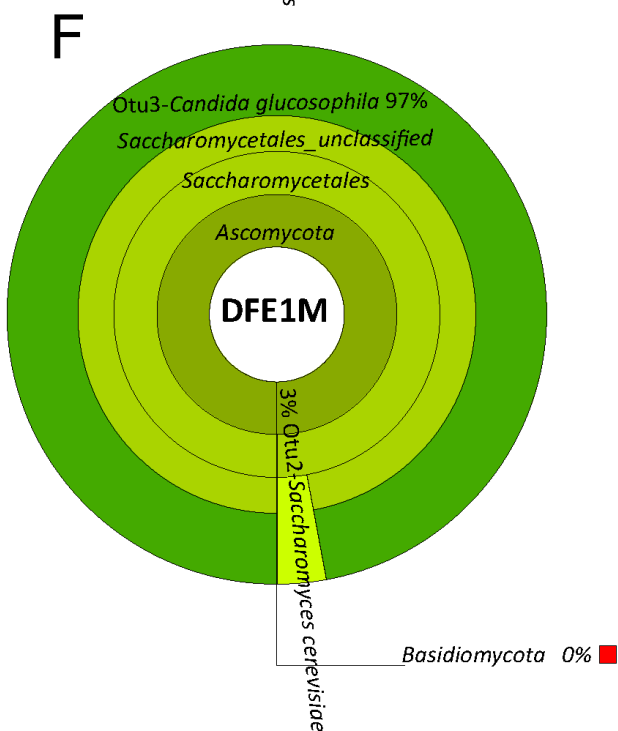
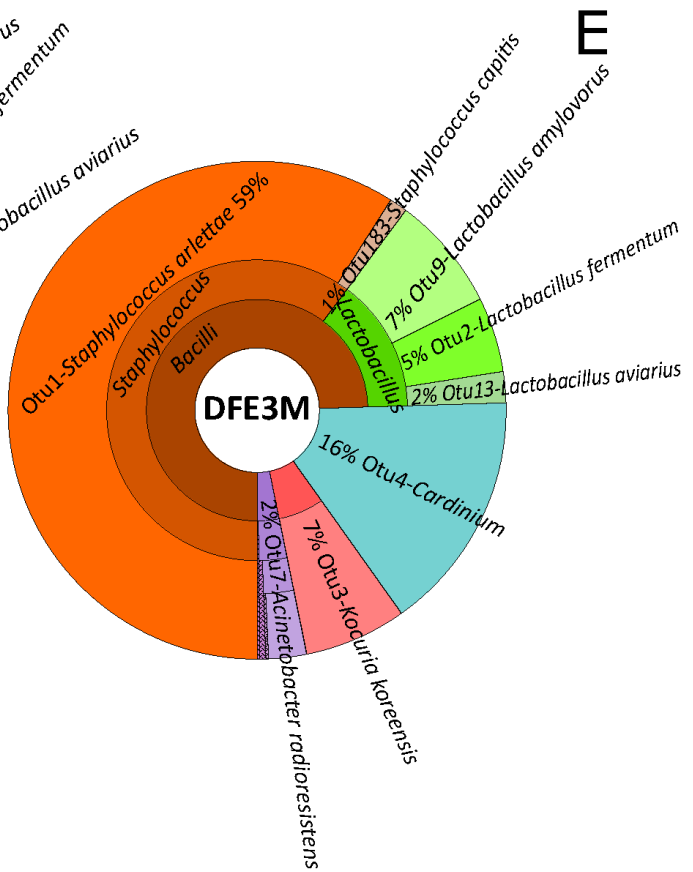
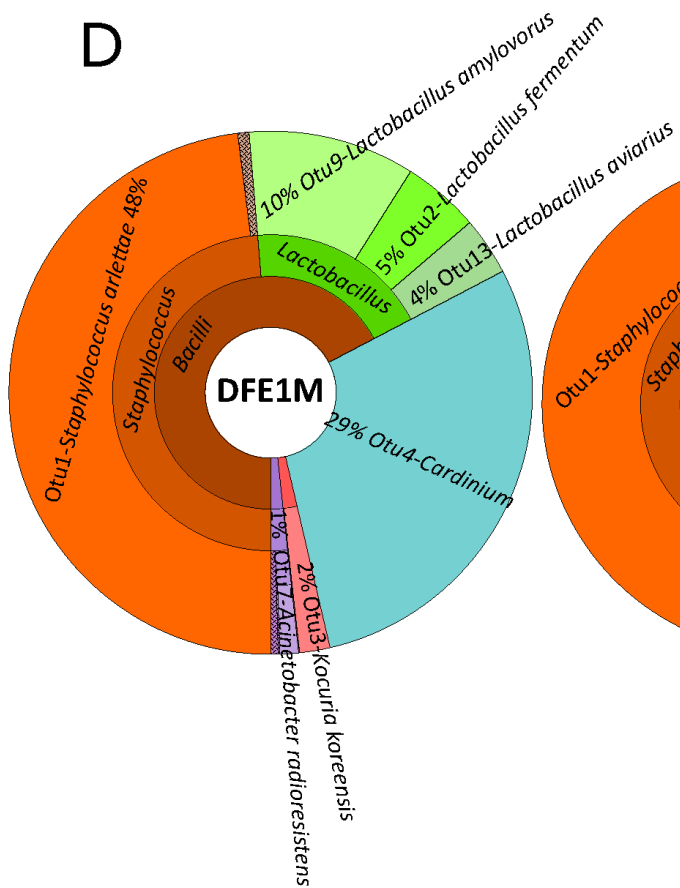
Id.	Název	Druh	vzorek	16S DNA	16S DNA	16S DNA	16S DNA	18S DNA	18S DNA
D1	SAMN08903310	<i>Dermatophagoides farinae</i>	dieta+SPGM-3M	D1_R1_001.fastq	D1_R2_001.fastq	D1b_R1_001.fastq	D1b_R2_001.fastq	H1_R1_001.fastq	H1_R2_001.fastq
D2	SAMN08903311	<i>Dermatophagoides farinae</i>	dieta+SPGM-3M	D2_R1_001.fastq	D2_R2_001.fastq	D2b_R1_001.fastq	D2b_R2_001.fastq	H2_R1_001.fastq	H2_R2_001.fastq
D3	SAMN08903312	<i>Dermatophagoides farinae</i>	dieta+SPGM-3M	D3_R1_001.fastq	D3_R2_001.fastq	D3b_R1_001.fastq	D3b_R2_001.fastq	H3_R1_001.fastq	H3_R2_001.fastq
D4	SAMN08903313	<i>Dermatophagoides farinae</i>	dieta+SPGM-3M	D4_R1_001.fastq	D4_R2_001.fastq	D4b_R1_001.fastq	D4b_R2_001.fastq	H4_R1_001.fastq	H4_R2_001.fastq
D5	SAMN08903314	<i>Dermatophagoides farinae</i>	dieta+SPGM-3M	D5_R1_001.fastq	D5_R2_001.fastq	D5b_R1_001.fastq	D5b_R2_001.fastq	H5_R1_001.fastq	H5_R2_001.fastq
D6	SAMN08903315	<i>Dermatophagoides farinae</i>	dieta+SPGM-3M	D6_R1_001.fastq	D6_R2_001.fastq	D6b_R1_001.fastq	D6b_R2_001.fastq	H6_R1_001.fastq	H6_R2_001.fastq
D7	SAMN08903316	<i>Dermatophagoides farinae</i>	dieta+SPGM-1M	D7_R1_001.fastq	D7_R2_001.fastq	D7b_R1_001.fastq	D7b_R2_001.fastq	H7_R1_001.fastq	H7_R2_001.fastq
D8	SAMN08903317	<i>Dermatophagoides farinae</i>	dieta+SPGM-1M	D8_R1_001.fastq	D8_R2_001.fastq	D8b_R1_001.fastq	D8b_R2_001.fastq	H8_R1_001.fastq	H8_R2_001.fastq
D9	SAMN08903318	<i>Dermatophagoides farinae</i>	dieta+SPGM-1M	D9_R1_001.fastq	D9_R2_001.fastq	D9b_R1_001.fastq	D9b_R2_001.fastq	H9_R1_001.fastq	H9_R2_001.fastq
D10	SAMN08903319	<i>Dermatophagoides farinae</i>	dieta+SPGM-1M	D10_R1_001.fastq	D10_R2_001.fastq	D10b_R1_001.fastq	D10b_R2_001.fastq	H10_R1_001.fastq	H10_R2_001.fastq
D11	SAMN08903320	<i>Dermatophagoides farinae</i>	dieta+SPGM-1M	D11_R1_001.fastq	D11_R2_001.fastq	D11b_R1_001.fastq	D11b_R2_001.fastq	H11_R1_001.fastq	H11_R2_001.fastq
D12	SAMN08903321	<i>Dermatophagoides farinae</i>	dieta+SPGM-1M	D12_R1_001.fastq	D12_R2_001.fastq	D12b_R1_001.fastq	D12b_R2_001.fastq	H12_R1_001.fastq	H12_R2_001.fastq
D20	SAMN08903322	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Kontrola	D20_R1_001.fastq	D20_R2_001.fastq	D20b_R1_001.fastq	D20b_R2_001.fastq	H20_R1_001.fastq	H20_R2_001.fastq
D21	SAMN08903323	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Kontrola	D21_R1_001.fastq	D21_R2_001.fastq	D21b_R1_001.fastq	D21b_R2_001.fastq	H21_R1_001.fastq	H21_R2_001.fastq
D22	SAMN08903324	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Kontrola	D22_R1_001.fastq	D22_R2_001.fastq	D22b_R1_001.fastq	D22b_R2_001.fastq	H22_R1_001.fastq	H22_R2_001.fastq
D23	SAMN08903325	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Kontrola	D23_R1_001.fastq	D23_R2_001.fastq	D23b_R1_001.fastq	D23b_R2_001.fastq	H23_R1_001.fastq	H23_R2_001.fastq
D24	SAMN08903326	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Kontrola	D24_R1_001.fastq	D24_R2_001.fastq	D24b_R1_001.fastq	D24b_R2_001.fastq	H24_R1_001.fastq	H24_R2_001.fastq
D25	SAMN08903327	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Kontrola	D25_R1_001.fastq	D25_R2_001.fastq	D25b_R1_001.fastq	D25b_R2_001.fastq	H25_R1_001.fastq	H25_R2_001.fastq
D33	SAMN08903328	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	dieta+SPGM-3M	D33_R1_001.fastq	D33_R2_001.fastq	D33b_R1_001.fastq	D33b_R2_001.fastq	H33_R1_001.fastq	H33_R2_001.fastq
D34	SAMN08903329	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	dieta+SPGM-3M	D34_R1_001.fastq	D34_R2_001.fastq	D34b_R1_001.fastq	D34b_R2_001.fastq	H34_R1_001.fastq	H34_R2_001.fastq
D35	SAMN08903330	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	dieta+SPGM-3M	D35_R1_001.fastq	D35_R2_001.fastq	D35b_R1_001.fastq	D35b_R2_001.fastq	H35_R1_001.fastq	H35_R2_001.fastq
D36	SAMN08903331	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	dieta+SPGM-3M	D36_R1_001.fastq	D36_R2_001.fastq	D36b_R1_001.fastq	D36b_R2_001.fastq	H36_R1_001.fastq	H36_R2_001.fastq
D37	SAMN08903332	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	dieta+SPGM-3M	D37_R1_001.fastq	D37_R2_001.fastq	D37b_R1_001.fastq	D37b_R2_001.fastq	H37_R1_001.fastq	H37_R2_001.fastq
D38	SAMN08903333	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	dieta+SPGM-3M	D38_R1_001.fastq	D38_R2_001.fastq	D38b_R1_001.fastq	D38b_R2_001.fastq	H38_R1_001.fastq	H38_R2_001.fastq
D39	SAMN08903334	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	dieta+SPGM-3M	D39_R1_001.fastq	D39_R2_001.fastq	D39b_R1_001.fastq	D39b_R2_001.fastq	H39_R1_001.fastq	H39_R2_001.fastq
D40	SAMN08903335	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	dieta+SPGM-3M	D40_R1_001.fastq	D40_R2_001.fastq	D40b_R1_001.fastq	D40b_R2_001.fastq	H40_R1_001.fastq	H40_R2_001.fastq
D41	SAMN08903336	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	dieta+SPGM-3M	D41_R1_001.fastq	D41_R2_001.fastq	D41b_R1_001.fastq	D41b_R2_001.fastq	H41_R1_001.fastq	H41_R2_001.fastq
D42	SAMN08903337	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	dieta+SPGM-3M	D42_R1_001.fastq	D42_R2_001.fastq	D42b_R1_001.fastq	D42b_R2_001.fastq	H42_R1_001.fastq	H42_R2_001.fastq
D43	SAMN08903338	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	dieta+SPGM-3M	D43_R1_001.fastq	D43_R2_001.fastq	D43b_R1_001.fastq	D43b_R2_001.fastq	H43_R1_001.fastq	H43_R2_001.fastq
D45	SAMN08903339	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Kontrola	D45_R1_001.fastq	D45_R2_001.fastq	D45b_R1_001.fastq	D45b_R2_001.fastq	H45_R1_001.fastq	H45_R2_001.fastq
D46	SAMN08903340	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Kontrola	D46_R1_001.fastq	D46_R2_001.fastq	D46b_R1_001.fastq	D46b_R2_001.fastq	H46_R1_001.fastq	H46_R2_001.fastq
D47	SAMN08903341	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Kontrola	D47_R1_001.fastq	D47_R2_001.fastq	D47b_R1_001.fastq	D47b_R2_001.fastq	H47_R1_001.fastq	H47_R2_001.fastq
D48	SAMN08903342	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Kontrola	D48_R1_001.fastq	D48_R2_001.fastq	D48b_R1_001.fastq	D48b_R2_001.fastq	H48_R1_001.fastq	H48_R2_001.fastq
D49	SAMN08903343	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Kontrola	D49_R1_001.fastq	D49_R2_001.fastq	D49b_R1_001.fastq	D49b_R2_001.fastq	H49_R1_001.fastq	H49_R2_001.fastq
D50	SAMN08903344	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Kontrola	D50_R1_001.fastq	D50_R2_001.fastq	D50b_R1_001.fastq	D50b_R2_001.fastq	H50_R1_001.fastq	H50_R2_001.fastq
E1	SAMN08903345	<i>Dermatophagoides farinae</i>	SPGM-1M	E1_R1_001.fastq	E1_R2_001.fastq	E1b_R1_001.fastq	E1b_R2_001.fastq	EE1_R1_001.fastq	EE1_R2_001.fastq
E2	SAMN08903346	<i>Dermatophagoides farinae</i>	SPGM-3M	E2_R1_001.fastq	E2_R2_001.fastq	E2b_R1_001.fastq	E2b_R2_001.fastq	EE2_R1_001.fastq	EE2_R2_001.fastq
E3	SAMN08903347	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	SPGM-1M	E3_R1_001.fastq	E3_R2_001.fastq	E3b_R1_001.fastq	E3b_R2_001.fastq	EE3_R1_001.fastq	EE3_R2_001.fastq
E4	SAMN08903348	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	SPGM-3M	E4_R1_001.fastq	E4_R2_001.fastq	E4b_R1_001.fastq	E4b_R2_001.fastq	EE4_R1_001.fastq	EE4_R2_001.fastq

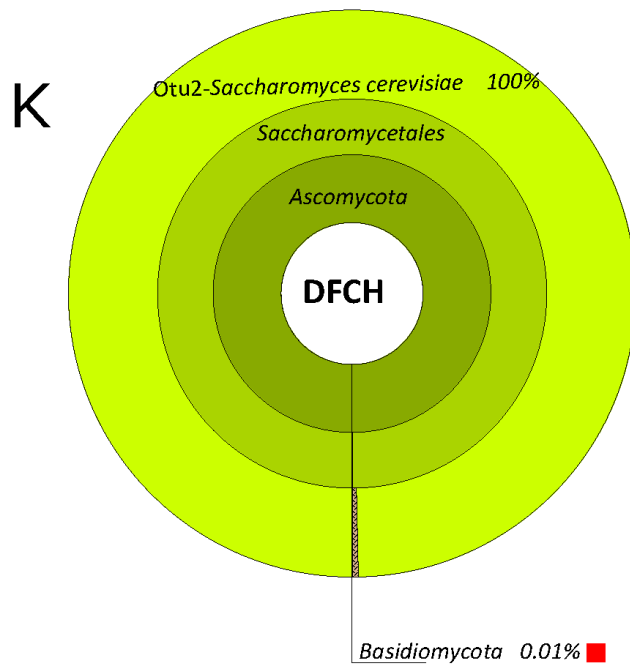
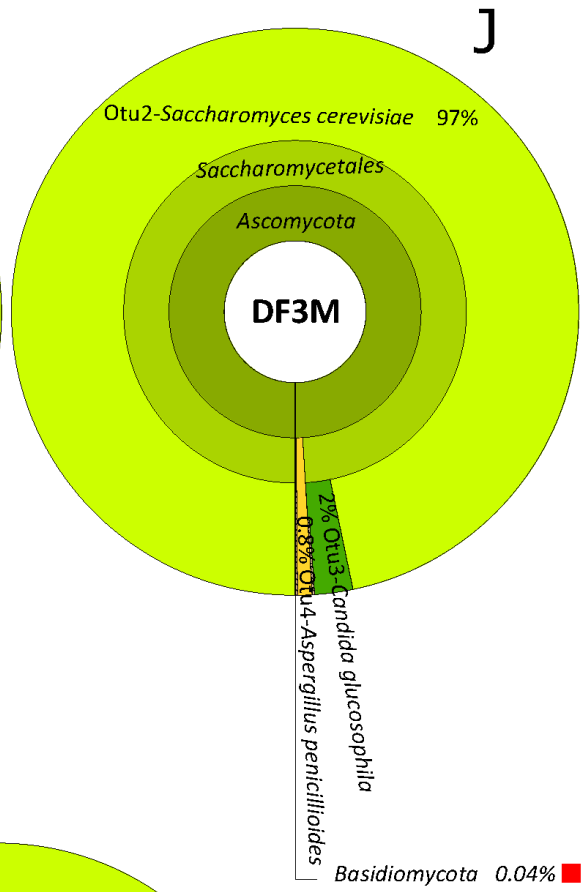
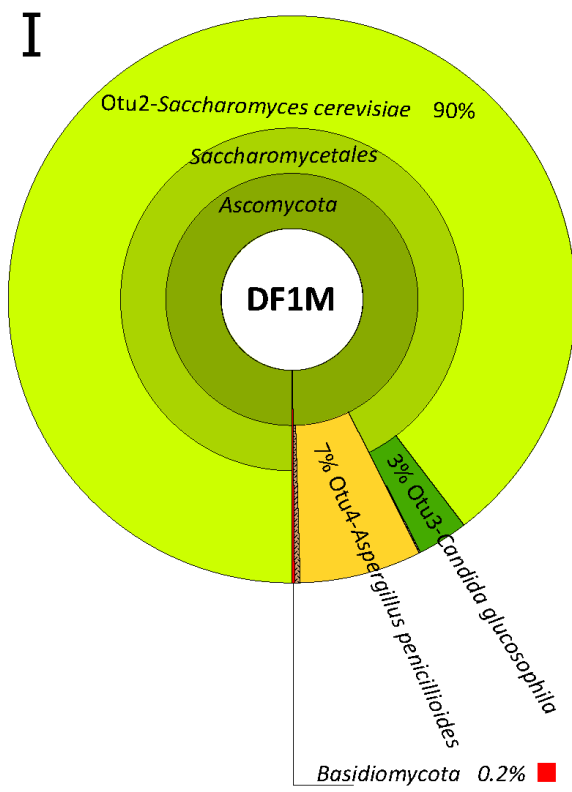
**Legenda:** SPGM – zbytkové růstové médium, 1M – 1 měsíc stará kultura roztočů, 3M – 3 měsíce stará kultura roztočů

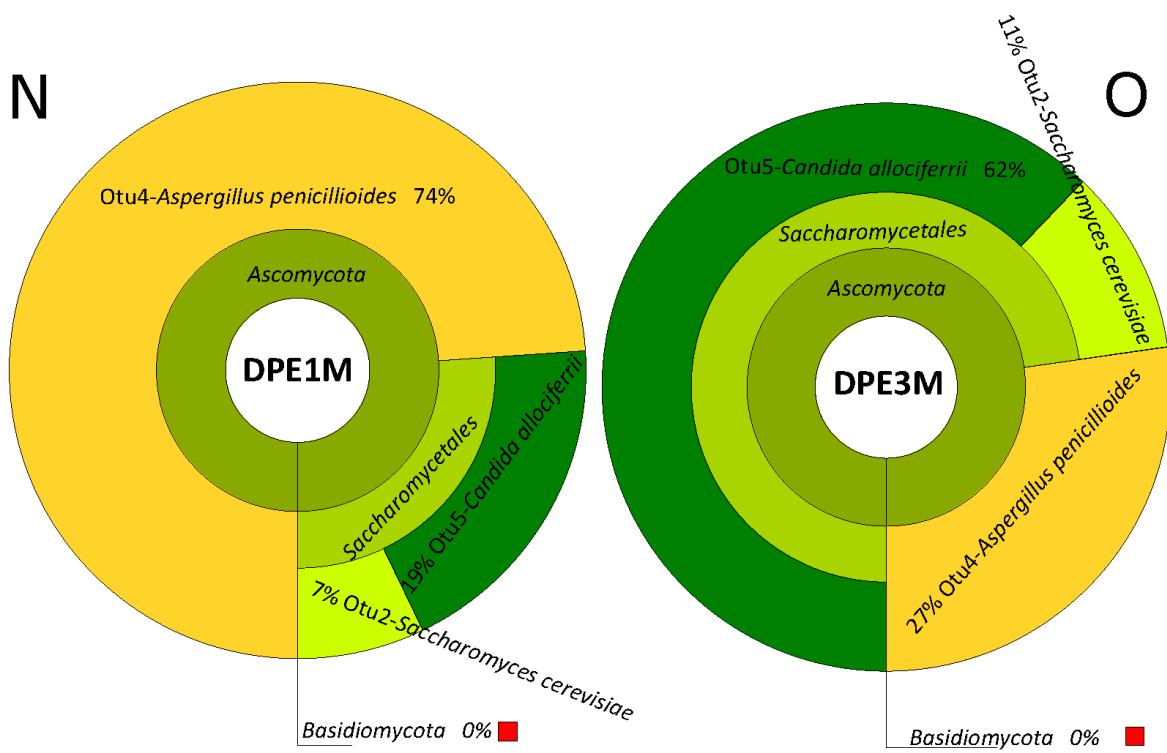
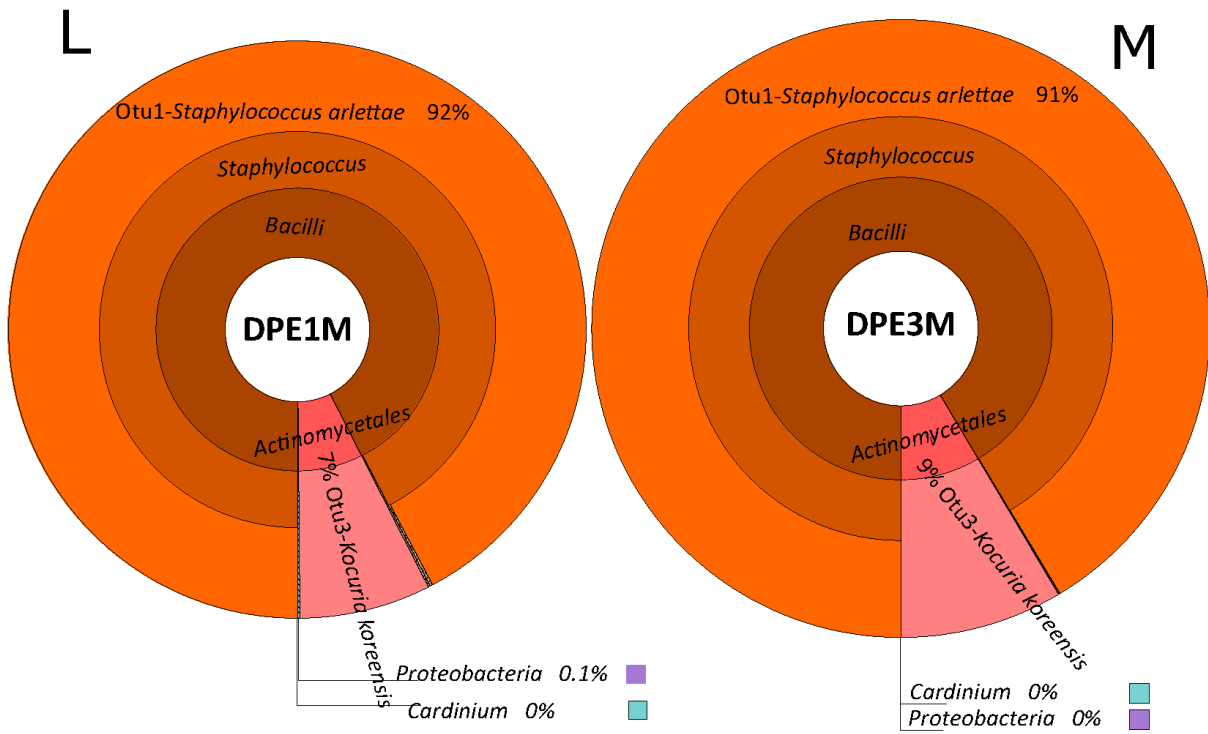


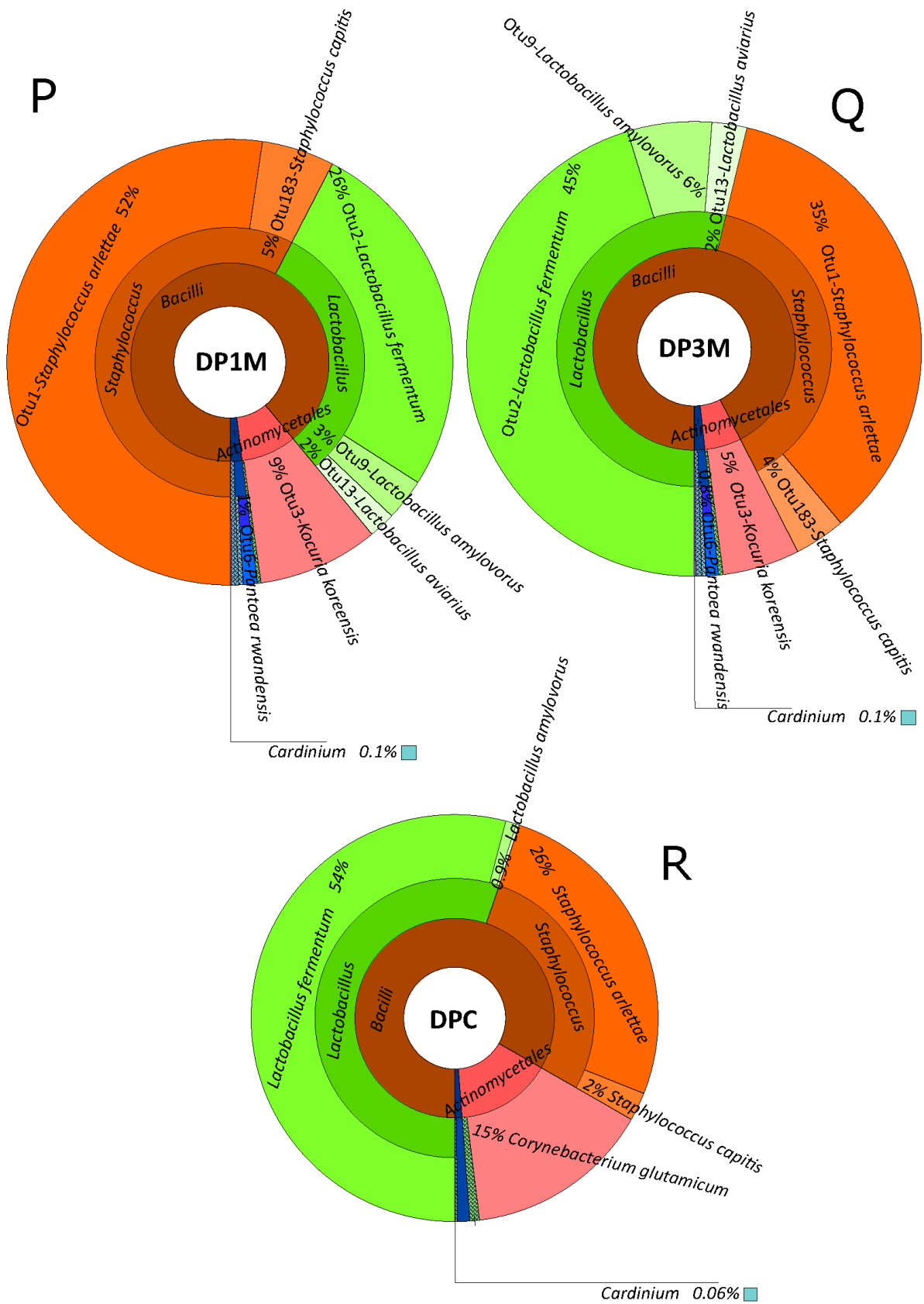
**Příloha 2** Krona vizualizace bakteriálního a houbového mikrobiomu *D. farinae* a *D. pteronyssinus* na různých dietách. **A** – Bakteriální profil *D. farinae* na dietě obohacené o 1 měsíc staré SPGM. **B** – Bakteriální profil *D. farinae* na kontrolní dietě. **C** – Bakteriální profil *D. farinae* na dietě obohacené o 3 měsíce staré SPGM. **D** – Bakteriální složení 1 měsíc starého SPGM z kultury *D. farinae*. **E** – Bakteriální složení 3 měsíce starého SPGM z kultury *D. farinae*. **F** – Houbové složení 1 měsíc starého SPGM z kultury *D. farinae*. **H** – Houbové složení 3 měsíce starého SPGM z kultury *D. farinae*. **I** – Houbový profil *D. farinae* na dietě obohacené o 1 měsíc starého SPGM. **J** – Houbový profil *D. farinae* na dietě obohacené o 3 měsíce starého SPGM. **K** – Houbový profil *D. farinae* na kontrolní dietě. **L** – Bakteriální složení 1 měsíc starého SPGM z kultury *D. pteronyssinus*. **M** – Bakteriální složení 3 měsíce starého SPGM z kultury *D. pteronyssinus*. **N** – Houbové složení 1 měsíc starého SPGM z kultury *D. pteronyssinus*. **O** – Houbové složení 3 měsíce starého SPGM z kultury *D. pteronyssinus*. **P** – Bakteriální profil *D. pteronyssinus* na dietě obohacené o 1 měsíc staré SPGM. **Q** – Bakteriální profil *D. pteronyssinus* na dietě obohacené o 3 měsíce staré SPGM. **R** – Bakteriální profil *D. pteronyssinus* na kontrolní dietě. **S** – Houbový profil *D. pteronyssinus* na dietě obohacené o 1 měsíc starého SPGM. **T** – Houbový profil *D. pteronyssinus* na dietě obohacené o 3 měsíce starého SPGM. **U** – Houbový profil *D. pteronyssinus* na kontrolní dietě.

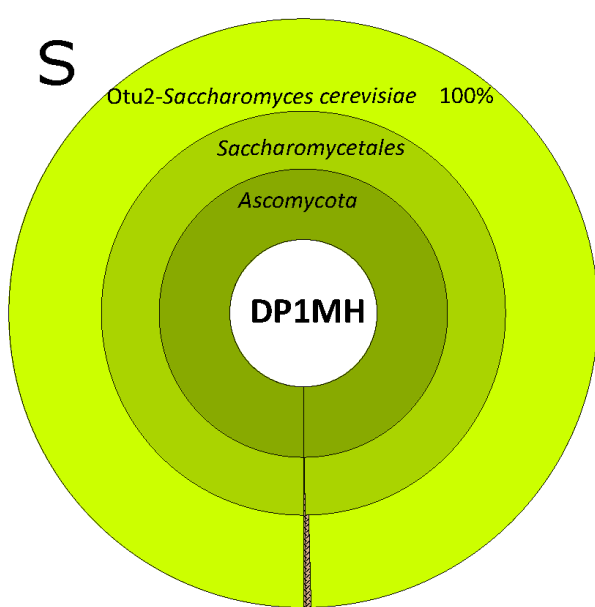




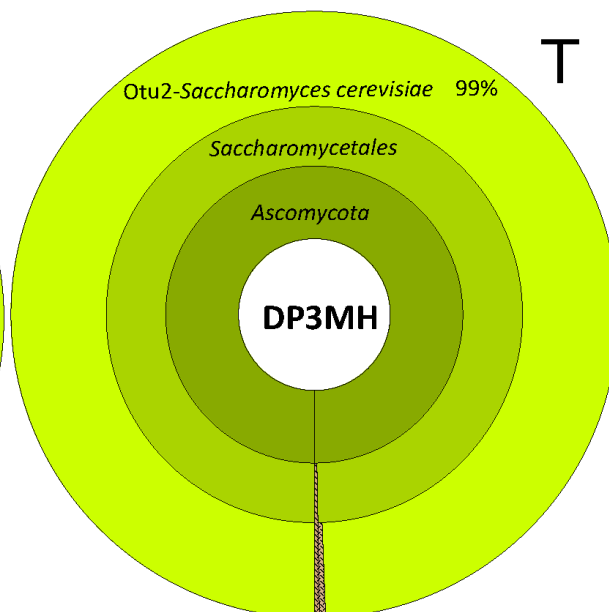




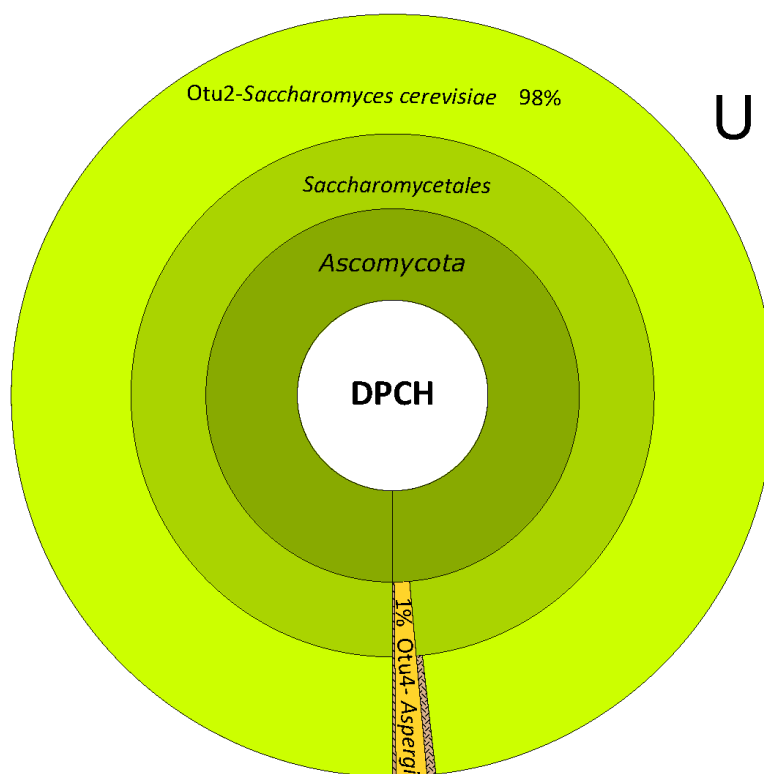




*Basidiomycota* 0% ■

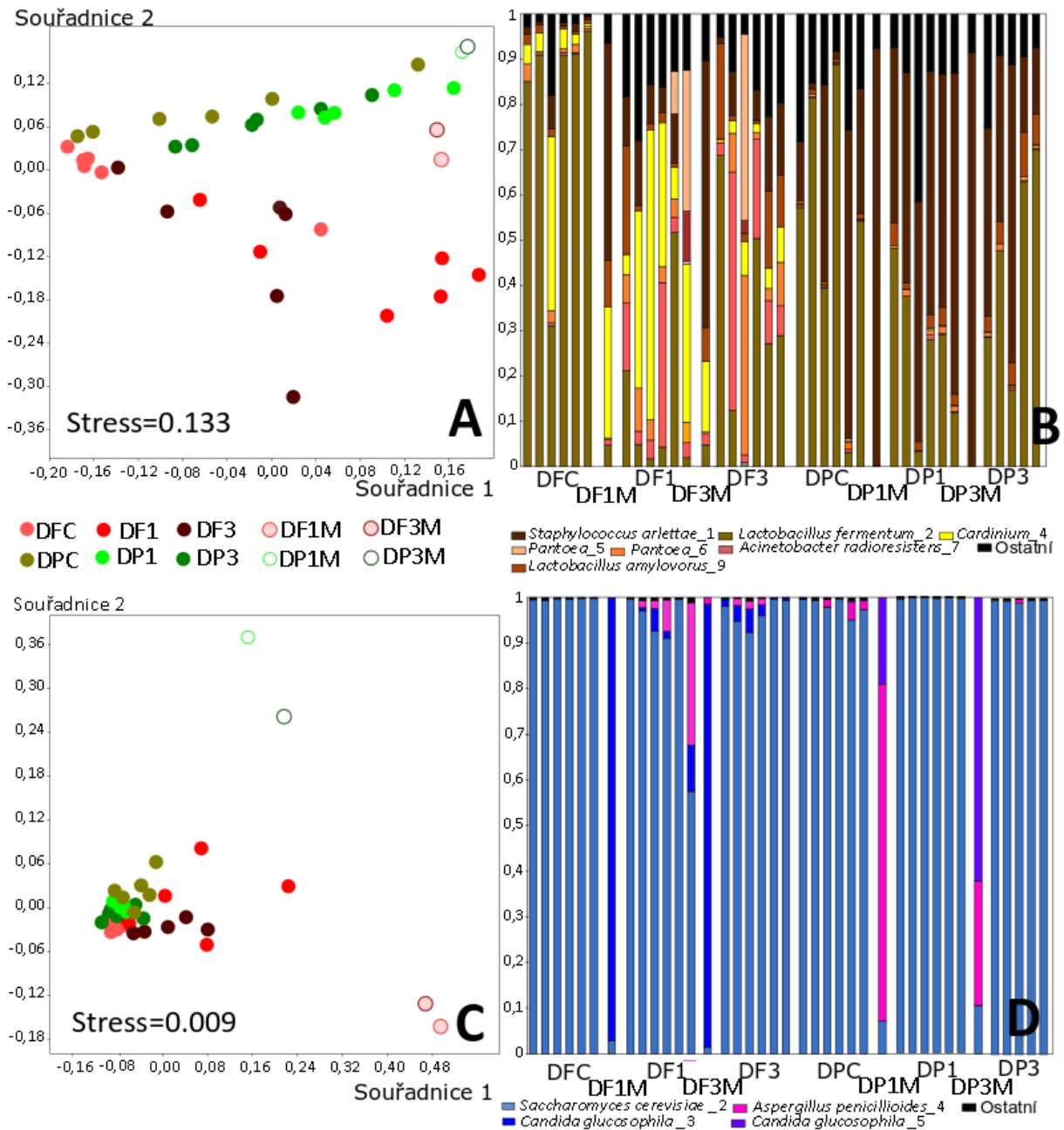


*Basidiomycota* 0% ■



*Basidiomycota* 0.007% ■

**Příloha 3** Mikrobiom prachových roztočů. (A) Mnohorozměrné nemetrické škálování bakteriálního složení mikrobiomu roztočů na různých typech diet (DFC, DF1, DF3, DPC, DP1 a DP3) a bakteriálního složení různě starého SPGM (DF1M, DF3M, DP1M a DP3M) (B) Bakteriální profil prachových roztočů na různých typech diet a bakteriální profil jednotlivých diet. (C) Mnohorozměrné nemetrické škálování houbového složení mikrobiomu roztočů na různých typech diet a různě starého SPGM (B) Houbový profil prachových roztočů na různých typech diet a houbový profil jednotlivých diet.





## ORIGINAL ARTICLE

# Do the microorganisms from laboratory culture spent growth medium affect house dust mite fitness and microbiome composition?

Vit Molva<sup>1,2</sup>, Marie Bostlova<sup>1</sup>, Marta Nesvorna<sup>1</sup> and Jan Hubert<sup>1</sup> <sup>1</sup>Crop Research Institute, Prague 6-Ruzyne, Czechia and <sup>2</sup>Faculty of Science, Department of Parasitology, Charles University, Prague 2, Czechia

**Abstract** The interaction of house dust mites (HDM) and microorganisms is the key factor in the survival of these mites in human-made environments. Spent growth medium (SPGM) provides the rest of the diet, along with dead mite bodies and microorganisms. SPGM represents a source of microorganisms for the recolonization of mite food and the mite digestive tract. An experiment was performed to observe how adding SPGM to the HDM diet affects HDM population growth, the microbiome composition and the microbial respiration in microcosms. We analyzed American house dust mite (*Dermatophagoides farinae*) and European house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) originating from control diets and diets treated with an extract of SPGM from 1- and 3-month-old mite cultures. The microbiome was described using 16S and 18S barcode sequencing. The composition of the bacterial and fungal microbiomes differed between the HDM species, but the SPGM treatment influenced only the bacterial profile of *D. farinae*. In the *D. farinae* microbiome of specimens on SPGM-treated diets compared to those of the control situation, the *Lactobacillus* profile decreased, while the *Cardinium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, and *Sphingomonas* profiles increased. The addition of SPGM extract decreased the microbial respiration in the microcosms with and without mites in almost all cases. Adding SPGM did not influence the population growth of *D. farinae*, but it had a variable effect on *D. pteronyssinus*. The results indicated that the HDM are marginally influenced by the microorganisms in their feces.

**Key words** diet; feces; feeding; house dust mites; microbiome; microorganisms; mites  
+420 233 022 111; fax: +420 233 310 638; email: hubert@vurv.cz

## Introduction

House dust mites (HDM, *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*) are inhabitants of indoor environments. These mites are found in beds, bedding, carpets, and upholstered furniture (Colloff, 1998). They are parts of airborne materials and have been sampled from curtains, ledges, and the filters of forced-air furnaces (Lang & Mulla, 1978). HDM are unwanted inhabitants of human houses due to their

production of a wide spectrum of allergens that endanger human health (Arlan, 2002).

By viewing the human skin microbiome to understand the host's development of a microbial community, recent studies have shown that (Kong *et al.*, 2012; Brandwein *et al.*, 2016) humans transfer millions of microbial cells and that the human microbiome interacts with the indoor environment, creating a specific microbial community (Lax *et al.*, 2014) that makes the skin and nail debris available to mites. The HDM interact with microorganisms, and microorganisms are the key factor influencing their feeding (Hay *et al.*, 1992,

Correspondence: Jan Hubert, Crop Research Institute, Drnovska 507/73, CZ-16106 Prague 6-Ruzyne, Czechia. Tel:

1993). Barcode sequencing is a very important tool for studying mite–microbial associations, and it enables researchers to identify the microorganisms in the mite microbiome (Kim *et al.*, 2018). Barcode analyses of bacterial 16S DNA revealed that *D. farinae* is inhabited by *Enterococcus* and *Bartonella*-like bacteria as the prevailing taxa in the microbiome (Kim *et al.*, 2018).

In the laboratory cultures of HDM, the specific growth patterns have been characterized, and they included a latent phase of low growth, an exponential growth phase and the death phase of the culture (Eraso *et al.*, 1997a,b). Hypothetically, the death phase of the mite culture could be caused by acaropathogenic bacteria that were poisoning the mites. Spent growth medium (SPGM), that is, the remains of the culture after mite cultivation, is formed from the dead bodies of mites, feces, and diet debris, and it was selected as the source of microorganisms (Stewart *et al.*, 1986; Erban *et al.*, 2016). We hypothesized that SPGM extract is a source of microorganisms that grow in the diets of mites and enhance mite survival on the treated diet, or that these microorganisms have antagonistic effects on the mites. In this study, we focused on comparing the effects of the SPGM extract from 1- and 3-month-old cultures on *D. farinae* and *D. pteronyssinus*. The SPGM fraction was added to the mite diet, and we observed the effects of the SPGM-treated diet on the mite microbiome and the growth and microbial respiration of microcosms.

## Materials and methods

### Mites

*Dermatophagoides pteronyssinus* (DP) was obtained from Czech facility for allergen production (Dr. A. Zgarbovsky) in 2012. The laboratory population of *D. farinae* (DF) was obtained as laboratory obtained from Medical University of Silesia, Katowice, Poland (Prof. K. Solarz) in 2005. The both cultures were cultivated in IWAKI tissue culture flasks with a 25-cm<sup>2</sup> surface and 70-mL capacity (IWAKI flasks; Cat. No. 3100-025; Sterilin, Newport, WLS, UK) at 75% relative humidity in a Secador desiccator (Bel-Art Products, Pequannock, NJ, USA) at 25 ± 1 °C. The mites were provided with an HDMd diet consisting of dog food/wheat germ/dried fish food/Mauripandried yeast extract (*Saccharomyces cerevisiae*)/gelatin at a ratio of 10/10/3/2/1 w/w. The diet was mill-powdered, sieved (mesh size, 500 µm), and heated to 70 °C for 0.5 h. For the experiments, the

mites were collected from the surface of the chambers, which were plugged.

### Feces extract preparation

To prepare the spent growth medium, the mite cultures were prepared in 12 chambers per species of mite with the HDMd diet. To establish a new chamber, approximately 5000 mites plus their diets were placed in a new chamber containing 0.5 g of a freshly prepared HDMd; the mites were obtained from mites in the exponential phase of growth (Eraso *et al.*, 1997a,b). Then the cultures were cultivated for 1 and 3 months when the spent growth medium (SPGM) was collected. The contents of the six chambers were mixed and transferred to sterile beakers. A 50 mL volume of sterilized phosphate-buffered saline (PBST; 3.2 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 mmol/L KCl, and 135 mmol/L NaCl) with 0.05% w/w Tween<sup>®</sup> 20 detergent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was added and mixed. The mixture was then filtered through a 40 µm mesh Cell Strainer and centrifuged at 845× g for 5 min. The supernatant was resuspended in PBST and centrifuged again, and this step was repeated. The cleaned pellet was resuspended in 10 mL of PBST and used for diet preparation and DNA extraction. The SPGM-treated diets were prepared from the extracts obtained from 1- and 3-month-old cultures of both HDM species. The HDMd (10 g) was mixed with 4 mL of extract and dried under a vacuum (Hubert *et al.*, 2005).

### Experimental design

The experiments (Fig. 1) included (i) a control consisting of HDMd with or without the mites (0, 0DF, and 0DP) and (ii) SPGM-treated HDMd, with SPGM from DF or DP cultures that were 1 and 3 months old and with or without mites (DF1, DF3, DP1, and DP3 and 0DF1, 0DF3, 0DP1, and 0DP3).

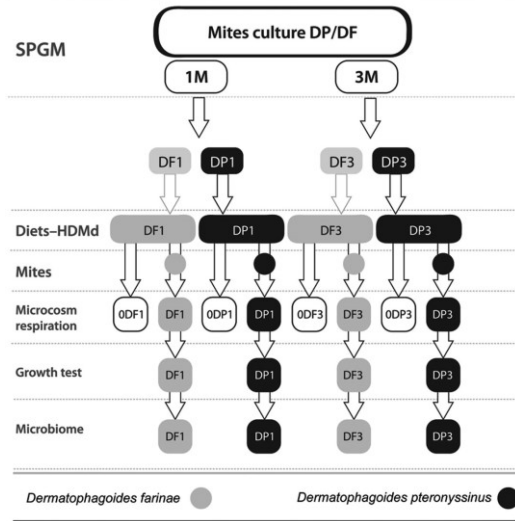
### Mite growth tests

The suitability of the treated diets for mite population growth was compared using a growth test (Hubert *et al.*, 2005), that is, 0DPF, DF1, DF3, 0DP, DP1, and DP3 (Fig. 1). It is expected that the high population growth of mites correlated with the most suitable diet (Matsumoto, 1965). Diets weighing 0.01 ± 0.005 g were added to the flasks. Sexed adult mites consisting of 40 females and 10 males were added to the chamber at 10 replicates per treatment.

The flasks were kept at  $25 \pm 1$  °C and 75% RH for 21 d. The chambers were then filled with Oudemans' fluid (Hughes, 1976), and the mites (adults, nymphs, and larvae) were counted using a dissection microscope.

### Respiration

The microcosm experiments were performed according to a previously described protocol (Nesvorna *et al.*,



**Fig. 1** The experimental design describing the test on house dust mites in spent growth medium (SPGM) and the isolated microorganisms in relation to microcosm respiration and house dust mite population growth in the laboratory. The control was HDMd with or without the mites (0, 0DF, and 0DP); the SPGM-treated HDMd had SPGM from DF or DP cultures at 1 and 3 months of age with or without mites (DF1, DF3, DP1, and DP3 and 0DF1, 0DF3, 0DP1, and 0DP3). Note: DF, *D. farinae*; DP, *D. pteronyssinus*.

2018). In all the treatments, the total respiration was measured in microcosms with or without mites, that is, DF1, DF3, DP1, and DP3 and 0DF1, 0DF3, 0DP1, and 0DP3 (Fig. 2). The microcosms consisted of diets with SPGM or the control and were incubated in the Iwaki chambers with or without mites (40 females and 10 males) for 7 d. The same amount of diet was used as in the growth test. The experimental design included twelve replicates per treatment. The contents of the chamber were then transferred into a syringe. The aperture of the syringe was filled with a moistened piece of filter paper to prevent the movement of mites into the apparatus. The volume of the gas in every syringe was 0.6 mL. The controls were empty syringes. The syringes were incubated for 2 h in the

ES-500 thermostat (Trigon Plus, Cestlice, Czechia) at a temperature  $26 \pm 0.1$  °C. Following the incubation, the CO<sub>2</sub> content was measured immediately by applying 0.5 mL of the gas from the syringe at 120 s intervals (Nesvorna *et al.*, 2018). The CO<sub>2</sub> produced by the chamber was recalculated to the µL of CO<sub>2</sub> per g of fresh weight of the diet. The contribution of the 50 mites to the microorganism respiration was observed, but the CO<sub>2</sub> production was not significantly different from that of the empty syringes; that is, the respiration of 50 mites is negligible.

### DNA extraction

The mites (50 adult individuals) were surface-cleaned with washing ethanol, and then, the ethanol was removed with ddH<sub>2</sub>O (Hubert *et al.*, 2016). The mites were homogenized using a plastic pestle homogenizer in 100 µL of resterilized ddH<sub>2</sub>O. We used a Chelex extraction (Konakandla *et al.*, 2006). Chelex<sup>®</sup> 100 sodium (Cat No: C7901, Sigma-Aldrich) was added to obtain a 10% solution in PBST (w/v). The solution was then boiled for 10 min and centrifuged (1 min at 8000× g). The supernatant was used as a source of microbial/mite DNA. *DNA amplification*

The DNA from the mite homogenates was amplified with CS1515F and CS2806R primers targeting the V4 of the 16S rRNA gene and the fungal community using CS1FF390 and CS2FR1 for 18S rRNA and previously described conditions (Chemidlin Prevost-Boure *et al.*, 2011; Caporaso *et al.*, 2012). For the DNA amplification, we used Takara Ex Taq DNA polymerase, and master mix (cat No. RR001A, Takara Bio, Saint-Germainen-Laye, France), and the negative control, ddH<sub>2</sub>O, was added. The amplicons were sequenced at the DNA Services Facility, Research Resources Center, University of Illinois (Chicago, IL, USA) on a MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) (Earley *et al.*, 2015). The sequences were demultiplexed, and the barcodes and primers were removed by the company. The forward and reverse sequences were aligned and processed using a combination of MOTHUR 1.39.5 (Schloss *et al.*, 2009) and UPARSE 10 (Edgar, 2013, 2016) according to the standard operation procedure (Kozich *et al.*, 2013; Sagova-Mareckova *et al.*, 2017). The operational taxonomic units (OTUs) were described according to the Ribosomal Database Project (Cole *et al.*, 2014), with training set No. 15 and Silva128 (Quast *et al.*, 2013). The representative sequences for each OTU were then compared to those in GenBank using the BLASTn. Raw sequences of 16S rRNA and 18S rRNA genes are

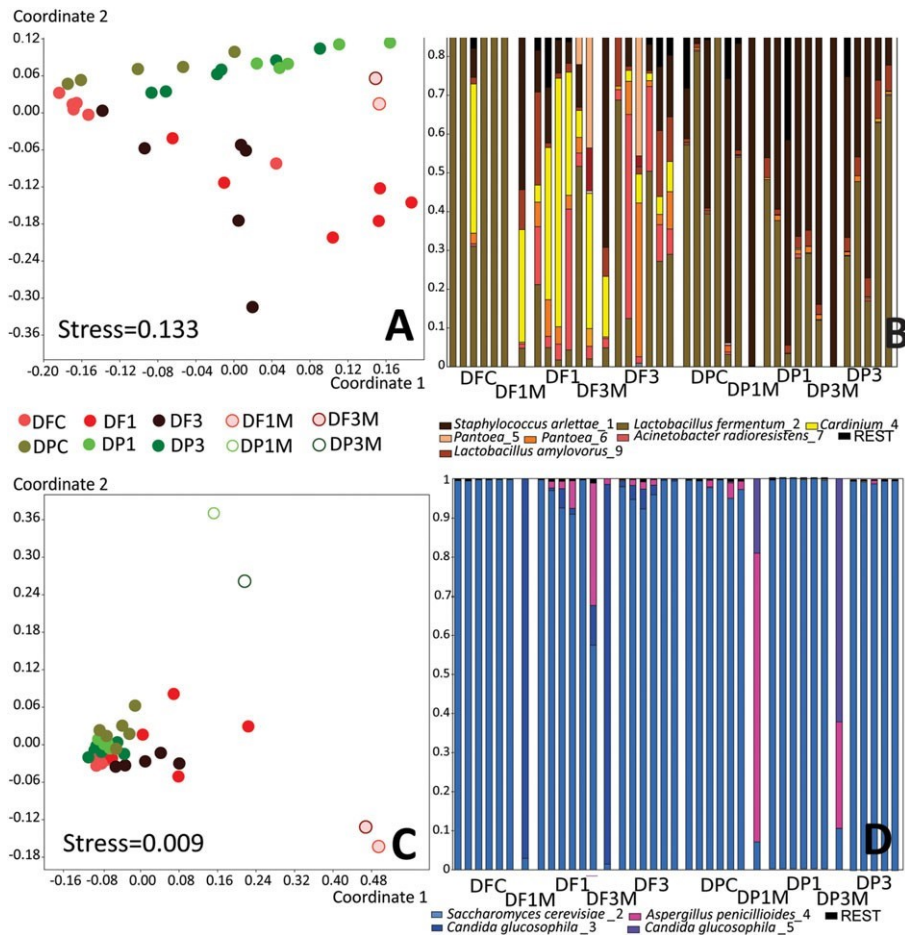
accessible through SRA study accession number SRP139166 (Table S1). In the bacterial dataset, all the sequences with numbers lower than 1000 were eliminated. Both datasets were standardized by recalculating to 5000 reads/sample (Tables S2–S6). The OTUs were visualized by Krona projections (Ondov *et al.*, 2011) (Figs. S1–S6).

### Data analyses

The microbiome profiles were analyzed by two-way

corrections. In all the analyses, the data were analyzed in a Bray–Curtis distance matrix using 10 000 permutation in the PAST 3.14 program (Hammer *et al.*, 2001). The differences were visualized by nonmetric multidimensional scaling (NMDS) (Fig. 2). If significant differences were found among the treatments, then METASTATS analyses (White *et al.*, 2009) were applied to identify the OTUs with significant differences ( $P < 0.05$ ) among the treatments using MOTHUR (Table S7).

The respiration and population growth data were



**Fig. 2** Microbiome of house dust mites, (A) nonlinear multidimensional scaling of the samples of the bacterial microbiome for house dust mites; (B) bacterial profiles of samples from house dust mites; (C) nonlinear multidimensional scaling of samples from the house dust mite fungal microbiome; and (D) the fungal profile of the samples from house dust mites. Note: DF, *D. farinae*; DP, *D. pteronyssinus*; C, mites receiving a control diet without any treatment; 1, mites receiving a 1-month-old spent growth medium extract-treated diet; 3, mites receiving a 3-month-old spent growth medium extract-treated diet; and M, feces extract.

nonparametric multivariate analyses (PERMANOVA) (Anderson, 2001) when the tested variables were mite species (DF and DP) and treatments (DFC, DPC, DF1, DF3, DP1, and DP3). If the species and treatments had a significant effect, a one-way PERMANOVA was performed separately for the species and a pairwise comparison was performed after Bonferroni

log(10)-transformed. The data were analyzed by nonparametric test, that is, Kruskal–Wallis with a Dunnett pairwise comparison after Bonferroni correction and Mann–Whitney tests (Fig. 2). The analyses were performed in PAST (Hammer *et al.*, 2001) and XLSTAT (Addinsoft, New York, NY, USA).

## Results

### *Spent growth medium induces changes in the bacterial profile of D. farinae but not D. pteronyssinus*

The addition of spent growth medium (SPGM) to house dust mite diets (HDMd) caused changes in the bacterial

**Table 1** The comparison of the effect of spent growth medium to microbiome of house dust mites based on two- and one-way permutational analyses of variance (PERMANOVA). The tested variables were species of house dust mites and spent growth medium treatment. The analyses were calculated in Bray–Curtis distance. Statistical significant values are indicated by bold.

Dataset	Factor	df	F	P
Bacteria	Species	1	<b>1.560</b>	<b>0.001</b>
	SPGM	2	<b>0.705</b>	<b>0.001</b>
	Interaction	2	<b>0.007</b>	<b>0.020</b>
Bacteria-DF	SPGM	1	<b>5.021</b>	<b>0.002</b>
Bacteria-DP	SPGM	1	<b>4.171</b>	<b>0.024</b>
Fungi	Species	1	2.261	<b>0.023</b>
	SPGM	2	1.153	0.210
	Interaction	2	-0.620	0.150

Note: DF, *D. farinae*; DP, *D. pteronyssinus*; SPGM, mites from HDMd (house dust mite rearing diet) treated with spent growth medium extract.

**Table 2** The pairwise comparison after Bonferroni correction between diets treated by spent growth medium and control to bacterial microbiome of house dust mites.

DF	DF3	DF1	DFC
		1.995	4.338
<b>DF1</b>	0.3204		<b>10.92</b>
<b>DFC</b>	<b>0.0486</b>	<b>0.018</b>	
<b>DP</b>	<b>DP3</b>	<b>DP1</b>	<b>DPC</b>
			2.387
<b>DP1</b>	0.3381		7.242
<b>DPC</b>	0.357	0.052	
<b>DF3</b>			

**DP3**

2.675

Note: DF, *D. farinae*; DP, *D. pteronyssinus*; C, mites from control diet without any treatment; 1, mites from 1 month spent growth medium extract treated diet; 3, mites from 3 months spent growth medium extract treated diet; F values are above

diagonals; P values are in the diagonal. Statistical significant values are indicated by bold.

microbiome compositions of the mites. Based on a twoway PERMANOVA, the microbiome composition was influenced by the species of mite, the SPGM and their interaction (Table 1). When a one-way PERMANOVA was applied separately for the species, the effect of the SPGM was still significant for both species. The pairwise comparison after Bonferroni correction revealed differences (Table 2) among the bacterial microbiomes of the control mites and the mites receiving the 1- or 3-month-old SPGM-treated diets in *D. farinae*, but not in *D. pteronyssinus* (Figs. S1 and S4). The situation with the sample similarity is visualized by multiple dimensional scaling (NMDS) in Fig. 2A.

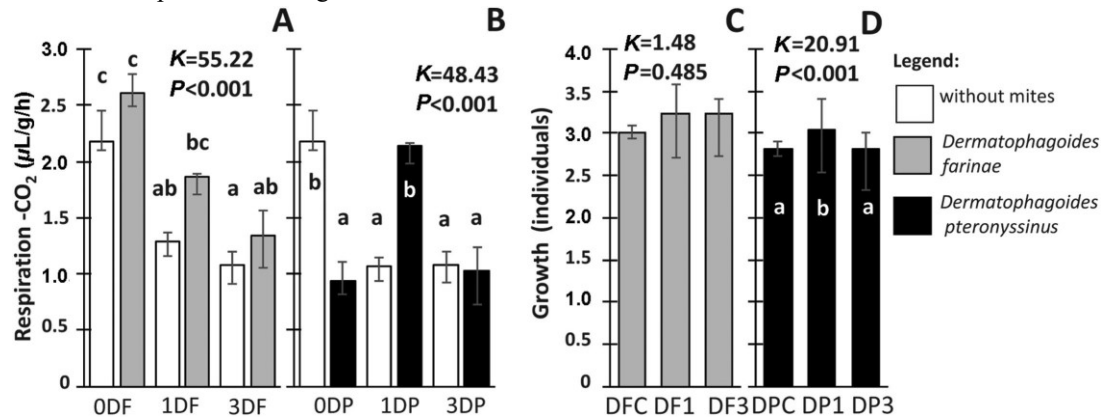
The *D. farinae* bacterial microbiome contains a high amount of *Lactobacillus* (OTU2), and the profile of this bacterium decreased in the mite microbiome in response to the SPGM-treated diet, in comparison to that of the control (Table S7). The profile of the other OTUs significantly increased in the mite microbiomes under the SPGM-treated diet in comparison to that of the control (Fig. S1). The influenced OTUs included *Staphylococcus* (OTU1), *Acinetobacter* (OTU7), and *Sphingomonas* (OTU12) and partly *Cardinium* (OTU4) (Fig. 1B). *Staphylococcus* (OTU1) and *Cardinium* (OTU4) formed the majority of the profile of bacterial sequences in SPGM.

The fungal microbiome of mites differed among species (Table 1), but it was not influenced by adding SPGM to the diet (Fig. 2C). Almost all the sequences of the fungal microbiome belonged to *S. cerevisiae* (OTU2), and the differences between mite species were caused by *A. penicillioides* (OTU4) (Figs. S2 and S5). The SPGM fungal composition differed from the mite fungal microbiome (Figs. S3 and S6). The differences were due to the low numbers of sequences in *S. cerevisiae* (OTU2) profile and the high numbers of *Candida* (OTU3) sequences in SPGM obtained from *D. farinae* cultures as well as *A. penicillioides* (OTU4) and the *Candida* (OTU5) obtained under SPGM treatment from the *D. pteronyssinus* culture (Fig. 2D).

### *The influence of SPMG on microbial respiration and the population growth of house dust mites*

In the absence of mites, SPGM from the mite cultures had inhibitory effects on the CO<sub>2</sub> production by microorganisms in the microcosms. Adding SPGM to

the diet in the microcosms decreased the microcosm respiration (Fig. 3A, B). The inhibitory effect of SPGM on microbial respiration was the same for the SPGM from the cultures of both species and was not influenced by the culture age. When the mites were added to microcosms receiving the control diet without SPGM, the CO<sub>2</sub> production of the microcosms was species-dependent (Fig. 3A, B). In comparison to the control, that is, the control diet without mites, the presence of *D. pteronyssinus* led to a 10 fold decrease in respiration, while no *D. farinae* effect was observed on microcosm respiration (Fig. 3A). The population growth of *D. farinae* was 2 fold higher than it was for *D. pteronyssinus* under the control diet without SPGM addition (Fig. 3C, D). The combination of *D. farinae* mites and SPGM resulted in no effect, nor did it influence microbial respiration or DF growth.



**Fig. 3** The effect of house dust mite spent growth medium (SPGM) and isolated microorganisms on the microcosm respiration and house dust mite population growth. (A, B) Microcosm respiration with SPGM with and without mites: (A) *D. farinae*; (B) *D. pteronyssinus*. (C, D) Population growth of house dust mites under the control and the diet treated with SPGM: (C) *D. farinae*; (D) *D. pteronyssinus*. The columns are medians, and the error bars represent the interquartile range after log<sub>10</sub> transformation. The data were analyzed by Kruskal–Wallis test, and the *K* and *P* values are shown. The letters indicate differences upon *post hoc* comparison according to the Dunnett test using Bonferroni corrections. (E, F) The effect of isolated microbial species on microcosm respiration and population growth in house dust mites. Note: DF, *D. farinae*; DP, *D. pteronyssinus*; 0, no mites in the experiment; 1, mites from 1-month-old spent growth medium extract-treated diet; 3, mites from 3-month-old spent growth medium extract-treated diet; and M, feces extract.

The *D. pteronyssinus* population growth and respiration showed different responses than those observed for *D. farinae*. The results indicated that the *D. pteronyssinus* presence eliminated the suppressive effect of the spent growth medium (1-month-old culture), but it disappeared during the interaction in the 3-month-old culture. The numbers of mites after 21 d of growth were 2 fold higher under diets treated with 3-month-old SPGM than those treated with the 1-month-old spent growth medium and control and (Fig. 3D).

## Discussion

The results of the study supported the “nutritional hypothesis” (Douglas & Hart, 1989) in that the mites used the microorganisms as food sources. This strategy seems to be beneficial for survival in an indoor environment in the developed microbial community. In this study, we demonstrated that SPGM contains fungi and bacteria and that their addition changes the diet of mites. This situation is analogous to the developed mite cultures when the diet is contaminated by the feces of mites, dead mite bodies and the microorganisms growing on them (Stewart *et al.*, 1986; Erban *et al.*, 2016). SPGM was shown to be the source of microorganisms that were colonizing the diets in this study. This finding was supported by the bacterial and fungal profiles of SPGM. The respiration of microcosms

without mites was inhibited by SPGM addition compared to that of the control situation. The explanation is that in the microcosm without SPGM, there are a few random bacterial species without any competition, resulting in massive growth and CO<sub>2</sub> production. SPGM contains a more diversified community of microorganisms, which is inhibited, and the respiration is reduced by half. This result corresponds to the experiments on the interaction between mites or springtails and microorganisms in a microcosm experiment (Hanlon, 1981; Seastedt, 1984; Lussenhop, 1992; A’Bear *et al.*, 2014). These effects accelerated the respiratory production (CO<sub>2</sub>) of the microcosms (Hanlon, 1981).

Microorganisms are known to have various effects on mite population growth (van Bronswijk & Sinha, 1973). For example, mite-feeding on *A. penicillioides* resulted in the reduced growth of HDM mites, but the mites cannot survive without the fungus (Hay *et al.*, 1993). Adding *Bacillus sphaericus* (*Lysinibacillus sphaericus*) to the mite diet prolonged the length of time needed for development by *D. pteronyssinus* (Saleh *et al.*, 1991b). However, in this study, we found that the effect of adding SPGM to the diet is only marginal in relation to the mite population growth. The explanations for this finding may be that no antagonistic microorganisms were in the SPGM or that the composition of the diet was more complex and the mites did not exhibit selective feeding on antagonistic microbial species. The interaction between *D. pteronyssinus* and SPGM from 1-month-old cultures differs from that of the other situations. The mites had accelerated population growth and decreased the suppressive effect of SPGM on microbial respiration in the microcosm. The explanation is that the mites were feeding on the microorganisms in the microcosms, and they stimulated the microbial metabolic activity by feeding, vectoring inside diets or feces production, but no changes were observed in the microbiome composition.

The observed differences between microbial profiles from mite bodies and SPGM are caused by the inhibition of bacterial growth, selective feeding, the presence of symbionts in the mite bodies or random processes (Burns *et al.*, 2016). *Dermatophagoides* are known to produce antibacterial proteins and hydrolytic enzymes; for example, 14.5 kDa protein can inhibit bacterial growth, peptidoglycan-degrading (lysozymes and/or chitinases) hydrolyzing the peptidoglycan in the cell walls of Gram-positive bacteria and chitin in the fungal cell walls (Mathaba *et al.*, 2002; Erban *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015). These proteins can accumulate in the feces fraction and inhibit microbial growth and respiration. Some fungi (*Eurotium amstelodami*, *A. penicillioides*, and *Wallemia sebi*) are known to have beneficial effects on population growth in mites; *W. sebi* is a “tasty fungus” preferred by mites in food choice tests (Naegele *et al.*, 2013), indicating selective feeding. In this study, the mites fed selectively on yeasts (*S. cerevisiae*) as indicated by the 99% matching sequences from this species for the fungal microbial profile from the mite bodies. The high preference for yeasts is well known, due to the rearing diet composition (van Bronswijk, 1971; Andersen, 1991; Saleh *et al.*, 1991a). The absence of yeast sequences in the feces profile indicated that the yeasts were digested completely. If there was selective feeding on bacteria, it was hard to evaluate due to missing data. It was previously demonstrated that adding *Micrococcus lysodeikticus* (*Actinobacteria*) to the diet

accelerated the population growth of *D. farinae*, but not *D. pteronyssinus* (Erban & Hubert, 2008). *D. farinae* hosted the intracellular symbiotic bacterium *Cardinium* (Zchori-Fein & Perlman, 2004), which strongly influenced the bacterial profile. *Cardinium* was also present in SPGM, although it was not defecated. This finding indicates that when *Cardinium* is present, the SPGM is formed not only by the feces of mites but also from the rest of the mite bodies.

The observed changes in the *D. farinae* bacterial profile induced by feeding on SPGM diets were connected to the ingestion of *Staphylococcus*, which was present in SPGM and replaced *Lactobacillus*. *Staphylococcus* formed almost 90% of the sequences in the SPGM profile. Being a Gram-positive bacterium, the *Staphylococcus* cell wall is a suitable target for lysozyme-like enzymes in the guts of mites (Erban & Hubert, 2008). The hydrolysis of bacterial cell walls can provide nutrients to mites (Erban & Hubert, 2008). However, both *Dermatophagoides* mites are equipped with lysozyme-like enzymes. The significant changes in the *D. farinae* microbiome indicated the ingestion of bacteria from the SPGM-treated diet, but without any effect on their respiration in the microcosms.

The ancestors of HDM were mites with parasitic modes of life, but within indoor environments, the mites return to a commensal lifestyle where the mites are living all together with nonparasitic, free-living stored product mites (SPM) (Klimov & OConnor, 2013). The commensal lifestyle of house dust mites is dependent on nutrients from human skin, nails, hairs and microorganisms (Sinha *et al.*, 1970; van Bronswijk, 1971; de Saint Georges-Grédelet, 1987; Hart *et al.*, 2007). Our experiments showed that the SPGM has minimal influence on HDM growth and its microbiome composition. Because the mites were not limited in nutrients, this result indicates that no antagonistic microorganisms were present in the SPGM or that there were too few of them to influence the mites. Alternatively, the influence of SPGM was not studied under optimal dietary conditions, unlike the tested diet. Based on these limitations, the observed fraction of SPGM has no negative influence on HDM. The further study is recommended to test the interaction between mites and isolated microorganism to confirm the low effect of microbes to HDM.

## Acknowledgments

The authors are obligated to two anonymous referees for valuable comments of previous version of draft. This study was supported by the Czech Science Foundation as project

17–12068S. We thank Martin Markovic and Jan Hubert Jr. for their technical help. Experimental design JH, VM, MN, experiments VM, MB, MN, writing paper JH and VM, bioinformatics JH.

## Disclosure

This study was funded by 17-12068S the Czech Science Foundation has no influence to the results of the study.

All authors that they have no conflict of interest.

## References

- A'Bear, A.D., Jones, T.H. and Boddy, L. (2014) Size matters: what have we learnt from microcosm studies of decomposer fungus–invertebrate interactions? *Soil Biology and Biochemistry*, 78, 274–283.
- Andersen, A. (1991) Nutritional value of yeast for *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Epidermoptidae) and the antigenic and allergenic composition of extracts during extended culturing. *Journal of Medical Entomology*, 28, 487–491.
- Anderson, M.J. (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26, 32–46.
- Arlian, L.G. (2002) Arthropod allergens and human health. *Annual Review of Entomology*, 47, 395–433.
- Brandwein, M., Steinberg, D. and Meshner, S. (2016) Microbial biofilms and the human skin microbiome. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2, 3. <https://doi.org/10.1038/s41522-0160004-z>.
- Burns, A.R., Stephens, W.Z., Stagaman, K., Wong, S., Rawls, J.F., Guillemin, K. *et al.* (2016) Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in the zebrafish over host development. *ISME Journal*, 10, 655–664.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N. *et al.* (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, 6, 1621–1624.
- Chemidlin Prevost-Boure, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougel, C., Lelievre, M., Jolivet, C. *et al.* (2011) Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS ONE*, 6, e24166.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y. *et al.* (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42, D633–D642.
- Colloff, M.J. (1998) Distribution and abundance of dust mites within homes. *Allergy*, 53(s48), 24–27.
- de Saint Georges-Grèdelet, D. (1987) Vitamin requirements of the European house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae), in relation to its fungal association. *Journal of Medical Entomology*, 24, 408–411.
- Douglas, A.E. and Hart, B.J. (1989) The significance of the fungus *Aspergillus penicillioides* to the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Symbiosis*, 7, 105–116.
- Earley, Z.M., Akhtar, S., Green, S.J., Naqib, A., Khan, O., Cannon, A.R. *et al.* (2015) Burn injury alters the intestinal microbiome and increases gut permeability and bacterial translocation. *PLoS ONE*, 10, e0129996.
- Edgar, R.C. (2013) UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10, 996–998.
- Edgar, R.C. (2016) UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. bioRxiv.org. DO: <https://doi.org/10.1101/081257>. Retrieved from <https://www.biorxiv.org/content/early/2016/10/15/081257>. Accessed 10 April 2018.
- Eraso, E., Guisantes, J.A., Martinez, J., Saenz-de-Santamaria, M., Martinez, A., Palacios, R. *et al.* (1997a) Kinetics of allergen expression in cultures of house dust mites, *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae* (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of Medical Entomology*, 34, 684–689.
- Eraso, E., Martinez, J., Martinez, A., Palacios, R. and Guisantes, J.A. (1997b) Quality parameters for the production of mite extracts. *Allergologia et Immunopathologia*, 25, 113–117.
- Erban, T., Di Presa, C.A., Kopecky, J., Poltronieri, P. and Hubert, J. (2013) PCR detection of the 14.5 antibacterial NlpC/P60-like *Dermatophagoides pteronyssinus* protein in *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of Medical Entomology*, 50, 931–933.
- Erban, T. and Hubert, J. (2008) Digestive function of lysozyme in synanthropic acaridid mites enables utilization of bacteria as a food source. *Experimental and Applied Acarology*, 44, 199–212.
- Erban, T., Rybanska, D., Harant, K., Hortova, B. and Hubert, J. (2016) Feces derived allergens of *Tyrophagus putrescentiae* reared on dried dog food and evidence of the strong nutritional interaction between the mite and *Bacillus cereus* producing protease bacillolysins and exo-chitinases. *Frontiers in Physiology*, 7, 53. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00053>.
- Hammer, O., Harper, D.A.T. and Ryan, P.D. (2001) PAST—PAleontological STatistics. Retrieved from [https://www.uv.es/~pardomv/pe/2001\\_1/past/pastprog/past](https://www.uv.es/~pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past). Accessed 10 April 2018.



- Hanlon, R.D.G. (1981) Influence of grazing by *Collembola* on the activity of senescent fungal colonies grown on media of different nutrient concentration. *Oikos*, 36, 362–367.
- Hart, B.J., Crowther, D., Wilkinson, T., Biddulph, P., Ucci, M., Pretlove, S. *et al.* (2007) Reproduction and development of laboratory and wild house dust mites (Acari: Pyroglyphidae) and their relationship to the natural dust ecosystem. *Journal of Medical Entomology*, 44, 568–574.
- Hay, D.B., Hart, B.J. and Douglas, A.E. (1992) Evidence refuting the contribution of the fungus *Aspergillus penicillioides* to the allergenicity of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 97, 86–88.
- Hay, D.B., Hart, B.J. and Douglas, A.E. (1993) Effects of the fungus *Aspergillus penicillioides* on the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*: an experimental re-evaluation. *Medical and Veterinary Entomology*, 7, 271–274.
- Hubert, J., Doleckova-Maresova, L., Hyblova, J., Kudlikova, I., Stejskal, V. and Mares, M. (2005) *In vitro* and *in vivo* inhibition of alpha-amylases of stored-product mite *Acarus siro*. *Experimental and Applied Acarology*, 35, 281–291.
- Hubert, J., Kopecky, J., Nesvorna, M., Perotti, M.A. and Erban, T. (2016) Detection and localization of *Solitalea*-like and *Cardinium* bacteria in three *Acarus siro* populations (Astigmata: Acaridae). *Experimental and Applied Acarology*, 70, 309–327.
- Hughes, A.M. (1976) *The Mites of Stored Food and Houses: Technical Bulletin 9 of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food*, 2nd edn. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- Kim, J.Y., Yi, M.H., Hwang, Y., Lee, J.Y., Lee, I.Y., Yong, D. *et al.* (2018) 16S rRNA profiling of the *Dermatophagoides farinae* core microbiome: *Enterococcus* and *Bartonella*. *Clinical and Experimental Allergy*, 48, 607–610.
- Klimov, P.B. and O'Connor, B. (2013) Is permanent parasitism reversible?—Critical evidence from early evolution of house dust mites. *Systematic Biology*, 62, 411–423.
- Konakandla, B., Park, Y. and Margolies, D. (2006) Whole genome amplification of Chelex-extracted DNA from a single mite: a method for studying genetics of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*. *Experimental and Applied Acarology*, 40, 241–247.
- Kong, H.H., Oh, J., Deming, C., Conlan, S., Grice, E.A., Beatson, M.A. *et al.* (2012) Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research*, 22, 850–859.
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K. and Schloss, P.D. (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 5112–5120.
- Lang, J.D. and Mulla, M.S. (1978) Spatial distribution and abundance of house dust mites, *Dermatophagoides* spp., in homes in southern California. *Environmental Entomology*, 7, 121–127.
- Lax, S., Smith, D.P., Hampton-Marcell, J., Owens, S.M., Handley, K.M., Scott, N.M. *et al.* (2014) Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science*, 345, 1048–1052.
- Lussenhop, J. (1992) Mechanisms of microarthropod–microbial interactions in soil. *Advances in Ecological Research*, 23, 1–33.
- Mathaba, L.T., Pope, C.H., Lenzo, J., Hartofilis, M., Peake, H., Moritz, R.L. *et al.* (2002) Isolation and characterisation of a 13.8-kDa bacteriolytic enzyme from house dust mite extracts: homology with prokaryotic proteins suggests that the enzyme could be bacterially derived. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 33, 77–88.
- Matsumoto, K. (1965) Studies on environmental factors for breeding of grain mites VII. Relationship between reproduction of mites and kind of carbohydrates in the diet. *Medical Entomology and Zoology*, 16, 118–122.
- Naegele, A., Reboux, G., Scherer, E., Roussel, S. and Millon, L. (2013) Fungal food choices of *Dermatophagoides farinae* affect indoor fungi selection and dispersal. *International Journal of Environmental Health Research*, 23, 91–95.
- Nesvorna, M., Bittner, V. and Hubert, J. (2018) The mite *Tyrophagus putrescentiae* hosts population-specific microbiomes that respond weakly to starvation. *Microbial Ecology* (in press, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29967922> or <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1224-y>).
- Ondov, B.D., Bergman, N.H. and Phillippy, A.M. (2011) Interactive metagenomic visualization in a web browser. *BMC Bioinformatics*, 12, 385. <https://doi.org/10.1186/1471-210512-385>.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P. *et al.* (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, D590–D596.
- Sagova-Mareckova, M., Omelka, M. and Kopecky, J. (2017) Sequential analysis of soil factors related to common scab of potatoes. *FEMS Microbiology Ecology*, 93, fiw201.
- Saleh, S.M., Abdel-Hamid, M.M. and Rezk, H.A. (1991a) Biology of the European house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart). *Acarologia*, 32, 57–60.
- Saleh, S.M., Kelada, N.L. and Shaker, N. (1991b) Control of European house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) with *Bacillus* spp. *Acarologia*, 32, 257–260.

- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B. *et al.* (2009) Introducing mothur: opensource, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7537–7541.
- Seastedt, T.R. (1984) The role of microarthropods in decomposition and mineralization processes. *Annual Review of Entomology*, 29, 25–46.
- Sinha, R.N., van Bronswijk, J.E.M.H. and Wallace, H.A.H. (1970) House dust allergy, mites and their fungal associations. *Canadian Medical Association Journal*, 103, 300–301.
- Stewart, G.A., Butcher, A., Lees, K. and Ackland, J. (1986) Immunochemical and enzymatic analyses of extracts of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 77, 14–24.
- Tang, V.H., Stewart, G.A. and Chang, B.J. (2015) House dust mites possess a polymorphic, single domain putative peptidoglycan D,L endopeptidase belonging to the NlpC/P60 superfamily. *FEBS Open Bio*, 5, 813–823.
- van Bronswijk, J.E.M.H. (1971) Food preference of pyroglyphid house-dustmites (Acari). *Netherlands Journal of Zoology*, 22, 335–340.
- van Bronswijk, J.E.M.H. and Sinha, R.N. (1973) Role of fungi in the survival of *Dermatophagoides* (Acarina: Pyroglyphidae) in house-dust environment. *Environmental Entomology*, 2, 142–145.
- White, J.R., Nagarajan, N. and Pop, M. (2009) Statistical methods for detecting differentially abundant features in

clinical metagenomic samples. *PLoS Computational Biology*, 5, e1000352.

Zchori-Fein, E. and Perlman, S.J. (2004) Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular Ecology*, 13, 2009–2016.

Manuscript received May 28, 2018

Final version received July 24, 2018

Accepted July 29, 2018

## Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**Table S1.** Sequenced microbiomes of *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* at different experimental conditions. Bacterial and fungal microbiomes are referred to by the sequenced gene fragments, 16S and 18S rRNA, respectively. Sequences were deposited in GenBank as SRA bioproject PRJNA449428 (SRP139166).

**Table S2.** The identification of bacterial OTUs based on Ribosome database project.

**Table S3.** The identification of bacteria OTUs based on comparison of representative sequences to GenBank.

**Table S4.** The identification of fungal OTUs based on Ribosome database project.

**Table S5.** The identification of fungal OTUs based on comparison of representative sequences to GenBank.

**Table S6.** Standardized profile dataset of bacterial microbiome of house dust mites.

**Table S7.** The results of METASTATS analyses of *D. farinae* microbiome.

**Fig. S1.** Krona visualization of bacterial OTUs *Dermatophagoides farinae*. A, *Dermatophagoides farinae* bacterial microbiome of mites feeding on control diet (DFC); B, *Dermatophagoides farinae* bacterial microbiome of mites feeding on 1-month-old SPGM medium-treated diet (DF1M); C, *Dermatophagoides farinae* bacterial microbiome of mites feeding on 3-month-old SPGM medium-treated diet (DF3M).

**Fig. S2.** Krona visualization of fungal OTUs *Dermatophagoides farinae*. A, *Dermatophagoides farinae* fungal microbiome of mites feeding on control diet (DFC); B, *Dermatophagoides farinae* fungal microbiome of mites feeding on 1-month-old SPGM

medium-treated

diet (DF1M); C, *Dermatophagoides farinae* fungal microbiome of mites feeding on 3-month-old SPGM medium-treated diet (DF3M).

**Fig. S3.** Krona visualization of bacterial and fungal OTUs of SPGM (*Dermatophagoides farinae*). A, the bacterial composition of SPGM extract from 1-month-old mite (*Dermatophagoides farinae*) culture (DFE1M); B, the bacterial composition of SPGM extract from 3-month-old mite (*Dermatophagoides farinae*) culture (DFE3M);

C, the fungal composition of SPGM extract from 1-month-old mite (*Dermatophagoides farinae*) culture (DFE1M); D, the fungal composition of SPGM extract from 3-month-old mite (*Dermatophagoides farinae*) culture (DFE3M).

**Fig. S4.** Krona visualization of bacterial OTUs *Dermatophagoides pteronyssinus*. A, *Dermatophagoides pteronyssinus* bacterial microbiome of mites feeding on control diet (DPC); B, *Dermatophagoides pteronyssinus* bacterial microbiome of mites feeding on 1-month-old SPGM medium-treated diet (DP1M); C, *Dermatophagoides pteronyssinus* bacterial microbiome of mites feeding on 3-month-old SPGM medium-treated diet (DP3M).

**Fig. S5.** Krona visualization of fungal OTUs *Dermatophagoides pteronyssinus*. A, *Dermatophagoides pteronyssinus* fungal microbiome of mites feeding on 1-month-old SPGM medium-treated diet (DPCH); B, *Dermatophagoides pteronyssinus* fungal microbiome of mites feeding on 1-month-old SPGM medium-treated diet (DP1M); C, *Dermatophagoides pteronyssinus* fungal microbiome of mites feeding on 3-month-old SPGM medium-treated diet (DP3M).

**Fig. S6.** Krona visualization of bacterial and fungal OTUs extract of *Dermatophagoides pteronyssinus*. A, the bacterial composition of SPGM extract from 1-month-old mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) culture (DPE1M); B, the bacterial composition of SPGM extract from 3-month-old mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) culture (DPE3M); C, the fungal composition of SPGM extract from 1-month-old mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) culture (DPE1M); D, the fungal composition of SPGM extract from 3-month-old mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) culture (DPE3M).