

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

Magisterské studium

Studijní obor: Biologie-chemie VVP pro střední školy

Akademický rok: 2005/2006

Forma studia: prezenční

**BAKTERIE JAKO POTRAVA SYNANTROPNÍCH
ROZTOČŮ (ACARI: ACARIDIDA)**

(Diplomová práce)

Vypracoval: Tomáš Erban

Školitel: Prof. RNDr. Jaroslav Smrž, CSc.

Školitel konzultant: Mgr. Jan Hubert, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že předkládanou diplomovou práci na téma „Bakterie jako potrava synantropních roztočů (Acari: Acaridida)“ jsem vypracoval samostatně pod vedením uvedených školitelů. Veškerou použitou literaturu a podkladové materiály jsem uvedl v přehledu literatury.

V Praze dne 27.8.2006

Tomáš Ivan

Poděkování

Za vedení diplomové práce děkuji vedoucímu diplomové práce prof. RNDr. Jaroslavu Smržovi, CSc. Především bych však chtěl poděkovat Mgr. Janu Hubertovi, Ph.D., který mi vytvořil ideální podmínky potřebné při řešení diplomové práce, ať již se jedná o materiální či finanční podporu projektu, bez kterých by nebylo možno diplomovou práci vůbec realizovat. Děkuji mu také za ochotu ke konzultacím během celých dvou let, po které jsem pod jeho vedením ve VÚRV pracoval na řešení tématu.

Za ochotu zabývat se obsahem mé diplomové práce a za velmi cenné připomínky k textu děkuji prof. Jaroslavu Smržovi, Mgr. Janu Hubertovi a také Mgr. Ivě Kudlíkové-Křížkové.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Ivě Kudlíkové-Křížkové z VÚRV Praha za zpřístupnění laboratoře na oddělení mykologie. V neposlední řadě děkuji také Šárce Tučkové a Bc. Martě Nesvorné taktéž z VÚRV Praha za technickou pomoc v chovech roztočů a při přípravě biologického materiálu. Nemalý dík patří také vedoucímu oddělení ochrany zásob Ing. Václavu Stejskalovi Ph.D.

Tato práce byla financována z grantu COST 1P04OC853.003.

Abstract

Bacteria as food source for synanthropic mites (Acari: Acaridida)

The lysozyme activity is usually exhibited by the cell of immune system as unspecific immunity. Lysozyme is also involved in digestion of bacteria in some organisms, such as ruminants, folivorous monkeys and birds, rabbits, termites or Diptera Cyclorrhapha. The antropogenous mites inhabited bacteria reach habitats including house dust and stored product. Although in some species the lysozyme activity has been reported, nothing is known about utilization of bacteria. The main goal of this study was to find whether mites utilize bacteria as a food source.

The activity of lysozyme as the enzyme hydrolyzing the cell walls of G⁺ bacteria was measured on 10 species of acaridid mites (i) in the whole mite extracts (WME) and (ii) in the spent growth medium extracts (SGME). In addition, the pH optima of lysozyme activities were found for both fractions separately. In biotests, the effects of bacterial enriched and control rearing diets on population growth were compared. The bacteria were added into rearing diet (*Micrococcus lysodieticus* – 5 % w/w) and population growth starting from 20 specimens was observed 21 days after cultivation in optimal conditions (85 % RH and 25°C except *D. farinae* - 75 % RH). The numbers of individuals on both diets were compared. As bacteria-feeding species were suggested species of significantly higher numbers on bacteria-enriched diet than on control (T-test).

The lysozyme activities were found in WME and SGME of all tested species in different levels. The results also showed that the mite lysozymes have similarities to ruminant stomach lysozyme and Cyclorrhapha midgut lysozyme, in being active at middle acid pH values. Curves of pH optima also showed, that the mite lysozymes could be resistant to acid endogenous proteinases. The species differs in their population increase on bacteria-enriched diets. Among tested species, *T. lini*, *L. destructor*, *C. redickorzevi* and *D. farinae* were referred as bacteria feeding. Lower degree of bacteriophagy was observed in *G. domesticus* and *A. ovatus*, and for *T. putrescentiae*, *T. brevicrinathus*, *A. siro* and *A. gracilis* there were no significant differences in population increase on bacteria-enriched and control diets. In spite of biotests, digestive function of lysozyme in these species is indicated by: (i) activity of lysozyme in WME and SGME; (ii) pH optima corresponding to physiological conditions in midgut (ventriculus and caeca).

These results confirmed the ability of studied antropogenous mites to digest bacteria. The bacteria-mites interactions as well as allergen potential

Obsah

Obsah.....	1
1. Úvod	3
2. Literární přehled	5
2.1. Úvodem o roztočích	5
2.2. Evoluce skladištních roztočů.....	5
2.3. Ekonomický a medicínální význam skladištních a prachových roztočů.....	8
2.4. Lysozym a lysozyme-like proteiny jako alergeny.....	10
2.5. Potravní biologie roztočů	11
2.6. Bakteriofagie jako potravní strategie.....	13
2.6.1 Podmínky bakteriofagie.....	13
2.6.2 Lysozym funguje u některých organismů jako trávicí enzym.....	17
2.6.3 Lysozym byl nalezen i u roztočů, dosud nebyl studován jako trávicí enzym	18
3. Materiál a metodika.....	23
3.1. Modelové druhy roztočů.....	23
3.2. Chovné a experimentální diety	23
3.3. Chovné boxy a chovné komůrky.....	24
3.4. Materiál pro enzymatické stanovení.....	24
3.5. <i>In vitro</i> analýza.....	25
3.5.1 Princip metody.....	25
3.5.2 Měření enzymové aktivity	26
3.5.2.1 Determinace orientačního pH optima.....	27
3.5.2.2 Stanovení aktivit a pH optima v WME	27
3.5.2.3 Stanovení aktivit a pH optima v SGME	27
3.5.2.4 Testování bakteriolytické aktivity potravy	27
3.5. <i>In vivo</i> analýza.....	28
3.6. Statistická analýza dat	28
3.7. Určení pH optima ve střevě roztočů.....	28
3.8. Seznam použitých použité techniky, chemikálií a programů.....	29
4. Výsledky.....	32
4.1. Výsledky <i>in vitro</i> analýzy.....	32
4.1.1. Orientační pH optimum lysozymu	32
4.1.2. Aktivity a pH optimum lysozymu v WME a SGME	35

4.2.	Výsledky <i>in vivo</i> analýzy.....	40
4.2.1.	Populační růst roztočů	40
4.3.	pH v částech střeva	47
5.	Diskuse	48
6.	Závěr.....	54
7.	Použitá literatura.....	55
7.1.	Citace	55
8.	Přílohy	63
8.1.	Pufrovací rozsah Britton-Robinsonova pufru I	63
8.2.	Kalibrace <i>M. lysodiekcticus</i>	64
8.3.	Kalibrace proteinů	64
8.4.	Postup čištění roztočů.....	65
8.5.	Alergeny prachových roztočů.....	66
8.6.	Použité zkratky a symboly.....	67

1. Úvod

Pod pojmem synantropní roztoči si nejčastěji představujeme skladištní a prachové roztoče. Skladištní roztoči jsou významní škůdci, kteří škodí žírem a infestací potravin exkrementy a svými těly. Prachoví roztoči znehodnocují životní prostředí člověka. Infestace potravin či okolního prostředí roztoči je významná z hlediska přítomnosti potenciálních patogenních agens. Ty jsou u nich reprezentovány především řadou hydrolytických enzymů. Pozřením či vdechnutím exkrementů či zbytků těl obsahujících antigeny roztočů dochází k imunitní odpovědi a u některých jedinců ke znatelné alergické reakci. Některé enzymy jsou prokázanými alergeny, jiné jsou z alergenicity pouze podezřelé. U řady hydrolytických enzymů je též známá jejich trávicí funkce. Předmětem zkoumání v této diplomové práci je enzym jehož alergenicita není zcela jasná a jehož trávicí funkce nebyla dosud u roztočů studována a tudíž ani prokázána. Tímto enzymem je lysozym.

Lysozym (EC 3.2.1.17) náleží mezi hydrolasy, tj. enzymy katalyzující hydrolytické reakce. Patří k velmi dlouho známým enzymům a byl objeven roku 1922 britským bakteriologem Alexandrem Flemिंगem v nosním hlenu. Tento v živočišné říši velmi hojně zastoupený enzym má prokázaný baktericidní účinek. Baktericidní účinek lysozymu je způsoben tím, že katalyzuje štěpení $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidové vazby mezi NAM a NAG, což jsou jednotky, které tvoří základní stavení kameny buněčné stěny bakterií.

Přítomnost lysozymu v trávicím traktu roztočů může být podnětem k následujícím otázkám: (i) zda je lysozym u roztočů součástí nespecifické imunity, (ii) zda je lysozym zdrojem alergenicity a konečně (iii) zda je lysozym využíván jako trávicí enzym. Zatímco na první otázku existuje jednoduchá odpověď, tak otázka (ii) a zejména (iii) vyžadují podrobnější zkoumání.

Lysozym byl v minulosti řazen mezi vůdčí alergeny roztočů. V posledních letech však došlo k výraznému pokroku ve zkoumání alergenů roztočů a dnes již lysozym mezi hlavní alergeny nepatří. Nahradily jej tzv. lysozyme-like proteiny, které mají sice podobnou molekulovou hmotnost jako lysozym, ale jejich rekombinantní proteiny postrádají baktericidní účinky. To však neznamená, že by lysozym jako protein nemohl působit jako alergen. Pouze byla v poslední době přeorientována pozornost na výzkum lysozyme-like proteinů jako alergenů na úkor lysozymu.

Hlavním cílem předložené diplomové práce je zjistit, zda synantropní roztoči využívají lysozym jako trávicí enzym. K tomuto účelu bylo vybráno 10 modelových druhů roztočů 3

čeledí podřádu Acaridida. Na všech vybraných druzích roztočů byla v této práci provedena *in vivo* a *in vitro* analýza. Z analýz vyplývají následující dílčí cíle práce:

- zjistit, zda se lysozym vyskytuje v tělech modelových organismů;
- zjistit, zda se lysozym vyskytuje v exkrementech modelových organismů;
- částečná charakterizace lysozymu, tj. určení pH optima pro jednotlivé druhy v WME (celotělní homogenát) i SGME (homogenát z exkrementů);
- porovnání enzymových aktivit lysozymu u druhů pro WME i SGME;
- zjistit, zda existuje korelace mezi enzymovou aktivitou v WME a SGME;
- určit pH v jednotlivých částech střeva roztočů;
- zjistit, zda bakteriemi obohacená dieta významně ovlivňuje populační růst roztočů.

Závěry by měly poskytnout cenné informace pro pochopení fyziologie a ekologie roztočů. A jelikož alergenicitu lysozymu by neměla být podceňována, mohou být výsledky této práce využitelné i v imunologii potažmo alergologii.

2. Literární přehled

2.1. Úvodem o roztočích

Roztoči (Acari) jsou druhově nejpočetnější a nejdiversifikovanější skupina z třídy pavoukovců (Arachnida) a zahrnují přes 45 000 dosud popsaných druhů, což je odhadem asi 5 % z celkového odhadovaného počtu druhů. Jejich velikost se pohybuje v rozpětí od 0,09 mm do 30 mm. Roztoči obývají všechny typy ekosystémů a najdeme mezi nimi volně žijící i parazitické formy. Nejrozšířenější jsou volně žijící druhy všech hlavních skupin, vyjma klišťat (Ixodida). Volně žijící roztoči představují predáční, saprofágní, fungivorní, fytofágní, koprofágní i nekrofágní druhy (Alberti & Coons 1999, Walter *et al.* 2006). Systematika řádu Acari je značně složitá a nejednotná, dnes se nejčastěji používá dělení na 2 skupiny:

Skupina: Parasitiformes (Anactinotrichida)

Podřád: Opilionacarida (Notostigmata)

Holothyrida (Tetrastigmata)

Ixodida (Metastigmata)

Gamasida (Mesostigmata)

Skupina: Acariformes (Actinotrichida)

Podřád: Actinedida (Trombidiformes sensu lato)

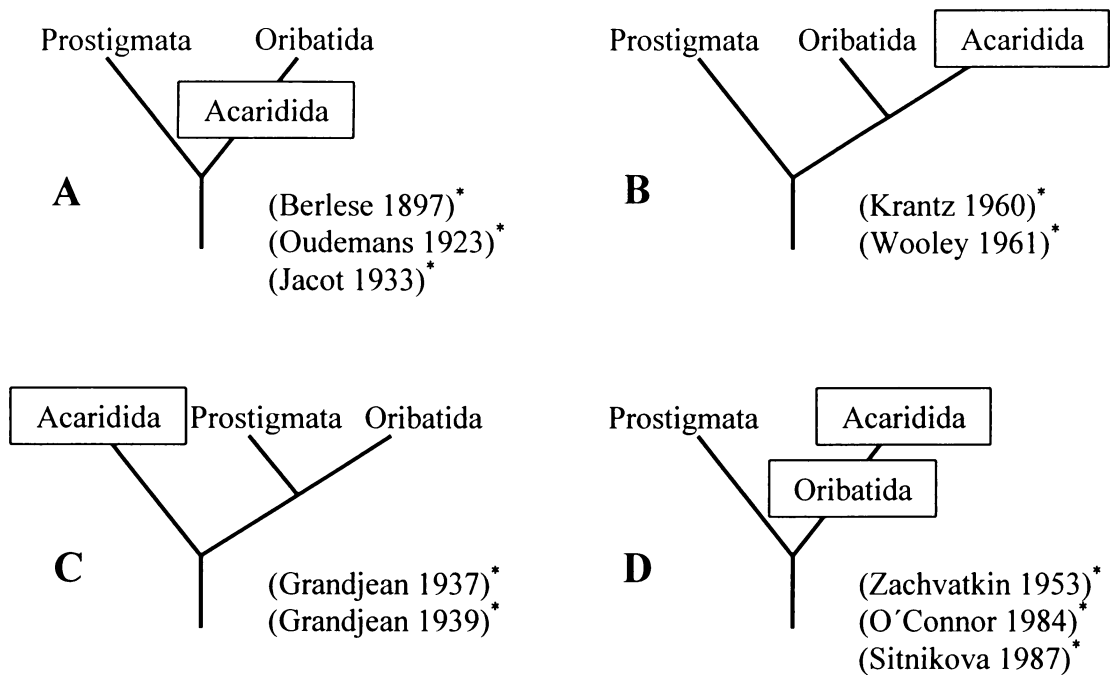
Oribatida (Cryptostigmata)

Acaridida (Astigmata)

2.2. Evoluce skladištních roztočů

Synantropní roztoči náleží do podřádu Acaridida, což je velká skupina většinou málo sklerotizovaných a křehkých roztočů, jejichž velikost se pohybuje od 0,2 do 1,8 mm. Podřád Acaridida čítá kolem 5000 popsaných druhů v 800 rodech a 70 čeledích (Alberti & Coons 1999).

Acaridida jsou považováni za monofyletickou skupinu, která se vyvinula z pancířníků (Oribatida). Tato teorie prošla jistým vývojem, který ilustrují schémata na obrázku 1.



Obrázek 1: Hlavní příbuzenské koncepty mezi třemi podřády ve skupině Acariformes.

(A) Oribatida se vyvinuli z Acaridida. (B) Oribatida a Acaridida jsou sesterské skupiny. (C) Oribatida a Prostigmata mají společného předka, ale mezi Acaridida. (D) Acaridida se vyvinuli z Oribatida. *Sekundární citace. Převzato a upraveno z Norton (1998).

Jako nejpravděpodobnější se dnes zdá teorie znázorněná schématem (D). Tu poprvé navrhl Zachvatkin, který jako první pracoval s myšlenkou, že Acaridida se vyvinuli z Oribatida. Tato teorie je v podstatě protikladem k Berleseho myšlenkám, tj. že Oribatida se vyvinuli z Acaridida (Obrázek 1 A) (Norton 1998).

Vzhledem k velmi malé velikosti jsou tyto roztoči schopni obývat různorodé habitaty a ekologické niky. Mezi těmito habitaty jsou takové, které vytvářejí specificky jiná živočišná, a to jak „bezobratlá“, tak strunatci. Příkladem takových habitatů jsou hnízda, různé nory a chodby, kolonie mikroskopických hub, sklady potravin, různorodé organické zbytky, trus, zdechliny, nebo také různé mikrohabitaty reprezentované například těly živočichů, např. na kůži ovci žije a parazituje *Psoroptes ovis* (O'Connor 1982).

S objevením roztočů v blízkosti člověka pravděpodobně souvisí přechod člověka od společnosti lovců a sběračů ke společnosti usedlé, což odpovídá tzv. neolitické revoluci. Proces neolitizace probíhal tisíciletí a nejednalo se v žádném případě o změnu rychlou. Tento proces proběhl mezi 10. a 8. tisíciletím př. n. l. v oblastech středního východu. Lidé postupně začali sami účelově pěstovat obilí, hlavně pšenici a ječmen, a domestikovat zvířata. Tím jak lidé koncentrovali uskladněné potraviny a domácí dobytek čím dál tím ve větším množství,

vytvářeli velice vhodná prostředí pro různé škůdce a z našeho hlediska hlavně roztoče dnes označované termínem synantropní roztoči. Ani spodní hranice počátku neolitizace 10 000 let však není ještě dosti dlouhá doba na to, aby se vyvinula nová skupina synantropních organismů žijících výlučně v blízkosti člověka. Znamená to, že Acaridida žijící v lidských obydlích mají původ někde v přírodním prostředí, odkud se vývojově šířili k člověku. Jejich předci byli pravděpodobně fungivorní a žili ve specifickém nebo různorodém prostředí, odkud některé druhy invadovaly uskladněné produkty a prach domácností. A protože jen několik druhů z jednotlivých rodů invadovalo uskladněné produkty, tak jejich přirozená prostředí mohou indikovat evoluční původ skladištních roztočů. Přirozená prostředí pro synantropní roztoče můžeme rozdělit do čtyř skupin (O'Connor 1979):

- 1) roztoče asociované se specifickými potravními zdroji;
- 2) roztoče asociované s polními zdroji;
- 3) roztoče asociované s obydlími savců;
- 4) roztoče asociované s hnízdy ptáků.

Rod *Tyrophagus* a jemu velmi úzce příbuzný rod *Tyroborus* se nejvíce vyskytují na loukách, polích a v hrabance. Rod *Glycyphagus* obsadil velmi široké spektrum lokalit: louky, listový opad, jeskyně, obydlí netopýrů a nory hlodavců. Rody *Acarus* a *Aleuroglyphus* obývají široké spektrum savčích obydlí, včetně netopýřích. Výskyt zástupců rodu *Lepidoglyphus* je spjat také s obydlími savců. Oproti tomu výskyt rodu *Dermatophagoides* je vázán spíše na ptačí hnízda (O'Connor 1979). Prachoví roztoči dali pravděpodobně vznik parazitickým formám Acaridida, konkrétně rod *Dermatophagoides* druhu *Psoroptes ovis* (Hamilton *et al.* 2003). Potravní preference rodu *Caloglyphus* je specifická a spojena s rozkládajícím se a hnijícím hmyzem (Rohde & Oemick 1967).

Účinným mechanismem, který pomohl roztočům osídlit sklady potravin a domácností, je stadium hypopa, což je deutonymfa. Ta je mnohem lépe než dospělec vybavena k foresii, disperzi na těle jiného živočicha. Hypopus se liší od dospělého řadou morfologických zvláštností. Je to klidové stadium, které nepřijímá potravu a má neprůchodnou trávicí soustavu. Tělo je dorzoventrálně zploštělé, silně sklerotizované a končetiny jsou nápadně krátké. V přichycení mu slouží dlouhé sety a přísavky na anální destičce. K foresii mohou být využiti různí živočichové. Například druhy rodu *Acarus* využívají v přírodě jako foronty blechy, avšak druhy infestující sklady potravin často ztratily schopnost tvorby deutonymfy (O'Connor 1982). Zástupci rodu *Tyrophagus* a *Glycyphagus* mají podobnou evoluci, protože se šířili z původních stanovišť, pravděpodobně hnízd blanokřídlých *Hymenoptera*, a nyní se

takové druhy vyskytují v půdním prostředí. V takovýchto případech stadium deutonymfy zcela vymizelo (Hughes 1976).

2.3. Ekonomický a medicínální význam skladištních a prachových roztočů

Skladištní roztoči osidlují spontánně obydlí člověka, kde se přiživují na potravě shromážděné člověkem nebo se živí organickými zbytky. Roztoči pronikají bez větších problémů nejen do starších domů, ale také do moderních staveb z nových konstrukčních a stavebních materiálů. Jsou rozšířeni po celém světě, a to jak ve skladech potravin, tak v domácnostech. Acaridida zde napadají skladované produkty nezpracované (obilí, zeleninu, ovoce, textilní rostliny, seno atd.) i zpracované (mouku, sýry, sušené ovoce atd.). Svou činností pak snižují kvalitu skladovaných produktů, ničí je, znečišťují svými exkrementy, a sekrety, exuviemi (svlečená pokožka členovců a některých obratlovců) a uhynulými jedinci a činí je nebezpečnými pro zdraví lidí a zvířat (Rosický *et al.* 1979). Do těla se mohou roztoči, zbytky jejich těl, či exkrementy snadno dostat i vdechnutím, v tomto hraje klíčovou roli jejich velmi malá velikost. Někteří roztoči mohou také přežít průchod trávicí trubicí člověka (Chmielewski 1970). U druhu *Caloglyphus* (syn. *Sancassania*) *berlesei* (Acari, Acaridida) byla dokonce sledována parazitická nákaza sluchové trubice vnějšího sluchového orgánu člověka (Cho *et al.* 1999) a je možné, že vdechnutí prachoví roztoči dokáží žít v plicích člověka (van Woerden 2004). Mnoho druhů skladištních roztočů se vyskytuje jak v uskladněných potravinách, tak v prachu domácností.

Kontaminovaný prach či zpracované potraviny mohou být zdrojem alergenů. Nejběžnější druhy roztočů nalezené v prachu jsou *D. farinae* a *D. pteronyssinus*. Jejich abundance v mírném pásmu vykazuje sezónní fluktuace s vysokými počty ve vlhkých letních měsících s relativní vlhkostí (RH) nad 70 % a s nižšími počty v měsících zimních, kdy je RH obvykle nižší než 50 %. V subtropích je fluktuace mnohem menší, než v mírném pásmu (Arlan 2002). Lékařská vyšetření v Evropě i v USA prokázala, že 20 až 30 % lidských jedinců je citlivých na zmíněné prachové roztoče. V USA byl proveden výzkum infestace domácností prachovými roztoči, kde v 82 % domácnostech byla zjištěna přítomnost obou druhů *D. farinae* i *D. pteronyssinus* (Arlan *et al.* 1992).

Roztoči jsou nejvíce početnou a nejčastěji se vyskytující skupinou skladištních škůdců, napadajících uskladněné potravinářské obilí v silech a podlahových skladech v Česku. Tento fakt vyplývá z výzkumu, který provedl Hubert a Stejskal (2002) na 379 vzorcích. Z tohoto celkového množství vzorků bylo napadeno 243 roztoči, zatímco 73 pisivkami a 114 brouky.

Průměrná četnost roztočů byla 308 jedinců na vzorek (1 kg obilí) a více než 22 % vzorků bylo napadeno populacemi roztočů s více než 100 jedinci a 4 % vzorků populacemi s více než 1000 jedinci. Podle frekvence výskytu ve vzorcích měly největší významnost druhy *L. destructor*, *A. siro*, *T. putrescentiae* a také dravý roztoč *Ch. eruditis* (Hubert *et al.* 2002, Stejskal *et al.* 2003). Velkou roli v infestaci potravin hraje způsob jejich uskladnění. Skladištní roztoči se vyskytují především na povrchu uskladněných potravin (Žďárková *et al.* 1983). Důkazem toho je, že v pytlované mouce bylo nalezeno více než 10 000 jedinců roztočů na 100 g blízko povrchu, zatímco uvnitř pytlů žádní (Brett 1969).

Alergenicitu roztočů nesmí být podceňována ani vzhledem k profesím pracujícím v zemědělství. Bylo zjištěno, že 12 % z testovaných 440 farmářů na ostrově Gotland v Baltském moři mělo pozitivní reakci na skladištní roztoče *A. siro*, *L. destructor*, *T. putrescentiae* a *G. domesticus* (van Hage-Hamsten *et al.* 1985). Ohroženi jsou též zaměstnanci zpracovatelského průmyslu a konečně samotní konzumenti cereálních produktů. Běžná sensitivita na skladištní roztoče byla potvrzena i na mléčných farmách ve studii prováděné ve Wisconsinu. Nad všemi zjišťovanými alergeny determinovanými buď kožními testy nebo RAST (Ratio Allergen Sorbent Test) testy převládaly alergeny prachových roztočů (21,6 %) a skladištních roztočů (11,2 %). Za zmínku stojí, že alergeny konidiálních hub *Cladosporium* a *Aspergillus* tvořily 7,5 %, respektive 6,0 %. Ze skladištních roztočů byl v IgE reaktivitě nejvýznamnější *L. destructor* v 7 z 8 případů, následovaný *T. putrescentiae* v 6 z 8 případů, *G. domesticus* v 5 z 8 případů a *A. siro* ve 2 z 8 případů. (Marx *et al.* 1993).

Význam skladištních roztočů z hlediska infestace jejich okolí alergeny je tedy zcela neoddiskutovatelný. Dosud bylo izolováno a biochemicky charakterizováno 14 skupin alergenů (Příloha 8.5.). Do nomenklatury jsou řazeny pouze alergeny s větší než 5 %-ní IgE reaktivitou. Mnoho z nich patří mezi hlavní alergeny, tj. váží IgE serum z více než 50 % u RAST pozitivně reagujících pacientů. (Arlan *et al.* 1997, Arlian 2002). Astmatické potíže způsobené skladištními roztoči se projevují dokonce i po déletrvající izolaci člověka od infestovaného prostředí. Zdravotní problémy mohou být tedy i dlouhodobějšího rázu, což bylo potvrzeno ve studii prováděné na *L. destructor* (Alvarez *et al.* 1999).

Kromě toho, že roztoči sami produkují alergenní látky, mohou také fungovat i jako vektory nebo mezihostitelé mikroorganismů, např. mikroskopických hub (mikromycet) či virů. Přítomnost roztočů v některých potravinách nebo krmivech proto může vést také k jejich rychlé kontaminaci nebezpečnými mikroorganismy. Roztoči vyvíjející se v „plesnivém“ obilí na sebe totiž nabalují spory hub a ty pak šíří dál (Hubert *et al.* 2004). Mikromycety produkují také řadu alergenů, ale i toxinů, ať již se jedná o hydrolytické či nehydrolytické enzymy, popř.

jiné látky organického původu. Zvláště nebezpečný je karcinogenní mykotoxin aflatoxin B₁ a sterigmatocystin, oba produkované některými zástupci hub rodu *Aspergillus*. Navíc řada zástupců tohoto rodu působí choroby zvířat i lidí známé jako aspergilózy (onemocnění dýchacích cest, rohovky, středního ucha, aj.) (Kalina & Váňa 2005). Roztoči šíří spory nejen na povrchu svého těla, ale i svými exkrementy (Smrž & Čatská 1987). Mikromycety hrají z hlediska alergenů významnou roli také v prachu (Sinha *et al.* 1970). Přenos mikromycet roztoči je navíc specifický (Hubert *et al.* 2003).

Synantropní roztoči tedy spolu s přenesenými mikroorganismy významně znehodnocují potraviny a také životní prostředí člověka. Z toho vyplývá jejich medicínální a ekonomický význam pro člověka.

2.4. Lysozym a lysozyme-like proteiny jako alergeny

Lysozym spolu s řadou dalších hydrolytických enzymů patří mezi alergeny. Lysozym slepičího vaječného bílku (HEWL), který je jedním z nejlépe prozkoumaných enzymů, je biochemicky aktivním alergenem (Stewart & Thompson 1996). Výskyt lysozymu byl dosud potvrzen jen u některých zástupců podřádu Acaridida (*D. farinae*, *D. pteronyssinus*, *L. destructor*, *G. destructor*, *G. domesticus*, *Rhizoglyphus callae*, *Rhizoglyphus robini* a *Tyrophagus longitor*) (Childs & Bowman 1981, Stewart *et al.* 1998). Jeho alergenicita u roztočů je diskutována (Stewart *et al.* 1991).

Lysozym byl dříve považován za jeden z nejvýznamnějších alergenů skladištních a prachových roztočů, významnějšími a prokázanými alergeny jsou dnes však alergeny druhé skupiny Grp 2 (Příloha 8.5.), např. Der f2, Der p2, Eur m2. Jsou to proteiny o molekulové hmotnosti většinou kolem 14 kDa a neznámé funkce. Homology proteinů Der p2 a Der f2 byly nalezeny u úzce příbuzných druhů *L. destructor*, *T. putrescentiae*, *G. domesticus* a *E. maynei*. Zatímco proteiny Der f2, Der p2 a Eur m2 mají shodu aminokyselinových sekvencí 83 %, tak Lep d2, Tyr p2 a Gly d2 jsou shodné už jen asi ze 40 % s Der p2. Pozitivní reakci na Der p2 vykazuje 80 až 90 % sensitivních jedinců. Všechny lysozyme-like proteiny se vyskytují ve vícerozličných isoformách, např. Der p2 v šesti a Der f2 ve čtyřech (Smith *et al.* 2001). Rekombinantní protein Der p2, získaný produkcí *Saccharomyces cerevisiae* (Ascomycota, Saccharomycotina, Saccharomycetes), a který byl v IgE reaktivitě a dalších vlastnostech téměř nebo úplně nerozeznatelný od přírodního Der p2 (Hakkaart *et al.* 1998), nevykazoval lysozymovou aktivitu (Hakkaart *et al.* 1997, Hakkaart *et al.* 1998).

2.5. Potravní biologie roztočů

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2., Acaridida jsou odvozenou skupinou Oribatida. Z tohoto faktu lze vyvodit, že lze u nich hledat podobnosti v potravních strategiích. Kvantita poznatků v této oblasti se liší skupinu od skupiny, u synantropních roztočů jsou poznatky ovšem poněkud chudší.

Oribatida jsou obecně spojováni s půdním prostředím a jsou nejdůležitější dekompozitoři z mesofauny (Alberti & Coons 1999). V půdě nalezneme různé typy nik, proto je možno Oribatida zařadit do různých potravních skupin (guild), i když tato rozdělení nebudou nikdy exaktní. Každá nika bude poskytovat více zdrojů, které mohou být využívány více či méně. K ekologickým účelům byly definovány následující hlavní a vedlejší skupiny a podskupiny (Luxton 1972):

A. Hlavní potravní skupiny

- 1) Makrofytofágové – živící se výhradně rostlinným materiálem
 - a) Xylofágové – požírající dřevní hmotu
 - b) Fytofágové – požírající listový opad
- 2) Mikrofytofágové – živící se výhradně mikroflorou
 - a) Mykofágové – požírající houby (mikromycety a kvasinky)
 - b) Bakteriofágové – požírající bakterie
 - c) Fykofágové – požírající řasy
- 3) Panfytofágové – kombinující všechny nebo některé podskupiny a mající atributy obou hlavních typů

B. Vedlejší potravní skupiny

- 4) Zoofágové – živící se živým zvířecím materiálem
- 5) Nekrofágové – živící se zdechlinami
- 6) Koprofágové – živící se exkrementy

Z tohoto přehledu je čitelné, že potravní možnosti Oribatida jsou velmi široké. Nicméně někteří autoři se vydali trochu jinou cestou. Především Siepel a de Ruiter-Dijkman (1993) definovali potravní guildy na základě aktivit a přítomnosti třech enzymů: celulasu, trehalasu a chitinasu. Pomocí výzkumu provedeného na 49 druzích Oribatida a 1 druhu Acaridida bylo definováno 5 majoritních potravních guild (body 1 až 5) a dvě minoritní guildy (body 6 a 7). Navíc byly definovány dvě základní skupiny, v nichž první dokáže trávit buněčné stěny i buněčný obsah (body 1, 2, 3, 5, 7), druhá tráví pouze buněčný obsah (body 4, 6) (Siepel & de Ruiter-Dijkman 1993):

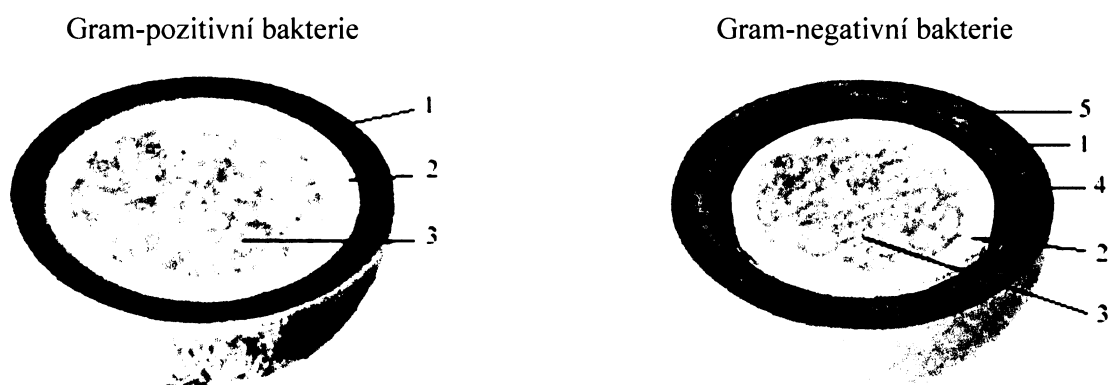
- 1) Herbivoři – mají celulasovou aktivitu, živí se pouze rostlinami
- 2) Fungivoři – mají chitinasovou stejně jako trehalasovou aktivitu a dokáží trávit buněčné stěny a buněčný obsah mikroskopických hub
- 3) Herbo-fungivoři – tráví všechny hlavní komponenty zelených rostlin a mikroskopických hub
- 4) Fungivorní okusovači – tráví pouze trehalosu
- 5) Oportunističtí herbo-fungivorové – tráví celulosu a trehalosu
- 6) Herbivorní okusovači – nemají celulosu, chitinasu ani trehalasu, mohou být predátorní, nekrofágní a živí se bakteriemi
- 7) Všežravci

Oribatida a Acaridida mají vztah s mikroorganismy, jako jsou mikroskopické houby a bakterie. Dokáží je totiž přenášet z místa na místo, a tím výrazně ovlivňují prostředí kolem sebe. Fungují jako dekompozitoři, kteří mají vliv na mikroorganismy ve svém okolí a mohou ovlivňovat jejich metabolickou aktivitu (Siepel & Maaskamp 1994). Významný je vliv na dekompozici organického materiálu, ale i fakt, že tyto mikroorganismy mohou tvořit jejich potravní zdroj, a to především díky trehalasové a chitinolytické aktivitě (Siepel & de Ruyter-Dijkman 1993, Smrž 1998). Chitinolytická a trehalasová aktivita může být navíc spojena s přítomností symbiotických bakterií u roztočů (Smrž *et al.* 1991, Smrž 1998). Bakterie se vyskytují jak v okolí, na povrchu roztoče, tak i v jeho trávicím traktu. K jejich přežití v trávicím traktu je nutná rezistence vůči trávicím enzymům. Pokud je tato podmínka splněna mohou takovéto bakterie pomáhat svému hostiteli v trávení pomocí exoenzymů (Smrž & Trelová 1995). Synantropní prachový roztoč. *D. pteronyssinus* žije v symbióze s houbou *Aspergillus penilloides* (Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes) (de Saint Georges-Grédelet 1987). Trávení součástí buněčných stěn hub bylo potvrzeno u *T. putrescentiae* (Smrž & Čatská 1989). Sinha a Harasymek (1974) studovali přežití a reprodukční schopnost *G. domesticus* a *A. siro* na 19 druzích hub a 6 druzích bakterií. Vždy roztoči přežili podstatně déle než bez potravy, tedy více než 7 dní. Mortalita byla vždy dosti velká, což bylo způsobeno toxickými látkami mikroorganismů nebo jejich neadekvátním nutričním složením. Na čisté bakteriální dietě byli roztoči přesto schopni přežít snadno déle než 50 dní. Byly potvrzeny jisté mezidruhové rozdíly v přežívání na stejném druhu bakterie, a také rozdíly v toleranci jednoho druhu roztoče na různé druhy bakterií (Sinha & Harasymek 1974). Jak vidno, mikroorganismy hrají velmi důležitou roli v potravní biologii roztočů.

2.6. Bakteriofagie jako potravní strategie

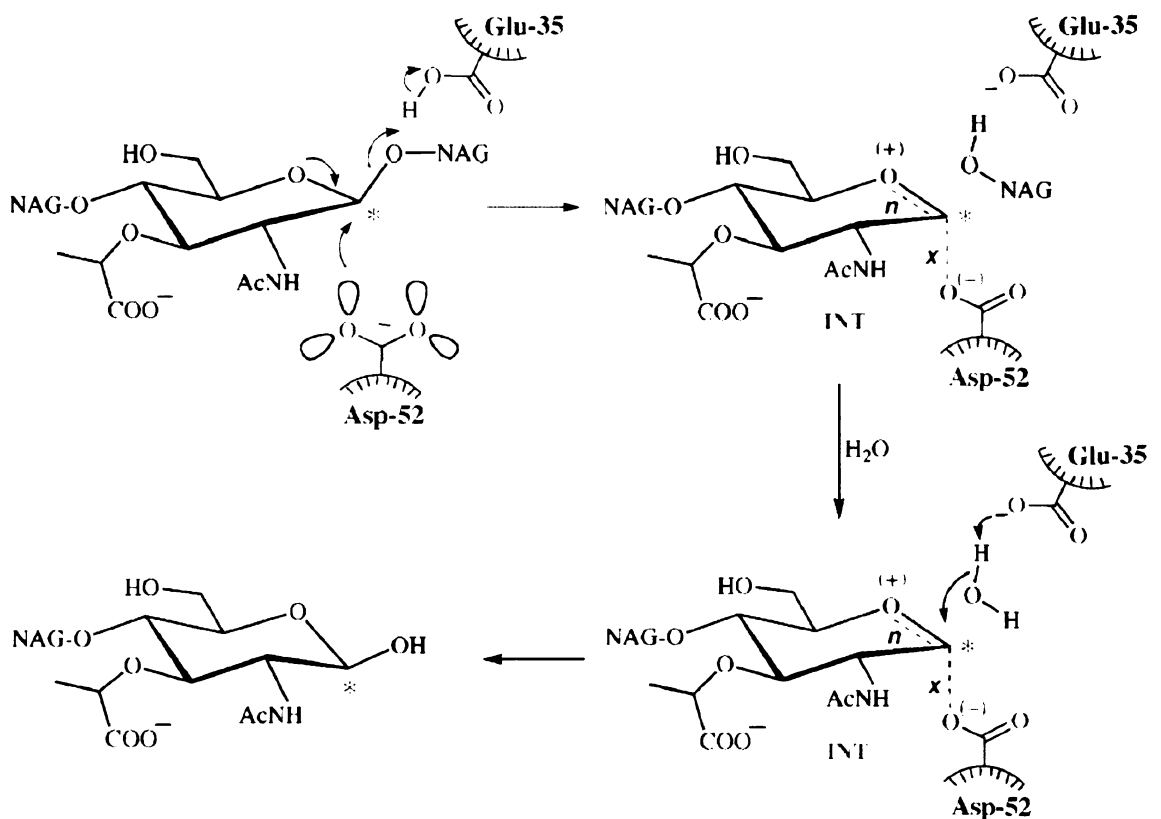
2.6.1 Podmínky bakteriofagie

Bakterie jsou obdány pevnou stěnou, která jim dává charakteristický tvar a umožňuje jim existenci v hypotonickém prostředí. Bakteriální buněčná stěna je významná z lékařského hlediska, neboť je zodpovědná za bakteriální virulenci. Bakterie se rozdělují na 2 základní skupiny dle Gramova barvení na Gram-pozitivní (G^+) a Gram-negativní (G^-). G^+ bakterie mají silnou stěnu (přibližně 25 nm), obklopující jejich cytoplazmatickou membránu, zatímco G^- bakterie mají stěnu tenčí (asi 3 nm), která je zato obdána komplexní vnější membránou (Obrázek 2).



Obrázek 2: Schematické srovnání buněčných obalů G^+ a G^- bakterií. (1) peptidoglykan (buněčná stěna), (2) plasmatická membrána, (3) cytoplasma, (4) periplasmatický prostor, (5) vnější membrána. Převzato a upraveno z Voet & Voet (1995).

K tomu, aby byla rozrušena buněčná stěna bakterií za fyziologických podmínek je zapotřebí lysozymu (EC 3.2.1.17), alternativní název je 1,4-beta-N-acetylmuramidasa. Tento enzym katalyzuje hydrolytické štěpení peptidoglykanu (Obrázek 3), který je složen z $\beta(1\rightarrow4)$ repetitivně vázaných jednotek N-acetylglukosaminu (NAG) a N-acetylmuramové kyseliny (NAM). Díky přítomnosti D-aminokyselin jsou peptidoglykanové vrstvy odolné vůči působení proteinas. Přítomnost vnější membrány u G^- bakterií je příčinou rezistence těchto bakterií vůči působení lysozymu. G^+ bakterie tuto vnější vrstvu postrádají, a proto může lysozym atakovat 1,4- β -D-glykosidové vazby mezi NAM a NAG (Voet & Voet 1995). Ačkoliv lysozym způsobuje hydrolýzu buněčné stěny G^+ bakterií, některé jsou vůči jeho působení rezistentní (Dominguez-Bello *et al.* 2004).



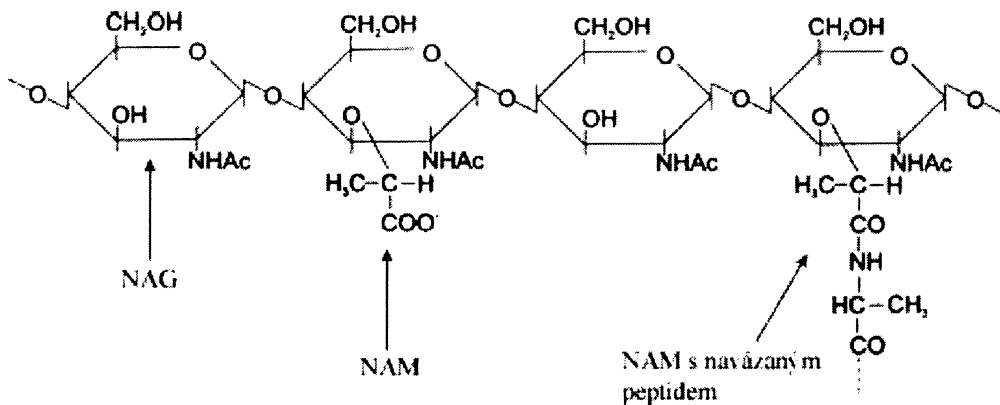
Obrázek 3: Mechanismus účinku lysozymu.

Navázáním substrátu je protonizována 4-OH skupina NAG a je odstraněna pomocí COOH skupiny Glu-35 (donor protonů během katalýzy). Pak dochází ke vzniku meziprojektu (INT). Ve skutečnosti je přítomna jen jedna z přerušovaných exo (x) a endo (n) vazeb INT, a to je podstata mechanismu. Reakce může probíhat dvěma mechanismy: (i) n-vazba chybí, (ii) x-vazba chybí (S_N1 mechanismus). Na schématu (i) Asp-52 (stabilizuje tranzitní oxoniový stav) zahajuje první krok jako nukleofil (mechanismus S_N2) a vzniká INT glykosyl-enzym. Ve druhém kroku je tento komplex pak nahrazen molekulou vody. Skupiny enzymu jsou obarveny zeleně, elektronové přesuny, vazby vytvářející klíč a náboje červeně, atak vody na INT modře. Převzato z Kirby (2001).

Nejlépe prostudovaným lysozymem je lysozym slepičího bílku (HEWL). Jedná se o malý protein (14,6 kDa), jehož jednoduchý řetězec se skládá z 129 aminokyselinových zbytků. HEWL katalyzuje hydrolyzu svého substrátu tak účinně, že katalyzovaná reakce probíhá až 10^{10} rychleji než reakce nekatalyzovaná. Zajímavostí je, že HEWL katalyzuje hydrolyzu poly(NAG), tedy chitin, stejně jako přírodní peptidoglykanový substrát (Voet & Voet 1995). Podobnou chitinolytickou aktivitu vykazují i lysozym např. u *Musca domestica* (Ito *et al.* 1995). Chitinolytická aktivita je možná spojena s nespecifickou aktivitou lysozymu také u *Acaridida* (Bowman & Childs 1982). Z této skutečnosti vyplývá, že lysozym nemá tak velkou specifitu účinku, jak je u enzymů obvyklé. Nicméně chemická konstituce peptidoglykanu a chitinu je natolik podobná, že je logické hydrolyzu obou substrátů předpokládat.

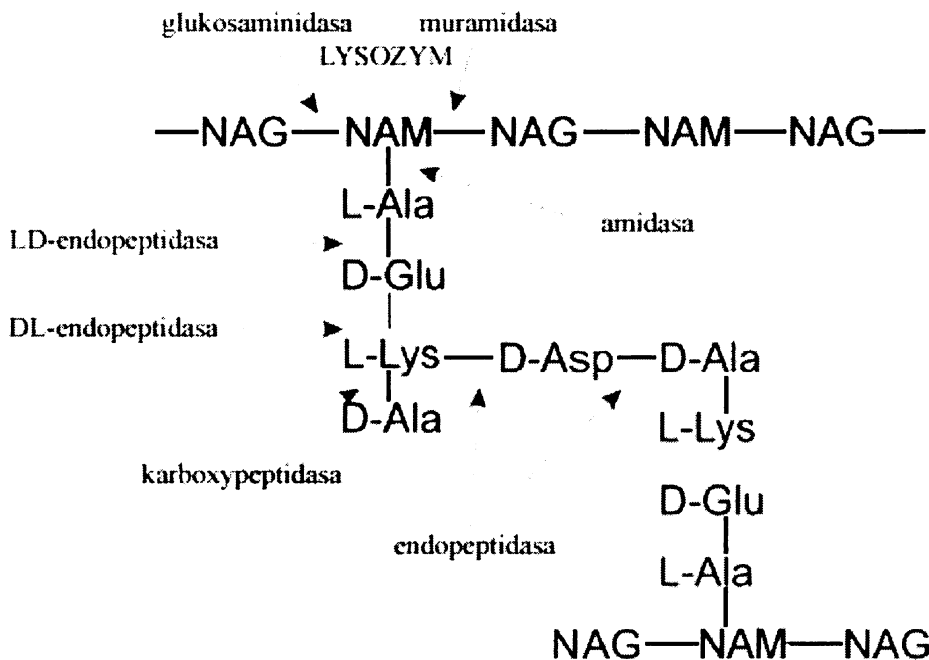
Pokud má být lysozym uzpůsoben k trávení, musí jím „trávené“ bakterie přinášet jistý prospěch pro organismus. Jestliže se podíváme na strukturu peptidoglykanu (Obrázek 4), lze jednoduše odvodit, že tato vrstva může být zdrojem hlavních makrobiogenních prvků, C, O a N. Nejpodstatnější jsou evidentně sacharidové jednotky spolu s aminokyselinami. K získání základních jednotek využitelných v metabolismu by však samotný lysozym nemohl v žádném případě stačit. Proto musí při trávicí funkci pracovat v součinnosti s dalšími enzymy: endopeptidasami, exopeptidasami, amidasami či karboxypeptidasami (Obrázek 5).

Buněčná stěna bakterií však není jediným zdrojem látek pro organismy, které se jimi živí. Narušením buněčné stěny bakterií se zpřístupní cesta k dalším látkám. Cytoplasma je podstatným zdrojem aminokyselin, tvoří 50 % celkového obsahu proteinů bakterií. V cytoplasmě jsou navíc buněčné inkluze, které jsou tvořeny např. kapénkami lipidů, granuly volutinu, glykogenu, granulózy, krystaly uhličitanu vápenatého či kapénkami síry. Velice dobře využitelný je glykogen, který je spolu s poly- β -hydroxymáseľnou kyselinou zásobní látkou bakterií (nikoliv lipidy). Volutinové granule jsou polyfosfátový komplex a jsou tedy zdrojem fosforu. Dalším zdrojem látek může být také genetický materiál, z toho lze vytěžit fosfáty, pentózy a báze. Kromě toho bakterie obsahují poměrně velké množství vody 70 až 98 % celkové živé váhy. Prvkové složení bakterií je dosti variabilní. Uhlík je zastoupen v rozmezí 22 až 64 % sušiny, fosfor od 2,5 do 5 % sušiny a dusík 8 až 15 % (Ambrožová 2004). Kupříkladu u přežvýkavců je do bakteriálních buněk uloženo z potravy přibližně 10 % uhlíku, 80 % dusíku a 60 % fosforu (Hoogenraad & Hird 1970, Ørskov & MacLeod 1982, Dobson *et al.* 1984), z čehož je patrné, že pokud by nebyly symbiotické bakterie tráveny, docházelo by k obrovským prvkovým a energetickým ztrátám, které by musely být kompenzovány zvýšeným příjmem potravy. Toto tvrzení platí samozřejmě za předpokladu bakteriofagie jako potravní strategie organismu.



Obrázek 4: Struktura glykanového řetězce peptidoglykanu.

Opakující se jednotky NAM a NAG. V pozici C3 NAM je navázána kyselina mléčná. Laktylový postranní řetězec může být substituován prostřednictvím D-aminokyseliny tetrapeptidem, zde je znázorněna první aminokyselina alanin. Převzato a upraveno z Steen (2005).



Obrázek 5: Hydrolytické enzymy působící na peptideoglykan.

Lysozym působí jako muramidasa i glukosaminidasa (alternativní názvy používané pro lysozym). Enzymy vyobrazené na obrázku, kromě lysozymu, používá bakterie při svém růstu. Enzymy stejné kategorie pak mohou degradovat peptidoglykan. Převzato a upraveno z Steen (2005).

2.6.2 Lysozym funguje u některých organismů jako trávicí enzym

Lysozym je součástí obranného mechanismu proti bakteriím u řady organismů (Jollès & Jollès 1984). Kromě toho je lysozym také využíván jako trávicí enzym. Konkrétně lysozym C je považován za jeden z hlavních trávicích enzymů u přežvýkavců (Ruminantia) (Dobson *et al.* 1984, Dominguez-Bello *et al.* 2004), folivorních (listožravých) opic (Cercopithecidae, Colobinae) (Stewart *et al.* 1987, Bowen 2005) či králíků (Camara & Prieur 1980, Camara & Prieur 1984, Ito *et al.* 1994) a dokonce i folivorních ptáků (Ruiz *et al.* 1994). Pomocí toho enzymu jsou tráveny střevní bakterie a především symbiotické bakterie (fermentační bakterie), které se u přežvýkavců vyskytují především v bachoru (rumen). Jako součást trávicího procesu pak přecházejí do vlasního žaludku (abomasum), kde je sekretováno značné množství lysozymu C. Lysozym C má pH optimum 5 a v místě žaludku, kde je sekretováno jeho největší množství, je pH kolem 6. Zjištěné pH optimum lysozymu C spolu s jeho rezistencí vůči pepsinu, což je proteinasa, je ve shodě s myšlenkou, že lysozym působí jako trávicí enzym bakterií v anteriorní části vlastního žaludku a v proximální části tenkého střeva (Dobson *et al.* 1984). U králíků se vyvinul poněkud odlišný systém a bakterie jsou tráveny v colonu (Camara & Prieur 1984). Kyselé pH optimum lysozymu a rezistence vůči pepsinu je také u *Opisthocomus hoazin* (Aves, Opisthocomidae) a biochemická charakteristika lysozymu je v podstatě shodná se situací u býložravců. Bakterie jsou u tohoto folivorního ptáka tráveny v žaludku (Ruiz *et al.* 1994).

Paralelu s evolucí lysozymu k trávicí funkci můžeme najít i u hmyzu. Velká část larev zástupců Diptera, Cyclorrhapha jsou saprofágní a živí se převážně bakteriemi (Terra 1990). Je prokázáno, že larvy *Musca domestica* (Diptera, Cyclorrhapha, Muscidae), vyvíjející se v tlejících a zahnívajících organických materiálech, usmrcují velké množství bakterií v prostřední části středního střeva. Bakterie jsou přitom jejich hlavním potravním zdrojem. Dochází k tomu kombinací značně kyselého pH, lysozymu a cathepsin D-like proteinasy (Espinoza-Fuentes *et al.* 1987, Lemos & Terra 1991a). Lysozym *M. domestica* je velmi podobný lysozymu C u býložravců. Je aktivní v kyselé oblasti pH a navíc je rezistentní vůči vlastním proteinasám (Lemos *et al.* 1993). Podobným případem je larva *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Cyclorrhapha, Tephrididae) (Lemos & Terra 1991b), a také *Drosophila melanogaster* (Diptera, Cyclorrhapha, Drosophilidae) (Kylsten *et al.* 1992, Regel *et al.* 1998). Poněkud jiná situace je ale u detritovorní larvy *Trichosia pubescens* (Diptera, Nematocera, Sciaridae), kde se lysozym vyskytuje pouze v hemolymfě a tukových orgánech, nikoli ve střevě, jako je tomu u *M. domestica*, *A. fraterculus* a *D. melanogaster*. Trávicí funkce

lysozymu je tedy u *T. pubescens* vyloučena. Navíc je pravděpodobné, že zatímco předek Diptera nebyl adaptován k trávení bakterií lysozymem, tak předek Cyclorrhapha adaptován k trávení bakterií už byl (Lemos & Terra 1991b). Také molekulární studie potvrzují adaptaci lysozymu u hmyzu k trávicí funkci. Navíc je zjištěna evidentní podobnost mezi obratlovčím lysozymem C a lysozymem D *D. melanogaster* (Regel *et al.* 1998), který je transkribován pouze ve střevě a plní zde trávicí funkci (Kylsten *et al.* 1992, Daffre *et al.* 1994). Uvažovalo se také o tom, že lysozym P, produkovaný ve slinných žlázách *D. melanogaster* (Kylsten *et al.* 1992), by mohl být trávicím lysozymem. Jedná se však o lysozym, který se vyvinul k obranným účelům. Nicméně lysozym P je vlastně jakýsi mezistupeň v evoluci trávicích lysozymů (Regel *et al.* 1998). Podobnost obratlovčích lysozymů s hmyzími je častější, než by se mohlo zdát. Například lysozimy izolované z hemolymfy *Bombyx mori* (Lepidoptera, Macrolepidoptera, Bombycoidea), *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Macrolepidoptera, Pyraloidea) a *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Macrolepidoptera, Noctuoidea) vykazují strukturní příbuznost slepičímu lysozymu C (Jollès *et al.* 1979), lysozimy hemolymfy jsou vyvinuty k defenzivním účelům a jsou součástí nespecifické humorální imunity (Jarosz & Spiewak 1979). Důležitou roli v trávicích procesech hraje lysozym zřejmě také u termitů. U *Reticulitermes speratus* (Dictyoptera, Isoptera, Rhinotermitidae) byla zjištěna dosti podobná specifická aktivita lysozymu v předním střevě jako ve slinných žlázách. Je možné, že lysozym ve střevě je právě původem ze slinných žláz, ale to nemusí vylučovat jeho trávicí funkci (Fujita *et al.* 2001). Termiti musí nějakým způsobem korigovat deficit dusíku a poměr C/N v potravě, kterou je dřevní hmota. Ta totiž obsahuje pouze 0,03 až 0,1 % tohoto prvku. Pomocí izotopu ¹⁵N bylo prokázáno, že *Neotermes koshunensis* (Dictyoptera, Isoptera, Kalotermitidae) získává kolem 50 % dusíku z atmosféry (Fujita 2004). Termiti sice fixují vzdušný dusík s pomocí symbiotických bakterií (Breznak *et al.* 1973), ale mechanismus, jakým je dusík asimilován je dosud nejasný. Je však pravděpodobné, že zde hraje klíčovou roli opět lysozym.

2.6.3 Lysozym byl nalezen i u roztočů, dosud nebyl studován jako trávicí enzym

Přítomnost baktericidních agens byla u roztočů prokázána a spojena s lysozymovou aktivitou nejprve u skupiny Ixodida (Anigstein *et al.* 1950, Podboronov *et al.* 1972, Podboronov 1982). Byla prokázána rapidně zvýšená aktivita lysozymu v těle *Alveonassus lahorensis* (Ixodida, Argasidae) po infekci bakteriemi (např. *Micrococcus lysodieticus*, *Staphylococcus aureus*) (Podboronov 1983). Charakteristika lysozymu izolovaného ze střeva

Ornithodoros moubata (Ixodida, Argasidae) prokázala jeho vysokou lytickou aktivitu vůči G⁺ bakterii *Micrococcus luteus*. N-koncová aminokyselinová sekvence K-V-Y-D-R-C-S-L-A-S-E-L-R je velmi podobná s lysozomy v trávicím traktu některých savců a motiv D-R-C-S-L-A je specifický pro trávicí lysozomy některých Diptera (Kopáček *et al.* 1999).

Zajímavá situace je u parazitického roztoče *Psoroptes ovis* (Acari, Acaridida, Psoroptidae), který parazituje na kůži ovčí. Tento zástupce Acaridida je úzce příbuzný synantropním roztočům a asi nejvíce prachovým roztočům rodu *Dermatophagoides* (Stewart & Fisher 1986, Lee *et al.* 2002, Hamilton *et al.* 2003). Je možné, že *P. ovis* využívá jako potravní zdroj také bakterie množící se na postižené tkáni (Hogg & Lehane 1999, Hogg & Lehane 2001, Hamilton *et al.* 2003).

Childs a Bowman (1981) studovali přítomnost lysozomu u šesti skladištních druhů roztočů: *A. siro*, *L. destructor*, *G. domesticus*, *G. destructor*, *R. callae*, *R. robini* a *T. longior*. Přítomnost lysozomu byla prokázána u všech testovaných druhů, signifikantní mezidruhové rozdíly v aktivitách lysozomu však byly ve studii negovány (Childs & Bowman 1981). Mezidruhové rozdíly v lysozymové aktivitě byly ale potvrzeny v SGME u *D. farinae*, *D. pteronyssinus* a *L. destructor*. Bakteriolytická aktivita byla dvojnásobná pro *L. destructor* a trojnásobná pro *D. pteronyssinus*, než u *D. farinae* (Stewart *et al.* 1998). Recentně byla přítomnost lysozomu prokázána u prachových roztočů *D. farinae* a *D. pteronyssinus* v SGME i WME. Bakteriolytická aktivita zjištěná pro G⁺ bakterii *M. lysodieticus* byla vyšší u *D. pteronyssinus* než u *D. farinae*, v WME 2,2-krát a v SGME 3,7-krát (Mathaba *et al.* 2002). Jak vidno, znalosti o lysozomu u synantropních roztočů jsou doposud jen velmi skromné, známá charakteristika enzymu je uvedena v tabulce 1.

Species	zdroj	Mr (kDa)	pI isoformem	pHo	isoformy hl. vedl.	Reference
<i>D. farinae</i>	SGME				2 6	(Stewart <i>et al.</i> 1992)
	WME		7,6 > 8		2 6	(Stewart <i>et al.</i> 1998)
<i>D. pteronyssinus</i>	SGME	13			3 6	(Stewart <i>et al.</i> 1992)
	WME		5,8 > 8		3 6	(Stewart <i>et al.</i> 1998)
	WME	10		(6,2*)		(Stewart <i>et al.</i> 1991)
<i>L. destructor</i>	WME		7,4 > 8		3 5	(Stewart <i>et al.</i> 1998)

Tabulka 1: Známa charakteristika lysozomu u Acaridida, Acariformes.

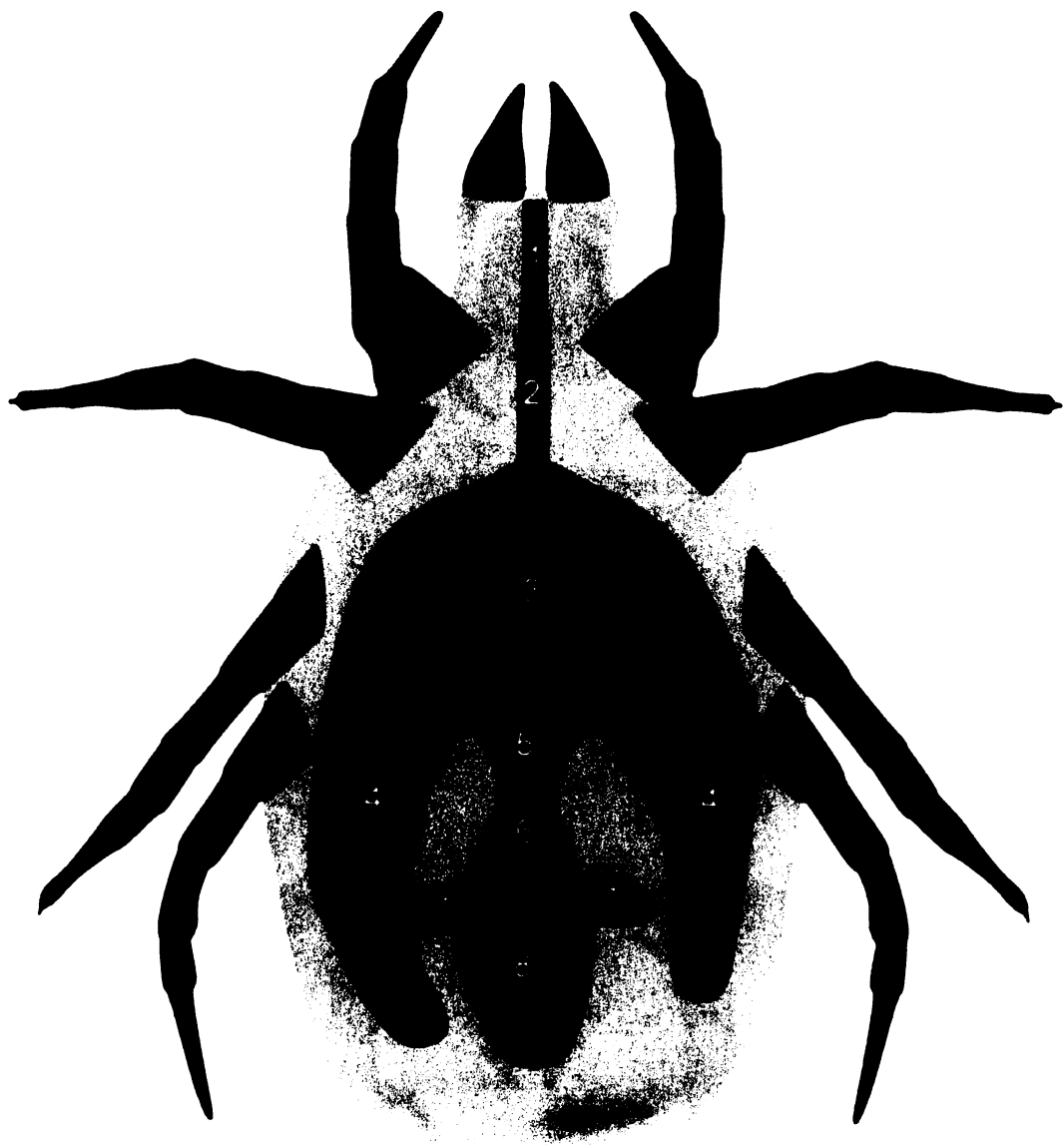
*Hodnota při které byla měřena enzymová aktivita, byla považována pravděpodobně za pH optimum.

Trávicí funkce lysozymu pro tyto synantropní (skladištní ani prachové) roztoče však nebyla doposud studována a bakteriolytická aktivita ve střevě je dosud nejasná. Vzhledem k přítomnosti lysozymu v exkremetech je ale možné, že zde plní obrannou a možná i trávicí funkci (Stewart *et al.* 1991, Mathaba *et al.* 2002).

Důležitou informací, která může pomoci při hledání odpovědi na to, zda je lysozym trávicí enzym, je pH v jednotlivých částech trávicího traktu. Anatomie je zobrazena na obrázcích 6a-d a přehled známých hodnot pH pro některé druhy poskytuje tabulka 2. Pokud je pH ve střevě a pH optimum enzymu shodné nebo podobné může to indikovat trávicí funkci daného enzymu (Dobson *et al.* 1984, Ruiz *et al.* 1994, Dominguez-Bello *et al.* 2004). Největší podíl na trávení má ventriculus a caeca. V colonu a postcolonu dochází především k resorpci vody (Smrž & Čatská 1989).

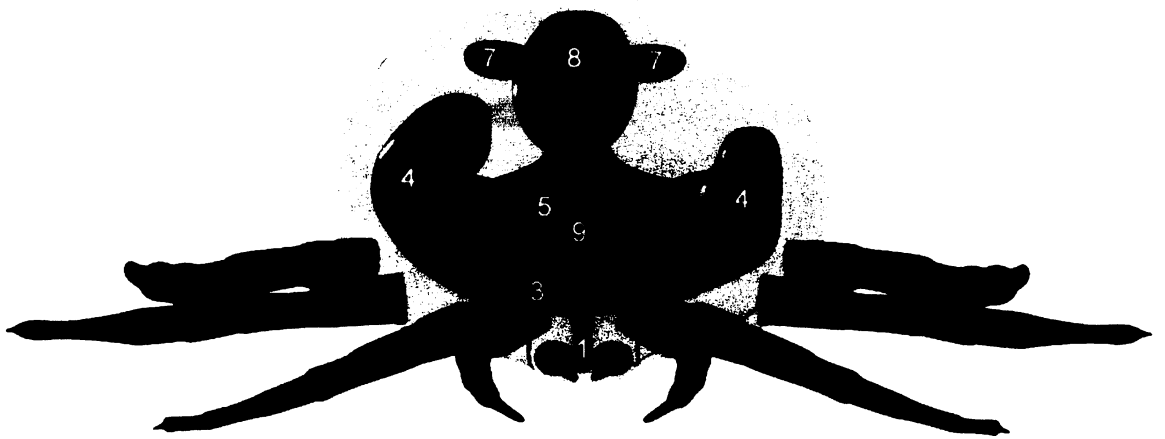
Species	Část střeva				Reference
	ventr.	caeca	colon	postcol.	
<i>A. siro</i>	5,4-6,0	5,4-6,0	6,2-6,8	6,8-7,0	(Akimov & Barabanova 1976)
<i>A. ovatus</i>	5,6-6,0	5,6-6,0	6,5-7,0	7,0-7,6	(Akimov & Barabanova 1976)
<i>C. berlesei</i>	5,4-5,6	5,4-5,6	5,9-6,0	6,5	(Akimov & Barabanova 1976)
<i>C. lactis</i>	6,5	6,5	6,8-7,0	7,0	(Akimov & Barabanova 1976)
<i>D. farinae</i>	5,0-6,0	5,0-6,0	7,0-8,0	7,0-8,0	(Wharton & Brody 1972) (Hughes 1950)
<i>G. domesticus</i>	5,6-6,0	5,0-6,0	6,5	7,2	(Akimov 1985)
<i>T. putrescentiae</i>	6,2-6,3	6,2-6,3	6,5	6,8-7,0	(Akimov & Barabanova 1978)

Tabulka 2: Dosud známá pH v jednotlivých částech střeva.



Obrázek 6a: Anatomie trávicího traktu roztoče *Acarus siro* (pohled zhora), podle Šobotník *et al.* (2006), terminologie převzata z Alberti *et al.* (2003).

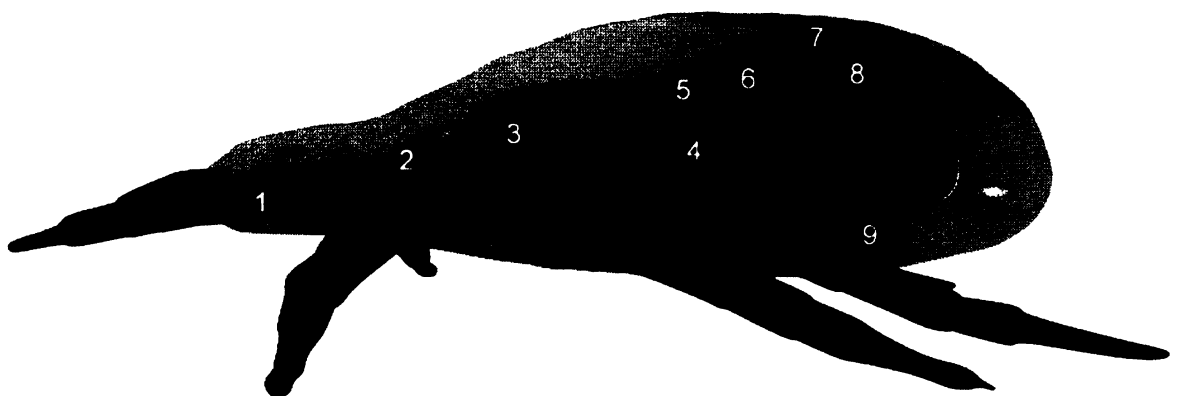
- 1) pharynx
- 2) oesophagus
- 3) ventriculus
- 4) caeca
- 5) colon
- 6) intercolon
- 7) postcolon diverticula
- 8) postcolon
- 9) anal atrium (viz obr. 6b a 6d)



Obrázek 6b: Anatomie trávicího traktu roztoče (pohled zezadu).



Obrázek 6c: Anatomie trávicího traktu roztoče (pohled zepředu/zhora).



Obrázek 6d: Anatomie trávicího traktu roztoče (pohled z boku).

3. Materiál a metodika

3.1. Modelové druhy roztočů

Jako modelové druhy bylo vybráno 10 druhů roztočů ze skupiny Acariformes podřádu Acaridida. Všechny druhy pocházely z laboratorních kmenů chovaných v laboratoři oddělení ochrany zásob VÚRV. Modelové druhy, spolu s autory, kteří je popsali, jsou uvedeny v následujícím přehledu, jehož nomenklatura je převzata (Hughes 1976):

- čeleď: Acaridae
 - *Caloglyphus redickorzevi* (Zachvatkin 1941)
 - *Aleuroglyphus ovatus* (Tropeau 1878)
 - *Tyroborus lini* (Oudemans 1923)
 - *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank 1781)
 - *Tyrophagus brevicrinatus* (Robertson 1959)
 - *Acarus siro* (Linné 1758)
 - *Acarus gracilis* (Hughes 1957)
- čeleď: Pyroglyphidae
 - *Dermatophagoides farinae* (Huges 1961)
- čeleď: Glycyphagidae
 - *Lepidoglyphus destructor* (Schrank 1871)
 - *Glycyphagus domesticus* (De Geer 1778)

3.2. Chovné a experimentální diety

Druhy byly chovány na 2 odlišných chovných dietách. Většina druhů (*C. redickorzevi*, *A. ovatus*, *A. siro*, *A. gracilis*, *T. lini*, *T. putrescentiae*, *T. brevicrinatus*,) byla chována na dietě, která byla připravována smícháním ovesných vloček, obilných klíčků a kvasnic v hmotnostním poměru (9 : 9 : 2). Zbylé 3 druhy (*D. farinae*, *L. destructor*, *G. domesticus*) byly chovány na chovné dietě reprezentované vločkovým kmením pro rybičky LON MIX, jehož složení bylo následující: mlýnská krmiva, rybí maso, rostlinné úsušky, gluten, rybí olej, plankton, agar, potravinářské barvivo E 151.

Experimentální (bakteriální) dieta pro všechny modelové druhy byla odvozena od chovné diety. Ta byla obohacena z 5 % (w/w) G⁺ lyofilizovanou bakterií *Micrococcus lysodieticus*.

3.3. Chovné boxy a chovné komůrky

Chovné boxy byly vybaveny teploměry a vlhkoměry na sledování fyzikálních podmínek. Ty byly udržovány v konstantních hodnotách, teplota 25°C pomocí termostatu a vlhkost vzduchu 85 nebo 75 % RH pomocí nasyceného roztoku KCl, respektive NaCl. Všechny druhy, až na *D. farinae* byly chovány v prostředí 85 % RH.

Roztoči spolu s naváženou potravou byli umístěni do chovných komůrek (frit) a v těchto chovných komůrkách do chovných boxů.

3.4. Materiál pro enzymatické stanovení

K enzymatickému stanovení byly použity vzorky získané chovem na chovné dietě. Materiál byl rozdělen na 3 skupiny:

- 1) těla roztočů + exkrementy (WME + SGME);
- 2) těla roztočů (WME);
- 3) exkrementy (SGME).

V prvním případě byli roztoči jednoduše extrahováni spolu s exkrementy z chovné komůrky. V druhém případě byli roztoči separováni z chovné komůrky a dále byl aplikován dvoufázový postup čištění. V první fázi byla oddělena těla roztočů od exkrementů prosíváním přes mikrosíto (hustota mřížky 0,16 mm). Ve druhé fázi byla těla roztočů oddělena i od zbytků exkrementů. Za tímto účelem byl vyvinut jednoduchý, ale účinný postup (Příloha 8.4.). Z plastové injekční stříkačky (na 20 ml) byl odříznuta celá přední část a na vzniklý otvor byla poté připevněna pomocí gumiček nylonová tkanina s velmi jemnými póry. Do takto připravené separační aparatury pak byli nasypáni roztoči k přečištění. Do injekční stříkačky byl zvolna nasáván roztok detergentu (0,1 % w/w Tween), tímto nasáváním docházelo v podstatě k čištění flotací. K zefektivnění postupu byl vždy celý obsah promícháván překlápěním. Vytlačení kapaliny z aparatury byl vzorek zbavován drobných částic, trusu a vajíček. Celý postup byl opakován tolikrát, dokud odcházela z aparatury nečistota, tedy asi pětkrát. Poslední promývání bylo provedeno destilovanou vodou. Vzorek byl pak vytlačen na petriho misku a umístěn do vakuového exikátoru, kde byl po dobu pěti hodin sušen pod vakuem. Takto získaný vzorek byl zvážen na mikroanalytické váze. Čisté exkrementy, které byly z chovu vybírány vždy po 10 dnech, byly získávány prosíváním přes velmi jemné síto (mušelín), a opět váženy na mikroanalytické váze. Takto připravené vzorky byly buď hned dále zpracovávány nebo uloženy do hluboko mrazícího boxu při -40°C k pozdějšímu použití.

Připravený materiál byl použit k přípravě 3 typů homogenátů, vždy ve fyziologickém roztoku (FR):

- 1) WME + SGME: 0,15 g na 3 ml FR, t = 10 min za chlazení ledem;
- 2) WME: 0,1 g na 3 ml FR, t = 10 min, za chlazení ledem;
- 3) SGME: 0,1 g na 3 ml FR, t = 10 min, za chlazení ledem.

Homogenizace byla prováděna pomocí Potter-Elvehjem skleněného homogenizéru. FR byl připraven rozpuštěním 0,9 g NaCl ve 100 ml destilované vody a přidavkem NaN₃ na špičku lžičky na objem 10 l. Homogenát byl odstředěn v mikrozkušavkách typu eppendorf na vysokootáčkové chlazené centrifuze předchlazené na 4°C při 20 000 otáčkách po dobu 10 min.

Ve všech homogenátech byl změřen obsah proteinů pomocí Bradfordova činidla. Do mikrotitračních destiček o počtu 96 jamek bylo pipetováno vždy 50 µl homogenátu a 250 µl Bradfordova činidla v šesti opakováních. Absorbance pak byla měřena na elisa-readeru při vlnové délce 590 nm. Kalibrace metody byla provedena proteinovým standardem o koncentraci 1 mg BSA na 1 ml 0,15 M NaCl. Hodnoty byly vypočítány z kalibrační závislosti (Příloha 8.3). Kalibrační závislost byla vytvořena programem Origin 6.1, dle exponenciální rovnice:

$$y = y_0 + Ae^{-x t}, \quad (1)$$

kde y je absorbance, x koncentrace proteinů ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a y_0 , A a t jednotlivé parametry funkce. Z průběhu grafu je vidět, že s vysokou spolehlivostí lze detekovat koncentraci proteinů do cca $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při vyšší koncentraci proteinů v homogenátu je nutno homogenát ředit a následné hodnoty přepočítat.

Všechny vzorky, které nebyly použity k okamžité analýze byly, vždy uloženy do hluboko mrazícího boxu při -40°C v zamrazovacích zkumavkách.

3.5. *In vitro* analýza

3.5.1 Princip metody

Ke zjištění enzymové aktivity lysozymu bylo využito poznatku, že lysozym je schopen hydrolyzovat peptidoglykanovou vrstvu buněčné stěny G⁺ bakterií. Na tuto hydrolytickou reakci je velmi citlivá G⁺ bakterie *Micrococcus lysodieticus*, která byla již dříve v několika případech využívána k determinaci enzymové aktivity lysozymu (Childs & Bowman 1981,

Stewart *et al.* 1998, Mathaba *et al.* 2002). Vlivem lyze bakterií se mění absorbance bakteriální suspenze a díky tomu lze kvantifikovat aktivitu lysozymu.

3.5.2 Měření enzymové aktivity

K determinaci enzymové aktivity byla v této práci použita nová modifikace metody využívající velké citlivosti G^+ bakterie *M. lysodieticus* na lysozym. Z lyofylovaných buněk *M. lysodieticus* byla připravována bakteriální suspenze v 0,2 M BR-I (Britton-Robinson I) pufru, který udržoval stálé pH. Tento pufr má velkou výhodu v tom, že je použitelný v širokém spektru pH (Příloha 8.1) (Čárský 1981). pH pufru bylo adjustováno na pH metru s teplotní kompenzací za stálého míchání na magnetické míchačce. Nejprve byla připravena kyselá složka 0,2 M roztoku H_3BO_3 , H_3PO_4 a CH_3COOH . Tato kyselá složka byla titrována pomocí pasturovy plastové pipety zásaditým 10 M roztokem NaOH. Enzymová reakce byla zahajována připipetováním příslušného homogenátu (WME nebo SGME) do bakteriální suspenze. Pro zvýšení kinetiky enzymové reakce byla směs inkubována při $37^\circ C$ a vždy po dobu 4 hodin. Stálá homogenita prostředí byla udržována kontinuálním mícháním, tyto podmínky zajišťovala vodní lázeň s mícháním. Současně byl prováděn vždy i slepý pokus (blank), kdy byla inkubována pouze bakteriální suspenze, do které byl právě po 4 hod. napipetován homogenát a okamžitě po jeho přidání byla ukončena enzymová reakce. K ukončení enzymové reakce bylo použito acetonové činidlo (10 g Na_2CO_3 na 100 ml CH_3COCH_3 , doplněno na objem 1 l destilovanou vodou). Nakonec byla suspenze promíchána na vortexu a přepipetována do mikrotitračních destiček, do jamky vždy po 250 μl . Tyto mikrotitrační destičky pak byly umístěny do zkalibrovaného elisa-readeru a byla změřena absorbance při vlnové délce 450 nm.

Kalibrace metody byla provedena roztoky *M. lysodieticus* o různé koncentraci ($mg \cdot ml^{-1}$) v 10 opakováních. Z naměřených hodnot pak byla sestrojena kalibrační závislost (Příloha 8.2.) programem Origin 6.1 dle Boltzmannovy funkce:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{[1 + e^{(x-x_0)/dx}]} + A_2 \quad (2)$$

kde y je absorbance, x koncentrace bakteriální suspenze a A_1 , A_2 a x_0 jednotlivé parametry funkce. Enzymová aktivita byla vyjádřena jako $v \cdot h^{-1}$, tedy změna koncentrace substrátu *M. lysodieticus* ($mg \cdot ml^{-1}$) vztažená na obsah proteinů v reagentu za časovou jednotku 1 hod. Vždy se jedná o relativní enzymové aktivity, neboť jsou hodnoty vztaženy na obsah proteinů.

Upřesněné postupy jsou uvedeny v následujících podkapitolách.

3.5.2.1 Determinace orientačního pH optima

Nejprve bylo určeno orientační pH optimum za použití homogenátu SGME+WME. Do 4 mikrozkušavek typu eppendorf bylo pipetováno 250 μl bakteriální suspenze *M. lysodieticus* (0,01 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 0,2 M BR-I pufru) a 50 μl homogenátu WME+SGME pro každé pH (3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0). Ke slepému pokusu byly použity 3 mikrozkušavky pro každé pH. Zkušavky pak byly umístěny k inkubaci při 37°C po dobu 4 hod. do předem vytemperované vodní lázně s vortexem. Po 4 hod. byla enzymová reakce ukončena 1 ml acetonového činidla.

3.5.2.2 Stanovení aktivit a pH optima v WME

Na základě nejvyšších hodnot zjištěných při determinaci orientačního pH optima byla zjišťována aktivita a pH optimum ve WME pouze ve třech pH (4,0; 4,5; 5,0) s nejvyšší zjištěnou lysozymovou aktivitou. Postup byl identický s determinací orientačního pH až na to, že reakce byla zahajována 50 μl WME.

3.5.2.3 Stanovení aktivit a pH optima v SGME

Vzhledem k přítomnosti kalných nečistot v exkrementech, byla metoda stanovení aktivit a pH optima v SGME modifikována. Proto byla použita nižší koncentrace bakteriální suspenze, a to 0,005 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na 0,2 M BR-I pufru. Tímto krokem bylo možno snáze korigovat poměrně velké rozptyly absorbance. Až na tuto změnu byla enzymová aktivita měřena úplně stejným způsobem jako v případě WME.

3.5.2.4 Testování bakteriolytické aktivity potravy

Někteří roztoči byli krmeni vločkovou potravou pro akvarijní rybičky, která mohla vykazovat bakteriolytickou aktivitu. Proto byla tato potrava na bakteriolytickou aktivitu testována. Bylo k tomu použito stejného postupu jako při stanovení aktivit v SGME. Místo SGME homogenátu byl ovšem použit homogenát získaný zhomogenizováním vločkové potravy pro rybičky (0,1 g na 3 ml FR).

3.5. *In vivo* analýza

In vivo analýza měla charakter biotestů, kdy byli použiti živí roztoči. Roztoči byli chováni na 2 různých dietách, na chovné (kontrolní) dietě a na dietě experimentální (bakteriální) (kap. 3.2.). Do šesti chovných komůrek bylo odpočítáno vždy 20 jedinců. Ti pak byli umístěni do chovného boxu na dobu 21 dnů v temnu, při podmínkách definovaných v kap. 3.3. Po této době byli roztoči extrahováni z jednotlivých komůrek pomocí Tullgren-Berleseho přístroje do nasyceného roztoku kyseliny pikrové a následně počítáni pod binokulární lupou.

3.6. Statistická analýza dat

Ke statistické analýze enzymové aktivity byly použity hodnoty v pH optimu pro jednotlivé druhy v WME a SGME. Tato data měla normální rozdělení, a proto byly jednotlivé druhy porovnány pomocí ANOVA testů pro WME a SGME zvlášť. Mezidruhové rozdíly byly vyhodnoceny pomocí Tukey HSD intervalů na hladině významnosti 0,05.

Výsledky biotestů byly porovnány pomocí T-testu, kde jednou proměnnou byla populace roztočů na kontrolní (chovné) dietě a druhou proměnnou populace roztočů na potravě experimentální (bakteriální). Test byl proveden na hladině významnosti 0,05. Pro nalezení mezidruhových rozdílů ve velikosti nárůstu populace byla použita jednofaktorová ANOVA, data měla normální rozdělení. Byly zvlášť porovnány nárůsty populace na kontrolní dietě a v další analýze na dietě obohacené lysozymem. Mezidruhové rozdíly byly vyhodnoceny pomocí Tukey HSD intervalů na hladině významnosti 0,05. Pro zjištění vlivu množství lysozymu na různé druhy roztočů byla data standardizována přepočtením na procenta, kde průměrný populační růst jednotlivých druhů roztočů na kontrole byl považován za 100 %-ní. A protože transformovaná data neměla normální rozdělení, byla takto standardizovaná data pro lysozym porovnána Kruskal-Wallisovým testem. Mezidruhové rozdíly byly vyhodnoceny opět na hladině významnosti 0,05.

3.7. Určení pH optima ve střevě roztočů

pH v částech trávicího traktu roztočů bylo určeno pomocí acidobazických indikátorů. Jedná se o organické látky, které mají schopnost měnit svoje zbarvení v závislosti na aciditě prostředí. Zbarvení je potom typické pro určitou aktivitu H_3O^+ iontů v roztoku a lze z něj odhadnout pH. Byly vybrány vhodné typy těchto indikátorů (Tabulka 3) a přimíchány do

chovné diety v hmotnostním poměru 1/20. Do zkumavky typu eppendorf bylo umístěno trochu takto obohacené potravy a také 20 jedinců roztočů. Po 24 hodinách byli roztoči přeneseni na petriho misku a přeneseni pod lupou pomocí štětečku na mikroskopické sklíčko, na kterém byly sledovány a následně fotografovány barevné změny v trávicím traktu roztočů pod mikroskopem za pomoci digitální kamery.

Běžný název	Interval pH	Změna zbarvení
Methylová oranž	3,1 – 4,4	červená → oranžovo žlutá
Bromfenolová modř	3,0 – 4,6	žlutá → modrá
Bromkrezolová zeleň	3,8 – 5,4	žlutá → modrá
Methylová červeň	4,4 – 6,2	červená → žlutá
Alizarinová červeň S	3,7 – 5,2	žlutá → hnědorůžová
Chlorfenolová červeň	5,0 – 6,6	žlutá → červená
Bromfenolová červeň	5,0 – 6,8	žlutá → červená
p-nitrofenol	5,0 – 7,0	bezbarvá → žlutá
Bromthymolová modř	6,0 – 7,6	žlutá → modrá
Fenolová červeň	6,4 – 8,2	žlutá → červená
Thymolová modř	1,2 – 2,8	červená → žlutá
	8,0 – 9,6	žlutá → modrá
Kongo červeň	3,0 – 5,2	modrá → červená

Tabulka 3: Přehled použitých acidobazických indikátorů při určování pH optima ve střevě roztočů.

3.8. Seznam použitých použité techniky, chemikálií a programů

Mikrozkumavka 1,5 ccm s uzávěrem – eppendorf	GAMA GROUP a.s.
Mikrotitrační destička P, 96 jamek	GAMA GROUP a.s.
Víčko mikrotitrační destičky	GAMA GROUP a.s.
Ultra Turrax T8	Ika-Werke®
Vícekanálové mikropipety TIPOR-M 8 CHANNEL (20-200 µl)	Orange Scientifics
Jednakanálové mikropipety TIPOR-V (100-1000 µl), TIPOR-V (10-100 µl), TIPOR-V (20-200 µl)	Orange Scientifics
Homogenizér MPW-302	Mechanika Precyzyina

Multikanálová pipeta, 8 kanálů, 30-300	Brand Transferpette®
Thermo Shaker PST-60 HL plus	Biosan
Multifunkční vysokootáčková centrifuga Jouan MR 23i	Jouan
Cool-hotter Dry Bath Incubator, MC-01N-220	Major Science
MS-1 minishaker	IKA®
Thermo Orion PerpHecT LogR meter model 350	Orion Research, Inc
Orion Triode™ pH electrode 91-57BN	Orion Research, Inc
Magnetic stirrer MSH 300	Biosan
Vakuový exikátor	NALGENE®
Exikátorové boxy Secador 4.0	Secador™
Předvážka Navigator™, ± 0,01 g	OHAUS
Vodní lázeň WB 22/SV 1422,	Memmert GmbH & Co. KG
Třepací nástavec na vodní lázeň MEM00	Memmert GmbH & Co. KG
Stemi 2000-C Stereo Zoom Microscope Video System	Carl Zeiss
Axioskop	Carl Zeiss
Osvětlení KL 1500 LCD	Carl Zeiss
Mikroanalytická váha Mettler AE 240, ±0,01 mg	METLER TOLEDO
Potter-Elvehjem skleněný homogenizér, 5 ml	Kavalier
Elisa reader, E-Max	Molecular Devices®
Frity S0	Kavalier
kryoskopické zkumavky Cryovia®	Roth
Pasteurovy pipety, LOT 1V1 Multi-X 50 x 250 mm	WIKIPAK MEDICAL
Tween, Triton X-100	Serva®
Kultivační láhve pro tkáňové kultury 50 ml	Iwaki
Bradford reagent, PN: B6916	Sigma-Aldrich Co.
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC No. 4698, PN: M3770	Sigma-Aldrich Co.
NaN ₃ , p. a.	Lach-Ner, s.r.o.
BSA protein standard 1 mg/ml	Sigma-Aldrich Co.
LON MIX, Kompletní vločkové krmivo pro akvarijní ryby	Aqua tropic Lonský
H ₃ BO ₃ , čistá	Lachema, s. p., Brno
H ₃ PO ₄ , p. a., 85 %	Lachema, a. s., Neratovice
CH ₃ COOH, min. 98 %	Lachema, a. s., Neratovice

NaOH, p. a., min. 98 %

Na₂CO₃, bezvodý, p. a.

Kyselina pikrová

NaCl

Statistix 7.1

Origin[®] 6.1

Photoshop[®] Elements 2.0 (2002)

Microsoft Office Professional Edition 2003

Lachema, s. p., Brno

Lachema, a. s., Neratovice

Lachema, a. s., Neratovice

Lachema, s. p., Brno

Analytic Software, Tallahassee

OriginLab Corporation

Adobe[®]

Microsoft[®]

4. Výsledky

4.1. Výsledky *in vitro* analýzy

4.1.1. Orientační pH optimum lysozymu

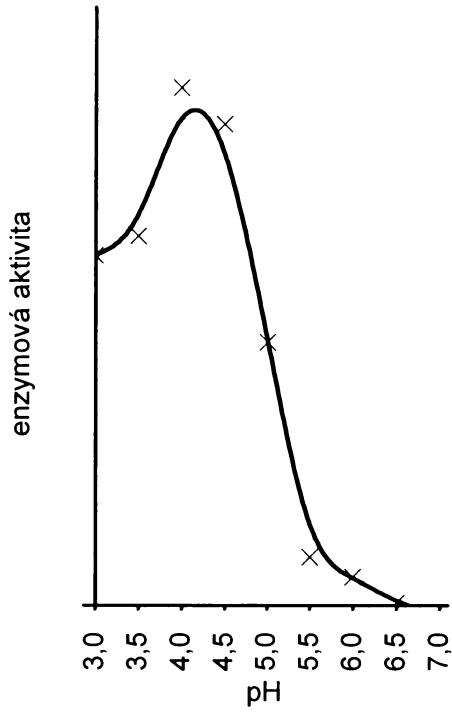
Bylo stanoveno orientační pH optimum pro všechny zkoumané druhy. Přehled stanovení ilustruje tabulka 4 a grafy 1 až 10 uvedené níže. Na grafech je uvedena enzymová aktivita bez jednotek, neboť se jedná pouze o orientační stanovení pH optima a hodnoty aktivity nejsou pro toto stanovení důležité. Nejdůležitějším faktorem je totiž maximum křivky a její tvar. Tato data jsou výchozí pro další stanovení. Klíčovou informací je, že maximální hodnoty nikdy nepřekračují pH 5,0 a nikdy nejsou nižší než pH 4,0. Hodnoty odečtené z maximální hodnoty získané proložením jsou nejbližše středně kyselému pH, tedy 4,5. Zjišťované pH optimum není rušeno bakteriolytickou aktivitou potravy, neboť zjištěná aktivita použité potravy byla nulová.

Species	Max. naměř.	Max. prol.
<i>Tyroborus lini</i>	4,0	4,1
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	5,0	4,2
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	4,5	4,6
<i>Tyrophagus brevicrinathus</i>	4,5	4,5
<i>Acarus gracilis</i>	4,5	4,2
<i>Glycyphagus domesticus</i>	4,5	4,5
<i>Acarus siro</i>	4,5	4,2
<i>Caloglyphus redickorzevi</i>	5,0	4,7
<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	4,0	4,0
<i>Dermatophagoides farinae</i>	4,5	4,5

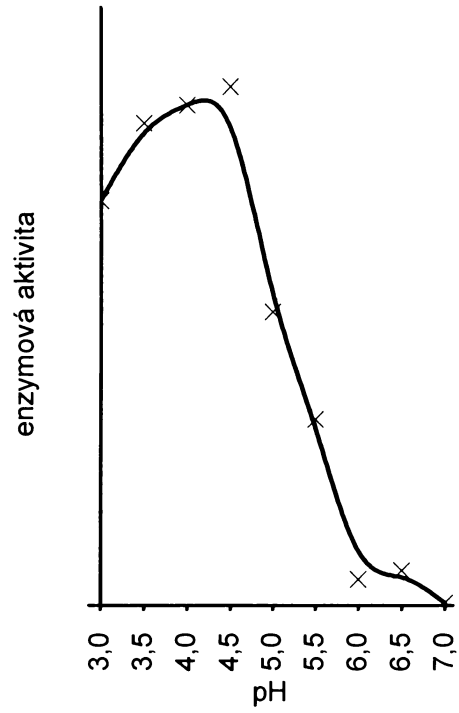
Tabulka 4: Přehled orientačního pH stanoveného v WME+SGME.

Max. prol. je maximální proložená hodnota, je odečtená z maxima grafu. Max. naměř. je maximální naměřená hodnota.

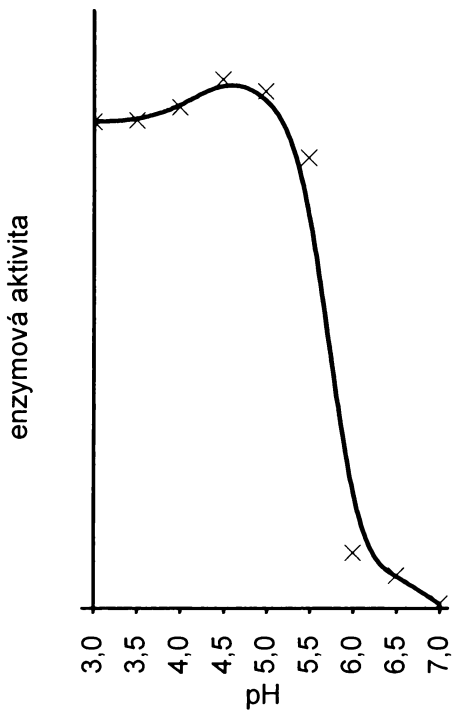
Graf 1: *Tyroborus lini*



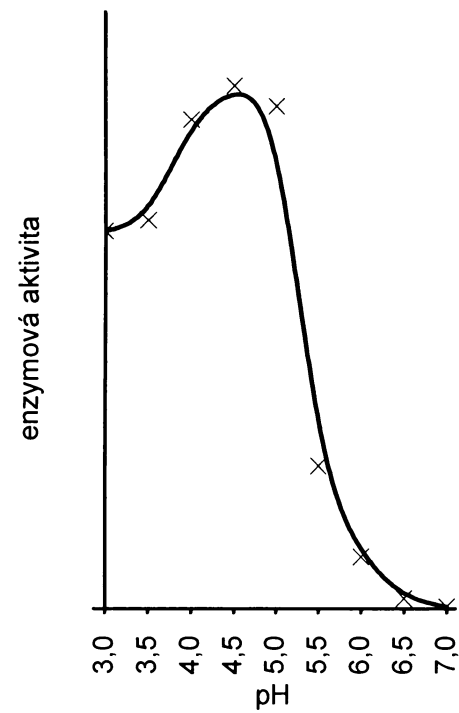
Graf 2: *Lepidoglyphus destructor*



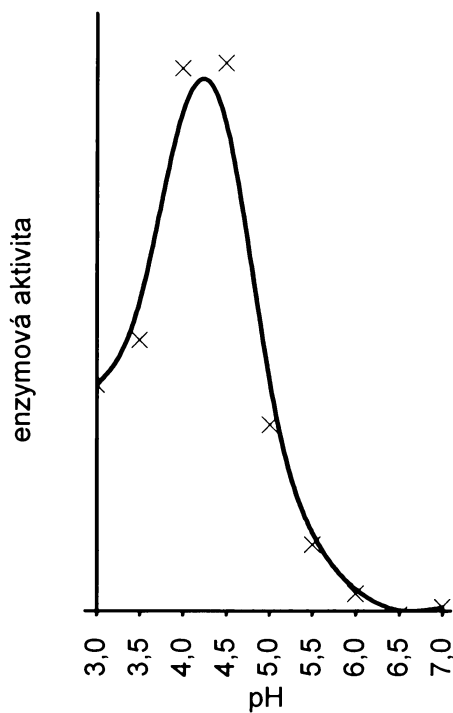
Graf 3: *Tyrophagus putrescentiae*



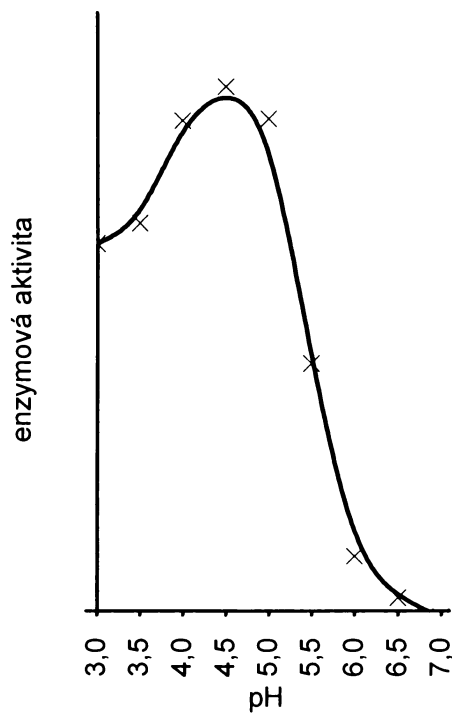
Graf 4: *Tyrophagus brevicrinathus*



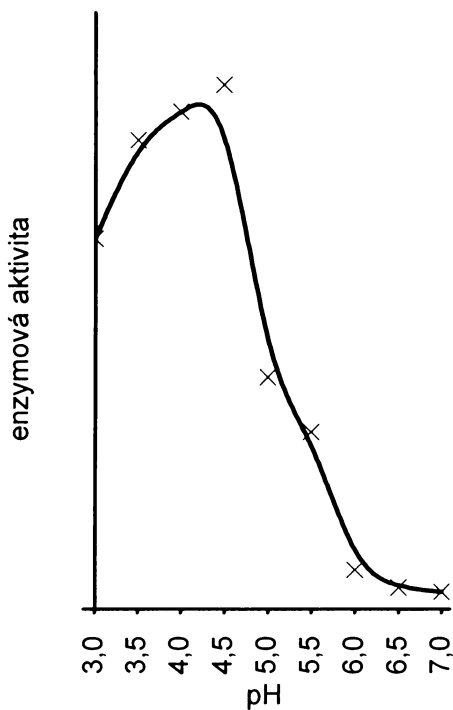
Graf 5: *Acarus gracilis*



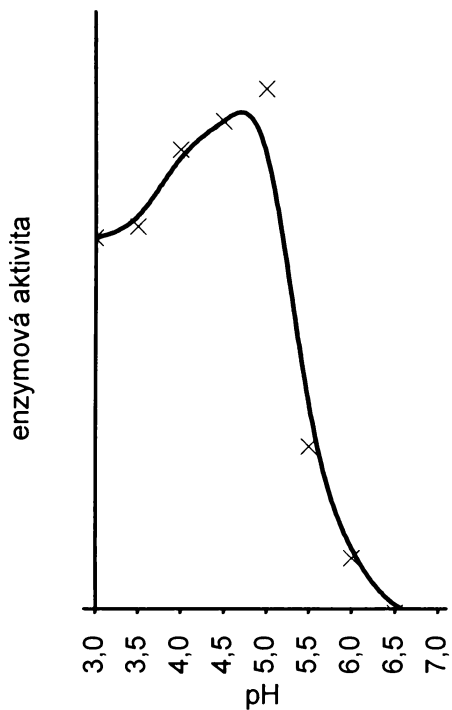
Graf 6: *Glycyphagus domesticus*

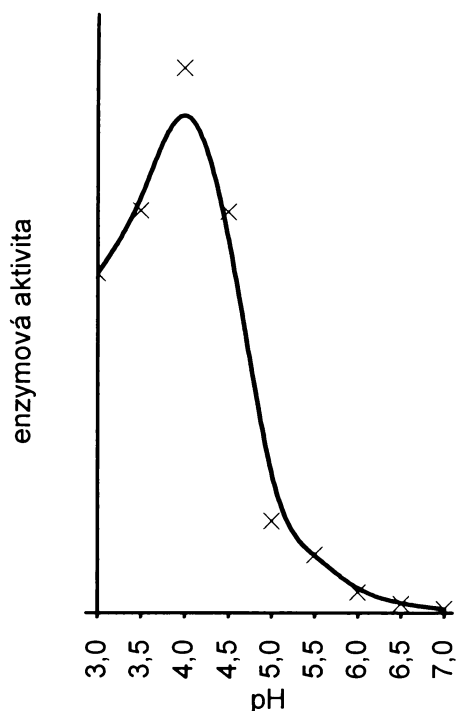
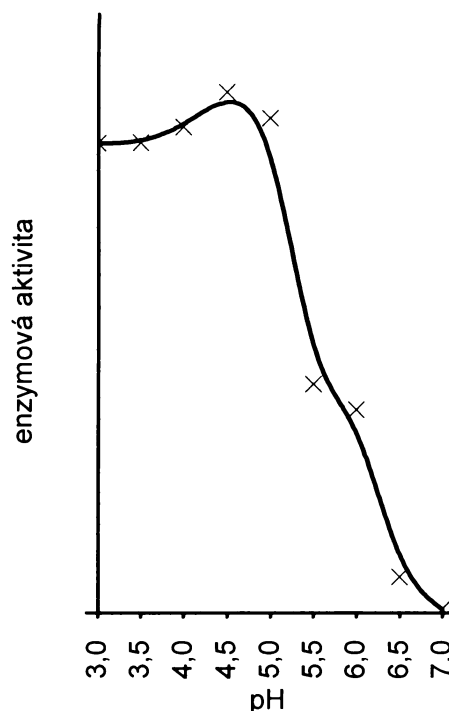


Graf 7: *Acarus siro*



Graf 8: *Caloglyphus redickorzevi*



Graf 9: *Aleuroglyphus ovatus*Graf 10: *Dermatophagoides farinae*

4.1.2. Aktivity a pH optimum lysozimu v WME a SGME

Po stanovení orientačního pH optima pro všechny druhy je zřetelné, že pH optimum lysozimu by se mělo pohybovat někde v rozmezí pH 4,0 až 5,0. Proto bylo zcela postačující změřit aktivity pro WME (Tabulka 6, Graf 11) a SGME (Tabulka 7, Graf 12) při pH 4,0, 4,5 a 5,0. Výsledkem toho měření byly kromě aktivit i pH optima lysozimu v WME a SGME (Tabulka 5). Z hodnot relativních aktivit lysozimu je patrné, že zde existují mezidruhové rozdíly a to jak pro WME, tak i pro SGME. Zvláště je to patrné při pohledu na grafy 11 a 12. Navíc vysoké aktivitě v WME u jednoho druhu často odpovídá nízká aktivita v SGME a naopak. V WME je pH optimum lysozimu (Tabulka 6) u 7 z 10 testovaných druhů 4,5, odlišuje se pouze *T. lini* s pH optimem 5,0 a *A. siro* s *L. destructor* s pH optimem 4,0. Pro SGME můžeme pH optimum považovat za homogenní, je u všech testovaných druhů 4,5. Hodnoty aktivit lysozimu v pH optimu byly testovány jednofaktorovou ANOVA analýzou ($\alpha = 0,05$), a to jak pro WME, tak SGME. Pro WME se hodnoty významně lišily; $F_{(9,70)} = 2485,58$; $p < 0,001$. Stejně tak se významně lišily i aktivity lysozimu v SGME; $F_{(9,70)} = 132,37$; $p < 0,001$. Roztoči byli seřazeni dle klesající enzymové aktivity a následně

rozdělení do 3 skupin charakterizovaných nízkou (do 33,33 %), střední (33,33 až 70 %) a vysokou aktivitou (66,66 až 100 %) (Tabulka 8 a 9, Graf 13). Za 100 %-ní aktivitu byl považován druh s nejvyšší aktivitou v WME, respektive SGME. Důvodem přepočtu na procentuální aktivitu byly 2 různé materiální zdroje (SGME a WME) při stanovování enzymové aktivity. Nejedná se totiž nikdy o absolutní hodnoty enzymová aktivity, ale o relativní aktivity, kdy je enzymová aktivita vztažena na obsah proteinů, a ten je pro homogenáty WME i SGME, získané byť stejným postupem, podstatně odlišný (cca pětinasobný pro WME). V grafu 13 je pomocí čtverců získaných kolmicemi k osám v místě s 33,33 %-ní a 66,66 %-ní aktivity vyznačeno 5 skupin, které charakterizují míru zastoupení enzymu v tělech a exkrementech. Jedná se v podstatě o kombinaci nízké, střední a vysoké aktivity v WME, respektive SGME. Do první skupiny s tendencí mít lysozym převážně v těle patří *A. gracilis* a *T. lini*, do druhé skupiny s tendencí mít lysozym spíše v těle patří *T. putrescentiae*, *G. Domesticus*, *T. brevicrinathus*, *A. ovatus*. Do třetí skupiny s tendencí mít lysozym shodně v exkrementech i v těle náleží *D. farinae*. Čtvrtá skupina s tendencí mít lysozym spíše v exkrementech je obsazena *A. siro* a poslední pátá skupina s tendencí mít lysozym převážně v exkrementech je obsazena rovněž jedním druhem *L. destructor*, přičemž tento druh má dosti blízko do skupiny čtvrté. Směrnice v grafu 13 rozděluje tento graf na 2 poloviny, druhy nad směrnicí vykazují tendenci mít lysozym více v exkrementech a druhy pod směrnicí více v těle.

Druh	pH _o (WME)	pH _o (SGME)
<i>Tyroboborus lini</i>	5,0	4,5
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	4,0	4,5
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	4,5	4,5
<i>Tyrophagus brevicrinathus</i>	4,5	4,5
<i>Acarus gracilis</i>	4,5	4,5
<i>Glycyphagus domesticus</i>	4,5	4,5
<i>Acarus siro</i>	4,0	4,5
<i>Caloglyphus redickorzevi</i>	4,5	4,5
<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	4,5	4,5
<i>Dermatophagoides farinae</i>	4,5	4,5

Tabulka 5: pH optima v WME a SGME.

Druh	EA _{WME} (v.h ⁻¹) ± SD		
	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0
<i>Tyroborus lini</i>	33,36 ± 0,36	34,36 ± 0,20	36,04 ± 0,09
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	15,46 ± 0,91	8,68 ± 0,65	8,42 ± 0,30
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	19,37 ± 0,56	23,69 ± 0,32	19,34 ± 0,62
<i>Tyrophagus brevicrinathus</i>	32,25 ± 0,87	34,80 ± 0,22	29,78 ± 0,66
<i>Acarus gracilis</i>	31,47 ± 1,13	38,15 ± 0,41	29,97 ± 1,00
<i>Glycyphagus domesticus</i>	36,28 ± 1,50	39,33 ± 1,08	30,71 ± 0,95
<i>Acarus siro</i>	11,40 ± 0,97	9,41 ± 0,79	8,04 ± 0,37
<i>Caloglyphus redickorzevi</i>	39,81 ± 0,37	47,80 ± 0,15	39,47 ± 0,33
<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	26,45 ± 0,82	27,09 ± 0,88	24,38 ± 0,71
<i>Dermatophagoides farinae</i>	30,96 ± 0,47	33,21 ± 0,18	31,75 ± 0,23

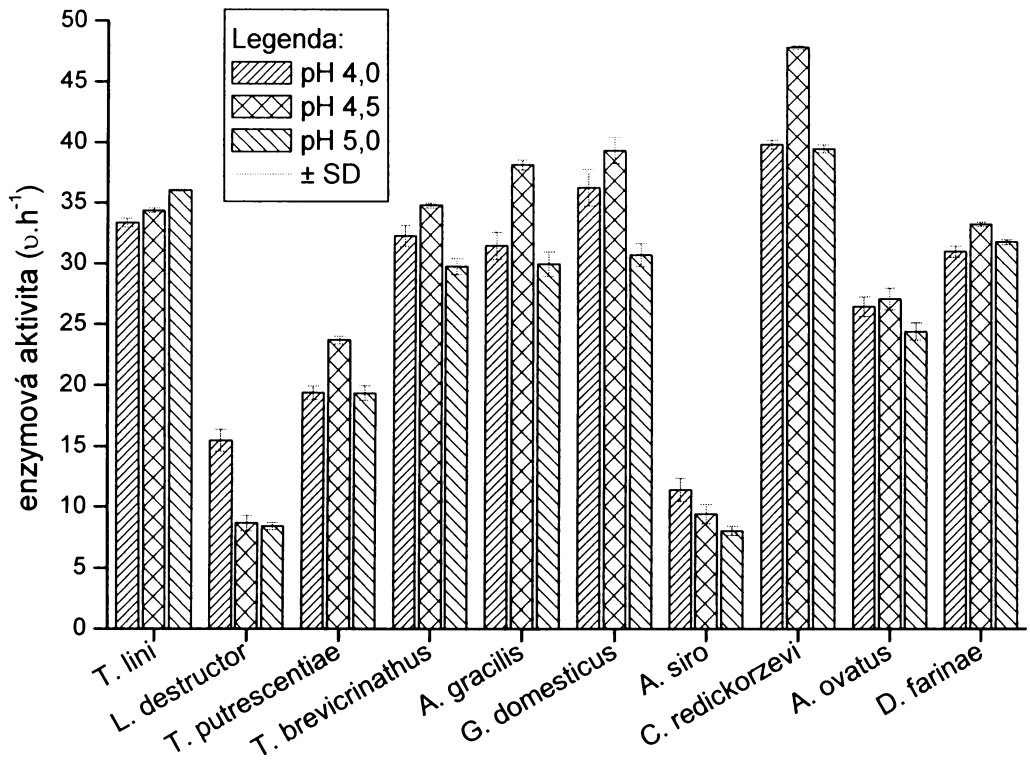
Tabulka 6: Relativní aktivity lysozymu v WME.

EA_{WME} vyjadřuje průměrnou relativní lysozymovou aktivitu v tělech roztočů a ± SD vyjadřuje směrodatnou odchylku.

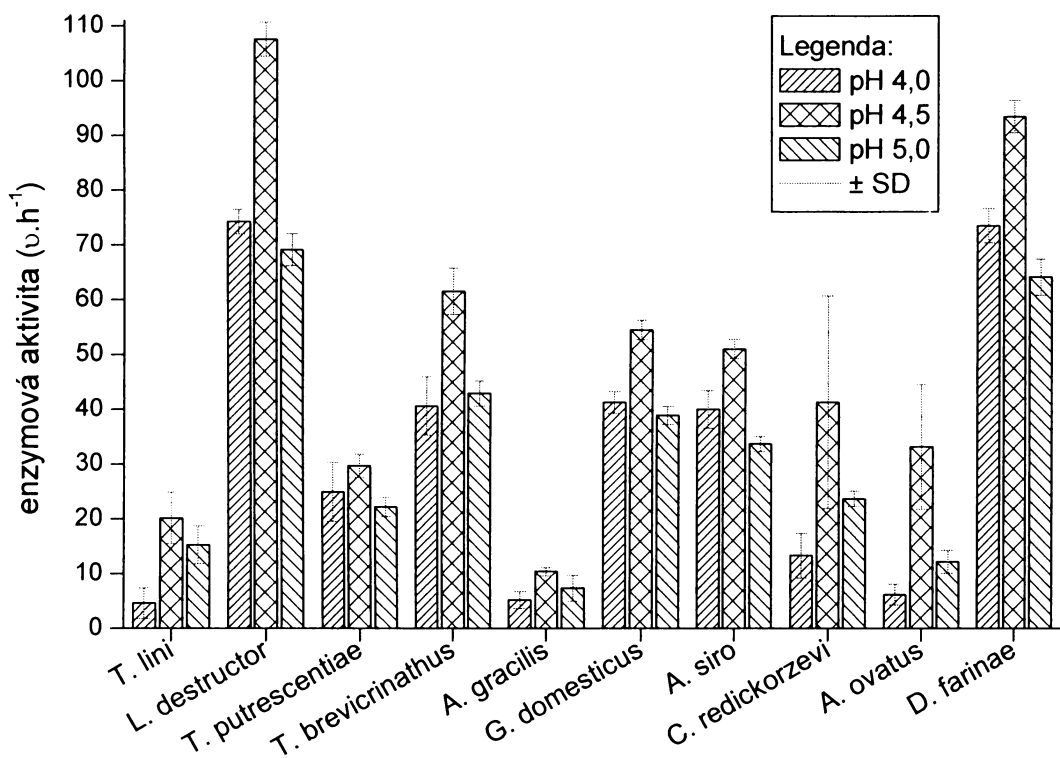
Druh	EA _{SGME} (v.h ⁻¹) ± SD		
	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0
<i>Tyroborus lini</i>	4,63 ± 2,81	20,15 ± 4,68	37,36 ± 3,45
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	74,25 ± 2,24	107,58 ± 3,10	69,19 ± 2,92
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	24,91 ± 5,40	29,68 ± 2,15	22,14 ± 1,72
<i>Tyrophagus brevicrinathus</i>	40,60 ± 5,33	61,55 ± 4,23	42,89 ± 2,35
<i>Acarus gracilis</i>	5,22 ± 1,55	10,38 ± 0,78	7,38 ± 2,37
<i>Glycyphagus domesticus</i>	41,24 ± 2,03	54,52 ± 1,80	38,84 ± 1,67
<i>Acarus siro</i>	40,00 ± 3,44	51,00 ± 1,77	33,67 ± 1,38
<i>Caloglyphus redickorzevi</i>	13,30 ± 4,06	41,27 ± 19,44	23,68 ± 1,39
<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	6,16 ± 1,88	33,14 ± 11,37	12,19 ± 2,10
<i>Dermatophagoides farinae</i>	73,52 ± 3,09	93,44 ± 2,98	64,17 ± 3,31

Tabulka 7: Relativní aktivity lysozymu v SGME.

EA_{SGME} vyjadřuje průměrnou relativní lysozymovou aktivitu v exkrementech a ± SD vyjadřuje směrodatnou odchylku.



Graf 11: Relativní aktivita lysozemu v tělech roztočů (WME) při pH 4,0, 4,5 a 5,0.



Graf 12: Relativní aktivita lysozemu v exremetech (SGME) při pH 4,0, 4,5 a 5,0.

Druh	EA _{WME}	Homogenní skupiny
<i>Caloglyphus redickorzevi</i> ³	47,80	A
<i>Glycyphagus domesticus</i> ³	39,33	• B
<i>Acarus gracilis</i> ³	38,15	• • C
<i>Tyroborus lini</i> ³	36,04	• • • D
<i>Tyrophagus brevicrinathus</i> ³	34,80	• • • • E
<i>Dermatophagoides farinae</i> ³	33,21	• • • • • F
<i>Aleuroglyphus ovatus</i> ²	27,09	• • • • • • G
<i>Tyrophagus putrescentiae</i> ²	23,69	• • • • • • • H
<i>Lepidoglyphus destructor</i> ¹	15,46	• • • • • • • • I
<i>Acarus siro</i> ¹	11,41	• • • • • • • • • J

Tabulka 8: Porovnání lysozymové aktivity ve WME u jednotlivých druhů roztočů, kontrasty vyhodnoceny pomocí Tukey HSD intervalů. ($\alpha = 0,05$)

Všech 10 průměrů se signifikantně navzájem odlišuje. Je zde 10 skupin (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) reprezentovaných vždy jedním druhem. Roztoči jsou vymezeni do 3 skupin:

¹Nízká aktivita (do 33,33 %)

²Střední aktivita (33,33 až 66,66 %)

³Vysoká aktivita (66,66 až 100 %)

Species	EA _{SGME}	Homogenní skupiny
<i>Lepidoglyphus destructor</i> ³	107,58	A
<i>Dermatophagoides farinae</i> ³	93,46	• B
<i>Tyrophagus brevicrinathus</i> ²	61,55	• • C
<i>Glycyphagus domesticus</i> ²	54,52	• • C
<i>Acarus siro</i> ²	51,00	• • C D
<i>Caloglyphus redickorzevi</i> ²	41,27	• • • D E
<i>Aleuroglyphus ovatus</i> ¹	33,15	• • • • E
<i>Tyrophagus putrescentiae</i> ¹	29,68	• • • • E F
<i>Tyroborus lini</i> ¹	20,15	• • • • • F G
<i>Acarus gracilis</i> ¹	10,38	• • • • • • G

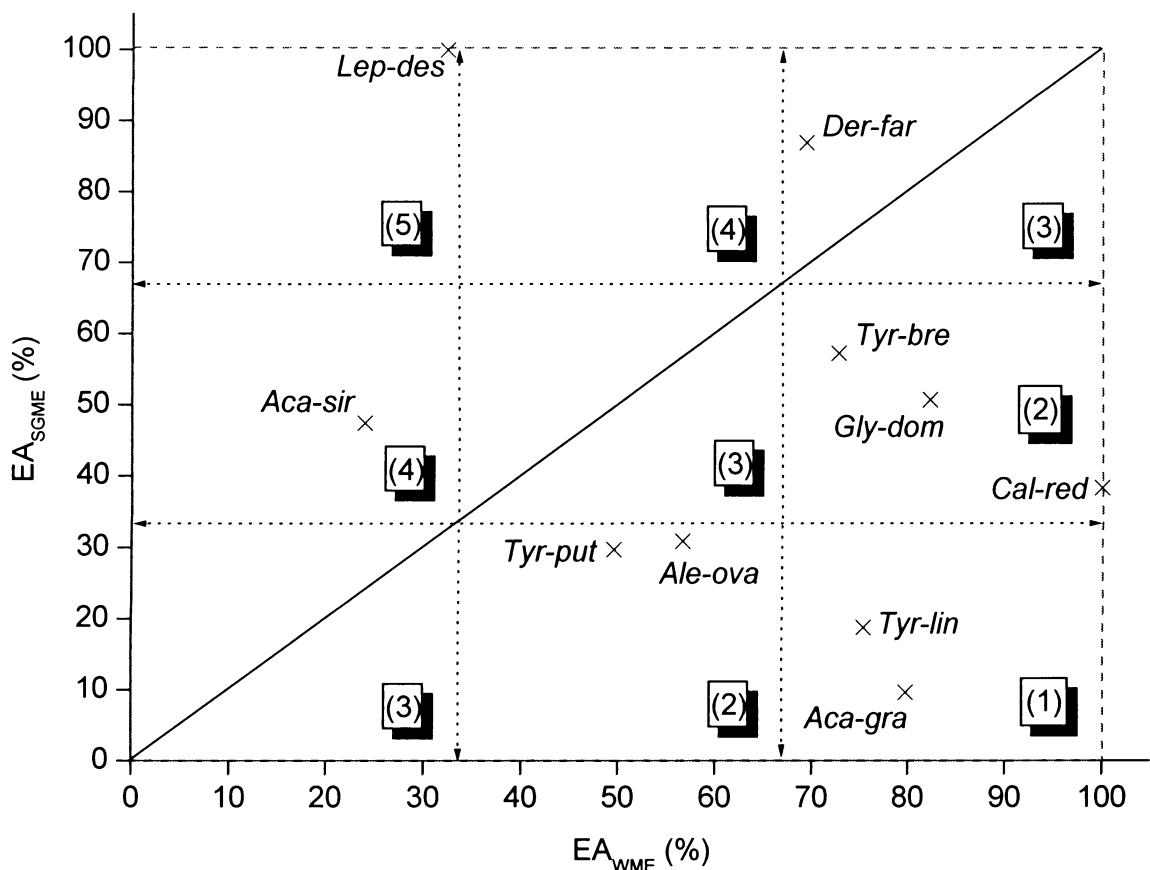
Tabulka 9: Porovnání lysozymové aktivity ve SGME u jednotlivých druhů roztočů, kontrasty vyhodnoceny pomocí Tukey HSD intervalů. ($\alpha = 0,05$)

Je zde 7 skupin (A, B, C, D, E, F, G) u kterých výsledky nejsou navzájem signifikantně odlišné. Roztoči jsou vymezeni do 3 skupin:

¹Nízká aktivita (do 33,33 %)

²Střední aktivita (33,33 až 66,66 %)

³Vysoká aktivita (66,66 až 100 %)



Graf 13: Porovnání relativní aktivity WME/SGME převedené na procentuální aktivitu, kde 100 %-ní aktivitu představuje nejvyšší zjištěná aktivita.

Druhy nad směrnicí vykazují tendenci mít lysozym více v exkrementech, druhy pod směrnicí vykazují tendenci mít lysozym více v těle. Roztoči jsou vymezeni do 5 skupin:

- (1) tendence mít lysozym převážně v těle;
- (2) tendence mít lysozym spíše v těle;
- (3) tendence mít lysozym shodně v exkrementech i v těle;
- (4) tendence mít lysozym spíše v exkrementech;
- (5) tendence mít lysozym převážně v exkrementech.

4.2. Výsledky *in vivo* analýzy

4.2.1. Populační růst roztočů

Populační růst na chovné (kontrolní) a bakteriální (experimentální) dietě ilustruje tabulka 10. Je patrné, že na obou dietách došlo k populačnímu nárůstu z původních 20 jedinců. Nejvyššího nárůstu na obou dietách dosáhli *T. lini* a *A. siro*. Zatímco *A. siro* (PRR 0,8) byl úspěšnější na dietě chovné, *T. lini* (PRR 2,22) na dietě bakteriální a to dosti významně. Rychlost množení byla naopak nejnižší pro *D. farinae* a *L. destructor*. Statisticky významných pozitivních hodnot populačního nárůstu na bakteriální dietě oproti dietě kontrolní dosáhlo plných 60 % (tj. 6 z 10) testovaných druhů: *T. lini*, *L. destructor*, *G. domesticus*, *C.*

redickorzevi, *A. ovatus* a *D. farinae*. *T. putrescentiae* a *T. brevicrinathus* měli statisticky shodné populační nárůsty na obou dietách. Zbylé 2 druhy *A. siro* a *A. gracilis* měly naopak vyšší přírůstek na kontrolní dietě.

Velikost konečné populace byla signifikantně mezidruhově rozdílná jak na kontrolní ($F_{(9,50)} = 15,85$; $p < 0,001$), tak i na bakteriální dietě ($F_{(9,51)} = 29,31$; $p < 0,001$), jak ukazují tabulky 12 a 13. Proto byla velikost populace na bakteriální dietě standardizována, převedením na procentuální počet, kde byla velikost populace na kontrolní dietě u příslušného druhu považována za 100 %-ní. Tato standardizovaná data, která vyjadřují vliv bakteriální diety, byla testována Kruskal-Wallisovou statistikou a ta prokázala signifikantní rozdíl mezi druhy ($W_{(9,51)} = 15,95$; $p < 0,001$), jak ukazuje tabulka 14.

Pro charakterizaci populačního růstu na obou dietách byly vymezeny 4 skupiny (Tabulka 12 a 13, Graf 14 a 15), a to podle konstanty λ (Tabulka 12, resp. 13), která je definovaná následujícím vztahem:

$$N = \lambda \cdot N_0, \quad (3)$$

kde N je velikost populace, N_0 počáteční velikost populace a λ je konstanta nezávislá na čase a velikosti populace. Konstanta λ v podstatě vyjadřuje kolikanásobný je nárůst konečné populace oproti populaci počáteční. Pro nízkou reprodukční schopnost byla určena kritická hodnota s konstantou 10, pro střední s konstantou 25, pro vysokou s konstantou 50, extrémně vysoká reprodukční schopnost omezení nemá. Pomalou reprodukci na kontrolní dietě vykazovaly druhy *C. redickorzevi*, *G. domesticus*, *L. destructor* a *D. farinae*, středně rychlou *T. putrescentiae*, *T. brevicrinathus*, *A. gracilis* a *A. ovatus*, rychlou *A. siro* a *T. lini*, extrémně rychlá zde chybí. Na bakteriální dietě byla zjištěna pomalá reprodukce u *L. destructor* a *D. farinae*, středně rychlá u *C. redickorzevi*, *G. domesticus*, *T. putrescentiae*, *T. brevicrinathus*, *A. gracilis* a *A. ovatus*, rychlá u *A. siro* a extrémně rychlá u *T. lini*. Pomocí zpracování dat Kruskal-Wallisovou statistikou (Tabulka 14) byl vyjádřen vliv přítomnosti 5 % (w/w) G^+ bakterie *M. lysodiecticus* v potravě. Roztoči byli zařazeni do 4 skupin vyplývajících z homogenity skupin v tabulce 14, kdy malý vliv bakteriálního obohacení byl určen pro *A. siro* a *A. gracilis*, středně velký vliv pro *G. domesticus*, *A. ovatus*, *T. putrescentiae* a *T. brevicrinathus*, velký vliv pro *D. farinae*, *C. redickorzevi* a *T. lini*, a konečně velmi velký vliv pro *L. destructor*. Druhy pod směrnici v grafech 14 a 15 vykazují menší růst na bakteriální dietě oproti dietě kontrolní, naproti tomu druhy nad směrnici vykazují vyšší růst na bakteriální dietě.

Druh	(poř.) poč. j. ± SE		(poř.) poč. j. ± SE		Statistika
	Kontrolní dieta		Bakteriální dieta		
<i>Tyroborus lini</i>	(2)	597 ± 75	(1)	1324 ± 42	T(1,8) = 8,49 p = 0,001 ***
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	(9)	69 ± 7	(9)	188 ± 14	T(1,10) = 7,69 p = 0,001 ***
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	(3)	461 ± 56	(3)	469 ± 45	T(1,10) = 0,11 p = 0,912 ns
<i>Tyrophagus brevicrinathus</i>	(4)	432 ± 70	(4)	400 ± 105	T(1,10) = 0,26 p = 0,802 ns
<i>Acarus gracilis</i>	(5)	358 ± 76	(8)	220 ± 16	T(1,9) = 1,96 p = 0,082 ns
<i>Glycyphagus domesticus</i>	(8)	168 ± 22	(7)	279 ± 40	T(1,15) = 2,52 p = 0,024 *
<i>Acarus siro</i>	(1)	920 ± 164	(2)	732 ± 140	T(1,10) = 0,88 p = 0,401 ns
<i>Caloglyphus redickorzevi</i>	(7)	194 ± 13	(5)	383 ± 28	T(1,10) = 6,18 p = 0,001 ***
<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	(6)	283 ± 21	(6)	372 ± 34	T(1,10) = 2,27 p = 0,047 *
<i>Dermatophagoides farinae</i>	(10)	47 ± 3	(10)	91 ± 9	T(1,9) = 4,25 p = 0,002 **

Tabulka 10: Populační růst na kontrolní a bakteriální dietě.

Podtržené číslo v závorce před absolutní hodnotou nárůstu značí pořadí v populačním nárůstu na dané dietě, v pořadí od nejvyšší hodnoty, ± SE je střední chyba. ns – nesignifikantní rozdíl; * stupně signifikance statistického testu (T-test)

Druh	PPR (bakt./kontr).
<i>Tyroborus lini</i>	2,22
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	2,72
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	1,02
<i>Tyrophagus brevicrinathus</i>	0,93
<i>Acarus gracilis</i>	0,61
<i>Glycyphagus domesticus</i>	1,66
<i>Acarus siro</i>	0,80
<i>Caloglyphus redickorzevi</i>	1,97
<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	1,31
<i>Dermatophagoides farinae</i>	1,94

Tabulka 11: Podíl rychlosti růstu (PPR) na bakteriální dietě ku kontrolní (chovné) dietě.

Koeficienty PPR v podstatě vyjadřují míru úspěšnosti populačního růstu na bakteriální dietě vzhledem k dietě kontrolní. Čím vyšší a vzdálenější od 1 je hodnota koeficientu PPR, tím větší přínos má bakteriální obohacení potravy pro populační růst roztočů.

Druh	Počet j.	Homogenní skupiny	λ_{Kon}
<i>Acarus siro</i> ³	920	A	46,00
<i>Tyroborus lini</i> ³	597	A B	29,85
<i>Tyrophagus putrescentiae</i> ²	461	• B C	23,05
<i>Tyrophagus brevicrinathus</i> ²	432	• B C D	21,60
<i>Acarus gracilis</i> ²	358	• B C D E	17,90
<i>Aleuroglyphus ovatus</i> ²	283	• B C D E	14,15
<i>Caloglyphus redickorzevi</i> ¹	194	• • C D E	9,70
<i>Glycyphagus domesticus</i> ¹	168	• • • D E	8,40
<i>Lepidoglyphus destructor</i> ¹	69	• • • • E	3,45
<i>Dermatophagoides farinae</i> ¹	47	• • • • E	2,35

Tabulka 12: Porovnání populačního růstu na kontrolní dietě u jednotlivých druhů roztočů, kontrasty vyhodnoceny pomocí Tukey HSD intervalů. ($\alpha = 0,05$)

Je zde 5 skupin (A, B, C, D, E) u kterých výsledky nejsou vzájemně signifikantně odlišné. Roztoči jsou vymezeni do 4 skupin (4. zde chybí):

¹Pomalá reprodukce; $\lambda = (0, 10)$

³Rychlá reprodukce ; $\lambda = (25, 50)$

²Středně rychlá reprodukce; $\lambda = (10, 25)$

⁴Extrémně rychlá reprodukce; $\lambda = (50, \infty)$

Druh	Počet j.	Homogenní skupiny	λ_{Bak}
<i>Tyroborus lini</i> ⁸	1324	A	66,20
<i>Acarus siro</i> ⁷	732	• B	36,60
<i>Tyrophagus putrescentiae</i> ⁶	469	• B C	23,45
<i>Tyrophagus brevicrinathus</i> ⁶	400	• • C	20,00
<i>Caloglyphus redickorzevi</i> ⁶	383	• • C	19,15
<i>Aleuroglyphus ovatus</i> ⁶	372	• • C D	18,60
<i>Glycyphagus domesticus</i> ⁶	279	• • C D	13,95
<i>Acarus gracilis</i> ⁶	220	• • C D	11,00
<i>Lepidoglyphus destructor</i> ⁵	188	• • C D	9,40
<i>Dermatophagoides farinae</i> ⁵	91	• • • D	4,55

Tabulka 13: Porovnání populačního růstu na bakteriální dietě u jednotlivých druhů roztočů, kontrasty vyhodnoceny pomocí Tukey HSD intervalů. ($\alpha = 0,05$)

Jsou zde 4 skupiny (A, B, C, D) u kterých výsledky nejsou vzájemně signifikantně odlišné. Roztoči jsou vymezeni do 4 skupin:

⁵Pomalá reprodukce; $\lambda = (0, 10)$

⁷Rychlá reprodukce; $\lambda = (25, 50)$

⁶Středně rychlá reprodukce; $\lambda = (10, 25)$

⁸Extrémně rychlá reprodukce; $\lambda = (50, \infty)$

Druh	Průměr	Homogenní skupiny
<i>Lepidoglyphus destructor</i> ⁴	55,67	A
<i>Tyroborus lini</i> ³	48,60	A B
<i>Caloglyphus redickorzevi</i> ³	43,00	A B C
<i>Dermatophagoides farinae</i> ³	42,50	A B C
<i>Glycyphagus domesticus</i> ²	35,38	A B C D
<i>Aleuroglyphus ovatus</i> ²	28,17	A B C D
<i>Tyrophagus putrescentiae</i> ²	19,83	• B C D
<i>Tyrophagus brevicrinathus</i> ²	16,33	• B C D
<i>Acarus siro</i> ¹	13,17	• • C D
<i>Acarus gracilis</i> ¹	8,83	• • • D

Tabulka 14: Vyjádření vlivu bakteriální diety Kruskal-Wallisovou statistikou na jednotlivé druhy, ($\alpha = 0,05$).

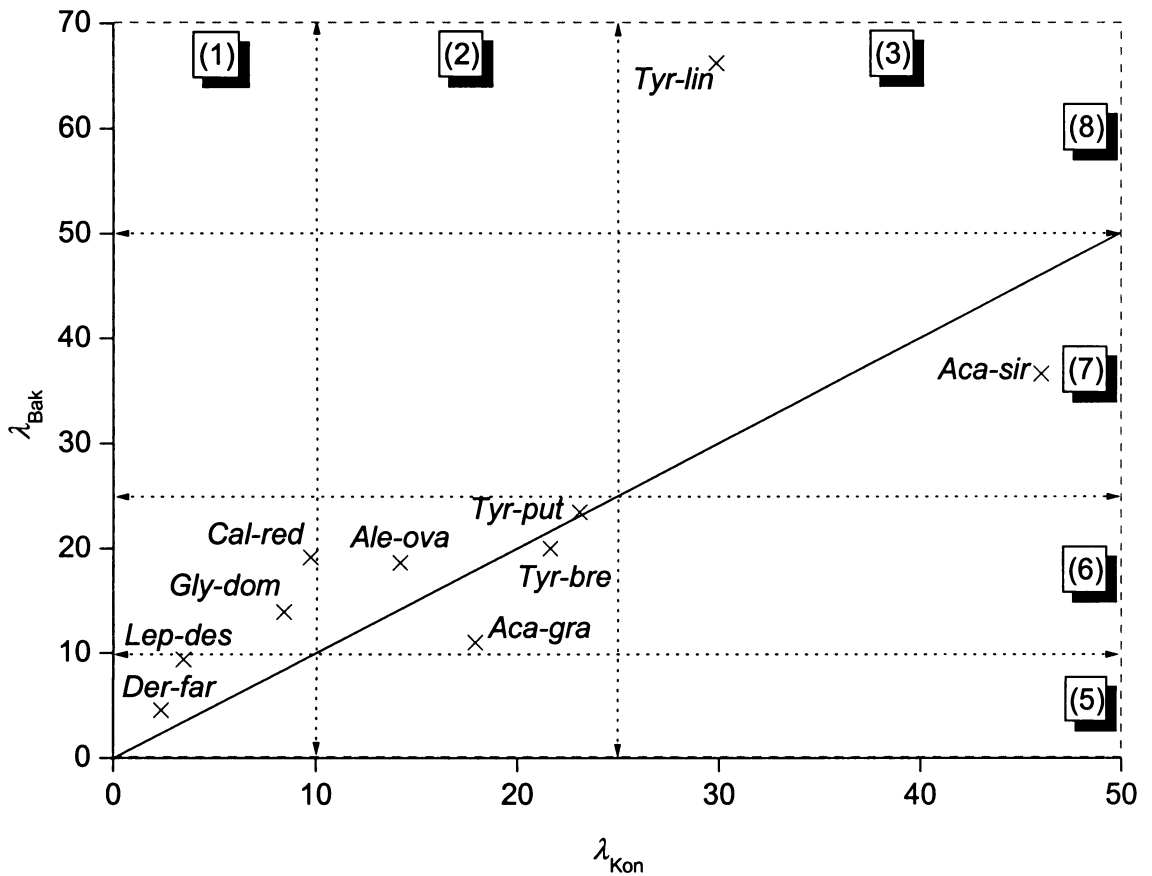
Jsou zde 4 skupiny (A, B, C, D) u kterých výsledky nejsou vzájemně signifikantně odlišné. Roztoči jsou vymezeni do 4 skupin:

¹Malý vliv bakteriálního obohacení

²Středně velký vliv bakteriálního obohacení

³Velký vliv bakteriálního obohacení

⁴Velmi velký vliv bakteriálního obohacení



Graf 14: Porovnání rychlosti růstu roztočů na kontrolní a bakteriální dietě pomocí konstanty λ

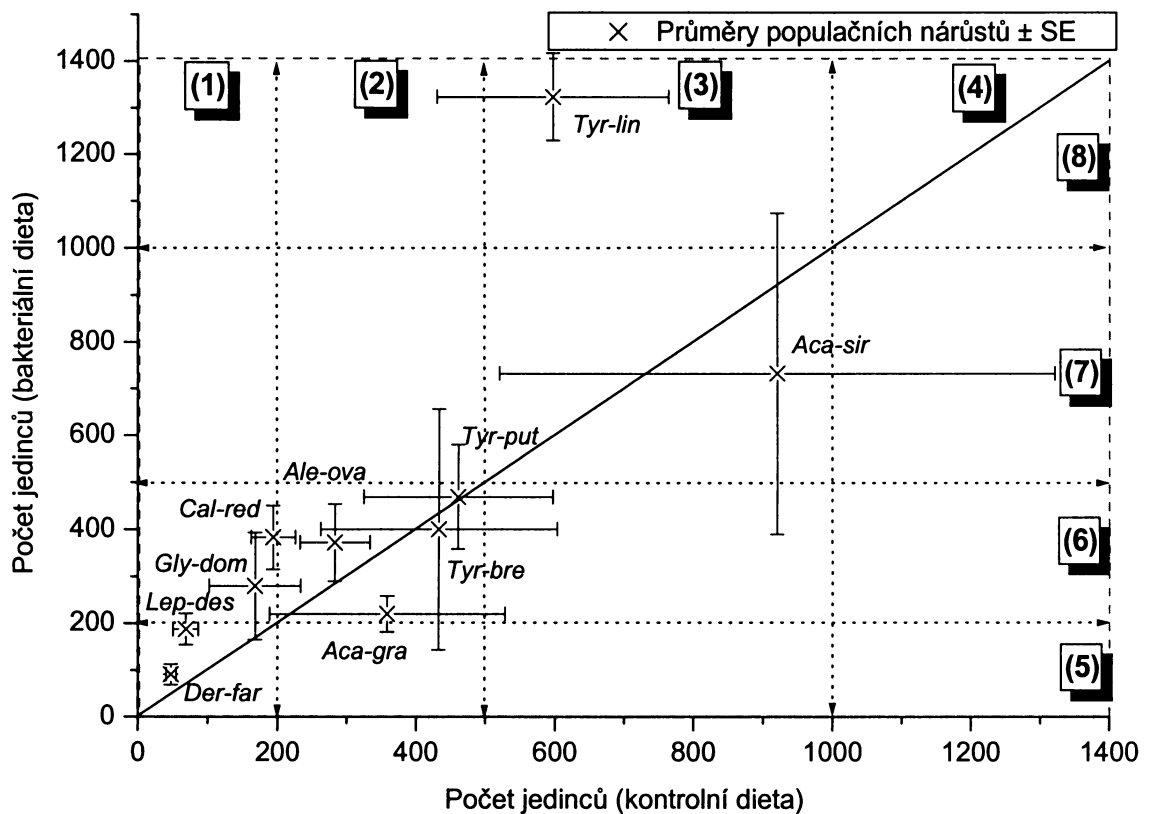
Druhy pod směrnicí vykazují nižší růst na bakteriální dietě oproti dietě kontrolní. Naproti tomu druhy nad směrnicí vykazují pozitivní růst na bakteriální dietě.

Vymezení roztočů do skupin na kontrolní dietě (zde 4. skupina chybí):

- (1) Pomalá reprodukce; $\lambda = (0, 10)$
- (2) Středně rychlá reprodukce; $\lambda = (10, 25)$
- (3) Rychlá reprodukce; $\lambda = (25, 50)$
- (4) Extrémně rychlá reprodukce; $\lambda = (50, \infty)$

Vymezení roztočů do skupin na bakteriální dietě:

- (5) Pomalá reprodukce; $\lambda = (0, 10)$
- (6) Středně rychlá reprodukce; $\lambda = (10, 25)$
- (7) Rychlá reprodukce; $\lambda = (25, 50)$
- (8) Extrémně rychlá reprodukce; $\lambda = (50, \infty)$



Graf 15: Porovnání velikosti konečné populace roztočů na kontrolní a bakteriální dietě. Druhy pod směrnici vykazují nižší růst na bakteriální dietě oproti dietě kontrolní. Naproti tomu druhy nad směrnici vykazují vyšší růst na bakteriální dietě.

Vymezení roztočů do skupin na kontrolní dietě:

- (1) Pomalá reprodukce; $\lambda = (0, 10)$
- (2) Středně rychlá reprodukce; $\lambda = (10, 25)$
- (3) Rychlá reprodukce; $\lambda = (25, 50)$
- (4) Extrémně rychlá reprodukce $\lambda = (50, \infty)$

Vymezení roztočů do skupin na bakteriální dietě:

- (5) Pomalá reprodukce; $\lambda = (0, 10)$
- (6) Středně rychlá reprodukce; $\lambda = (10, 25)$
- (7) Rychlá reprodukce; $\lambda = (25, 50)$
- (8) Extrémně rychlá reprodukce; $\lambda = (50, \infty)$

4.3. pH v částech střeva

Získaná data byla mezi sebou porovnána a vylučovací metodou bylo stanoveno pH pro jednotlivé části střeva (Tabulka 15). Jedná se o rozsahy pH, neboť pomocí acidobazických indikátorů nelze pH stanovit nikdy přesně, záleží totiž i na iontové síle roztoku a také koncentraci indikátoru. Z výsledků je evidentní, že se pH v jednotlivých částech střeva liší a to od nejkyselějších částí ventriculu a caeca s pH 4 až 5, přes colon s pH, které odpovídá 5, až po postcolon, kde je zjištěné pH nejméně kyselé tedy 5 až 6. Ve výsledcích je evidentní mezidruhová shoda.

pH v jednotlivých částech střeva				
	ventriculus	caeca	colon	postcolon
<i>Tyroborus lini</i>	4 – 5	4 – 5	~ 5	5 – 6
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	4 – 5	4 – 5	~ 5	5 – 6
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	4 – 5	4 – 5	~ 5	5 – 6
<i>Tyrophagus brevicrinathus</i>	4 – 5	4 – 5	~ 5	5 – 6
<i>Acarus gracilis</i>	4 – 5	4 – 5	~ 5	5 – 6
<i>Glycyphagus domesticus</i>	4 – 5	4 – 5	~ 5	5 – 6
<i>Acarus siro</i>	4 – 5	4 – 5	~ 5	5 – 6
<i>Caloglyphus redickorzevi</i>	4 – 5	4 – 5	~ 5	5 – 6
<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	4 – 5	4 – 5	~ 5	5 – 6
<i>Dermatophagoides farinae</i>	4 – 5	4 – 5	~ 5	5 – 6
Průměrná hodnota	4 – 5	4 – 5	~ 5	5 – 6

Tabulka 15: pH v jednotlivých částech střeva modelových druhů roztočů.

5. Diskuse

Lysozym byl v minulosti dosti studován, ale především u obratlovců. Navíc je znám mechanismus jeho účinku, a u některých organismů známe kromě jeho primární struktury dokonce i strukturu terciární. Jeho funkce byla zpočátku spojována pouze s antibakteriálními účinky, později také s trávicí funkcí. Ta se podařila prokázat u řady obratlovců, ale i u hmyzu. Trávicí funkce u roztočů nebyla dosud studována. Předmětem této práce bylo studium lysozymu a jeho funkce u synantropních roztočů podřádu Acaridida. Charakteristika lysozymu je u těchto roztočů velmi nedostatečná, neboť bylo na toto téma zpracováno pouze několik prací. Enzymové aktivity lysozymu byly dosud determinovány u *D. farinae*, *D. pteronyssinus* a *L. destructor*, u nichž byla prokázána přítomnost lysozymu ve více isoformách jak v exkrementech, tak v tělech (Stewart *et al.* 1998, Mathaba *et al.* 2002). Myšlenku, že by lysozym mohl u těchto roztočů fungovat jako trávicí enzym předložila pouze Mathaba *et al.* (2002). S podobnou myšlenkou se setkáváme i v pracích Hogg & Lehane (1999, 2001) a Hamilton *et al.* (2003), které se týkají roztoče *P. ovis*, jenž je úzce příbuzný rodu *Dermatophagoides*.

Ve snaze dokázat trávicí funkci lysozymu bylo pro tuto práci vybráno 10 modelových druhů Acaridida, na nichž byla provedena *in vitro* a *in vivo* analýza. *In vitro* analýza spočívala v důkazu přítomnosti lysozymu, enzymatickém stanovení aktivity lysozymu v WME a SGME a *in vivo* analýza spočívala ve sledování populačního růstu roztočů na 2 dietách, chovné a experimentální (bakteriální). Do *in vivo* analýzy spadá také určení pH v částech střeva.

In vitro analýza jednoznačně prokázala bakteriolytickou aktivitu a tedy i přítomnost lysozymu u všech testovaných druhů v WME i SGME. Bylo stanoveno pH optimum v obou typech homogenátů. V WME bylo zjištěno pH optimum u *G. domesticus*, *C. redickorzevi*, *A. ovatus*, *D. farinae*, *T. putrescentiae*, *T. brevercrinatus* a *A. gracilis* 4,5, u *A. siro* a *L. destructor* 4,0 a u *T. lini* 5,0. Naproti tomu v SGME bylo zjištěné pH optimum shodné pro všechny druhy, a to 4,5. Jediné dosud známé pH, při kterém byla měřena aktivita lysozymu, bylo 6,2 a v tomto pH byly měřeny veškeré dosud zjištěné lysozymové aktivity (Childs & Bowman 1981, Stewart *et al.* 1998, Mathaba *et al.* 2002). Jak je vidět, pH optima stanovené v této práci se značně liší od zmiňovaného pH 6,2 a pravděpodobně nebylo nikdy měřeno experimentálně. Zmíněná hodnota pH totiž odpovídá pH optimu lysozymu z vaječného bílku (HEWL) (varianty produktu jsou dostupné např. u firmy Sigma-Aldrich®), který se používá především v molekulárně-biologických technikách k hydrolýze bakteriálních buněčných stěn při přípravě

protoplastu či sféroplastu (Kusaka 1967, Kuroda *et al.* 1998). Jeho využití je však také při hydrolýze mucopolysacharidů, mucopolypeptidů nebo chitinu. Při pohledu na grafy determinace orientačního pH optima (Kap. 4.1.1.) je čitelné, že lysozymová aktivita při pH 6,2 je již velice nízká, a proto je nevhodné při této hodnotě stanovovat aktivitu enzymu. Zřejmě proto byla Stewartem (1998) zjištěná aktivita dvojnásobná u *L. destructor*, než u *D. farinae*, zatímco v této práci byla aktivita při pH optima v SGME pro tyto druhy téměř shodná a v WME byl poměr opačný. Pro shodné pH, tedy 4,5, je ve WME aktivita u *D. farinae* téměř čtyřnásobná než u *L. destructor*. Zmínění autoři museli z důvodu nízké aktivity lysozymu při pH 6,2 uměle zvyšovat bakteriolytickou aktivitu. Stewart *et al.* (1998) optimalizoval bakteriolytickou aktivitu pomocí přídavku DTT (dithiothreitol), Mathaba *et al.* (2002) třemi různými způsoby, tedy přídavkem DTT, EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) a DTT+EDTA. Navíc se snažili zvýšit lysozymovou aktivitu ještě přídavkem bílkoviny (albumin), a tím inhibovat proteolytickou aktivitu proteas na lysozymu. Vzhledem k charakteristickému zvonovitému tvaru křivky (Banerjee *et al.* 1975, Pahud & Widmer 1982, Lemos *et al.* 1993, Kopáček *et al.* 1999, Fujita *et al.* 2001) u grafů v kap. 4.1.1, která nemá žádné zřetelné výkyvy (zuby) lze konstatovat, že lysozym není rozkládán tělu vlastními proteasami, a pokud ano, tak ve velmi malé míře, která má na stanovení jen velmi nepatrný vliv. Stabilita lysozymu vůči vlastním proteasám je jednou z klíčových informací, která podporuje jeho trávicí funkci a je ve shodě s jinými trávicími lysozimy (Dobson *et al.* 1984, Lemos *et al.* 1993, Ruiz *et al.* 1994, Dominguez-Bello *et al.* 2004).

Samotná přítomnost lysozymu v SGME je základní podmínkou trávicí funkce lysozymu, neboť z tohoto faktu lze odvodit, že je vylučován do trávicího traktu roztočů. V každém případě je lysozym součástí defenzivního mechanismu u roztočů, neboť se vyskytuje ve střevě a dokáže zde atakovat některé G⁺ bakterie hydrolýzou jejich buněčné stěny. Na otázku, zda plní trávicí funkci by měly pomoci odpovědět výsledky *in vivo* analýzy a srovnání pH ve střevě s pH optimem lysozymu.

Podářilo se určit pH v částech trávicího traktu (Tabulka 15) kombinací řady acidobazických indikátorů. Tyto hodnoty jsou zhruba o jednotku pH nižší než hodnoty uvedené v přehledu tabulky 2. Zjištěné pH ve ventriculu a caecu je 4 až 5, v colonu kolem 5 a v postcolonu 5 až 6. Vzhledem k tomu, že pH optimum lysozymu v SGME zjištěné v této práci je pro všechny druhy 4,5, tak to velmi dobře koresponduje s pH zjištěným v některých částech trávicího traktu roztočů. Nejvíce této hodnotě odpovídá pH ve ventriculu a caecu, kde je pH kolem 5 u všech druhů. V dalších částech colonu a postcolonu se spíše blíží neutrální oblasti a pohybuje se kolem pH 5 až 6. Pokud tedy někde působí lysozym jako trávicí enzym,

tak především ve ventriculu a caecu. Toto souhlasí též s poznatkem, že ve ventriculu a caecu probíhá největší část trávení (Smrž & Čatská 1989). Lysozymová aktivita a biochemická charakteristika lysozymu u těchto modelových druhů roztočů vykazuje navíc řadu podobností s trávicími lysozimy u jiných organismů, především býložravců a *M. domestica*. Ty jsou si navzájem podobny maximální aktivitou v kyselé oblasti, kolem pH 5,0 a rezistencí vůči vlastním proteasám. Taková podobnost byla nalezena i u testovaných druhů roztočů.

Na základě zjištěných enzymových aktivit lysozymu v pH optimu pro WME a SGME byli roztoči rozděleni pomocí statistické analýzy do jednotlivých skupin s vysokou, střední a nízkou aktivitou. Zajímavým zjištěním je, že u všech druhů, kromě *D. farinae*, je určená kategorie enzymové aktivity odlišná v WME od SGME. Nejmarkantnější rozdíly jsou u *T. lini*, *A. gracilis* a také u *C. redickorzevi*, kteří mají výrazně vyšší tendenci mít lysozym v WME, a u *L. destructor*, který má naopak podstatně vyšší tendenci mít lysozym v exkrementech (Graf 13). Takovéto rozdíly upozorňují na to, že může existovat mechanismus hospodaření s lysozymem v trávicím traktu. Druhy, které mají tendenci mít lysozym v těle na úkor exkrementů jej pravděpodobně nějakým mechanismem a z nějakého důvodu zadržují v těle. Naopak druhy, které mají tendenci mít lysozym v exkrementech, jej buď těžko mohou zadržovat nebo ho vylučují do trávicího traktu z nějakého důvodu velké množství a pokud existuje reverzní mechanismus, tak nestačí lysozym vracet zpět. Existuje analogie pro reverzi trávicích enzymů, která je popsána pro α -amylasy a serinové proteasy u hmyzu (Terra *et al.* 1996). Myšlenka přítomnosti reverzního mechanismu u roztočů je dosti pravděpodobná, neboť roztoči mají peritrofickou membránu stejně jako hmyz (Alberti *et al.* 2003). Každý organismus musí vynaložit značné množství energie, aby enzymy (a jakékoliv proteiny) vyrobil. Proto by bylo neekonomické jimi plýtvat a vylučovat zbytečně všechny spolu s exkrementy mimo tělo. Acaridida jsou navíc organismy s dosti úsporným metabolismem, dokáží žít na minimálních potravních zdrojích a v případě potřeby řada z nich dokáže vytvořit také klidové stadium hypopa. Když se dokázal vyvinout tak složitý životně obranný mechanismus jako je tvorba hypopa, proč by nemohl existovat mechanismus pro reverzi enzymů zpět na místo potřeby.

Pomocí *in vivo* testů byla určena rychlost reprodukce na chovné a bakteriální dietě obohacené *M. lysodieticus* (Graf 14 a 15). Pořadí populačního růstu na chovné dietě je uvedeno v tabulce 12 a na bakteriální dietě v tabulce 13. Nejvyšší reprodukční schopnost na chovné dietě vykazoval *A. siro* následovaný *T. lini*, nejnižší pak *D. farinae* následovaný *L. destructor*. Na bakteriální dietě se absolutně nejlépe množil *T. lini*, který dokázal svou populaci zmožít za 21 dní více než 66 krát ($\lambda_{\text{Bak}} = 66,2$) a jeho schopnost růstu na potravě

obohacené *M. lysodieticus* byla označena jako extrémní. Z prvního místa byl odsunut na druhé *A. siro*, poslední 2 místa obsadili opět *D. farinae* a *L. destructor*, a to ve stejném pořadí. Důležité závěry vyplývají z podílů rychlosti růstu (viz tabulka 11 a 16), výsledků Kruskal-Wallisovy statistické analýzy vlivu bakteriální složky na růst (Tabulka 14) a statistiky v tabulce 10, kde jsou vyjádřeny stupně signifikance. Přestože *T. lini* vykazoval extrémní rychlost reprodukce na bakteriální dietě, měl o něco nižší podíl rychlosti růstu (PRR 2,22), než *L. destructor* (PRR 2,72). Významné kladné hodnoty podílu rychlosti růstu vykazují také *C. redickorzevi* (PRR 1,97), *D. farinae* (PRR 1,94). Podíl rychlosti růstu odpovídá vlastně vlivu bakteriální složky na růst roztočů, statisticky je toto zpracováno Kruskal-Wallisovou statistikou v tabulce 14. Vliv této složky potravy na *L. destructor* byl určen jako velmi velký, na *T. lini*, *C. redickorzevi* a *D. farinae* jako veliký. Tyto druhy mohou tedy evidentně využívat G^+ bakterie jako potravní zdroj. Naproti tomu druhy *A. gracilis* (PRR 0,61) a *A. siro* (PRR 0,80) můžeme díky podílu rychlosti růstu nižšímu než 1 považovat za druhy, pro které by neměla bakteriální potrava představovat vhodný potravní zdroj. Vzhledem k tomu, že *in vivo* testy byly prováděny pouze s jedním druhem bakterie, není vyloučeno, že by některé jiné bakterie nemohly představovat pro tyto roztoče vhodný potravní zdroj, již Sinha a Harasymek (1974) prokázali odlišnou míru tolerance skladištních roztočů na samotnou bakteriální potravu. Nelze totiž vyloučit přítomnost toxinů, které by měly na tyto druhy významný negativní vliv, tedy že by výhoda trávení lysozymem byla převážena přítomností toxických látek. Pozoruhodné podobnosti byly zjištěny u testovaných zástupců rodu *Tyrophagus*. U *T. putrescentiae* (PRR 1,02) i *T. brevicrinathus* (PRR 0,93) byl podíl rychlosti růstu velmi podobný, tedy velmi blízko 1. Takováto shoda vypovídá o podobném chování zmíněných zástupců jednoho rodu na 2 různých dietách a koresponduje s tím, že jsou si navzájem nejpříbuznější. Tento fakt podporují také téměř stejné zjištěné hodnoty konstanty λ pro kontrolní i bakteriální dietu u *T. putrescentiae* ($\lambda_{\text{Bak}} = 23,45$; $\lambda_{\text{Kon}} = 23,05$) i *T. brevicrinathus* ($\lambda_{\text{Bak}} = 20,00$; $\lambda_{\text{Kon}} = 21,60$) (Tabulka 12 a 13). Trochu jiná situace je u zástupců rodu *Acarus*. Zatímco podíl rychlosti růstu byl pro oba druhy velmi podobný, tak v populačních nárůstech se odlišovaly. *A. siro* ($\lambda_{\text{Bak}} = 36,60$; $\lambda_{\text{Kon}} = 46,00$) měl populační nárůsty na obou dietách mnohem vyšší než *A. gracilis* ($\lambda_{\text{Bak}} = 11,00$; $\lambda_{\text{Kon}} = 17,90$), což odpovídá rychlejší reprodukční schopnosti *A. siro*.

Z tabulky 16, kde jsou porovnány výsledky *in vitro* a *in vivo* testů, a která je zároveň komplexním shrnutím výsledků, vyplývá, že některé druhy mají potenciálně schopnost využívat bakterie jako potravní zdroj. Nejdůležitějšími parametry, kromě samotné přítomnosti lysozymu v exkrementech, jsou: vyšší reprodukce na bakteriální dietě než na dietě kontrolní,

vysoký vliv bakteriální složky na růst, a také podíl rychlosti růstu (PPR) alespoň vyšší než 1. Pokud jde o přítomnost lysozymu v těle a exkrementech jsou zajímavé dvě opozitní hlediska. První je výrazná tendence mít lysozym v těle a druhou je zase výrazná tendence mít lysozym v exkrementech. Druhy, které mají relativně vysoký obsah lysozymu v těle a nízký v exkrementech mají buď propracovaný reverzní mechanismus lysozymu v podobě již zmíněné peritrofické membrány nebo sekretují malé množství lysozymu do trávicího traktu. Naproti tomu druhy s relativně nízkým obsahem lysozymu v exkrementech buď reverzní mechanismus lysozymu nemají nebo vylučují lysozym do trávicího traktu v malém množství.

Druh	pHo WME/ SGME	Míra aktivity v WME	Míra aktivity v SGME	Míra aktivity v WME/SGME	Reprodukce na kontrolní dietě	Reprodukce na bakteriální dietě	Vliv bakteriální složky na růst	Podíl rychlosti růstu (bakt./ kontrol.) PRR
<i>T. lini</i>	5,0 / 4,5	vyšoká	nížká	převážně tělo	rychlá	extrémní	velký	2,22
<i>L. destructor</i>	4,0 / 4,5	nížká	vyšoká	převážně exkrementy	pomalá	pomalá	velmi velký	2,72
<i>T. putrescentiae</i>	4,5 / 4,5	střední	nížká	spíše tělo	střední	střední	střední	1,02
<i>T. brevicrinathus</i>	4,5 / 4,5	vyšoká	střední	spíše tělo	střední	střední	střední	0,93
<i>A. gracilis</i>	4,5 / 4,5	vyšoká	nížká	převážně tělo	střední	střední	malý	0,61
<i>G. domesticus</i>	4,5 / 4,5	vyšoká	střední	spíše tělo	pomalá	střední	střední	1,66
<i>A. siro</i>	4,0 / 4,5	nížká	střední	spíše exkrementy	rychlá	rychlá	malý	0,80
<i>C. redickorzevi</i>	4,5 / 4,5	vyšoká	střední	spíše tělo	pomalá	střední	velký	1,97
<i>A. ovatus</i>	4,5 / 4,5	střední	nížká	spíše tělo	střední	střední	střední	1,31
<i>D. farinae</i>	4,5 / 4,5	vyšoká	vyšoká	shodně	pomalá	rychlá	velký	1,94

Tabulka 16: Porovnání *in vivo* a *in vitro* výsledků.

6. Závěr

V této práci se podařilo pro 10 zástupců podřádu Acaridida potvrdit přítomnost lysozymu v tělech a exkrementech, stanovit pH optima a určit aktivity lysozymu v tělech a exkrementech, a také určit pH v jednotlivých částech trávicího traktu. Už samotná přítomnost lysozymu v exkrementech je velmi závažným faktem a to hned z několika důvodů. Přítomnost lysozymu v exkrementech indikuje, že je tento enzym přítomný i v trávicím traktu roztočů. Sekrece lysozymu probíhá pravděpodobně ve ventriculu. Důvodem této sekrece je buď nespecifická imunita zaměřená proti G^+ bakteriím nebo trávicí funkce tohoto enzymu, anebo pravděpodobně obojí. Vzhledem k tomu, že trávicí funkce lysozymu byla v živočišné říši prokázána v mnoha případech, je pravděpodobné, že lysozym bude hrát roli v trávicí funkci i u roztočů podřádu Acaridida. Navíc byly nalezeny podobné vlastnosti lysozymu jako u ostatních živočichů, kteří jej jako trávicího enzymu využívají. Jedná se o pH optimum v kyselé oblasti, rezistenci vůči vlastním proteasám a shodu pH optima s pH v některých částech trávicího traktu. K prokázání myšlenky, že lysozym funguje u Acaridida jako trávicí enzym, byly provedeny testy *in vivo* spočívající ve sledování populačního růstu na bakteriální a chovné dietě, pomocí kterých se podařilo prokázat u některých druhů výrazný vliv potravy obohacené G^+ bakteriemi na populační růst. Pro druhy *T. lini*, *L. destructor*, *C. redickorzevi* a *D. farinae* lze konstatovat, že jsou schopny využívat bakterie jako potravní zdroj, nasvědčují tomu výsledky *in vivo* i *in vitro* analýzy. Další dva druhy *G. domesticus* a *A. ovatus* mají jistý potenciál žít se bakteriemi. Druhy *T. putrescentiae* a *T. brevicrinathus* *A. siro* a *A. gracilis* nemají z bakterií zřejmě žádný velký užitek. Nicméně potenciál mít G^+ bakterie jako potravní zdroj nebo nutriční doplněk mají zřejmě všechny druhy studovaných roztočů, pro což mluví přítomnost lysozymu se stejnými biochemickými charakteristikami v trávicím traktu. Tato přítomnost enzymu v exkrementech je důležitá také vzhledem k jeho potenciální alergicitě, neboť roztoči tyto enzymy šíří svými exkrementy do okolního prostředí. Vedle těchto závěrů byla zjištěna reprodukční rychlost daných druhů na chovné dietě, která je podobná potravě, konzumované v přirozeném prostředí. Tento výsledek ukázal, že mezi roztoči podřádu Acaridida existují v tomto směru velké mezidruhové rozdíly, stejně tak jako v aktivitách lysozymu v tělech a exkrementech a v růstu na potravě obohacené bakteriemi. Avšak u druhů téhož rodu se vyskytly v tomto směru podobnosti. Naproti tomu nebyly nalezeny rozdíly v pH optimu lysozymu v exkrementech pro všech deset druhů ani v celotělních homogenátech většiny druhů roztočů.

7. Použitá literatura

7.1. Citace

1. Akimov I. A. 1985. [The biological aspects of digestion of acaroid mites]. *Akad. nauk ukr. SSR, Kiev.* (in Russian)
2. Akimov, I. A., and V. V. Barabanova. 1976. [The digestive enzyme of acaroid mites]. *Dopov. Akad. nauk. ukr. SSR.* 6: 547-549. (in Ukrainian)
3. Akimov, I. A., and V. V. Barabanova. 1978. [The influence of the feeding to the activity of the digestive enzymes of acaroid mites]. *Ekologia* (Russian) 2: 27-31. (in Russian)
4. Alberti, G., and L. B. Coons. 1999. Acari: Mites. In *Chelicerate Arthropoda*. Willey - Liss, Inc. New York. pp. 515-876.
5. Alberti, G., A. Seniczak, and S. Seniczak. 2003. The digestive system and fat body of an early-derivate oribatid mite, *Archezogozetes longisetosus* Aoki (Acari: Oribatida, Trhypochthoniidae). *Acarologia* 83: 149-219.
6. Alvarez, M. J., R. Castillo, A. Rey, N. Ortega, C. Blanco, and T. Carrillo. 1999. Occupational asthma in a grain worker due to *Lepidoglyphus destructor*, assessed by bronchial provocation test and induced sputum. *Allergy* 54: 884-889.
7. Ambrožová J. 2004. Mikrobiologie v technologii vod. Elektronická verze 1.0 edition. VŠCHT Praha.
8. Anigstein, L., D. M. Whitney, and D. W. Micks. 1950. Antibacterial activity of a substance present in ticks (Ixodoidea) of Texas. *Nature* 166: 141-143.
9. Arlian, L. G. 2002. Arthropod allergens and human health. *Ann. Rev. Ent.* 47: 395-433.
10. Arlian, L. G., D. Bernstein, I. L. Bernstein, S. Friedman, A. Grant, P. Lieberman, M. Lopez, J. Metzger, T. Plattsmills, M. Schatz, S. Spector, S. I. Wasserman, and R. S. Zeiger. 1992. Prevalence of Dust Mites in the Homes of People with Asthma Living in 8 Different Geographic Areas of the United-States. *J. Allergy Clinic. Immunol.* 90: 292-300.
11. Arlian, L. G., D. L. Vyszenski-Moher, S. G. O. Johansson, and M. van Hage-Hamsten. 1997. Allergenic characterization of *Tyrophagus putrescentiae* using sera from occupationally exposed farmers. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 79: 525-529.

12. Banerjee, S. K., E. Holler, G. P. Hess, and J. A. Rupley. 1975. Reaction of N-acetylglucosamine oligosaccharides with lysozyme. Temperature, pH, and solvent deuterium isotope effects; equilibrium, steady state, and pre-steady state measurements. *J. Biol. Chem.* 250: 4355-4367.
- 13.* Berlese, A. 1897. Acari, Myriapoda et Scorpiones hucusque in Italia reperta. Ordo Cryptostigmata (Sarcoptidae). Portici.
14. Bowen R.A. Biomedical Hypertextbooks Internet: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/herbivores/index.html> . 2005. Ref Type: Electronic Citation.
15. Brett, G. A. 1969. Distribution of mites and moisture in long stored flour, as shown by a sampler of new design. *Proc. 2nd int. Congr. Acarol.* In: G. O. Evans (ed.) 235-240.
16. Breznak, J. A., W. J. Brill, J. W. Mertins, and H. C. Coppel. 1973. Nitrogen fixation in termites. *Nature* 244: 577-580.
17. Camara, V. M., and D. J. Prieur. 1980. Lysozyme activity in gastrointestinal and lymphoreticular tissues of rabbits genetically deficient in lysozyme. *Lab. Invest.* 43: 352-357.
18. Camara, V. M., and D. J. Prieur. 1984. Secretion of colonic isozyme of lysozyme in association with cecotrophy of rabbits. *Am. J. Physiol* 247: G19-G23.
19. Čárský, J. 1981. Příprava presných, tlmivých a izotonických roztokov. In Ferenčík M., and Škárka B. α kol. (eds.). *Biochemické a laboratórne metódy*. ALFA, Bratislava. pp. 39-86.
20. Childs, M., and C. E. Bowman. 1981. Lysozyme Activity in 6 Species of Economically Important Astigmatid Mites. *Comp. Biochem Physiol. B-Biochem. & Mol. Biol.* 70: 615-617.
21. Chmielewski, W. 1970. The passage of mites through the alimentary canal of vertebrates. *Ekol. Pol.* 18: 741-758.
22. Cho, J. H., J. B. Kim, C. S. Cho, S. Huh, and H. I. Ree. 1999. An infestation of the mite *Sancassania berlesei* (Acari: Acaridae) in the external auditory canal of a Korean man. *J. Parasitol.* 85: 133-134.
23. Daffre, S., P. Kylsten, C. Samakovlis, and D. Hultmark. 1994. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol. Gen. Genet.* 242: 152-162.
24. de Saint Georges-Grèdelet D. 1987. Vitamin requirements of the European house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae), in relation to its fungal association. *J. Med. Entomol.* 4: 408-411.
25. Dobson, D. E., E. M. Prager, and A. C. Wilson. 1984. Stomach lysozymes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 259: 11607-11616.

26. Dominguez-Bello, M. G., M. A. Pacheco, M. C. Ruiz, F. Michelangeli, M. Leippe, and M. A. de Pedro. 2004. Resistance of rumen bacteria murein to bovine gastric lysozyme. *BMC. Ecol.* 4: 7.
27. Espinoza-Fuentes, F. P., A. F. Ribeiro, and W. R. Terra. 1987. Microvillar and secreted digestive enzymes from *Musca domestica* larvae. Subcellular fractionation of midgut cells with electron microscopy monitoring. *Insect Biochem.* 17: 819-827.
28. Fujita, A. 2004. Lysozyme in insects: what role do they play in nitrogen metabolism? *Physiol. Entomol.* 29: 305-310.
29. Fujita, A., I. Shimizu, and I. Abe. 2001. Distribution of lysozyme and protease, and amino acid concentration in the guts of a woodfeeding termite, *Reticulitermes speratus* (Kolbe): possible digestion of symbiont bacteria transferred by trophallaxis. *Physiol. Entomol.* 26: 116-123.
- 30.* Grandjean, J. 1937. Sur quelques caractères des Acaridiae libres. *Bull. Soc. Zool. France* 62: 288-298.
- 31.* Grandjean, J. 1939. Quelques genres d' Acarines appartenant au groupe des Endeostigmata. *Ann. Sci. Nat. Zool* 2: 1-122.
32. Hakkaart, G. A., R. C. Aalberse, and R. R. Van. 1997. Lack of lysozyme activity of natural and yeast-derived recombinant Der p 2. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114: 202-204.
33. Hakkaart, G. A., M. M. Harmsen, K. Y. Chua, W. R. Thomas, R. C. Aalberse, and R. R. Van. 1998. Expression of the house dust mite allergen Der p 2 in the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Clin. Exp. Allergy* 28: 45-52.
34. Hamilton, K. A., A. J. Nisbet, M. J. Lehane, M. A. Taylor, and P. F. Billingsley. 2003. A physiological and biochemical model for digestion in the ectoparasitic mite, *Psoroptes ovis* (Acari : Psoroptidae). *Int. J. Parasitol.* 33: 773-785.
35. Hogg, J. C., and M. J. Lehane. 1999. Identification of bacterial species associated with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*) by using amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4227-4229.
36. Hogg, J. C., and M. J. Lehane. 2001. Microfloral diversity of cultured and wild strains of *Psoroptes ovis* infesting sheep. *Parasitology* 123: 441-446.
37. Hoogenraad, N. J., and F. J. Hird. 1970. The chemical composition of rumen bacteria and cell walls from rumen bacteria. *Br. J. Nutr.* 24: 119-127.
38. Hubert J., Stejskal V., and Lukáš J. 2002. Current importance of various groups of arthropods as sources of allergens in stored grain in Czech Republic. *Alergie* 1: 21-27.
39. Hubert, J., V. Jarošík, J. Mourek, A. Kubátová, and E. Žďárková. 2004. Astigmatid mite growth and fungi preference (Acari : Acaridida): Comparisons in laboratory experiments. *Pedobiologia* 48: 205-214.

40. Hubert, J., V. Stejskal, A. Kubátová, Z. Münzbergová, M. Váňová, and E. Ždárková. 2003. Mites as selective fungal carriers in stored grain habitats. *Exp. Appl. Acarol.* 29: 69-87.
41. Hughes A. M. 1976. The mites of stored food and houses. Technical bulletin edition. Her Majesty's Stationery Office, London.
42. Hughes, T. E. 1950. The physiology of the alimentary canal of *Tyrophagus farinae*. *Quart. J. Microscop. Sci.* 91: 54-60.
43. Ito, Y., M. Hirashima, H. Yamada, and T. Imoto. 1994. Colonic lysozymes of rabbit (Japanese white): recent divergence and functional conversion. *J. Biochem. (Tokyo)* 116: 1346-1353.
44. Ito, Y., M. Nakamura, T. Hotani, and T. Imoto. 1995. Insect lysozyme from house fly (*Musca domestica*) larvae: possible digestive function based on sequence and enzymatic properties. *J. Biochem. (Tokyo)* 118: 546-551.
- 45.* Jacot, A. P. 1933. Ordinal status of the Oribatoidea (Acarina). *Entomol. News* 44: 10-14.
46. Jarosz, J., and N. Spiewak. 1979. Comparative levels of lysozyme activity in larvae and pupae of *Galleria mellonella* after particulate and soluble materials injection. *Cytobios* 26: 203-219.
47. Jollès, J., F. Schoentgen, G. Croizier, L. Croizier, and P. Jollès. 1979. Insect lysozymes from three species of Lepidoptera: their structural relatedness to the C (chicken) type lysozyme. *J. Mol. Evol.* 14: 267-271.
48. Jollès, P., and J. Jollès. 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol. Cell Biochem.* 63: 165-189.
49. Kalina T., and J. Váňa. 2005. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum.
50. Kirby, A. J. 2001. The lysozyme mechanism sorted – after 50 years. *Nat. Struct. Biol.* 8: 737-739.
51. Kopáček, P., R. Vogt, L. Jindrák, C. Weise, and I. Šafařík. 1999. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 989-997.
- 52.* Krantz, G. W. 1960. The Acaridae: a recapitulation. *Pan Pacific Entomol.* 36: 157-166.
53. Kuroda, T., N. Okuda, N. Saitoh, T. Hiyama, Y. Terasaki, H. Anazawa, A. Hirata, T. Mogi, I. Kusaka, T. Tsuchiya, and I. Yabe. 1998. Patch clamp studies on ion pumps of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Formation, preparation, and utilization of giant vacuole-like structures consisting of everted cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* 273: 16897-16904.

54. Kusaka, I. 1967. Growth and division of protoplasts of *Bacillus megaterium* and inhibition of division by penicillin. *J. Bacteriol.* 94: 884-888.
55. Kylsten, P., D. A. Kimbrell, S. Daffre, C. Samakovlis, and D. Hultmark. 1992. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands. *Mol. Gen. Genet.* 232: 335-343.
56. Lee, A. J., J. Machell, A. H. M. Van den Broek, A. J. Nisbet, H. R. P. Miller, R. E. Isaac, and J. F. Huntley. 2002. Identification of an antigen from the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*, homologous with house dust mite group I allergens. *Paras. Immunol.* 24: 413-422.
57. Lemos, F. J., A. F. Ribeiro, and W. R. Terra. 1993. A bacteria-digesting midgut lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) larvae. Purification, properties and secretory mechanism. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 533-541.
58. Lemos, F. J., and W. R. Terra. 1991a. Properties and intracellular distribution of a cathepsin D-like proteinase active at the acidregion of *Musca domestica*. *Insect Biochem.* 21: 457-465.
59. Lemos, F. J., and W. R. Terra. 1991b. Digestion of bacteria and the role of midgut lysozyme in some insect larvae. *Comp Biochem. Physiol. B* 100: 265-268.
60. Luxton, M. 1972. Studies on the oribatid mites of Danish beech wood Soil. *Pedobiologia* 12: 434-463.
61. Marx, J. J., J. T. Twiggs, B. J. Ault, J. A. Merchant, and E. Fernandez-Caldas. 1993. Inhaled Aeroallergen and Storage Mite Reactivity in A Wisconsin Farmer Nested Case-Control Study. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147: 354-358.
62. Mathaba, L. T., C. H. Pope, J. Lenzo, M. Hartofillis, H. Peake, R. L. Moritz, R. J. Simpson, A. Bubert, P. J. Thompson, and G. A. Stewart. 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 Immunol. Med. Microbiol.* 33: 77-88.
63. Norton, R. A. 1998. Morphological evidence for the evolutionary origin of Astigmata (Acari : Acariformes). *Exp. Appl. Acarol.* 22: 559-594.
64. Ørskov, E. R., and N. A. MacLeod. 1982. The determination of the minimal nitrogen excretion in steers and dairy cows and its physiological and practical implications. *Br. J. Nutr.* 47: 625-626.
- 65.* Oudemans, A. C. 1923. Studie over de sedert 1877 ontworpen Systemen der Acari; Nieuwe classificatie; Phylogenetische Beschouwingwn. *Tijdschr. Entomol.* 46: 93-134.
- 66.* O'Connor B. M. 1984. Phylogenetic relationships among higher taxa in the Acariformes, with particular reference to the Astigmata., *Acarology VI*. Editors Griffiths D. A., Bowman C. E. Ellis Horwood Ltd., Chichester.

67. O'Connor, B. M. 1979. Evolutionary origins of astigmatid mites inhabiting stored products. *Rec. Adv. Acarol.* I: 273-278.
68. O'Connor, B. M. 1982. Evolutionary Ecology of Astigmatid Mites. *Annual Review of Entomology* 27: 385-409.
69. Pahud, J. J., and F. Widmer. 1982. Calf rennet lysozyme. *Biochem. J.* 201: 661-664.
70. Podboronov, V. M. 1982. [Biological activity of lysozymes of various origins]. *Antibiotiki.* 27: 770-774. (in Russian)
71. Podboronov, V. M. 1983. [Antibacterial effect of *Alveonassus lahorensis* tick lysozyme on pathogenic microorganisms in *in vitro* and *in vivo* tests]. *S. Biol. Nauk* 2: 40-47. (in Russian)
72. Podboronov, V. M., G. I. Stepanchenok-Rudnik, and I. M. Grokhovskaia. 1972. [The antibacterial action of the intestine and hemolymph of Ixodoidea ticks. I]. *Med. Parazitol. (Mosk)* 41: 468-471. (in Russian)
73. Regel, R., S. R. Matioli, and W. R. Terra. 1998. Molecular adaptation of *Drosophila melanogaster* lysozymes to a digestive function. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 309-319.
74. Rohde, Ch. J. Jr., and D. A. Oemick. 1967. Anathomy of the digestive and reproductive systems in an acarid mite (Sarcoptiformes). *Acarologia* IX: 608-616.
75. Rosický B., V. Černý, M. Daniel, F. Dusbábek, P. Palička, and K. Samsišník. 1979. Roztoči a klišťata škodící zdraví člověka., Cesta k věděni (ed.). Academia.
76. Ruiz, M. C., M. G. Dominguez-Bello, and F. Michelangeli. 1994. Gastric lysozyme as a digestive enzyme in the hoatzin (*Opisthocomus hoazin*), a ruminant-like folivorous bird. *Cell. Mol. Life Sc. (CMLS)* 50: 499-501.
77. Siepel, H., and E. M. de Ruiter-Dijkman. 1993. Feeding Guilds of Oribatid Mites Based on Their Carbohydrase Activities. *Soil Biol. & Biochem.* 25: 1491-1497.
78. Siepel, H., and F. Maaskamp. 1994. Mites of Different Feeding Guilds Affect Decomposition of Organic-Matter. *Soil Biol. & Biochem.* 26: 1389-1394.
79. Sinha, R. N., and L. Harasymek. 1974. Survival and reproduction of stored-product mites and beetles on fungal and bacterial diets. *Environ. Entomol.* 3: 243-246.
80. Sinha, R. N., J. E. van Bronswijk, and H. A. Wallace. 1970. House dust allergy, mites and their fungal associations. *Can. Med. Assoc. J.* 103: 300-301.
- 81.* Sitnikova L. G. 1987. Cryptostigmata (Oribatei) - the kernel of the class Acarina., B.R. Striganova edition. Moscow.

82. Smith, A. M., D. C. Benjamin, N. Hozic, U. Derewenda, W. A. Smith, W. R. Thomas, G. Gafvelin, M. van Hage-Hamsten, and M. D. Chapman. 2001. The molecular basis of antigenic cross-reactivity between the group 2 mite allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107: 977-984.
83. Smrž, J. 1998. Interactions between oribatids and micro-organisms: A complex method of study. *Appl. Soil Ecol.* 9: 109-110.
84. Smrž, J., and V. Čatská. 1987. Food Selection of the Field Population of *Tyrophagus Putrescentiae* (Schrank) (Acari, Acarida). *J. Appl. Entomol. - Z. Angew. Entomol.* 104: 329-335.
85. Smrž, J., and V. Čatská. 1989. The effect of the consumption of some soil fungi on the internal microanatomy of the mite *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acari, Acaridida). *Acta Univ. s Carol. - Biologica* 33: 81-93.
86. Smrž, J., J. Svobodová, and V. Čatská. 1991. Synergetic Participation of *Tyrophagus Putrescentiae* (Schrank) (Acari, Acaridida) and Its Associated Bacteria on the Destruction of Some Soil Micromycetes. *J. Appl. Entomol. - Z. Angew. Entomol.* 111: 206-210.
87. Smrž, J., and M. Trelová. 1995. The association of bacteria and some soil mites (Acari: Oribatida and Acaridida). *Acta Zool. Fenn.* 196: 120-123.
88. Šobotník, J., J. Hubert, G. Alberti, and F. Weyda. 2006. *Arthropod structure development* (submitted 8.2006) (in press).
89. Steen, A. 2005. Functional characterisation and cell wall interactions of peptidoglycan hydrolases of *Lactococcus lactis*. Molecular Genetics group of the Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute (Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Groningen, the Netherlands). Ph.D. thesis.
90. Stejskal, V., J. Hubert, Z. Kučerová, Z. Münzbergová, J. Lukáš, and E. Žďárková. 2003. The influence of the type of storage on pest infestation of stored grain in the Czech Republic. *Plant Soil Environ.* 49: 55-62.
91. Stewart, C. B., J. W. Schilling, and A. C. Wilson. 1987. Adaptive evolution in the stomach lysozymes of foregut fermenters. *Nature* 330: 401-404.
92. Stewart, G. A., C. H. Bird, and P. J. Thompson. 1992. Do the group II dust mite allergens correspond to lysozyme? *J. Allergy Clin. Immunol.* 90: 141-142.
93. Stewart, G. A., and W. F. Fisher. 1986. Cross-reactivity between the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* and the mange mites *Psoroptes cuniculi* and *P. ovis*. I. Demonstration of antibodies to the house dust mite allergen Dpt 12 in sera from *P. cuniculi*-infested rabbits. *J. Allergy Clin. Immunol.* 78: 293-299.
94. Stewart, G. A., F. R. Lake, and P. J. Thompson. 1991. Faecally derived hydrolytic enzymes from *Dermatophagoides pteronyssinus*: physicochemical characterisation of potential allergens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 95: 248-256.

95. Stewart, G. A., and P. J. Thompson. 1996. The biochemistry of common aeroallergens. *Clinnl Exp. Allergy* 26: 1020-1044.
96. Stewart, G. A., M. van Hage-Hamsten, K. Krska, P. J. Thompson, and S. Olsson. 1998. An enzymatic analysis of the storage mite *Lepidoglyphus destructor*. *Comp. Biochem Physiol. B-Biochem. & Mol. Biol.* 119: 341-347.
97. Terra, W. R. 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Ann. Rev. Entomol.* 35: 181-200.
98. Terra, W. R., C. Ferreira, and J. E. Baker. 1996. Compartmentalization of digestion. *in* M. J. Lehane, and P. F. Billingsley editors. *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall.
99. van Hage-Hamsten, M., S. G. O. Johansson, S. Höglund, P. Tüll, A. Wirén, and O. Zutterström. 1985. Storage mite allergy is common in a farming population. *Clin. Allergy* 15.
100. van Woerden, H. 2004. Dust mites living in human lungs--the cause of asthma? *Med. Hypotheses* 63: 193-197.
101. Voet D., and J. G. Voet. 1995. *Biochemie*. Victoria Publishing. Praha.
102. Walter D.E., Krantz G. & Lindquist E. Acari. Internet: <http://www.tolweb.org/acari> . 2006. Ref Type: Electronic Citation
103. Wharton, G. W., and A. R. Brody. 1972. The peritrophic membrane of the mite *Dermatophagoides farinae*: Acariformes. *J. Parasitol.* 58: 801-804.
- 104.* Wooley, T. A. 1961. A review of the phylogeny of mites. *Ann. Rev. Entomol.* 6: 263-284.
- 105.* Zachvatkin A. A. 1953. [Studies on the morphology and postembryonic development of tyroglyphids (Sarcoptiformes, Tyroglyphoidea)], A. A. Zachvatkin, Collected Scientific Works edition. Moscow State University Publishing House, Moscow . (in Russian)
106. Žďárková, E., P. H. Verner, and J. Novosad. 1983. Dispersion and distribution of mites and beetles in stored grain. *J. Stored Prod.* 19: 73-80.

* Sekundární citace. Nebyly čteny v originále.

8. Přílohy

8.1. Pufrovací rozsah Britton-Robinsonova pufru I

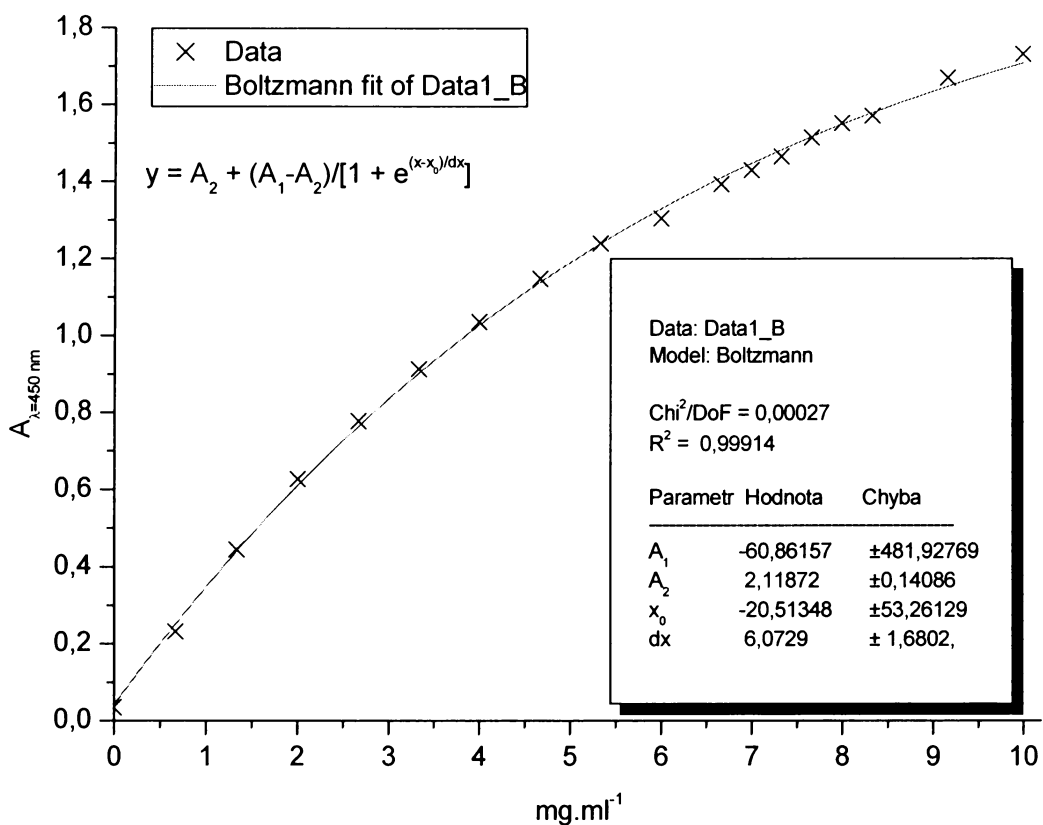
Tabuľka 2.9.1

Brittonov-Robinsonov univerzálny tlmiivý roztok I
(18 °C)¹

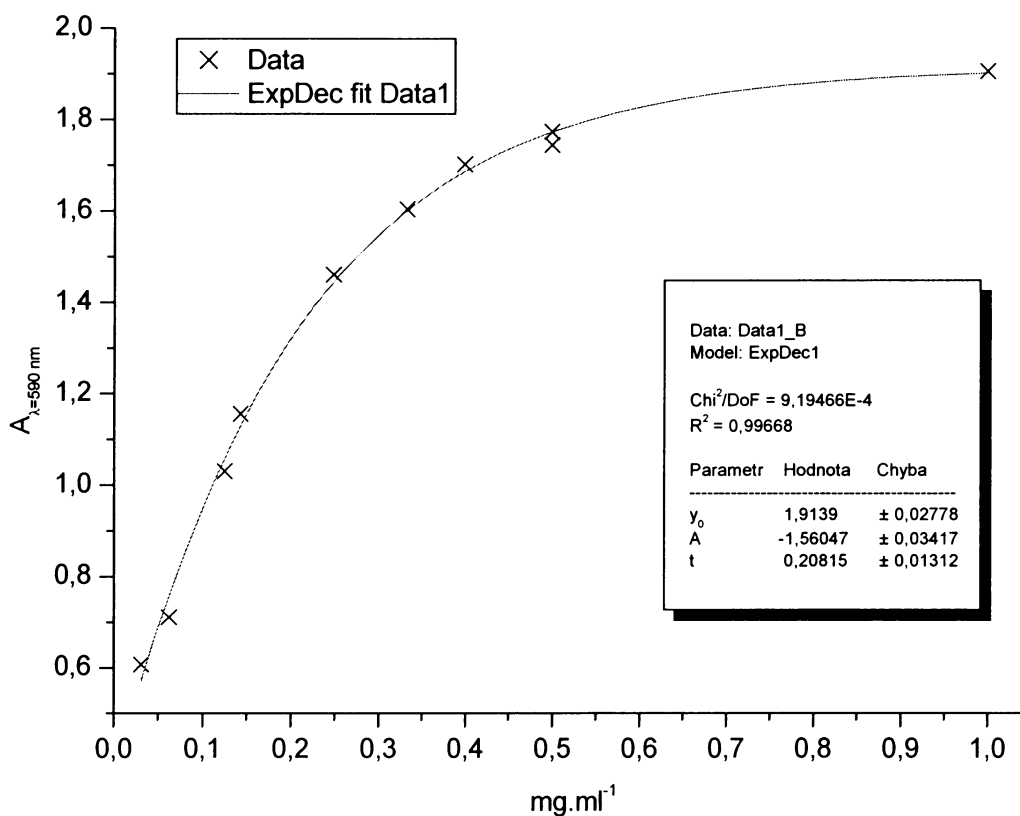
pH	a množstvo roztoku NaOH [cm ³]	I [mol dm ⁻³]	Množstvo NaClO ₄ · H ₂ O [g] na (100 + a) cm ³ zmesi pre I = 0.15 mol dm ⁻³	Množstvo NaClO ₄ · H ₂ O [g] na zvýšenie I o 0.05
1.81	0.0	0.015	1.896	0.702
1.89	2.5	0.018	1.900	0.720
1.98	5.0	0.020	1.917	0.737
2.09	7.5	0.022	1.933	0.755
2.21	10.0	0.024	1.947	0.773
2.36	12.5	0.027	1.944	0.790
2.56	15.0	0.029	1.955	0.808
2.87	17.5	0.031	1.964	0.825
3.29	20.5	0.034	1.955	0.843
3.78	22.5	0.037	1.944	0.860
4.10	25.0	0.040	1.931	0.878
4.35	27.5	0.043	1.916	0.895
4.56	30.0	0.046	1.899	0.913
4.78	32.5	0.049	1.880	0.931
5.02	35.0	0.052	1.858	0.948
5.33	37.5	0.055	1.835	0.966
5.72	40.0	0.059	1.790	0.983
6.09	42.5	0.063	1.741	1.001
6.37	45.0	0.069	1.650	1.018
6.59	47.5	0.074	1.575	1.036
6.80	50.0	0.080	1.475	1.053
7.00	52.5	0.085	1.392	1.071
7.24	55.0	0.090	1.306	1.089
7.54	57.5	0.094	1.239	1.106
7.96	60.0	0.098	1.169	1.124
8.36	62.5	0.100	1.141	1.141
8.69	65.0	0.102	1.112	1.159
8.95	67.5	0.104	1.082	1.176
9.15	70.0	0.106	1.051	1.194
9.37	72.5	0.107	1.042	1.212
9.62	75.0	0.109	1.008	1.229
9.91	77.5	0.110	0.997	1.247
10.38	80.0	0.112	0.961	1.264
10.88	82.5	0.117	0.846	1.282
11.20	85.0	0.121	0.754	1.299
11.40	87.5	0.125	0.658	1.317
11.58	90.0	0.129	0.560	1.334
11.70	92.5	0.133	0.460	1.352
11.82	95.0	0.136	0.383	1.370
11.92	97.5	0.138	0.333	1.387
11.98	100.0	0.141	0.253	1.405

¹ 100 cm³ roztoku s koncentráciou 4 · 10⁻² mol dm⁻³ H₃PO₄, CH₃COOH a H₃BO₃ (4.90 g 80 % H₃PO₄; 2.40 g CH₃COOH a 2.744 g H₃BO₃ na 1 dm³ roztoku) sa zmieša s a cm³ 2 · 10⁻¹ mol dm⁻³ roztokom NaOH

8.2. Kalibrace *M. lysodieticus*



8.3. Kalibrace proteinů



8.4. Postup čištění roztočů



Postup popsán v kapitole 3.4.

8.5. Alergeny prachových roztočů

TABLE 2 Characterized house dust mite allergens and percent patient reactivity to them

Allergen group	Specific allergens characterized	M.W. (kDa)	Frequency of reactivity (%)*	Homology
Grp 1	Der f 1, Der p 1, Eur m 1, Der m 1	25	>90 (205, 241)	Cysteine protease, homology similar to enzymes papain, actinidin, cathepsin H & B, bromelain, fren
Grp 2	Der f 2, Der p 2, Eur m 2, Tyr p 2, Lep d 2	14	>90 (205, 241)	Homology with primate epididymal or insect molting protein
Grp 3	Der f 3, Der p 3, Eur m 3	28–30	57–>90 (241, 242)	Trypsin-like serine protease
Grp 4	Der f 4, Der p 4	56–63	25–46 (152)	Amylase
Grp 5	Der p 5, Blo t 5	14–15	45–60 (163, 256)	Unknown
Grp 6	Der f 6, Der p 6	25	40–60 (235)	Chymotrypsin-like serine protease
Grp 7	Der f 7, Der p 7	22–28	50 (236)	Unknown
Grp 8	Der p 8	25–26	40 (192)	Rat & mouse glutathione-S-transferase
Grp 9	Der f 9, Der p 9	24–28	80 (138)	Collagenolytic serine protease
Grp 10	Der p 10	33–37	>60 (3)	Melanogaster, rabbit & human alfa-tropomyosin
Grp 11	Der f 11	98	High (259)	Paramyosin
Grp 12	Blo t 12	14	50 (210)	Unknown
Grp 13	Blo t 13	15–17	10 (48)	Cytosolic fatty acid-binding proteins
Grp 14	Der f 15, Der p 15, Eur m 15	177–190	70 (69)	Apolipoporphin-like protein

Der f, *Dermatophagoides farinae*; Der p, *Dermatophagoides pteromyssinus*; Eur m, *Euroglyphus maynei*; Blo t, *Blomia tropicalis*; Lep d, *Lepidoglyphus destructor*.

*References given in parentheses.

Převzato z Arlian (2002).

8.6. Použité zkratky a symboly

ANOVA	analýza rozptylu
BR-I	Britton-Robinsonův pufr I
DTT	dithiothreitol
EA	enzymová aktivita
EC	enzyme commission, symbol užívaný pro označení čtyřmístného katalogového čísla enzymů
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FR	fysiologický roztok
HEWL	lysozym slepičího bílku
IgE	třída protilátek
INT	intermediate = meziprodukt
kDa	jednotka molekulové hmotnosti
λ	konstanta vyjadřující nárůst populace oproti populaci počáteční
M	molární koncentrace v mol.dm ⁻³
NAG	N-acetylglukosamin
NAM	N-acetylmuramová kyselina
pH _o	pH optimum
PRR	podíl rychlosti růstu
RAST	Ratio Allergen Sorbent Test, test na přítomnost specifického IgE
RH	relative humidity = relativní vlhkost
SD	směrodatná odchylka
SE	střední chyba
SGME	spent growth medium, homogenát získaný z exkrementů
S _N 1	nukleofilní monomolekulová substituce
S _N 2	nukleofilní bimolekulová substituce
WME	whole mite extracts, homogenát získaný z těl roztočů