

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky (FAPPZ)



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Prebiotika jako zdroj uhlíku pro *Listeria monocytogenes*

Bakalářská práce

Anna Daťková

Výživa a potraviny (NUTRIB)

Ing. Tereza Kodešová

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Prebiotika jako zdroj uhlíku pro *Listeria monocytogenes*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní Ing. Tereze Kodešové, vedoucí mé bakalářské práce, za předané vědomosti, trpělivost, motivaci a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

Prebiotika jako zdroj uhlíku pro *Listeria monocytogenes*

Souhrn

Listeria monocytogenes je malá, grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporující, pohyblivá patogenní tyčinkovitá bakterie, která se může vyskytovat prakticky v každém prostředí. Zpravidla se vyskytuje v půdě, v povrchové vodě, na různé vegetaci, trávicím traktu zvířat a v potravinách. Tato bakterie způsobuje u člověka alimentární onemocnění označované jako listerióza. Přestože se listerióza objevuje relativně vzácně, jedná se o velice závažné onemocnění vyznačující se vysokou mortalitou v porovnání s ostatními alimentárními infekcemi. Jedním z mnoha preventivních opatření listeriózy je konzumace prebiotik, která podporují různorodost střevní mikrobioty a výrazně snižují kolonizaci střevního lumenu patogenními bakteriemi. Prebiotika jsou v lidském gastrointestinálním traktu využívána probiotickými kmeny bakterií, které pro svůj metabolismus vyžadují různé sacharidy a svou přítomností podporují zdraví hostitele. Bylo prokázáno, že prebiotika nemusí využívat pouze zdraví prospěšné bakterie, ale mohou podporovat růst i nežádoucích bakterií. Je známo, že *L. monocytogenes* je schopná štěpit různé sacharidy. Jen málo je ovšem známo o schopnosti využití prebiotik touto bakterií. Cílem práce bylo testování růstu bakterie *L. monocytogenes* na vybraných prebiotických sacharidech a zjištění, jak *L. monocytogenes* využívá prebiotika ke svému růstu i. Testovány byly 4 sbírkové izoláty *L. monocytogenes* prezentující 4 nejvíce rozšířené sérotypy (4b, 1/2b, 1/2a a 1/2c). Růstová schopnost izolátů byla testována na beta(1,3)-D-glukanu, inulinu, fruktooligosacharidech (FOS), galaktooligosacharidech (GOS), laktulóze, rafinóze, stachyóze, oligosacharidech mateřského mléka (OMM) a 2'-fukosyllaktóze. V první fázi byly kultivovány vybrané testované kultury *L. monocytogenes*. Ve druhé fázi bylo testováno vhodné kultivační médium, na kterém vybrané izoláty *L. monocytogenes* nevykazovaly růst bez přidání zdroje sacharidu (zdroje uhlíku). Ve třetí fázi probíhala příprava média pro testování obsahující vybrané probiotické sacharidy. Ve čtvrté fázi byl stanovován růst *L. monocytogenes* na prebiotických sacharidech rozpustných i nerozpustných ve vodě. Připravené vzorky obsahující sacharidy, které jsou rozpustné ve vodě, byly v penicilínkách kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Vzorky byly dále proměřeny v destičce pomocí přístroje Infinite M200 Tecan, který změřil denzitu vzorku při 620 nm. Připravené petriho misky obsahující beta(1,3)-D-glukan, který je nerozpustný ve vodě, byly kultivovány aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin. Růst kultur bylo nutné monitorovat pomocí mikrobiologického rozboru vzorků. V programu Statgraphics byl vypočítán statisticky významný rozdíl mezi růsty u jednotlivých pokusných skupin na základě rozdílu denzit u prebitických sacharidů rozpustných ve vodě a na základě počtů bakterií u beta-glukanu nerozpustného ve vodě. Výsledky ukázaly, že *L. monocytogenes* ke svému růstu je schopná využívat beta-glukany.

Klíčová slova: *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, listerióza, prebiotika, alimentární onemocnění

Prebiotics as a carbon source for *Listeria monocytogenes*

Summary

Listeria monocytogenes is a small, gram-positive, facultatively anaerobic, non-sporulating, motile pathogenic rod bacteria that can occur in any environment. It can be present in soil, in surface water, on various vegetation, in the digestive tract of animals and in food. This bacteria causes a foodborne human illness called listeriosis. Although listeriosis occurs relatively rarely, it is a very serious disease characterized by high mortality compared to other foodborne infections. One of the many preventive measures for listeriosis is the consumption of prebiotics, which support the diversity of the intestinal microbiota and significantly reduce the colonization of the intestinal lumen by pathogenic bacteria. Prebiotics are used in the human gastrointestinal tract by probiotic strains of bacteria that require various carbohydrates for their metabolism and support the health of the host by their presence. It has been proven that prebiotics may not only benefit health-promoting bacteria, but can also promote the growth of unwanted bacteria. *L. monocytogenes* is known to be able to break down various carbohydrates. However, little is known about the ability of this bacterium to use prebiotics. The aim of the work was to test the growth of the bacterium *L. monocytogenes* on selected prebiotic carbohydrates and to find out how *L. monocytogenes* uses prebiotics for its growth. 4 collection isolates of *L. monocytogenes* presenting the 4 most widespread serotypes (4b, 1/2b, 1/2a) and 1/2c) were tested. The growth ability of the isolates was tested for beta(1,3)-D-glucan, inulin, fructooligosaccharides (FOS), galactooligosaccharides (GOS), lactulose, raffinose, stachyose, mother's milk oligosaccharides (OMM) and 2'-fucosyllactose. In the first phase, selected test cultures of *L. monocytogenes* were cultivated. In the second phase, a suitable culture medium was tested, in which the selected *L. monocytogenes* isolates did not show growth without the addition of a carbohydrate source (carbon source). In the third phase, the medium for testing was prepared containing selected probiotic carbohydrates. In the fourth phase, the growth of *L. monocytogenes* on water-soluble and water-insoluble prebiotic carbohydrates was determined. Prepared samples containing carbohydrates that are soluble in water were cultured in penicillin tubes at 37°C for 24 hours. The samples were further measured on the plate using an Infinite M200 Tecan instrument, which measured the density of the sample at 620 nm. Prepared petri dishes containing beta(1,3)-D-glucan, which is insoluble in water, were cultured aerobically at 37°C for 24 hours. The growth of the cultures had to be monitored using microbiological analysis of the samples. In the Statgraphics program, a statistically significant difference between the growths of the individual experimental groups was calculated based on the difference in densities for water-soluble prebiotic carbohydrates and on the basis of the number of bacteria for water-insoluble beta-glucan. The results showed that *L. monocytogenes* is able to use beta-glucans for its growth.

Keywords: *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, listeriosis, prebiotics, foodborne illness

Obsah

1 Úvod	8
2 Hypotéza a cíl práce.....	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 <i>Listeria</i> sp.	10
3.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	14
3.1.1.1 Výskyt <i>Listeria monocytogenes</i>	17
3.1.1.2 Sérotypizace <i>Listeria monocytogenes</i>	18
3.1.1.3 Faktory virulence.....	19
3.1.1.4 Listeriόza	20
3.1.1.5 Lěčba a prevence listeriόzy	22
3.2 Prebiotka.....	23
3.2.1 Beta-glukany.....	25
3.2.2 Inulin a fruktooligosacharidy (FOS).....	26
3.2.3 Galaktooligosacharidy	26
3.2.3.1 β -Galaktooligosacharidy (GOS).....	27
3.2.3.2 α -Galaktooligosacharidy (RSO).....	27
3.2.4 Laktulόza	28
3.2.5 Oligosacharidy mateřského mléka (OMM).....	28
4 Metodika	29
4.1 Příprava testovaných kultur <i>Listeria monocytogenes</i>	29
4.2 Sestavení vhodného média pro testování růstu <i>Listeria monocytogenes</i> na sacharidech	29
4.3 Příprava médií pro testování růstu <i>Listeria monocytogenes</i> obsahující vybrané prebiotické sacharidy.....	31
4.4 Stanovení růstu <i>Listeria monocytogenes</i> na vybraných prebiotických sacharidech	32
4.4.1 Stanovení růstu <i>Listeria monocytogenes</i> na vybraných prebiotických rozpustných ve vodě	32
4.4.2 Stanovení růstu <i>Listeria monocytogenes</i> na vybraných prebiotických nerozpustných ve vodě	32
5 Výsledky.....	34
5.1 Stanovení vhodného média pro testování růstu <i>Listeria monocytogenes</i> na vybraných prebiotických	34
5.2 Stanovení růstu <i>Listeria monocytogenes</i> na vybraných prebiotických sacharidech	36

5.2.1 Stanovení růstu <i>Listeria monocytogenes</i> na vybraných prebiotických rozpustných ve vodě	36
5.2.2 Stanovení růstu <i>Listeria monocytogenes</i> na vybraných prebiotických nerozpustných ve vodě	38
6 Diskuze	39
7 Závěr.....	43
8 Literatura.....	44

1 Úvod

Rod *Listeria* je složen z malých, grampozitivních, nesporolujících, fakultativně anaerobních bakterií. Nejvýznamnějším druhem s patogenními vlastnostmi je *Listeria monocytogenes*, která může být přítomna v potravinách a způsobovat tak závažné alimentární onemocnění označované jako listerióza (Low, 1997; Vázquez-Boland, 2001; Bergey, 2009; Brychta, 2018). Optimální teplotní rozsah pro růst bakterií je 30–37 °C, avšak *L. monocytogenes* je schopna přežít i při nízkých teplotách a hodnotách pH do 9,6. Je schopna přežít i v salinitě prostředí kolem 10 % (Low, 1997; Brychta, 2018). Díky těmto vlastnostem se běžně nachází v životním prostředí jako je povrchová voda, půda, vegetace, střevní trakt zvířat i lidí, siláže a odpadní voda (Farber, 1991; Swaminathan, 2007).

Listerióza, přestože vykazuje nízkou míru výskytu, má vysokou průměrnou úmrtnost 20 až 30 % navzdory včasné antimikrobiální léčbě (Borucki, 2003; Liu, 2006; Schardt, 2017). Nejvíce jsou ohroženy rizikové skupiny obyvatel, kam se řadí novorozenci, těhotné ženy, starší osoby a osoby s oslabeným imunitním systémem (nádorově nemocní, nemocní s AIDS, žloutenkou či diabetem). Infikování hostitelského organismu probíhá perorálně požitím kontaminované potravy (Doumith, 2004; Schardt, 2017; Brychta, 2018). Toto onemocnění může způsobovat septikémii, meningitidu, potraty a v některých případech i smrt (Vázquez-Boland, 2001).

Jedním z preventivních kroků proti nákaze je dodržování hygienických a sanitačních postupů ve zpracování potravin, především v syrovém stavu. Dalším krokem je omezení konzumace rizikových potravin, jako jsou např. syrové nepasterované mléčné výrobky a špatně tepelně upravené maso. Preventivním krokem proti nákaze je i konzumace prebiotik, která podporují různorodost střevní mikrobioty, výrazně snižují kolonizaci střevního lumenu a zabraňují systémovému šíření listeriózy (Janakiraman, 2008; Becattini, 2017; Brychta, 2018).

Prebiotika jsou látky, které lidské tělo nedokáže strávit. Jsou fermentována střevní mikrobiotou a selektivně stimulují probiotické kmeny bakterií v tlustém střevě. Aktivita prebiotik příznivě ovlivňuje hostitele (Davani-Davari, 2019; Wang, 2020; You, 2022).

2 Hypotéza a cíl práce

Předpokládáme, že *Listeria monocytogenes* bude schopná využít pro svůj růst některé prebiotické sacharidy.

Cílem bakalářské práce bylo zpracovat literární přehled o listériích a prebiotících. Dále bylo cílem nalezení vhodného média a otestování schopnosti *Listeria monocytogenes* využít prebiotické sacharidy jako jediný zdroj uhlíku.

3 Literární rešerše

3.1 *Listeria* sp.

Rod *Listeria* náleží do čeledi *Listeriaceae* a tvoří skupinu bakterií s nízkým obsahem G+C (36–42 %), tzv. podílem guanino-cytosinového komplementárního páru, která je blíže příbuzná bakteriím rodu *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*. Svoje pojmenování získaly podle anglického chirurga Josepha Listera (Vázquez-Boland, 2001; Liu, 2006; Schardt, 2017).

Bakterie rodu *Listeria* jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní grampozitivní tyčinky až kokotyčinky o rozměrech 0,4 až 1,5 μm (Bergey, 2009). Obvykle se vyskytují jednotlivě nebo v krátkých řetězcích. Listérie netvoří pouzdra ani spory a nemají kapsulu (Low, 1997; Vázquez-Boland, 2001).

Některé druhy listérií mají 1-4 bičíky, čímž jsou řazeny mezi pohyblivé bakterie. Počet bičíků se může lišit podle podmínek růstu (Obrázek č. 1). Počet bičíků klesá při zvyšující se teplotě okolního prostředí, ve kterém se bakterie nachází. Při teplotě přesahující 25 °C se samotná pohyblivost bakterie začíná snižovat a po dosažení teploty 37 °C bičíky zcela zmizí. Pozorování bičíku pod běžným světelným mikroskopem je velice obtížné. Tudíž je důležité pro jejich pozorování využít metody náročného barvení (např. stříbření) anebo elektronového mikroskopu (Brychta, 2018).



Obrázek č. 1: *Listeria monocytogenes* s bičíky
(zdroj: https://www.textbookofbacteriology.net/Listeria_2.html)

U listérií se optimální teplota růstu pohybuje mezi 30–37 °C, nicméně dolní hranice samotného růstu se mohou pohybovat při chladírenských teplotách (od 0 °C). Horním teplotním limitem je teplota až 45 °C, listérie nepřežijí zahřívání při 60 °C po dobu 30 min (Bergey, 2009; Cupáková, 2010).

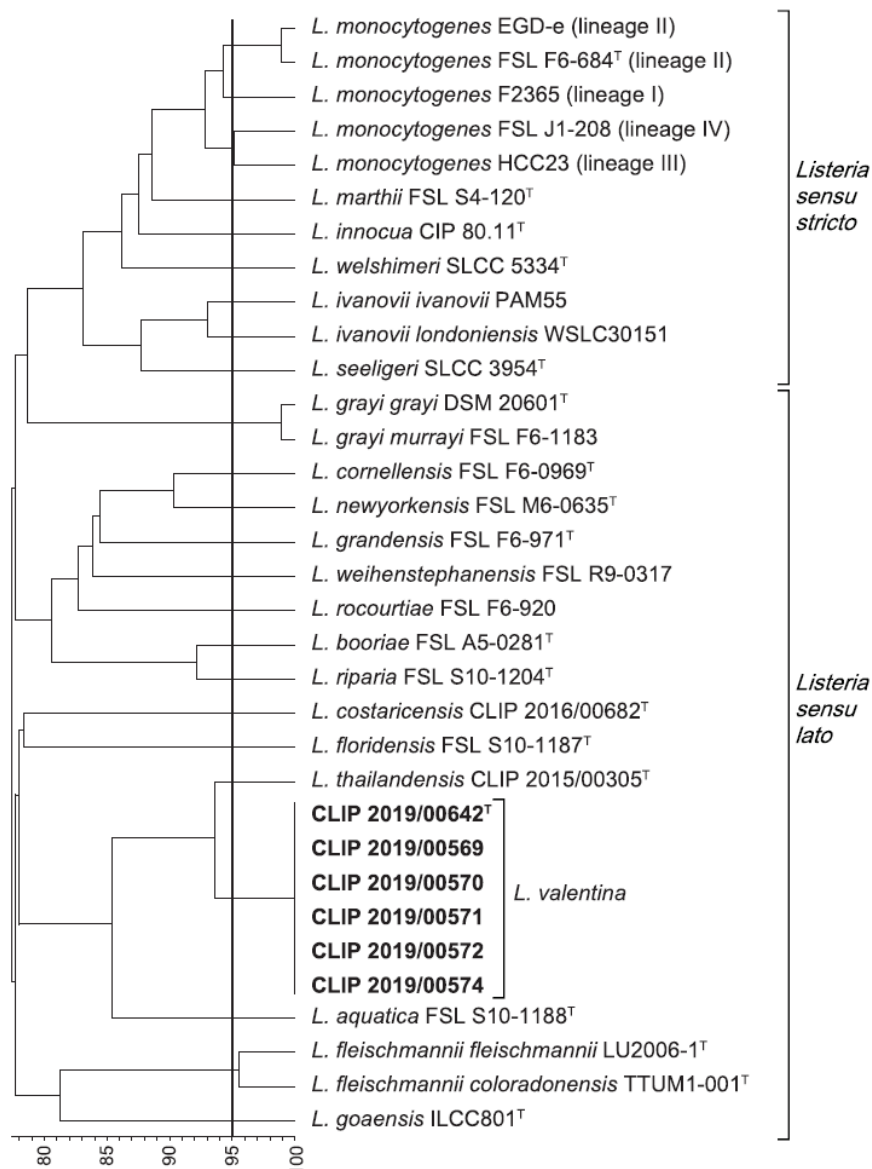
Bakteriím rodu *Listeria* nejvíce vyhovují podmínky v prostředí s pH v rozmezí od 6 do 9. Většina kmenů se pomnožuje v rozmezí pH 5,6–9,6, jsou ale schopné přežít i při pH 4,4. Listérie jsou celkově odolné vůči jakýmkoliv změnám vnějšího prostředí. Množení listérií může probíhat i při koncentracích soli do 10% roztoku NaCl a schopnost přežít mají listérie i v 25% roztoku NaCl (Gray, 1966; Bergey, 2009). Listérie jsou též schopné přežít 20 dní v suchém prostředí anebo i 6 dní v destilované vodě (Waites, 1990).

Listeria spp. produkují enzym katalasu, zároveň mají schopnost hydrolyzovat hippurát sodný a eskulinu (Low, 1997). Bakterie rodu *Listeria* netvoří ureasu, tudíž nejsou schopné štěpit močovinu, a dále nejsou schopny hydrolyzovat želatinu, kasein a mléko. Listérie patří mezi aktivní sacharolytické mikroorganismy (Gray, 1966; Bergey, 2009). Jsou také nenáročné na podmínky růstu (Gray, 1966). Všechny druhy *Listeria* sp. rostou dobře na většině neselektivních bakteriologických médiích, kam se řadí pevné kultivační půdy, jako je krevní nebo živný agar, a zároveň i tekutá média obsahující BHI agar (bujón z mozkosrdcové infúze) nebo trypton sójový bujón (Tryptone-soya broth, TSB). Růst listérií je posílen přidáním vhodného fermentovatelného sacharidu (0,2–1 % (w/v) glukóza – vhodná pro všechny druhy), krve anebo séra. Vzhledem k růstovým schopnostem jsou *Listeria* spp. izolovány z různých zdrojů životního prostředí, včetně půdy, vody, odpadních vod, ale i velkého množství potravin a výkalů zvířat a lidí. Předpokládá se, že přirozeným prostředím těchto bakterií jsou rozkládající se potraviny rostlinné hmoty, v níž žijí jako saprofyty. Klíčovou roli při udržování některých druhů *Listeria* sp. ve venkovském prostředí hrají domestikovaní přežvýkavci, kdy je jejich trávicí trakt zprostředkovatelem největšího rezervoáru těchto bakterií (Bergey, 2009; Schardt, 2017).

Rod *Listeria* zahrnuje v současné době 28 druhů (Euzéby, 1997). Podle schopností listérie kolonizovat tělo hostitele se bakterie rodu *Listeria* rozdělují na dvě větší skupiny „*Listeria sensu stricto*“ a „*Listeria sensu lato*“ (Quereda, 2020).

Do skupiny *Listeria sensu stricto* řadíme 6 druhů listérií: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* a *L. seeligeri* (viz Obrázek č. 2) (Schardt, 2017).

Všechny tyto druhy mají sdílené fenotypové charakteristiky jako je schopnost růstu při nízkých teplotách (cca 4 °C), motilitu (alespoň při 30 °C), pozitivní katalázovou reakci a neschopnost redukovat dusičnany na dusitany. Navíc jsou všechny druhy *sensu stricto* schopné fermentovat D-arabitol, α -methyl D-glukosid, celobiózu, D-fruktózu, D-manózu, N-acetylglukosamin, maltózu a laktózu. Tyto druhy naopak nedokáží fermentovat inositol, L-arabinózu a D-mannitol (Orsi, 2016). Všechny tyto druhy dokáží kolonizovat trávicí trak zvířat nebo člověka (Schardt, 2017). V této skupině listérií jsou zahrnuty i patogenní druhy listérií. Patogenita koreluje s přítomností neporušených genů virulence, které umožňují přímou interakci mezi bakteriemi a hostitelskými buňkami (Chiara, 2015). Fylogenomické analýzy *Listeria sensu stricto* naznačují, že nepatogenní druhy se vyvinuly z patogenních předků prostřednictvím ztráty patogenity (Chiara, 2015).



Obrázek č. 2: Fylogenetický strom rodu *Listeria* vyzobrazující dvě skupiny sensu stricto a sensu lato (zdroj: Quereda, 2020)

Ostatní druhy rodu *Listeria* se řadí do skupiny *Listeria sensu lato* (viz obrázek č. 2). V této skupině nejsou žádné potenciální patogenní druhy, jsou nepohyblivé (kromě *L. grayi*), jsou schopny redukovat dusičnany (kromě *L. floridensis*) a jsou negativní na Voges-Proskauerův test (kromě *L. grayi* a *L. aquatica*). Stejně jako druh *Listeria sensu stricto* jsou všechny druhy *sensu lato* kataláza pozitivní. Druhy *Listeria sensu lato* jsou méně přizpůsobené podmínkám gastrointestinálního traktu, tudíž nedokáží kolonizovat trávicí trakt. Běžně se vyskytují v životním prostředí (Orsi, 2016). Všechny druhy *sensu lato* jsou schopny štěpit D-xyulózu a D-glukózu, ale žádný druh není schopen štěpit glukózu-1-fosfát ani inulin (Orsi, 2016).

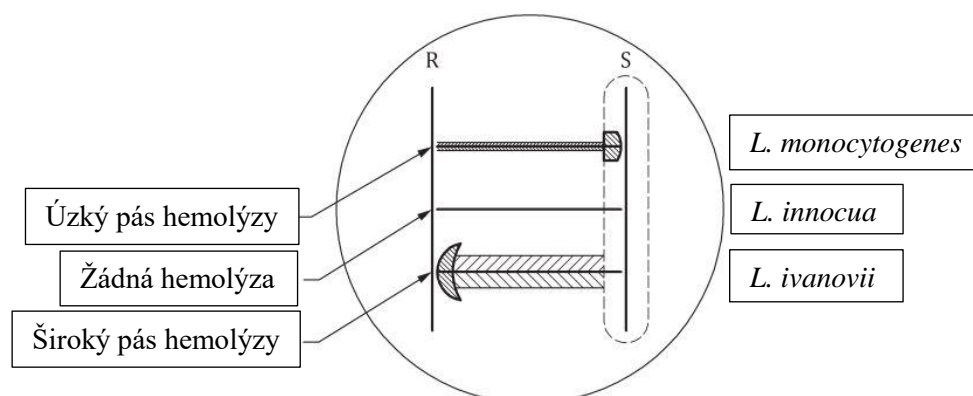
Na základě schopnosti fermentovat různé sacharidy jako je D-xylosa, L-rhamnosa, α -methyl-D-mannosid a D-mannitol, D-arabitol, methyl-D-glukosid, ribosa, glukosa-1-fosfát a D-tagatosa, lze rozlišit i jednotlivé druhy listérií (Blažková, 2005). Například *L. monocytogenes* a *L. innocua* využívají glukózu, laktózu a rhamnózu, kdežto *L. grayi*

a *L. murrayi* využívají i galaktózu. *L. ivanovi* a *L. seeligeri* jsou jediné *Listeria* spp., které fermentují xylózu (Farber, 1991). *L. grayi* dokáže využít D-mannitol. Nejvíce se pro rozlišení druhů využívá schopnost fermentace rhamnózy a fermentace xylózy (Gawade, 2010).

Studie fermentace sacharidů *Listeria* spp. publikovány Pinem et al. (1989) ukazují, že utilizace sacharidů jednotlivými druhy listérií je závislá na přítomnosti kyslíku. Za anaerobních podmínek růst listérií podporují pouze hexózy a pentózy, zatímco aerobně podporují též jejich růst maltóza a laktóza. Listérie naopak obecně nedokáží štěpit sacharózu (Farber, 1991).

Další významnou vlastností některých listérií, podle které můžeme rozlišit druhy listérií, je jejich hemolytická aktivita (Farber, 1991).

Nejčastěji využívaným testem k odlišení příbuzných druhů *Listeria* je CAMP test. Testování *Listeria* sp. pomocí CAMP testu probíhá za použití koňského krevního agaru, na který je natřen hemolytický kmen *Staphylococcus aureus* a nehemolytický kmen *Rhodococcus equi*. Hemolytická aktivita je sledována díky spolupráci mezi kmeny listérií a kmeny *S. aureus* a *R. equi* (viz Obrázek č. 3). Tento test pomáhá od sebe rozlišit zejména druhy *L. monocytogenes*, *L. innocua* a *L. ivanovii*. Mezi druhy vykazující hemolytickou aktivitu patří např. *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* a *L. seeligeri*. K druhům, které nejsou schopny hemolýzin tvořit, patří např. *L. innocua* a *L. welshimeri* (Blažková, 2005).



Obrázek č. 3: CAMP test

(zdroj: <https://biosistostandard.com/wp-content/uploads/2021/10/CAMP-test.jpg>)

Další schopností listérií je produkce enzymů β -galaktosidázy. Beta-galaktosidáza, běžně známá jako laktáza, je bakteriální enzym zodpovědný za hydrolýzu laktózy v tlustém střevě (He, 2005; Saqib, 2017). Díky této vlastnosti lze rozeznat a identifikovat rody bakterií (Saqib, 2017). Vzhledem k tomu, že jsou listérie až na výjimky (*L. aquatica*, *L. weihenstephanensis* či *L. grandensis*) schopné fermentovat laktózu a tím tak produkovat β -galaktosidázu (Orsi, 2016), je možné listérie odlišit od jiných bakterií, kterou tuto schopnost nemají (Gasarov, 2005). Dalším rozlišovacím znakem u některých druhů listérií je produkce fosfatidylinositol-specifická fosfolipáza C (PIPL-C) Jedná se o enzym, který je produkován pouze *L. monocytogenes* a *L. ivanovii* a aktivita tohoto enzymu je měřena pomocí chromogenních médií (Gasarov, 2005; Orsi, 2016). Listeriální fosfolipáza C, neboli lecitináza, je důležitým faktorem listeriální virulence, který může být využit jako marker pro rozlišení *Listeria* sp. z potravin (Ermolaeva, 2003). Tuto aktivitu lze snadno vizualizovat na agaru doplněným

vaječným žloutkem (Ermolaeva, 2003). Aktivita PIPL-C je tedy spolehlivým markerem umožňující rozlišení mezi patogenními a nepatogenními druhy *Listeria* sp. (Notermans, 1991).

Společně se sledováním schopností špěpení sacharidů, hemolytické aktivity a produkce enzymů galaktosidázy a fosfolipázy C lze vcelku přesně odlišit patogenní druhy bakterií rodu *Listeria*. Tyto fenotypové schopnosti jsou zapsány v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Vybrané fenotypové vlastnosti druhů *Listeria* (upraveno dle Orsi, 2016)

Druhy listérií	Pohyblivost	β -hemolýza	Fermentace L-Rhamnózy	Fermentace D-Xylózy	Produkce fosfolipázy C
<i>Listeria sensu stricto</i>					
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	-	+
<i>L. marthii</i>	+	-	-	-	-
<i>L. innocua</i>	+	-	V	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	+	+
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	+	-
<i>L. welshimeri</i>	+	-	V	+	-
<i>Listeria sensu lato</i>					
<i>L. grayi</i>	+	-	V	-	-
<i>L. fleischmanii</i>	-	-	+	+	-
<i>L. rocourtiae</i>	-	-	+	+	-
<i>L. weihenstephanensis</i>	-	-	+	+	-

V: variabilní reakce

-: žádná reakce

+: přes 90 % pozitivní reakce

Mezi dva nejvýznamnější druhy s patogenním potenciálem patří *L. monocytogenes* a *L. ivanovii*. *Listeria ivanovii* (dříve známá pod názvem *L. monocytogenes* sérotyp 5) byla poprvé izolována v Bulharsku v roce 1955 z jehňat s vrozenou listeriózou. Lidské případy infekce *L. ivanovii* jsou vzácné. Je považována za patogena zvířat. Nejčastěji se vyskytuje u přežvýkavců a nejtypičtější klinický projev je perinatální infekce, která se projevuje potraty, mrtvě narozenými mláďaty či neonatálních septikémií u ovcí a skotu (Low, 1997; Vázquez-Boland, 2001). Naopak *L. monocytogenes* způsobuje závažné lokální a generalizované infekce nejen u zvířat, ale i u lidí.

3.1.1 *Listeria monocytogenes*

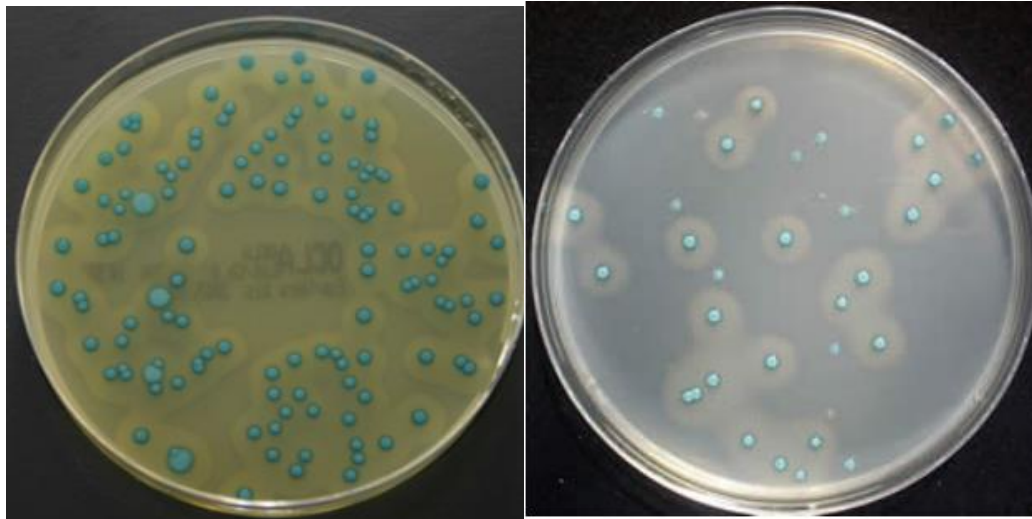
Poprvé byla bakterie *Listeria monocytogenes* popsána v roce 1926 Murraym et al. jako *Bacterium monocytogenes*, jelikož u infikovaných jedinců způsobovala monocytózu. O rok později byla H. Piriem kvůli patologickým nálezům na játrech infikovaných zvířat přejmenována na *Listerella hepatolytica*. Nicméně až v roce 1940 byl název této bakterie pozměněn na současnou podobu *Listeria monocytogenes* (Farber, 1991; Low, 1997).

Listeria monocytogenes se stejně jako ostatní druhy rodu *Listeria* charakterizuje jako malá, grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující, oxidáza negativní, kataláza pozitivní tyčinka o velikosti 0,5 x 1–2 μ m. Buňky se mohou vyskytovat jednotlivě anebo

ve dvojicích, občas tvoří i řetízky (závisí na podmínkách jejich růstu). Při nepříznivých podmínkách v období jejich růstu může zároveň dojít ke změně jejich tvaru, kdy se buňky zkracují do kokoidních forem (Brychta, 2018). Bakterie *Listeria monocytogenes* leží často v palisádách či jsou přítomné jako nitkovité formy v některých kulturách (Low, 1997). K růstu bakterií dochází mezi -0,4 a 50 °C, ale optimální teplotní rozsah je 30–37 °C. Nejen široké teplotní spektrum poukazuje na vysokou odolnost *Listeria monocytogenes* a zároveň demonstruje i schopnost přežít či růst v nepříznivém prostředí. Organismus se rychle množí v aerobních podmínkách nebo mikroaerofilních podmínkách při hodnotách pH do 9,6 (optimální hodnota pH 7,0), naopak množení je inhibováno hodnotami pH pod 5,6 (Low, 1997). *L. monocytogenes* je dále schopná růst v salinitě kolem 10 % a při nízké aktivitě vody (0,92). V ideálních podmínkách (optimální pH, Aw a T) bývá namnožení listérií velmi rychlé a může překročit stanovený legislativní limit bezpečnosti 100 KTJ/g (ml) v potravině již za 3–4 dny. (Brychta, 2018).

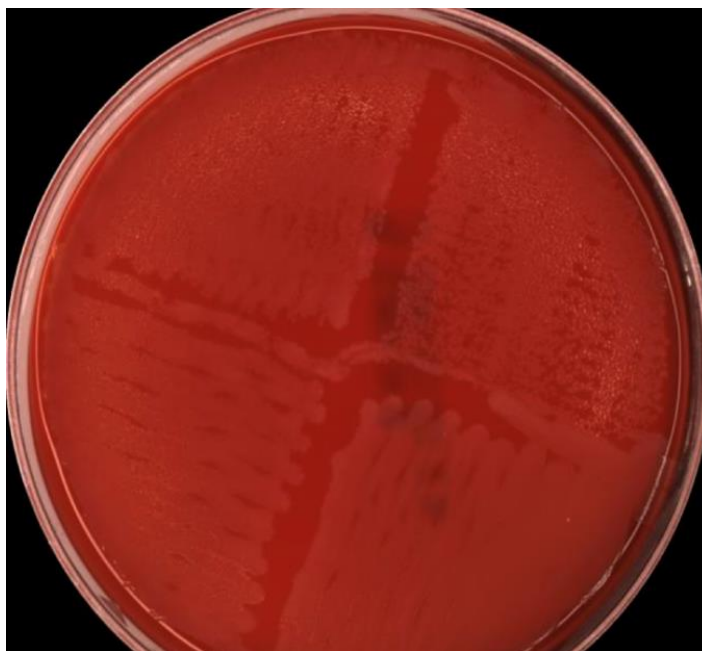
L. monocytogenes je nenáročná, ale pro růst požaduje základní živiny. Ke svému růstu vyžaduje sedm aminokyselin, organicky vázanou síru a čtyři vitamíny. Nezbytnými živinami je sedm aminokyselin, mezi které se řadí leucin, valin, izoleucin, cystein, glutamin, methionin a arginin. Důležitými AMK jsou především cystein a methionin, jakožto zdroje organicky vázané síry, kterou *L. monocytogenes* ke kultivaci využívají. Hlavním zdrojem uhlíku při růstu bakterie *L. monocytogenes* je glukóza. Dokáže ovšem využívat i jiné sacharidy jako například fruktózu, manózu, trehalózu nebo celobiózu. Mezi méně vhodné substráty mohou patřit např. maltóza či glycerol. K růstovým faktorům patří též řada vitamínů: riboflavin, thiamin, biotin a kyselina thioktová. Stimulování růstu dále probíhá i za přídavku železitých iontů, nejčastěji v podobě přídavku citrátu železitého. Požadavky na živiny jsou kmenově specifické a mohou se lišit v závislosti na původu organismu (Premarante, 1991; Sauer, 2019).

Bakteriální kolonie jsou malé až středně velké (1–3 mm), hladké, mírně zploštělé a mléčně bíle zbarvené (Gray, 1966). Při šikmém osvětlení kolonie prokazují charakteristický modrozelený lesk. Jedním ze základních médií pro kultivaci *Listeria monocytogenes* je médium ALOA, jiným názvem Agar dle Ottavianiho a Agostiho. *Listeria monocytogenes* na ALOA rostou vlivem produkce galaktosidázy jako modrozelené kolonie a vlivem aktivity fosfolipázy C jsou kolonie obklopené kruhovou zónou precipitace (lecitinázová aktivita) vyobrazenou na Obrázku č. 4 (Farber, 1991). Organismy pěstované při 37 °C vykazují jen malou nebo žádnou pohyblivost (Gray, 1966). Organismus má peritrichální bičíky, které mu dávají charakteristické kymácivé pohyby vyskytující se pouze v úzkém teplotním rozmezí. Pokud je bakterie kultivována mezi 20 a 25 °C, bičíky jsou vytvořené na povrchu buňky, ale při 37 °C je produkce bičíků výrazně snížena (Farber, 1991). Generační doba při teplotě 4 °C je 30 až 40 hodin, při teplotě 8 °C jenom 10 až 13 hodin. Chladírenské teploty jsou pro listerie příznivé, přežívají také mražení (Brychta, 2018).



Obrázek č. 4: Kolonie *L. monocytogenes* v modrozelené barvě se zónou precipitace
 (zdroj: <http://www.oxid.com/pdf/cz/OXOID-Katalog-HKM-2012-2013.pdf>)

Další důležitou vlastností *Listeria monocytogenes* je její β -hemolytická aktivita (viz Obrázek č. 5), která zajišťuje její určení a rozpoznání od ostatních druhů listérií. *L. monocytogenes* exprimuje β -hemolysin, který vytváří zóny prosvětlení na krevním agaru (Farber, 1991). Hemolytická aktivita kmenů *L. monocytogenes* se liší podle druhu média nebo použité krve. Velikost hemolytické zóny daného kmene může být ovlivněna krevním agarem. Hemolytická aktivita byla silnější na médiích obsahujících koňskou krev než na těch obsahujících ovčí krev (Fujisawa, 1994).



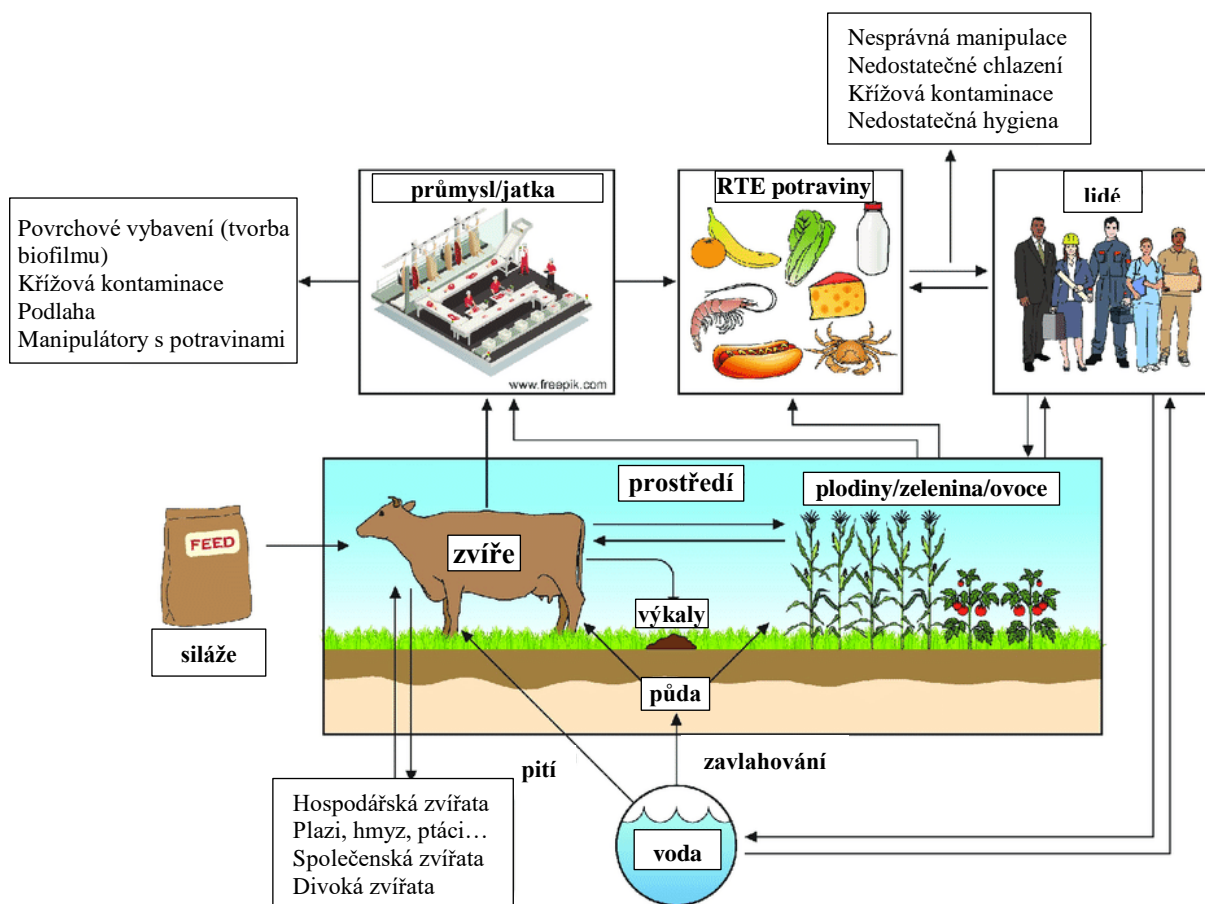
Obrázek č. 5: β -hemolytická aktivita kmenů *L. monocytogenes*
 (zdroj: <https://labmedicineblog.files.wordpress.com/2022/01/list-mono-1.png>)

3.1.1.1 Výskyt *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes se běžně nachází v životním prostředí, odkud se může šířit na rostliny, zvířata a dále na člověka (viz Obrázek č. 6). Zpravidla se nachází v povrchové vodě, půdě, na různé vegetaci, střevním traktu volně žijících zvířat a jejich výkalech. Nalézá se též v siláži, odpadních vodách, jatečním odpadu či kravském mléce. Tato bakterie žije saprofytickým či patogením způsobem života. *L. monocytogenes* je zpravidla izolována ze skotu, ovcí, koz a drůbeže, ale zřídka z divokých zvířat (Farber, 1991; Swaminathan, 2007).

Největší zdravotní riziko pro člověka představují potraviny rostlinného a živočišného původu, ve kterém se *L. monocytogenes* mohou vyskytovat. Přenos bakterií je především spojený s konzumací zpracovaných potravin, které nevyžadují žádné další vaření ze strany spotřebitele. Jedná se tudíž o patogen alimentárního původu. Objevuje se především v syrovém masu (hovězí, vepřové i drůbeží), zelném salátu, mléce, měkkých sýrech, másle, paštikách a lahůdkách a případně dalších potravinách, včetně nedostatečně tepelně upravených párků, uzenin a měkkýšů (Premarante, 1991; Kells, 2004).

Přítomnost listérií v potravinách je obvykle výsledkem znečištění z produkčního prostředí. Celkově rozlišujeme primární a sekundární kontaminaci potravin. Primární kontaminace vzniká při hnojení fekáliemi nemocných zvířat, v důsledku používání nekvalitních krmiv obsahující velký počet listérií. Kvůli bezpříznakovým či neléčeným onemocněním zvířat může dojít ke kontaminaci zeleniny a ovoce hnojenými těmito hnojivy nebo při špatném vykrvení infikovaného zvířete může dojít i ke kontaminaci masa při porážkách zvířat. Sekundární kontaminace je způsobena zpravidla znečištěním produkčního prostředí a jiných potravinářských závodů. Kromě toho *L. monocytogenes* snadno tvoří biofilm, což jí pomáhá přežít delší dobu v potravinách rostlinné a živočišné produkce (např. přežití více než 10 let ve stejném produkčním prostředí). V neposlední řadě dochází ke kontaminaci potravin listériemi v průběhu přípravy pokrmů a k jejich pomnožení při uchovávání při pokojové teplotě (Beumer, 2003; Blažková, 2006; Swaminathan, 2007).



Obrázek č. 6: Koloběh kontaminace *L. monocytogenes*

(zdroj: https://www.researchgate.net/figure/L-monocytogenes-contamination-sources-Transmission-scenarios-for-L-monocytogenes_fig1_355118522)

3.1.1.2 Sérotypizace *Listeria monocytogenes*

Kmeny *L. monocytogenes* jsou sérotypizovány podle variací somatických (buněčných) (O) a flagelárních (bičíkatých) (H) antigenů za použití komerčních sér (viz Tabulka č. 2). Na základě sérologické reakce ve formátu skličkové aglutinace jsou kmeny *L. monocytogenes* rozděleny na 13 sérotypů. Každý z těchto sérovarů může způsobit onemocnění člověka. Nicméně 98 % hlášených případů lidské listeriózy je způsobeno pouze třemi sérovary 1/2a, 1/2b a 4b, přičemž sérovar 4b způsobuje 33–50 % listerióz na světě. Zajímavé je, že ikdyž nejčastějším sérotypem izolovaný z potravin je sérotyp 1/2a, většinu lidských epidemií způsobuje sérotyp 4b. Proto, je pravděpodobné, že označení sérotypu je spojeno s virulencím potenciálem. Zároveň může být důvodem častějších výskytů sérotypu 4b lepší snášenlivost vůči kritické kyselosti v žaludku. Podíl sérotypů na vzniku onemocnění v klinických vzorcích je: 4b (37 až 64 %); 1/2b (10 až 35 %); 1/2a (15 až 25 %); 3 (1 až 2 %); 4 ne b (0 až 6 %); 1/2c (0 až 4 %) (Borucki, 2003; Liu, 2006; Brychta, 2015).

Tabulka č. 2: Sérotypy *L. monocytogenes*^{a)} (upraveno dle Farbera, 1991)

Sérotyp	Somatické antigeny (O)	Flagelární antigeny (H)
1/2a	I, II, III	A, B
1/2b	I, II, III	A, B, C
1/2c	I, II, III	B, D
3a	II, III, IV	A, B
3b	II, III, IV, (XII), (XIII)	A, B, C
3c	II, III, IV, (XII), (XIII)	B, D
4a	III, (V), VII, IX	A, B, C
4ab	III, V, VI, VII, IX, X	A, B, C
4b	III, V, VI	A, B, C
4c	III, V, VII	A, B, C
4d	III, (V), VI, VIII	A, B, C
4e	III, V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
7	III, XII, XIII	A, B, C

a) Faktory v závorce nebyly pokaždé detekovány

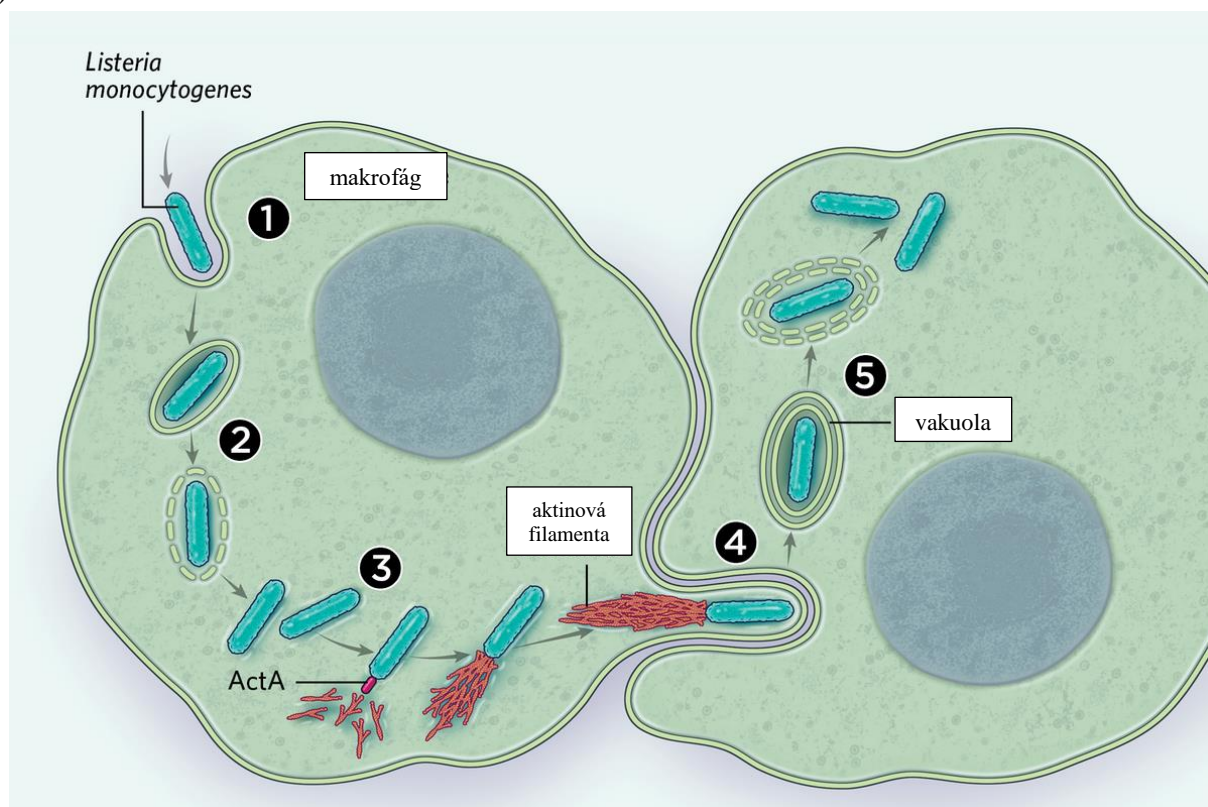
3.1.1.3 Faktory virulence

V buněčné stěně a cytoplazmatické membráně *L. monocytogenes* se nachází početná řada proteinů. Tyto proteiny jsou uzpůsobeny k proniknutí do hostitelských buněk, k jejich přežití v nich a zároveň i postupnému dalšímu šíření (viz Obrázek č. 7). Zmíněné proteiny nezbytné pro šíření a přežití bakterií v hostitelských buňkách jsou nazývány virulentními proteiny (Blažková, 2005).

Klíčovými faktory virulence zprostředkovávající vstup do hostitelských buněk jsou povrchové proteiny (internaliny A a B). Internalin A (InlA), který interaguje s E-cadherinem přítomným na povrchu hostitelské buňky, zprostředkovává vstup *L. monocytogenes* do střevní epiteliální buňky. Pronikání do organismu je možné přes různé tělní bariéry (intestinální, hemazoencefalitická či placentární). Po pohlcení *L. monocytogenes* fagocytární vakuolou dochází k rozpuštění vakuolové membrány pomocí aktivovaného hemolyzinu (listeriolysin O) v kombinaci s působením fosfolipázy C (specifická pro fosfatidylinositol). Po úniku z vakuoly vstupuje *L. monocytogenes* do cytoplazmy hostitelské buňky, kde se replikuje a dále roste. Do 2 hodin po infekci se díky proteinu ActA polymerizuje buněčný aktin, díky kterému se může bakterie šířit z buňky do buňky. Struktura podobná ohonu komety se tímto prodlužuje a bakterie je zatlačena do sousední buňky, která ji následně pohltí. V nové buňce je bakterie znovu zapouzdřena ve vakuole se dvěma membránami. K rozpuštění těchto membrán a uvolnění *L. monocytogenes* do cytosolu slouží druhý enzym fosfolipázy lecitináza PlcB. Po uvolnění do cytosolu se bakterie intracelulárně množí a pohybují v nově napadené buňce. Výše popsané děje se opakují a ohnisko infekce se těmito procesy dále rozšiřují z buňky do buňky (Farber, 1991; Blažková, 2005; Bergey, 2009; Ricci, 2018).

Hemolyzin *L. monocytogenes* je rozpoznán jako hlavní faktor virulence a jeho sekrece je nezbytná pro podporu intracelulárního růstu a rozpoznávání T-buněk organismu (Farber, 1991). Teplota, osmotický stres a pH ukázaly, že mají vliv na profil virulence (Ricci, 2018). Virulence pro *Listeria monocytogenes* je tedy multifaktoriální vlastností a alespoň devět genů a jejich

produktů je vyžadováno pro infekci, invazi, přežití, mobilitu a šíření z buňky do buňky (Bergey, 2009).



Obrázek č. 7: Virulence *L. monocytogenes*

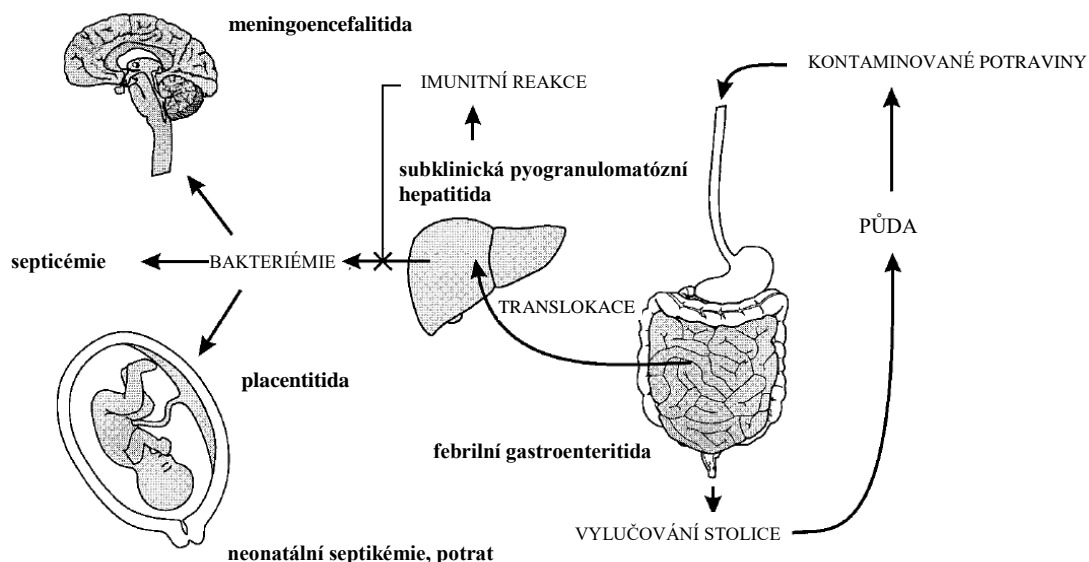
(zdroj: <https://www.the-scientist.com/infographics/infographic-how-intracellular-bacteria-manipulate-host-cells-70747>)

3.1.1.4 Listeriόza

Onemocnění, kterou *L. monocytogenes* způsobuje, se nazývá listeriόza. Poprvé bylo toto onemocnění popsáno v roce 1926 u králíků a morčat, kdy bakterie *L. monocytogenes* způsobovala u těchto savců epizootie. Po mnoho let byla listeriόza považována pouze za onemocnění zvířat. Na konci 70. let a začátku 80. let se však počet zpráv o nákaze člověka listériemi začal zvyšovat a od roku 1983 se objevila série epidemických ohnisek u lidí v Severní Americe a Evropě, které jasně ukázaly, že listeriόza je závažnou infekcí přenášenou potravinami (Schuchat, 1991; Swaminathan, 2007). Listeriόza má většinou velmi progresivní a těžký průběh. Hlavní příčinou jsou účinné mechanismy, kterými *Listeria monocytogenes* infikuje savčího hostitele (Gray, 1966).

Jedná se o alimentární onemocnění, tedy infikování hostitelského organismu perorálně požitím potravy, která obsahovala infekční dávku listérií. Tu nelze jednoznačně stanovit, jelikož je různá pro zdravého člověka a pro rizikové skupiny obyvatel. Pro zdravého člověka je určena infekční dávka v rozsahu $1,31 \times 10^8$ až $5,01 \times 10^{11}$ buněk, zatímco infekční dávka pro rizikové skupiny se pohybuje mezi 10^2 až 10^3 buněk. Do rizikových skupin se řadí novorozenci, těhotné ženy, osoby vyššího věku (obvykle nad 65 let) a osoby s oslabenou imunitou (nádorově nemocní, nemocní s AIDS, žloutenkou, diabetem, osoby dlouhodobě léčené imunosupresivy a antacidy (Doumith, 2004; Schardt, 2017; Brychta, 2018). K infekci může dojít i přes kůži, např. u veterinářů, ošetřovatelů, řezníků či uzenářů, kteří byli v přímém

kontaktu s infikovanými zvířaty. Objasnění epidemiologie listeriózy brání často dlouhá inkubační doba onemocnění, často přesahující 30 dnů. I ta se může lišit od několika dnů až týdnů (rozsah 11–70 dní) v závislosti na infekční dávce, virulenci bakterií a imunitním stavu pacienta či jeho citlivosti na infekci. Právě interval od požití potravy do projevu prvních symptomů odlišuje listeriózu od jiných alimentárních infekčních onemocnění (Schuchat, 1991; Swaminathan, 2007; Brychta, 2018; Ricci, 2018;).



Obrázek č. 8: Patofyziologie listeriózy

(zdroj: Vazquez-Boland, 2001)

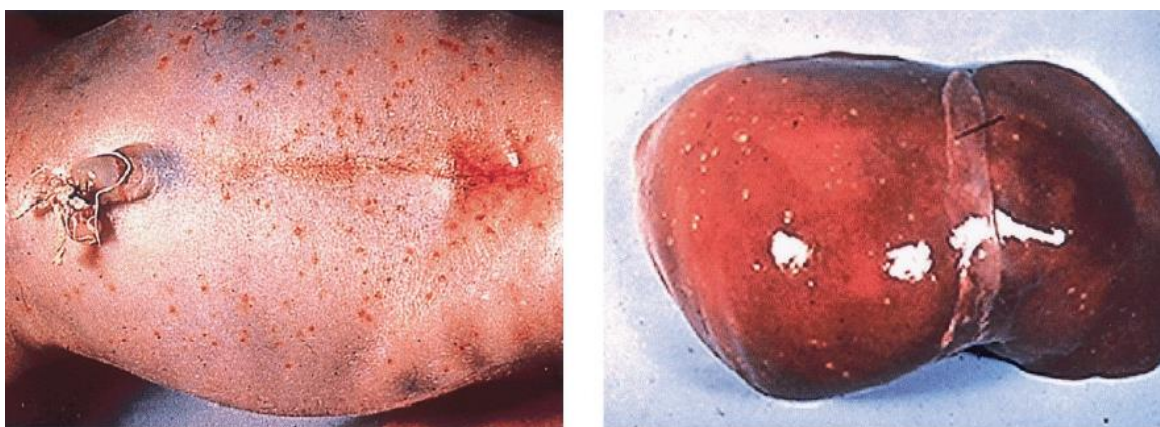
Výskyt listeriózy se v různých zemích pohybuje mezi 0,1 a 11,3 případů nemoci na 1 000 000 lidí v populaci. Průběh listeriózy může být bezpříznakový, příznakový neinvazivní či invazivní. U bezpříznakového průběhu nakažený člověk nevykazuje žádné symptomy, tudíž ani nepozná, že byl *L. monocytogenes* nakažen. U příznakového průběhu se listerióza často projevuje nespecifickými příznaky podobné chřipce (např. zimnice, únava, bolest hlavy a bolesti svalů a kloubů) či gastroenteritidě. U zdravých jedinců infikovaných listeriózou mohou být hlavními příznaky průjem a horečka (Vazquez-Boland, 2001; Zhu, 2017; Brychta, 2018). Onemocnění se může projevit také jako kožní listerióza, což je ekzematózní kožní infekce způsobená přímým vystavením neporušené kůže s *L. monocytogenes*. Typicky se tato forma onemocnění může vyskytnout u veterináře, který byl vystaven nemocnému zvířeti – často po listeriálním potratu (Swaminathan, 2007; Zhu, 2017). U neinvazivních forem listeriózy se symptomy ohrožující život vyskytují jen vzácně a většinou spontánně odezní sami během pár dní. Tyto projevy jsou samoomezujícími klinickými stavy s nespecifickými příznaky, a proto jsou pravděpodobně značně poddiagnostikovány.

Nejvíce nebezpečná forma je systémová invazivní listerióza (viz Obrázek č. 8), kterou způsobují vysoce invazivní formy *L. monocytogenes*, které se mohou rozšířit do celého těla a infikovat tak běžně sterilní části těla, mezi něž patří játra, slezina, mozkomíšní mok nebo krev (Swaminathan, 2007; Zhu, 2017). Po požití a průchodu přes žaludek, se *L. monocytogenes* množí ve střevním lumenu, prochází střevní bariérou, vstupuje do krevního oběhu a hromadí se v játrech a slezině. Listérie jsou v játrech chráněny před imunitním systémem infikovaného

organismu a mohou se tak dál bez problémů množit v jaterních buňkách (Schuchat, 1991; Ricci, 2018). Odtud jsou listérie dále krví transportovány do dalších částí těla (mozek, placenta, plíce, srdce, oko atd.). Vzhledem k závažnosti tohoto onemocnění, se většina hlášených případů projevuje jako život ohrožující onemocnění jako je maternofetální listerióza nebo neonatální listerióza, infekce krevního řečiště a meningoencefalitida. Bez vhodné antibiotické léčby se může navíc rozvinout septikémie, meningitida, potraty a v některých případech i smrti pacienta (Vazquez-Boland, 2001).

Velmi nebezpečnou infekcí je výše zmíněná neonatální infekce. Mateřský organismus zde figuruje jako zdroj nákazy, kdy listérie pronikají přes placentu a následně infikují plodovou vodu. Novorozenecká listerióza může být klasifikována jako časná nebo pozdní infekce (méně častá – 10 až 15 % případů). Důsledkem časná listeriózy je potrat (obvykle od 5. měsíce) nebo narození dítěte či mrtvého plodu s klinickým syndromem známým jako granulomatózní infantiseptica způsobující mikroabscesy (na povrchu těla a vnitřních orgánech plodu) a vysokou mortalitu. Toto onemocnění vyobrazuje Obrázek č. 9. Pozdní listerióza se vyskytuje obvykle 1 až 8 týdnů po porodu a zahrnuje syndrom meningitidy a v některých případech i gastroenteritidu a zápal plic. Při hospitalizaci infikovaných pacientů je potřeba dbát na protiepidemická opatření z důvodu ohrožení nozokomiální infekce (Vazquez-Boland, 2001; Blažková, 2006). Kromě těchto syndromů se listerióza může projevit jako fokální infekce v důsledku hematogenního šíření. Fokální infekce nejčastěji postihují pobřišnici, klouby, endokard nebo oči (Swaminathan, 2007).

I když lidská listerióza má nízkou míru výskytu oproti salmonelóze či kampylobakterióze a jiným běžným alimentárním patogenům, svou úmrtností a závažností je výrazně převyšuje (Borucki, 2003; Liu, 2006; Brychta, 2018;). Listeriíza má vysokou průměrnou úmrtnost 20 až 30 % navzdory včasné antimikrobiální léčbě (Schardt, 2017).



Obrázek č. 9: Mrtvý novorezenec s infekcí *L. monocytogenes*, klinický stav známý také jako granulomatosis infantiseptica, játra novorozence
(zdroj: Vazquez-Boland, 2001)

3.1.1.5 Léčba a prevence listeriózy

Izoláty *L. monocytogenes* jsou značně citlivé na širokou škálu antibiotik – na penicilin G, ampicilin, aminoglykosidy, trimethoprim, chloramfenikol, tetracyklin, makrolidy

a vankomycin (Bednář, 1996; Swaminathan, 2007;). Vykazují sníženou citlivost resp. rezistenci na sulfomethoxazol, cefalosporiny a staré chinolony, ale jsou obecně citlivé na fluorochinolony. Získaná antimikrobiální rezistence u klinických kmenů je vzácná, ale byla nalezena s významnou frekvencí u zvířecích izolátů. Toto zjištění je důvodem k obavám a může naznačovat objevení rezistence u klinických lidských izolátů. Obecně je léčba invazivní listeriózy doporučovaná jako podpůrná terapie doprovázená vysokými dávkami intravenózního penicilinu nebo ampicilinu často v kombinaci s aminoglykosidem. Volenými léky u pacientů se známou alergií na peniciliny je vankomycin-teikoplanin nebo trimethoprim-sulfamethoxazol (Bednář, 1996; Swaminathan, 2007). Cefalosporiny by se neměly k léčbě listeriózy používat kvůli různým selháním během jejich podávání (Schuchat, 1991). Klinické zkušenosti s fluorochinolony chybí (Swaminathan, 2007). Doba trvání léčby listeriózy není standardizována. Doporučená doba léčby se pohybuje od 2 týdnů terapie nekomplikované sepse nebo meningitidy a do 4 až 6 týdnů terapie endokarditidy nebo nemeningokokového onemocnění (Schuchat, 1991). Léčba nesmí být přerušovaná či rychlá, může totiž dojít k relapsu nemoci a bez výjimky končí tyto případy fatálně (Gray, 1996).

Jednou z mnoha možností prevence je striktní dodržení hygienických a sanitačních postupů ve zpracování potravin v potravinářském průmyslu, kde ke kontaminaci může běžně docházet (Janakiraman, 2008). Dle Brychty (2018) byl Evropskou unií přijat integrovaný přístup k bezpečnosti potravin od zemědělské produkce po spotřebu konzumentem. Tento přístup umožňuje hodnocení rizik a poskytuje jejich zajištění všemi klíčovými aktéry, jako jsou členské státy EU, Evropská komise, Evropský parlament, EFSA (The European Food Safety Authority neboli Evropský úřad pro bezpečnost potravin) a ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control neboli Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí) (Brychta, 2018).

Dalším krokem preventivních opatření je omezení konzumace rizikových potravin. Těmi mohou být syrové nepasterované mléčné výrobky a špatně tepelně upravené maso. Rizika se mohou snížit i správným postupem při tepelné úpravě potravin, řádným omytím zeleniny, sanitací pracovních ploch a nástrojů či osobní hygienou (Brychta, 2018).

V neposlední řadě lze prebiotiky podpořit různorodost střevní mikrobioty, která výrazně snižuje kolonizaci střevního lumenu *Listeria monocytogenes* a zabraňuje tak jejímu systémovému šíření (Becattini, 2017).

3.2 Prebiotika

Definice prebiotik byla poprvé představena v roce 1995 Gibsonem a Roberfroidem jako nestravitelná složka potravy. Jedná se o látky, které lidské tělo nedokáže strávit, které odolají žaludeční kyselině a nerozkládají se při působení savčích enzymů a nejsou absorbovány v gastrointestinálním traktu. Prebiotika jsou fermentována střevní flórou a selektivně stimulují určitý počet přítomných bakterií v tlustém střevě, čímž se změní jejich růst a aktivita příznivě ovlivňuje hostitele (Davani-Davari, 2019; Wang, 2020; You, 2022).

V roce 2016 ISAPP organizace redefinovala prebiotika jako látky, které lze selektivně využívat a transformovat hostitelskými mikroorganismy za předpokladu, že jsou prospěšné pro zdraví hostitele. Nová definice prebiotik zahrnuje i látky, které se nezařazují mezi sacharidy

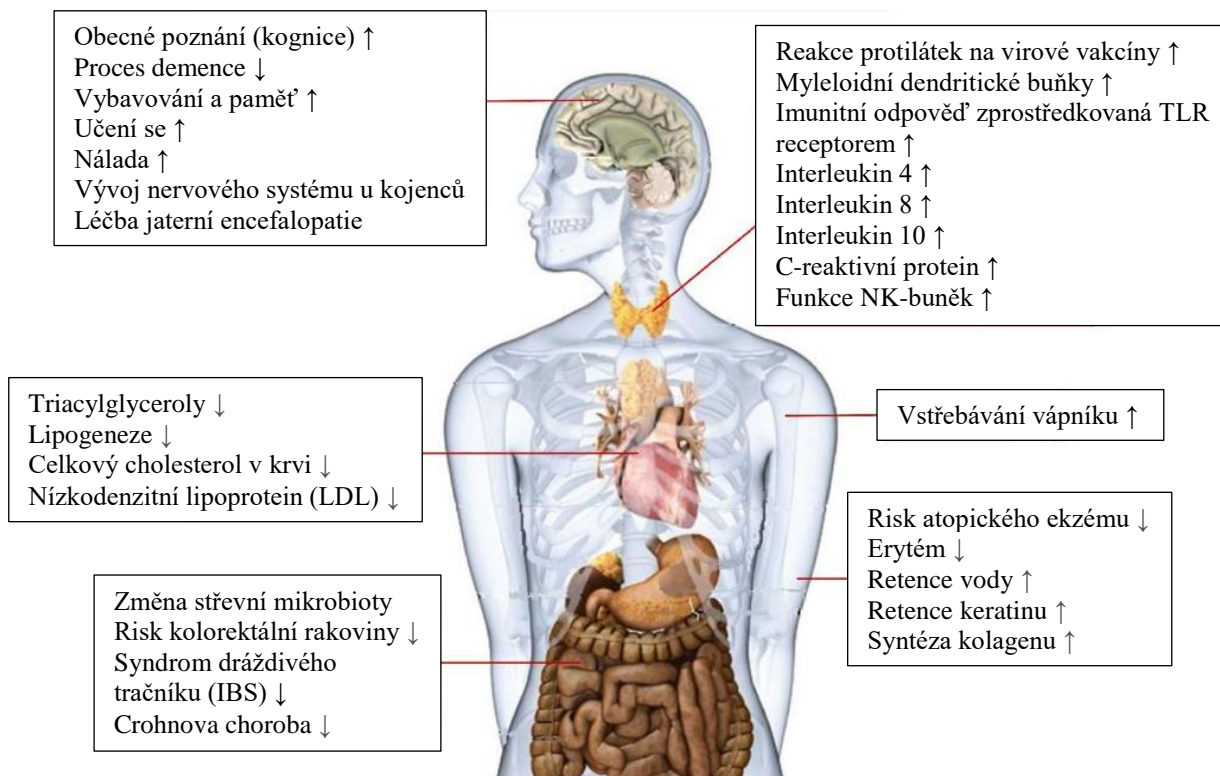
a místo účinku není omezeno na gastrointestinální trakt (GIT), ani není omezena na typ konzumované potraviny (Lockyer, 2019; You, 2022; Fan, 2023).

Nejrozšířenějšími prebiotiky jsou β -glukany, inulin, fruktooligosacharidy (FOS), beta-galaktooligosacharidy (GOS), laktulóza a oligosacharidy mateřského mléka (OMM). Podle nové definice byla zařazena nová prebiotika jako např. rezistentní škrob, xylooligosacharidy (XOS), cukerné alkoholy, laktosacharóza, alfa-galaktooligosacharidy (jinak také oligosacharidy rafinózové řady – RSO), izomaltooligosacharidy (IMO) a pekto-oligosacharidy (POS) (Wang, 2020).

Prebiotika jsou schopna modulovat složení a funkci mikroorganismů, kterým dodávají energii v podobě uhlíkových zdrojů. Pomocí metagenomické metody bylo zjištěno, že fylogeneticky odlišné bakteriální druhy jsou schopné konzumovat stejné specifické prebiotikum (např. kmeny *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* a *Firmicutes* dokáží fermentovat FOS, GOS a XOS). Naproti tomu existují konkrétní druhy degradující specifická prebiotika. Příkladem je *Bifidobacterium* sp. schopné fermentace rezistentních škrobů, fruktanů a galaktanů (Davani-Davari, 2019; Lockyer, 2019). Další komenzální bakterii, která využívá prebiotika ke svému růstu, je bakterie *Lactobacillus*. U ní je často pozorován růst po konzumaci laktulózy a GOS (Wang, 2020). V současnosti přijímaná prebiotika by měla zvyšovat především počet bifidobakterií v lidské mikrobiotě. Struktura fruktanů a galaktanů vysvětluje jejich bifidogenní účinek (schopnost stimulovat růst bifidobakterií). Tyto sacharidy obsahují vazby, které jsou degradovány enzymy β -fruktosidázou (produkované bifidobakteriemi, laktobacily a bakteroidy) a β -galaktosidázou (produkovanou bifidobakteriemi). Bifidobakterie přednostně metabolizují substráty s délkou řetězců o velikosti oligosacharidů. Tím se prebiotika liší od vlákniny, jako jsou pektin, celulóza a xylany, které podporují růst široké škály střevních mikroorganismů (jak s příznivými, tak i s nepříznivými účinky na makroorganismus) (Lockyer, 2019). Bakterie, které jsou schopny štěpit prebiotika a zároveň podporují zdraví hostitele, jsou označovány jako probiotika. Kombinace prebiotik a probiotik, které jsou schopné tyto látky štěpit, se nazývá synbiotikum (Rada, 2010).

Díky štěpení prebiotik vznikají v prostředí různé metabolity. Hlavními produkty fermentace prebiotik jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA – short-chain fatty acid). Jedná se například o acetát, butyrát, propionát atd. Tyto produkty snižují pH prostředí a tím ovlivňují růst nežádoucích či patogenních bakterií jako jsou například klostridie, kolibakterie, salmonela, listérie aj. Je prokázáno, že změna pH přispívá k transformaci populace střevní mikroflóry (Heinrich, 2015; Davani-Davari, 2019). Zároveň vyživují buňky střevního epitelu a tím podporují imunitní systém hostitele (Davani-Davari, 2019).

Společně s dalšími sekundárními metabolity jsou tyto molekuly díky své velikosti difundovány střevními enterocyty a transportovány do jater portální žilou. Tímto jsou prebiotika schopná ovlivnit nejen gastrointestinální trakt (GIT), ale i další vzdálené orgány a systémy (centrální nervový systém, imunitní systém a kardiovaskulární systém) (Davani-Davari, 2019; You, 2022). Prebiotika mají imunologickou funkci (regulují imunitu), zvyšují odolnost vůči patogenům, zlepšují funkci střevní bariéry, pozitivně ovlivňují metabolismus, zvyšují vstřebávání minerálů a snižují hladinu lipidů v krvi (You, 2022). Účinky prebiotik jsou vyobrazené na Obrázku č. 10.



Obrázek č. 10: Účinky prebiotik na zdraví jedince
(zdroj: upraveno dle Davani-Davari, 2019 a You, 2022)

Prebiotika jsou přirozeně přítomna v různých potravinách jako je ovoce, zelenina, celozrnné a luštěniny. Jsou nejčastější složkou cibulí, česneků, artyčoků, pórků, čekanek nebo topinamburů. Dále se mohou nacházet i v řasách, semenech nebo mikroorganismech obsahujících polysacharidy, polyfnoly a polypeptidové polymery (Heinrich, 2015; Lockyer, 2019; You, 2022).

Předpokládá se, že prebiotika nemají život ohrožující nebo závažné vedlejší účinky. Například vysoké (40–50 g/den) denní dávky prebiotik mohou způsobit plynatost a osmotický průjem. Doporučený denní příjem prebiotik je 2,5–10 g, aby došlo k uplatnění příznivých funkcí pro lidské zdraví. Většina produktů prebiotik na trhu má dávky 1,5–5 g/porce (Heinrich, 2015; Davani-Davari, 2019).

3.2.1 Beta-glukany

Beta-glukany jsou ve vodě částečně rozpustné polysacharidy sestávající z glukózových jednotek. Beta-glukany jsou bobtnavé a mohou zvyšovat viskozitu, a tím i podporují široké spektrum pozitivních účinků v lidském organismu. β -glukany se řadí ke skupině hemicelulóz a patří částečně k rozpustné i nerozpustné vláknině. Monomery glukózy jsou spojeny prostřednictvím β -(1,3) glykosidických vazeb a nachází se v bakteriích a řasách. Zde slouží β -glukany jako stavební jednotky buněčných stěn a vyplňují prostory mezi vlákny celulózy. Zatímco v kvasinkách a houbách jsou monomery glukózy spojeny prostřednictvím β -(1,3) a β -(1,6) glykosidických vazeb a mohou sloužit i jako významné potravní doplňky či jsou složky farmaceutických a kosmetických přípravků. V ovsu a ječmenu jsou monomery glukózy spojeny prostřednictvím β -(1,4) a β -(1,3) glykosidických vazeb, jejich poměr se však mezi druhy

obilovin liší. Tyto beta-glukany se nacházejí především ve vnějších vrstvách obilného zrna. β -glukan získaný z bakterií a řas vykazuje nevětvenou (lineární) strukturu, zatímco β -glukan extrahovaný z kvasnic, hub, ovsa a ječmene vykazuje rozvětvenou strukturu (Mitmesser, 2017; Mudgil, 2017; Sluková, 2017). Část β -glukanů se podílí na udržení hladiny cholesterolu a glukózy v krvi. Naopak imunostimulátory jsou β -glukany, jejichž schopnost podporuje imunitní reakce v lidském organismu (Sluková, 2017).

3.2.2 Inulin a fruktooligosacharidy (FOS)

Inulin se společně s fruktooligosacharidy neboli FOS se řadí do skupiny fruktanů. Základní struktura těchto sacharidů se skládá z jednotek fruktózy s β -glykosidickou vazbou, β -(1,2).

U inulinu se jedná o 10 až 60 fruktózových jednotek, je tedy řazen mezi polysacharidy. FOS jsou kratší a skládají se z 3 až 7 jednotek fruktózy (Davani-Davari, 2019; Lockyer, 2019). Existují dva typy fruktooligosacharidů, které se dělí na F_n typ a GF_n typ. FOS složené pouze z jednotek fruktózy se nazývají inulooligosacharidy (IOS) neboli F_n fruktooligosacharidy. Fruktooligosacharidy složené z jednotek fruktózy, zakončené molekulou glukózy (vázané stejnou vazbou jako u sacharózy), se nazývají GF_n fruktooligosacharidy (kde G = glukóza, F = fruktóza a n = počet jednotek fruktózy) (Bohačenko, 2014).

Inulin je přítomen v potravinách, jako je např čekanka, pórek, chřest, cibule, pšenice, česnek, oves, sójové boby a topinambury. FOS se nacházejí v ovoci, zelenině a potravinách z obilovin. Lze je syntetizovat transfruktosylací sacharózy nebo enzymatickou degradací inulinu (Lockyer, 2019).

Inulin purifikovaný z kořene čekanky může být používán jako náhrada tuku a cukru ve výrobcích (PHE – Public Health England, 2018). V současné době se přidává inulin do některých sušených mlék, pekárenských výrobků, cereálií a cereálních tyčinek (Lockyer, 2019). Fruktooligosacharidy mají řadu prospěšných fyziologických účinků, jako je nízká karcinogenita, zlepšení vstřebávání minerálních látek ve střevě a snižování hladiny sérového cholesterolu, triacylglycerolů a fosfolipidů. FOS zlepšují činnost střevní mikroflóry, zmírňují zácpu, snižují riziko srdečních onemocnění a některé druhy rakoviny, snižuje hladinu lipidů v krvi při hyperlipidémii, inhibuje produkci střevních hnilobných látek a umožňují, aby trávicí systém těla fungoval lépe (You, 2022). Směsi FOS a GOS se přidávají také do některých kojeneckých výživ, kvůli navrhované účinnosti při snižování rizika alergie (Lockyer, 2019).

3.2.3 Galaktooligosacharidy

Galaktooligosacharidy se mohou rozdělovat dle vazeb na α -galaktooligosacharidy a β -galaktooligosacharidy. Navzájem se liší strukturou i zdrojem, ze kterých se získávají. Pod pojmem galaktooligosacharidy (GOS), se ve většině případech jedná o β -galaktooligosacharidy. Alfa-galaktooligosacharidy jsou spíše označovány jako oligosacharidy rafinózové řady (RSO) (Davani-Davari, 2019; Lockyer, 2019; Mei, 2022).

3.2.3.1 β -Galaktooligosacharidy (GOS)

β -Galaktooligosacharidy (GOS) se skládají z 2 až 8 cukerných jednotek, z nichž jedna je a terminální glukóza a zbytek jsou galaktóza a disacharidy (obsahující dvě galaktózové jednotky). GOS neboli α -D-glukosa-(1,4)- β -D-galaktosa-(1,6)_n se skládá z β -glykosidických vazeb β -(1,6), β -(1,3) či β -(1,4). Tyto GOS jsou vyrobené z laktózy prostřednictvím enzymatické trans-glykosylace, dle které jsou též nazývané jako trans-galaktooligosacharidy (TOS). Nejsou snadno stravitelné a vstřebatelné tělem (Davani-Davari, 2019; Lockyer, 2019; You, 2022).

Galaktooligosacharidy jsou jedním z nejvíce běžných a široce používaných prebiotik. Mají mnoho zdravých prospěšných vlastností, jako je regulace rovnováhy mikrobioty v tlustém střevě a podpora proliferace bakterií rodu *Bifidobacterium* ve střevě. Zároveň jsou stimulovány vedle bifidobakterií i laktobacily a v menší míře i enterobakterie, dále i kmeny Bacteroidetes a Firmicutes. V současné době se GOS používají především v náhražkách lidského mléka (účinně nahrazují lidské mléko ve stanovení kojenecké mikrobioty) (Davani-Davari, 2019; You, 2022). GOS mohou být i prospěšné při prevenci cestovatelského průjmu a při zlepšování syndromu dráždivého tračníku (IBS). Izolovaný GOS lze přidat do ovocných a mléčných nápojů a mléčných výrobků (Lockyer, 2019).

3.2.3.2 α -Galaktooligosacharidy (RSO)

Mezi nejčastější α -galaktooligosacharidy neboli oligosacharidy rafinózové řady (RSO) se řadí rafinóza, stachyóza či verbaskóza. α -galaktooligosacharidy jsou produkovány transgalaktosylačními reakcemi α -galaktosidázy (α -Gal) nebo konverzí oligosacharidů rafinózové řady levansacharázou (Wang, 2014). Jsou vysoce zastoupeny v luštěninách, zejména pak v semenech lupiny či sójových bobech. Díky jejich výskytu se též nazývají jako sójové oligosacharidy (SOS). RSO jsou známé svými účinky vyvolávajícími plynatost (Johnson, 2017). Rafinóza se nachází v celé rostlině všudypřítomně, zatímco stachyóza či verbaskóza existují ve vakuolách určitých rostlin (Sharma, 2014).

Rafinóza je trisacharid tvořený α -D-galaktózou, α -D-glukózou a α -D-fruktózou. Má α i β glykosidické vazby, a proto může být hydrolyzován na D-galaktózu a sacharózu prostřednictvím enzymů s α -glykosidickou aktivitou a na melibiózu a D-fruktózu prostřednictvím enzymů s β -glykosidickou aktivitou. Bohatě se vyskytuje ve fazolích, hlávkovém zelí a dalších rostlinách (Chibbar, 2003; Moreno, 2012). Rafinóza může zvýšit růst bakterií mléčného kvašení, potlačit růst patogenních bakterií, zvýšit mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), snížit zácpu, inhibovat tvorbu hnilobných sloučenin z bílkovin a snížit riziko kardiovaskulárních onemocnění (Anggraeni, 2022).

Stachyóza je tetrasacharid tvořený dvěma α -D-galaktózovou, jednou α -D-glukózovou a jednou β -D-fruktózovou jednotkou, které jsou spojeny 3 glykosidickými vazbami. Vyskytuje se v řadě druhů zeleniny (fazole a sója), a v dalších rostlinách (Chibbar, 2003). Stachyóza může zvýšit aktivitu probiotik, jako jsou bifidobakterie a laktobacily, a regulovat rovnováhu mikrobioty v lidském gastrointestinálním traktu. Může podporovat tvorbu dominantních bakterií v trávicím traktu a inhibovat produkci patogenních bakterií, jako je *Clostridium* sp.

Stachyóza také podporuje střevní peristaltiku a urychluje vylučování patogenů a toxinů (He, 2020).

Verbaskóza je pentasacharid tvořený třemi galaktózovými jednotkami a jednou sacharózovou jednotkou navzájem spojenými glykosidickými vazbami. Verbaskóza se jako vyšší oligosacharid nachází pouze ve vakuolách určitých rostlinných druhů (Hanau, 2020). Verbaskóza může v rostlinách působit jako ochranný prostředek během dozrávacího sušení nebo jako zásoba uhlíku pro klíčení (Peterbauer, 2003).

3.2.4 Laktulóza

Laktulóza je nestravitelný, nevstřebatelný synteticky vyrobený disacharid. Laktulóza neboli galaktosyl β -(1,4)fruktóza je vyráběna z laktózy (mléčného cukru) alkalickou izomerizací, kdy se přeměňuje glukózová část v laktóze na fruktózový zbytek. Laktulóza se primárně používá v lékařství jako orální osmotické laxativum k léčbě zácpy, perorálně nebo jako rektální čípek při portosystémové encefalopatii (Tungland, 2018).

3.2.5 Oligosacharidy mateřského mléka (OMM)

Oligosacharidy mateřského mléka se liší v délce řetězce od 3 do 20 monosacharidů, je popsáno více než 200 struktur, a proto jejich umělá příprava je v současné době prakticky nemožná (Rada, 2010). Dále představují po laktóze a tucích třetí největší pevnou složku mateřského mléka (Corona, 2021).

Oligosacharidy mateřského mléka (OMM) mají rozličné funkce, jako je vlastní prebiotická podpora bifidobakterií ve střevě kojenců, vliv na rozvoj nervové soustavy nebo vstřebávání vápníku. Naopak negativně působí na adhezenci patogenních bakterií na střevní stěnu. OMM s definovanými strukturami působí jako cílená prebiotika pro bakterie rodu *Bifidobacterium* a tím modulují jejich růst a tvorbu zdravých prospěšných metabolitů (Lockyer, 2019; Fan, 2023). Podle struktury a jejich specifických vlastností jsou obvykle klasifikovány do tří hlavních kategorií: neutrální nefukosylované OMM (42–55 %), neutrální fukosylované OMM (35–50 %) a OMM obsahující kyselinu sialovou (12–14 %). Nejrozšířenějším OMM je 2'-fukosyllaktóza (2'-FL), která patří do fukosylované skupiny. Jedná se o trisacharid složený z jednotek L-fukózy, D-galaktózy a D-glukózy spojené α -(1,2) a β -(1,4) glykosidickými vazbami (α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-(1,4)-D-Glc) (Owen, 2018; Corona, 2021).

4 Metodika

Metodická část bakalářské práce se zaměřovala na sestavení vhodného kultivačního média pro jednoduché testování růstu *Listeria monocytogenes* na vybraných prebiotických sacharidech. Dále byla testována růstová schopnost *Listeria monocytogenes* na beta(1,3)-D-glukanu, inulinu, fruktooligosacharidech (FOS), galaktooligosacharidech (GOS), laktulóze, rafinóze, stachyóze, oligosacharidech mateřského mléka (OMM) a 2'-fukosyllaktóze. Pro testování byly vybrány sbírkové izoláty *Listeria monocytogenes* z Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky.

4.1 Příprava testovaných kultur *Listeria monocytogenes*

Pro testování růstové schopnosti *L. monocytogenes* na vybraných sacharidech byly vybrány 4 sbírkové izoláty *L. monocytogenes*, které prezentovali 4 nejvíce rozšířené sérotypy (4b, 1/2b, 1/2a a 1/2c). Každý izolát byl izolován z různého zdroje a to ze salámu Vysočina, ze stěru z pracovní desky v lahůdkářství, hovězího tataráku, a vegetariánského mletého masa (viz Tabulka č. 3).

Tabulka č. 3: Zdroje izolátů *L. monocytogenes*

Číslo vzorku	Sérotyp	Zdroje izolátů
1	4b	salám Vysočina
11	1/2b	stěru z pracovní desky v lahůdkářství
56	1/2a	hovězí tatarák
79	1/2c	vegetariánské mleté maso

Vybrané testované kmeny byly kultivovány v Brain heart infusion bujónu (BHI, Oxoid) za anaerobního prostředí, při 37 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci byla zkontrolována čistota čestřně narostlých kultur pomocí mikroskopu. Poté byla zapomoci denzitometru (Biosan) a McFarlandové zákalové stupnice stanovena koncentrace bakterií v kultuře. Na základě zjištěného zákalu, byla kultura dále ředěna sterilním fyziologickým roztokem na denzitu odpovídající hodnotě 1 na McFarlandově zákalové stupnici.

Pro odstranění kultivačního média od bakteriálních buněk bylo odebráno množství 1 ml narostlé kultury do mikrozkuumavek (typ Eppendorf). Eppendorfy byly následně centrifugovány po dobu 2 minut při 14,5 tis. otáček za minutu. Po vyjmutí z centrifugy byl odebrán supernatant a bakteriální peletka byla propláchnuta v 1 ml fyziologického roztoku. Toto propláchnutí bylo provedeno celkem 2x. Takto připravené kultury byly následně zaočkovány do testovaného média.

4.2 Sestavení vhodného média pro testování růstu *Listeria monocytogenes* na sacharidech

Podmínkou pro vhodné médium k testování růstu *L. monocytogenes* na vybraných prebiotických bylo složení kultivačního média, na kterém vybrané izoláty *L. monocytogenes*

nevykazují růst bez přidání zdroje sacharidu (zdroje uhlíku). Pro toto testování byla sestavena 4 různá bazální média s odlišným složením (viz Tabulka č. 4).

Tabulka č. 4: Seznam bazálních médií a jejich složení

Médium	Složení média
Minerální médium	Hydrogenfosforečnan draselný 1,73 g Dihydrogenfosforečnan draselný 0,86 g Heptahydrát síranu hořečnatého 0,1 g Chlorid sodný 4 g Heptahydrát síranu železnatého 0,03 g Dusičnan amonný 1 g Dihydrát chloridu vápenatého 0,02 g Demineralizovaná voda 1 l
API CHL 50	Bakteriologický pepton 10 g Kvasnicový extrakt 5 g Polysorbát 80 1 ml Citrát draselný 2 g Octan sodný 2 g Síran hořečnatý 0,2 g Síran manganatý 0,2 g Demineralizovaná voda 1 l
API® Listeria	Chlorid sodný 8,5 g ZYM B činidlo 5 ml Demineralizovaná voda 1 l
Vlastní médium	Trypton 5 g Chlorid sodný 9 g Demineralizovaná voda 1 l

Prvním pokusným médiem bylo minerální médium, které bylo připravené dle Sekara (2011). Skládalo se z hydrogenfosforečnanu draselného (Lachema), dihydrogenfosforečnanu draselného (Lachema), heptahydrátu síranu hořečnatého (Lachema), chloridu sodného (Lachema), heptahydrátu síranu železnatého (Lachema), dusičnanu amonného (Lachema), dihydrátu chloridu vápenatého (Lachema) a glukózy (Penta).

Druhým připravovaným médiem bylo API CHL50 médium, jehož příprava byla na základě kitu od firmy Biomérieux. To se skládalo z bakteriologického peptonu (Oxoid), kvasnicového extraktu (Oxoid), polysorbátu 80 (Lachema), citrátu draselného (Lachema), octanu sodného (Lachema), síranu hořečnatého (Lachema), síranu manganatého (Lachema).

Třetím médiem, které bylo navrženo k pokusu, bylo médium podle komerčního kitu API® Listeria (Biomérieux) sloužící pro identifikaci bakterií rodu *Listeria*. Médium obsahovalo 8,5 g/l chloridu sodného, a činidlo ZYM B, které obsahuje Fast Blue BB sůl neboli hemi (chlorid zinečnatý) sůl, metanol a dimethylsulfoxid (DMSO). Díky přidanému činidlu mohly aktivitu bakterií ukázat barevné změny v médiu.

Posledním zkoušeným médiem bylo vlastní médium obsahující 5 g/l tryptonu (Oxoid) a 9 g/l chloridu sodného (Lachema).

Jako jediný zdroj uhlíku byla pro stimulaci růstu *L. monocytogenes* v médiích použita D-glukóza o koncentraci 2 g/l (pozitivní kontrola).

Připravená média byla rozplněna po 9 ml do penicilínek. Penicilínky byly následně vloženy na 10 minut do vodní lázně při teplotě 80 °C. Ve vodní lázni proběhlo vytemperování médií a jejich nahřátí. Dále bylo médium v penicilínkách probubláváno oxidem uhličitým (CO₂), čímž bylo v médiích vytvořeno anaerobní prostředí. Penicilínky byly následně uzavřeny. Takto připravená média byla sterilována v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 °C. Po vychladnutí bylo do jednotlivých médiích zaočkováno 0,2 ml připravené kultury *Listeria monocytogenes* (kapitola 4.1). Pro testování růstu *L. monocytogenes* byla použita samotná bazální média i pozitivní kontroly s přidavkem D-glukózy. Takto připravené vzorky byly kultivovány 24 h při 37 °C. Každé médium bylo připraveno ve třech opakováních.

Pro jednoduché testování růstu *Listeria monocytogenes* na vybraných prebiotických sacharidech bylo vyžadováno číré médium před i po kultivaci u bazálního média, a číré médium před kultivací a zakalené médium po kultivaci u média představující pozitivní kontrolu.

4.3 Příprava médií pro testování růstu *Listeria monocytogenes* obsahující vybrané prebiotické sacharidy

Po otestování výše zmíněných médií (kapitola 4.2) bylo dále vybráno nejvhodnější médium, které bylo dále používáno pro testování růstu *Listeria monocytogenes* na vybraných prebiotících. Vybrána byla běžně používaná prebiotika v podobě potravních doplňků stravy beta(1,3)-D-glukan (Brainwag Inc.), inulin (Frutafit), fruktooligosacharidy (Nutri-extract), galaktooligosacharidy (Nutri-extract) a 2'-fukosyllaktóza (RAW'S). Dále byly vybrány také laktulóza (Sigma), rafinóza (Sigma), stachyóza (Sigma) a oligosacharidy mateřského mléka (izolované z mateřského mléka z Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, Ročková, 2011).

Beta(1,3)-D-glukan od výrobce Brainway Inc. byl složen ze 100 % z beta-glukanů z kvasinek a z toho více jak 86,6 % tvořil beta(1,3)-D-glukan. Inulin od firmy Frutafit měl čistotu více jak 92 %. Fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy byly vyrobeny výrobcem Nutri-Extract a obě prebiotika byla z více jak 95 % čistá (tedy v 1 litru se nacházelo 0,1 g těchto prebiotik). Od výrobce RAW'S pocházela 2'-fukosyllaktóza a ta se skládala z více jak 94 % z indikovaných prebiotik. Laktulóza od výrobce Sigma měla čistotu více jak 95 %. Rafinóza společně se stachyózou vykazovaly 98 % čistotu (Sigma). U oligosacharidů mateřského mléka není čistota známa.

Pro zajištění sterility kultivačního média a zároveň zabránění destrukce prebiotik byla prebiotika dodávána do média zvlášť. Nejprve byl připraven koncentrovaný roztok jednotlivých sacharidů, kdy bylo naváženo 1,8 g prebiotika do 9 ml fyziologického roztoku NaCl. Prebiotika byla ve fyziologickém roztoku řádně rozpuštěna a následně byl roztok sterilně přefiltrován přes injekční PES filtry s membránou o velikosti ok 0,22 µm (Rotilabo) do sterilních zkumavek. Připravené roztoky prebiotik se v množství 0,1 ml dále sterilně zaočkovaly do penicilínek s bazálním médiem. Konečná koncentrace sacharidu v penicilínkách s kultivačními médii byla 2 g/l.

Jediným prebiotikem, které nemohlo být sterilně přefiltrováno přes injekční PES filtry, byl beta(1,3)-D-glukan. Vzhledem k jeho částečné rozpustnosti ve vodě, nebylo možné jeho

přidání do médií jako u ostatních prebiotik. Na základě této vlastnosti byl beta-glukan vložen do bazálního média a následně došlo k jeho sterilování v médiu obdobně jako u glukózy.

4.4 Stanovení růstu *Listeria monocytogenes* na vybraných prebiotických sacharidech

Do připravených médií (kapitola 4.3) bylo sterilně zaočkováno 0,2 ml připravených kultur *Listeria monocytogenes* (kapitola 4.1). Každá skupina byla připravena ve třech opakováních. Jako pozitivní kontrola růstu bylo použito médium s přidavkem glukózy o koncentraci 2 g/l. Vzhledem k nečistotám vyskytujících se v testovaných prebiotických byla také zařazena kontrola s koncentrací glukózy odpovídající 5 % neznámých sacharidů, tzn. 0,1 g/l. Jako negativní kontrola růstu bylo použito bazální médium.

4.4.1 Stanovení růstu *Listeria monocytogenes* na vybraných prebiotických rozpustných ve vodě

U připravených vzorků obsahující sacharidy, které jsou rozpustné ve vodě (médium s přidavkem glukózy, inulinu, fruktooligosacharidů, galaktooligosacharidů, 2'-fukosyllaktózy, laktulózy, rafinózy, stachyózy, oligosacharidy mateřského mléka a médium bez sacharidů) bylo odebráno 0,1 ml vzorku a dáno do jamky v 96-jamkové mikrodestičce (VWR). Vzorky v destičce byly dále proměřeny pomocí přístroje Infinite M200 Tecan, který změřil denzitu vzorku při 620 nm. Připravené vzorky v penicilínkách byly kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci byly jednotlivé vzorky zkontrolovány pod mikroskopem, čímž proběhla kontrola čistoty kultur.

U zkontrolovaných vzorků byl opět odebrán vzorek o objemu 1 ml a byla opět proměřena denzita při 620 nm pomocí přístroje Infinite M200 Tecan. Poté byl určen rozdíl denzit na začátku a na konci experimentu a v programu Statgraphics byl vypočítán statisticky významný rozdíl mezi růsty u jednotlivých pokusných skupin.

4.4.2 Stanovení růstu *Listeria monocytogenes* na vybraných prebiotických nerozpustných ve vodě

U připravených vzorků obsahující beta(1,3)-D-glukan, nebylo možné kvůli vzniklému zákalu po přidání prebiotika do média, určit růst kultur pomocí měření denzity. Proto bylo nutné růst kultur monitorovat pomocí mikrobiologického rozboru vzorků. Pro srovnání růstu vůči médiu obsahující 2 g/l glukózy (pozitivní kontrole) a na médiu neobsahující žádný zdroj sacharidu (negativní kontrole) bylo nutné stanovit růst bakterií pomocí mikrobiologického rozboru i u těchto dvou skupin. Vzorky byly vždy vyhotoveny ve střezech opakováních.

Vzorky byly naředěny pomocí desítkového ředění až do 8. ředění (10^{-8}). Z penicilínek bylo odebráno 0,1 ml narostlé kultury a přeneseno do penicilínky obsahující 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Tím vzniklo 2. ředění (10^{-2}). Z druhého ředění bylo odebráno opět 0,1 ml roztoku a následně bylo vloženo do další penicilínky obsahující opět 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Tím vzniklo 4. ředění (10^{-4}). Šesté ředění probíhalo stejně jako předešlé ředění. Sedmé a osmé ředění už proběhlo odběrem 1 ml roztoku z předchozího ředění. Z 6., 7. a 8. ředění byly naředěné vzorky nanášeny v množství 0,5 ml do petriho misek

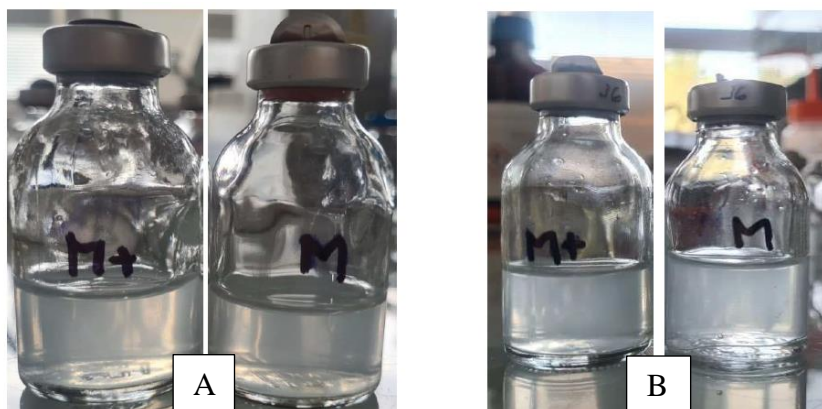
a přelity BHI agarem. Takto připravené petriho misky byly dále kultivovány aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin.

Po získání počtů bakterií v jednotlivých médiích před i po kultivaci byl určen rozdíl počtu na začátku a na konci experimentu a v programu Statgraphics byl vypočítán statisticky významný rozdíl mezi růsty u jednotlivých pokusných skupin.

5 Výsledky

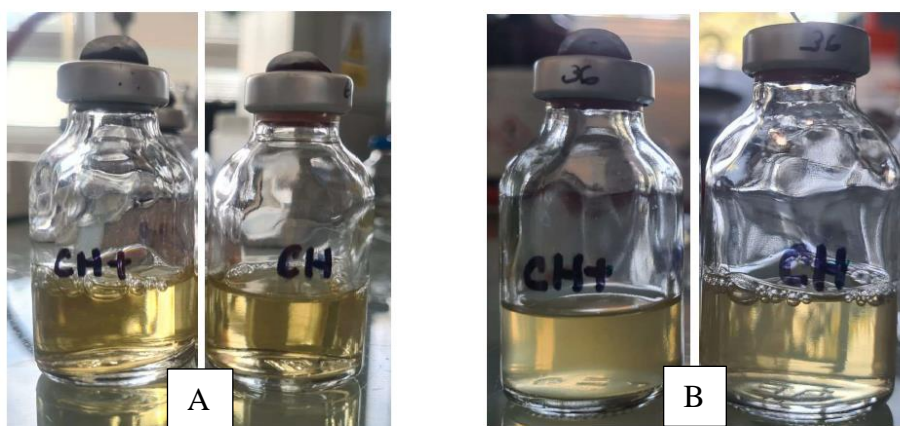
5.1 Stanovení vhodného média pro testování růstu *Listeria monocytogenes* na vybraných prebiotických

Prvotním cílem bylo stanovit médium vhodné pro kultivaci a testování růstu *Listeria monocytogenes*. U minerálního média byl pozorován zákal již po přípravě média a nebylo možné tudíž rozpoznat růstovou schopnost *L. monocytogenes* ani po kultivaci vzorků. Rozdíly mezi oběma kontrolami nebyly žádné. Z tohoto důvodu nebylo minerální médium vybráno k testování. Porovnání může být patrné na Obrázku č. 11.



Obrázek č. 11: Vzhled minerálního média před kultivací (A) a po kultivaci (B). M+: pozitivní kontrola s glukózou (2 g/l), M: negativní kontrola bez sacharidu

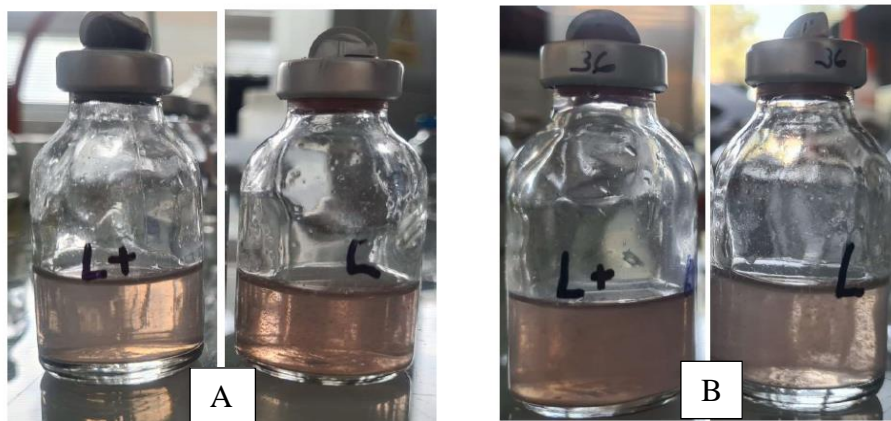
Na médiu API CHL 50 nebyl pozorován zákal po přípravě média. Kmeny *L. monocytogenes* byly ovšem schopny růst i na samotném bazálním médiu bez přidání sacharidů, tudíž rozdíl v zákalech po kultivaci u médií nebyl patrný (viz Obrázek č. 12). Médium bylo tudíž vyhodnoceno jako nevhodné pro testování.



Obrázek č. 12: Vzhled média API CHL 50 před kultivací (A) a po kultivaci (B). CH+: pozitivní kontrola s glukózou (2 g/l), CH: negativní kontrola bez sacharidu

U média API® Listeria bylo cílem detekce růstu změna barvy média. Po přípravě média byla barva médií stejná. Barva média se ovšem nezměnila ani po kultivaci média, tudíž kmeny listérií navykazovaly růst na tomto médiu (Obrázek č. 13).

Proto bylo médium API® Listeria vyhodnoceno jako nevhodné médium pro testování růstové aktivity *L. monocytogenes*.



Obrázek č. 13: Vzhled média API® Listeria před kultivací (A) a po kultivaci (B). L+: pozitivní kontrola s glukózou (2 g/l), L: negativní kontrola bez sacharidu

Nejlépe se pro testování prokázalo vlastní médium (viz Obrázek č. 14). Narozdíl od ostatních médií byl růst bakterií viditelný na médiu obsahující glukózu a naopak nebyl viditelný na médiu, které neobsahovalo žádný sacharid. Médium tedy nevykazovalo žádné senzorické vady, jako byl u předchozích médií zákal či nedostatek růstu LM. Pro testování tudíž bylo vybráno médium vlastní, obsahující 5 g/l tryptonu (Oxoid) a 9 g/l chloridu sodného.



Obrázek č. 14: Vzhled vlastního tryptonového média před kultivací (A) a po kultivaci (B). T+: pozitivní kontrola s glukózou (2 g/l), T: negativní kontrola bez sacharidu

5.2 Stanovení růstu *Listeria monocytogenes* na vybraných prebiotických sacharidech

Po zjištění adekvátního média pro testování růstu *L. monocytogenes* bylo druhým cílem určení prebiotického sacharidu, který *L. monocytogenes* je schopná využívat pro svůj růst. Vzhledem k rozdílnému stanovení růstu byly vzorky s prebiotiky rozpustnými ve vodě vyhodnocovány zvlášť od prebiotik nerozpustných ve vodě.

5.2.1 Stanovení růstu *Listeria monocytogenes* na vybraných prebiotických rozpustných ve vodě

Výsledky stanovení růstu na prebiotických rozpustných ve vodě jsou vidět v Tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Růst *Listeria monocytogenes* na vybraných prebiotických sacharidech

	LM1	LM11	LM56	LM79	<i>Listeria monocytogenes</i> průměr ± SD
Sérotyp	4b	1/2b	1/2a	1/2c	-
Pozitivní kontrola (2 g/l glukózy)	0,313±0,072 ^A	0,280±0,052 ^A	0,254±0,064 ^A	0,259±0,059 ^A	0,276±0,064 ^A
Kontrola (0,1 g/l glukózy)	0,064±0,014 ^{ab}	0,064±0,002 ^{abC}	0,080±0,009 ^{abB}	0,067±0,003 ^{ab}	0,069±0,010 ^B
Negativní kontrola (žádné sacharidy)	0,032±0,038 ^{ab}	-0,012±0,052 ^{bd}	0,017±0,016 ^{abE}	0,010±0,005 ^{abC}	0,012±0,034 ^{DE}
Inulin	0,054±0,012 ^{bb}	0,055±0,008 ^{bbC}	0,094±0,026 ^{abB}	0,086±0,010 ^{abB}	0,072±0,023 ^B
Fruktooligosacharidy	0,052±0,062 ^B	0,059±0,017 ^{BC}	0,069±0,02 ^{BC}	0,033±0,011 ^{BC}	0,053±0,032 ^{BC}
Galaktooligosacharidy	0,016±0,035 ^{bb}	0,093±0,012 ^{ab}	0,035±0,005 ^{bcD}	0,023±0,015 ^{bc}	0,042±0,036 ^{BC}
Laktulóza	0,028±0,080 ^B	0,019±0,028 ^{CD}	-0,001±0,01 ^D	-0,010±0,001 ^C	-0,002±0,020 ^{DE}
Rafinóza	0,008±0,013 ^B	0,012±0,004 ^{CD}	0,007±0,012 ^D	-0,006±0,014 ^C	0,005±0,012 ^{DE}
Stachyóza	0,064±0,011 ^{ab}	0,022±0,017 ^{bcD}	0,029±0,010 ^{bcD}	0,005±0,010 ^{cC}	0,030±0,025 ^{CD}
2'-fukosyllaktóza	0,038±0,004 ^{ab}	0,025±0,006 ^{abCD}	0,030±0,009 ^{abCD}	0,022±0,012 ^{bc}	0,029±0,009 ^{CDE}
Oligosacharidy mateřského mléka	0,057±0,028 ^{ab}	0,021±0,014 ^{abCD}	0,032±0,014 ^{acD}	-0,012±0,019 ^{bc}	0,024±0,031 ^{CDE}

Data jsou vyjádřena jako rozdíly denzity od počáteční a konečné denzity při 620 nm. Všechna data pro

jednotlivé kmeny jsou průměry z trojnásobného stanovení ± směrodatná odchylka.

^{ABCDE} statisticky významný rozdíl ve sloupcích (P<0,05)

^{abc} statisticky významný rozdíl v řádcích (P<0,05)

Průměrná rozdílná denzita kultur *L. monocytogenes* od počáteční do konečné denzity při 620 nm byla u pozitivní kontroly obsahující 2 g/l glukózy stanovena na hodnotu 0,276±0,064. Průměrná rozdílná denzita od počáteční do konečné denzity při 620 nm u kontroly obsahující 0,1 g/l glukózy byla stanovena na hodnotu 0,069±0,010. Průměrná rozdílná denzita od počáteční do konečné denzity při 620 nm u negativní kontroly (médiu bez sacharidů) byla stanovena na hodnotu 0,012±0,034. Mezi těmito třemi kontrolami byly nalezeny statisticky významné rozdíly (P<0,05), kdy kontrola pozitivní obsahující 2 g/l glukózy vykazovala nejvyšší růst, kontrola obsahující 0,1 g/l vykazovala snížený růst a negativní kontrola vykazovala pouze růst nepatrný.

U jednotlivých prebiotik se výsledky růstu lišily. Růsty kultur *L. monocytogenes* na prebiotických obsahující inulin, fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy se statisticky významně nelišily (P<0,05).

Statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) u růstu kultur *L. monocytogenes* na inulinu byl pozorován u pozitivní kontroly 2 g/l glukózy a u negativní kontroly, kdy průměrný nárůst *L. monocytogenes* na inulinu byl $0,072 \pm 0,023$. Zároveň se růst na inulinu statisticky významně ($P < 0,05$) nelišil od růstu listérií na kontrole 0,1 g/l glukózy. U inulinu byly mezi jednotlivými kmeny zaznamenány statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$), kdy se statisticky významně lišil růst mezi sérotypy 4b ($0,054 \pm 0,012$), 1/2b ($0,055 \pm 0,008$) a 1/2a ($0,094 \pm 0,026$), 1/2c ($0,086 \pm 0,010$). Sérotypy 1/2a a 1/2c vykazovaly větší nárůst než sérotypy 4b a 1/2b.

Na fruktooligosacharidech byla zaznamenána změna denzity při 620 nm o hodnotě $0,053 \pm 0,032$. Stejně jako u inulinu se statisticky významně lišil růst na fruktooligosacharidech od pozitivní kontroly 2 g/l glukózy a od negativní kontroly, avšak vůči kontrole 0,1 g/l glukózy nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$). U fruktooligosacharidů nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) v růstu mezi kmeny.

Růst *L. monocytogenes* na galaktooligosacharidech ($0,042 \pm 0,036$) vykazovaly statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v porovnání s pozitivní a negativní kontrolou a žádný statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) v porovnání s kontrolou obsahující 0,1 g/l glukózy. Kmenově specifický růst byl zaznamenán u kmene 1/2b, kdy hodnota rozdílu denzity při 620 nm $0,093 \pm 0,012$ byla nejvyšší v porovnání s ostatními sérotypy. Kmeny 4b, 1/2a a 1/2c se statisticky významně lišily ($P < 0,05$) od kmene 1/2b.

Růst *L. monocytogenes* na ostatních testovaných prebiotických se na rozdíl od inulinu, fruktooligosacharidů a galaktooligosacharidů, statisticky významně odlišovaly ($P < 0,05$) od pozitivní kontroly (2 g/l glukózy) i od kontroly obsahující 0,1 g/l glukózy. Všechna tato prebiotika vykazovala nižší růst než výše zmíněné kontroly. Zároveň nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) mezi růsty na těchto prebiotických a negativní kontrolou.

Průměrný nárůst při 620 nm na laktulóze byl $-0,002 \pm 0,020$. Zároveň nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) mezi růsty u jednotlivých kmenů. Průměrný růst *L. monocytogenes* při 620 nm na rafinóze byl $0,005 \pm 0,012$. Stejně jako u laktulózy nebyl u rafinózy nalezen žádný statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) mezi růsty u jednotlivých kmenů.

Na stachyóze byla zaznamenán průměrný nárůst *L. monocytogenes* při 620 nm, který dosahoval hodnoty $0,030 \pm 0,025$. U stachyózy byly zaznamenány statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v růstu mezi jednotlivými kmeny, kdy se statisticky významně lišily hodnoty rozdílu denzity při 620 nm mezi sérotypy 4b ($0,064 \pm 0,011$), 1/2b ($0,022 \pm 0,017$), 1/2a ($0,029 \pm 0,010$) a 1/2c ($0,005 \pm 0,010$). U kmene 4b byla hodnota nárůstu *L. monocytogenes* nejvyšší v porovnání s ostatními kmeny.

Průměrný nárůst při 620 nm na 2'-fukosyllaktóze byl zaznamenán o hodnotě $0,029 \pm 0,009$. U tohoto prebiotického sacharidu byl zaznamenán kmenově specifický růst *L. monocytogenes* mezi kmeny 4b a 1/2c. Kmen 4b vykazoval v porovnání s ostatními sérotypy nejvyšší hodnotu rozdílu denzity při 620 nm $0,038 \pm 0,004$. Kmen 1/2c ($0,022 \pm 0,012$) se statisticky významně lišil ($P < 0,05$) od kmene 4b.

Na oligosacharidech mateřského mléka byl při 620 nm zaznamenán průměrný nárůst v hodnotě $0,024 \pm 0,031$. Nárůst na oligosacharidech mateřského mléka byl kmenově specifický. Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v nárůstu byly zaznamenány mezi kmeny 4b ($0,057 \pm 0,028$), 1/2a ($0,032 \pm 0,014$) a 1/2c ($-0,012 \pm 0,019$). Sérotypy 4b a 1/2a vykazovaly větší

nárůst než sérotyp 1/2c. Kmen 1/2b nevykzoval ($0,021 \pm 0,014$) statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) v porovnání s ostatními sérotypy.

5.2.2 Stanovení růstu *Listeria monocytogenes* na vybraných prebiotických nerozpustných ve vodě

Výsledky stanovení růstu na prebiotických nerozpustných ve vodě jsou vidět v Tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Růst *Listeria monocytogenes* na vybraných prebiotických sacharidech

	LM1	LM11	LM56	LM79	<i>Listeria monocytogenes</i> průměr ± SD
Sérotyp	4b	1/2b	1/2a	1/2c	-
Pozitivní kontrola (2 g/L glukózy)	1,56±0,72 ^A	1,2±0,03 ^A	0,95±0,01 ^A	1,24±0,15 ^A	1,24±0,25 ^A
Negativní kontrola (žádné sacharidy)	0,33±0,05 ^B	0,49±0,12 ^B	0,16±0,02 ^B	0,24±0,11 ^B	0,30±0,14 ^B
Beta(1-3)-D-glukan	1,05±0,09 ^A	1,43±0,67 ^A	0,96±0,07 ^A	1,48±0,72 ^A	1,23±0,26 ^A

Data jsou vyjádřena jako rozdíly denzity od počáteční a konečné denzity log KTJ/ml. Všechna data pro jednotlivé kmeny jsou průměry z trojnásobného stanovení ± směrodatná odchylka.

^{AB} statisticky významný rozdíl ve sloupcích ($P < 0,05$)

Průměrný rozdíl počtu kultur *L. monocytogenes* od počátku do konce experimentu byl u pozitivní kontroly obsahující 2 g/l glukózy stanoven na hodnotu $1,24 \pm 0,25$ log KTJ/ml. Průměrný rozdíl počtu bakterií na začátku a na konci experimentu u negativní kontroly (médiu bez sacharidů) byl stanoven na hodnotu $0,30 \pm 0,14$ log KTJ/ml. Mezi těmito dvěma kontrolami byly nalezeny statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$), kdy kontrola pozitivní obsahující 2 g/l glukózy vykazovala nejvyšší růst a negativní kontrola vykazovala pouze růst nepatrný.

Statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) u růstu kultur *L. monocytogenes* na beta-glukanu byl pozorován pouze u negativní kontroly, kdy průměrný nárůst *L. monocytogenes* na beta-glukanu byl $1,23 \pm 0,26$ log KTJ/ml. Zároveň se růst na beta-glukanu statisticky významně ($P < 0,05$) nelišil od růstu listérií na pozitivní kontrole 2 g/l glukózy. U beta-glukanu nebyly mezi jednotlivými kmeny zaznamenány statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

6 Diskuze

Listeria monocytogenes je malá, grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující, tyčinka vyskytující se v různém prostředí. K růstu bakterií dochází mezi $-0,4$ a 50 °C, ale optimální teplotní rozsah je 30 – 37 °C. Zmíněné široké teplotní spektrum vykazuje vysokou odolnost *L. monocytogenes* a zároveň demonstuje i její schopnost přežít či růst v nepříznivém prostředí. (Brychta, 2018). Tato bakterie je nenáročná, ale pro růst vyžaduje základní živiny. Mezi nezbytné živiny se řadí sedm aminokyselin (leucin, valin, izoleucin, cystein, glutamin, methionin a arginin), kdy především cystein a methionin jsou potřebnými AMK, jakožto zdroje síry využívané listériemi ke kultivaci. Pro svůj růst preferuje *L. monocytogenes* jako hlavní zdroj uhlíku glukózu. Využívá však i jiné sacharidy jako jsou fruktóza, manóza, trehalóza či celobióza. (Premarante, 1991; Sauer, 2019).

Při testování prebiotik rozpustných ve vodě, byl zaznamenán růst *L. monocytogenes* oproti negativní kontrole u inulinu, fruktooligosacharidů a galaktooligosacharidů. Růst ovšem nebyl srovnatelný s růstem na pozitivní kontrole obsahující 2 g/l glukózy, kde byl růst výrazně vyšší než na testovaných prebioticích. Nabízí se tedy otázka, proč k růstu listérií došlo.

Fruktooligosacharidy a inulin jsou prebiotika složená z fruktózových jednotek spojených β -(1,2) glykosidickou vazbou, kdy se pouze liší délkou fruktózových jednotek v sacharidu (Gibson, 2004b; Davani-Davari, 2019). Vzhledem k tomu, že je *L. monocytogenes* ke svému růstu schopná využívat kromě glukózy i fruktózu, ze které se řetězce inulinu a fruktooligosacharidů skládají, předpokládali jsme, že pokud by kultury *L. monocytogenes* byly schopny štěpit β -(1,2) glykosidickou vazbu, které spojují jednotlivé fruktózové jednotky, bude nárůst bakterií srovnatelný s pozitivní kontrolou (2 g/l glukózy). Jelikož se růst ovšem lišil, předpokládáme, že byl růst způsoben spíše jinými faktory, které jsou popsány níže.

Galaktooligosacharidy patří mezi prebiotika složená z molekul galaktózy a jedné terminální glukózy, kdy se v řetězci zpravidla nachází 2 – 8 jednotek galaktózy spojených β -(1,6) glykosidickými vazbami (Gibson, 2004a). Bylo prokázáno, že *L. monocytogenes* je schopná štěpit β -(1,6) glykosidické vazby (Bierne, 2007), ale neboť galaktóza nepatří mezi substráty, které poskytují zdroj uhlíku pro růst bakterií *L. monocytogenes*, je spíše nepravděpodobné jejich štěpení a další využití pro kultivaci samotných listérií.

Vzhledem k tomu, že byl zaznamenán růst, které nebylo možné teoreticky vysvětlit a prebiotika nebyla 100% čistá, bylo nutné výsledky růstu porovnat i s kontrolou obsahující $0,1$ g/l glukózy. Toto množství demonstrovalo množství potenciálních nečistot v testovaných prebioticích. Mezi těmito skupinami nebyl sledován statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$), tudíž můžeme předpokládat, že růst, který byl zaznamenán na inulinu (čistota $>92\%$), fruktooligosacharidech (čistota $>95\%$) a galaktooligosacharidech (čistota $>95\%$) nebyl způsoben samotnými prebiotiky, ale mohl být způsobený nižší čistotou použitých prebiotik v testování, kdy příměsi jako glukóza, fruktóza či rhamnóza mohly být využity jako zdroje pomnožení listérií.

Přestože ostatní prebiotika (stachyóza – čistota $>98\%$, rafinóza – čistota $>98\%$, 2'-fukosyllaktóza – čistota $>94\%$) vykazovala podobnou čistotu, jako výše zmíněná prebiotika, nebyl na těchto prebioticích zaznamenán růst kultur *L. monocytogenes*. To mohlo být způsobeno vyšší čistotou prebiotik, či příměsemi, které *L. monocytogenes* není schopná využít pro svůj růst.

Vzhledem k tomu, že byl zaznamenán stejný růst *L. monocytogenes* na beta(1,3)-D-glukanu jako na glukóze, z výsledků vyplývá, že *L. monocytogenes* je schopná tento prebiotický sacharid štěpit. Beta(1,3)-D-glukan je prebiotický polysacharid tvořený pouze z monomerů glukózy, které jsou spojené β -(1,3) glykosidickými vazbami (Mudgil, 2017). Jelikož je tento prebiotický polysacharid složen jen z glukózových jednotek, které se považují za hlavní zdroj uhlíku v metabolismu listérií, lze předpokládat, že *L. monocytogenes* tato prebiotika dokáže štěpit a je na nich schopná růst. Toto tvrzení může být také podloženo faktem z mnoha studií (Bae, 2013; Gunathilake, 2013; Agostoni, 2017), že je *L. monocytogenes* schopná štěpit celulózu, která je stejně jako beta(1,3)-D-glukan řazena do betaglukanů (Sluková, 2017). Otázkou je, zdali se nezměnily vlastnosti beta(1,3)-D-glukanu vlivem tepelného ošetření. Dle studie Bai et al. (2021) jsou popsány vlastnosti beta-glukanů dokazující jejich termostabilitu do 180 °C. Zhao et al. (2020) zmiňují pozorování rozkladu β -glukanu při teplotách od 180 °C do 350 °C, což bylo způsobeno štěpením dlouhých řetězců a chemických vazeb. Ovšem Oliveira et al. (2012) zmiňují, že vysoké teploty přesahující 60 °C již mohou degradovat beta-glukany na fragmenty s nízkou molekulovou hmotností nebo dokonce depolymerizovat lineární struktury, čímž se změní jejich množství a pravděpodobně změní i samotné chování beta-glukanů. V případě, že by použité beta-glukany podlely degradaci v průběhu sterilace při 121 °C, mohly by kmeny listérií ke svému růstu využívat naštěpené fragmenty řetězce. Z hlediska čistoty použitého vzorku beta-glukanu od výrobce Brainway Inc. (100 % beta-glukanů z kvasinek, z toho >86,6 % beta(1,3)-D-glukanů) lze usuzovat, že nárůst *L. monocytogenes* nebyl ovlivněn žádnými jinými příměsemi sacharidů (např. glukóza nebo fruktóza), které *L. monocytogenes* snadno štěpí a využívá ke svému růstu.

Jelikož se *L. monocytogenes* řadí mezi patogenní druhy způsobující listeriózu, je pro tuto bakterii důležitá virulentní vlastnost. Mezi faktory virulence je zařazeno minimálně 9 genů a jejich produktů, které jsou vyžadovány pro infekci, invazi, přežití, mobilitu a šíření z buňky do buňky (Blažková, 2005; Bergey, 2009). Virulentní faktory jsou z velké části ovlivněny sacharidy v buňkách hostitele. Abdelhamed et al. (2019) ve své studii zmiňují pět virulentních faktorů z nichž jeden je pro sacharidy podstatný: fosfotransferázový systém (PTS) s enzymatickou podjednotkou transportéru fruktózy (EIIC). Podle Abdelhameda et al. (2019) je velmi důležitá role fosfotransferázové složky EIIC, která se řadí k základní složce fosfotransferázového systému (PTS). Ten je zodpovědný za rozpoznání, selektivní vazbu a transport specifických molekul cukru přes buněčnou membránu do cytoplazmy. Role EIIC je podstatná, jelikož růst *L. monocytogenes* jako intracelulárního patogenu závisí na efektivním využití cukru z hostitele. Přispívá tedy k selektivnímu transportu cukrů přes vnitřní bakteriální membránu (Abdelhamed, 2019). Jak uvádí Deutscher et al. (2014) ve své studii, jsou právě bakteriemi, mezi nimiž jsou i listérie, přijímány cukry a jejich deriváty, jako zdroje uhlíku pro svůj růst v hostitelských buňkách. Tento proces je možný právě prostřednictvím fosfotransferázového systému (PTS). Komponenty EIIC jsou rozděleny do několika skupin, včetně podtříd pro glukózu, sacharózu, mannitol, fruktózu, laktózu, manózu a celobiózu (Abdelhamed, 2019). Aké et al. (2011) zmiňují ve své studii, že růst *L. monocytogenes* na účinně metabolizovaných zdrojích uhlíku, jako je glukóza, celobióza či fruktóza, má represivní účinek na expresi několika genů virulence. Například Park a Kroll (1993) ve studii uvádějí, že přítomnost celobiózy v růstovém médiu silně potlačila expresi genů *hly* a *plcA*, zatímco jiné běžné fermentovatelné sacharidy neměly žádný účinek. Represe genů virulence

nemění množství PrfA proteinů (působící jako hlavní regulátory exprese virulenních faktorů) v buňkách, ale ovlivňuje jejich aktivitu. Dle experimentů je patrné, že složky fosfotransferázového systému (PTS) hrají klíčovou roli v regulaci exprese virulentních genů (Aké, 2011). Glukóza je například hlavním zdrojem uhlíku pro bakterie, přesto působí jako katabolický represor pro některé faktory virulence (Jaradat, 2002). Zdroj sacharidu tedy může ovlivnit několik virulentních genů, avšak neovlivní všechny. Celková patogenita však může být těmito vlivy snížena.

Sacharidy mohou také ovlivnit citlivost či rezistenci *L. monocytogenes* na antibiotika i bakteriociny. Spížek (2016) definuje bakteriociny jako antimikrobiální bílkoviny produkované probiotickými bakteriemi a řadí je k antibiotikům. Ve studii Balay et al. (2018) se uvádí, že prebiotické sacharidy jako glukóza, manóza či fruktóza zvyšují citlivost některých kmenů *L. monocytogenes* na bakteriociny, zatímco sacharidy jako celobióza a sacharóza zvyšují schopnost *L. monocytogenes* vytvářet rezistenci na bakteriociny. Dle studie je patrné, že sacharidy mohou ovlivnit schopnost bakterií *L. monocytogenes* růst v přítomnosti bakteriocinů a jiných antibiotik.

Vzhledem ke zjištění, že mohou sacharidy ovlivnit virulenci a citlivost k antimikrobiálním látkám u *L. monocytogenes*, nabízí se otázka, jaký vliv na virulenci a antibiotickou rezistenci mohou testovaná prebiotika na kultury *L. monocytogenes* mít, zejména pak u beta(1,3)D-glukanu, na kterém *L. monocytogenes* vykazovala růst.

Důležitým faktorem ovšem je také celková funkce prebiotik, které celkově podporují zdraví hostitele. Prebiotika mají obecně schopnost vyživovat zdravý prospěšné (probiotické) bakterie, které inhibují patogenní *L. monocytogenes* v lidském gastrointestinálním traktu. Vedle inhibičních vlastností vůči patogenním druhům bakterií vykazují probiotika (jako jsou bakterie mléčného kvašení, bifidobakterie a probiotické kvasinky) i zvýšení chuti a prodloužení trvanlivosti potravin. Zároveň probiotika účinně kontrolují růst *L. monocytogenes* *in vitro* prostřednictvím kompetitivního chování jednotlivých probiotických kmenů nebo produkcí metabolitů (oxid uhličitý, vodík, metan, mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) a další organické kyseliny) s antimikrobiálními aktivitami mezi které patří např. snížení pH v tlustém střevě (Goderska, 2008; Wu, 2022). Těmito způsoby se tedy může zlepšovat zdravotní stav hostitele i jeho odolnost vůči pronikání patogenů do organismu. Dle studie Goderska et al. (2008) vyžadují bifidobakterie pro svou kultivaci v médiích přítomnost zdroje uhlíku. Vedle glukózy jsou všechny bifidobakterie schopné využít galaktózu, laktózu a obvykle i fruktózu. Na rozdíl od listérií jsou bifidobakterie schopné štěpit i polysacharidy, které se pomocí intracelulárních enzymů přeměňují na fosfáty glukózy a jsou dále bifidobakteriemi metabolizovány. Většina laktobacilů může fermentovat amygdalin, cellobiózu, fruktózu, galaktózu, glukózu, laktózu, maltózu, manózu, salicin, sacharózu a trehalózu (Goderska, 2008). Goderska et al. (2008) dále zmiňují, že k růstovým substrátům střevních bakterií se řadí rezistentní škroby, dietní vláknina, cukry, oligosacharidy, proteiny, peptidy a aminokyseliny. Watson et al. (2013) ve své studii srovnávají metabolické charakteristiky laktobacilů a bifidobakterií. Ve zmíněné studii je prokázáno, že GOS, FOS/inulin a jiná prebiotika, jako je laktulóza (v případě laktobacilů) jsou probiotickými kmeny bakterií metabolizovány a podporují jejich růst v gastrointestinálním traktu člověka. V této studii jsou použity vzorky GOS, FOS a FOS/inulin, které obsahují značné množství mono- a disacharidů (glukózy a fruktózy), což může způsobit určité zvětšení pozorovaných růstových schopností (Watson,

2013). Z této studie je prokázána mikrobiální spotřeba prebiotických sacharidů pro laktobacily a bifidobakterie bez zjevné selektivity pro různé složky prebiotik. Zároveň studie ukazuje, že za účelem zvýšení diverzity střevní mikrobioty jsou použita konkrétní prebiotika podporující růst určitých kmenů/druhů. Touto studií dle Watsona et al. (2013) je zdůrazněn potenciál prebiotik selektivně obohacovat probiotické kmeny a zároveň zabraňovat kolonizaci střevní mikrobioty patogenními mikroorganismy. Prebiotika využívají rozdílů v preferencích substrátu a konkurenčních schopností bakterií v gastrointestinálním traktu (Watson, 2013). Proto prebiotika hrají důležitou roli v lidském zdraví a jsou tedy podstatnou složkou potravy.

7 Závěr

- Bylo setaveno médium, na kterém mohla být otestována schopnost růstu vybraných kmenů *Listeria monocytogenes* na prebiotických sacharidech jako jediném zdroji uhlíku.
- Schopnost růstu *Listeria monocytogenes* byl potvrzen u beta(1,3)D-glukanu.
- U inulinu, fruktooligosacharidů a galaktooligosacharidů, byl také zaznamenán růst kmenů *L. monocytogenes*. Tento růst byl ovšem nejspíše způsoben monosacharidy, které se v prebiotických doplňcích stravy mohou vyskytovat.
- U laktulózy, rafinózy, stachyózy, 2'-fukosyllaktózy a oligosacharidech mateřského mléka nebyl zaznamenán růst vybraných kmenů.
- Celkově byl prokázán kmenově specifický růst testovaných kmenů *L. monocytogenes*.

8 Literatura

ABDELHAMED, Hossam, Mark LAWRENCE, Reshma RAMACHANDRAN a Attila KARSI, 2019. Validation of Predicted Virulence Factors in *Listeria monocytogenes* Identified Using Comparative Genomics. *Toxins* [online]. 11(9) [cit. 2023-04-18]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins11090508

AGOSTONI, Marco, John A. HANGASKY a Michael A. MARLETTA, 2017. Physiological and Molecular Understanding of Bacterial Polysaccharide Monooxygenases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 81(3), e00015-17 [cit. 2023-04-20]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00015-17

AKÉ, Francine M. D., Philippe JOYET, Josef DEUTSCHER a Eliane MILOHANIC, 2011. Mutational analysis of glucose transport regulation and glucose-mediated virulence gene repression in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* [online]. 81(1), 274-293 [cit. 2023-04-19]. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07692.x

ANGGRAENI, A A, 2022. Mini-Review: The potential of raffinose as a prebiotic. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [online]. 980(1) [cit. 2023-04-18]. ISSN 1755-1307. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/980/1/012033

BAE, Dongryeoul, Keun Seok SEO, Ting ZHANG a Chinling WANG, 2013. Characterization of a Potential *Listeria monocytogenes* Virulence Factor Associated with Attachment to Fresh Produce. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 79(22), 6855-6861 [cit. 2023-04-21]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01006-13

BAI, Yi-Peng, Hui-Ming ZHOU, Ke-Rui ZHU a Qin LI, 2021. Effect of thermal processing on the molecular, structural, and antioxidant characteristics of highland barley β -glucan. *Carbohydrate Polymers* [online]. 271 [cit. 2023-04-18]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.118416

BALAY, Danielle R., Michael G. GÄNZLE a Lynn M. MCMULLEN, 2018. The Effect of Carbohydrates and Bacteriocins on the Growth Kinetics and Resistance of *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology* [online]. 9 [cit. 2023-04-18]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.00347

BECATTINI, Simone, Eric R. LITTMANN, Rebecca A. CARTER, et al., 2017. Commensal microbes provide first line defense against *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Experimental Medicine* [online]. 214(7), 1973-1989 [cit. 2023-04-10]. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20170495

BEDNÁŘ, Marek, Věra FRANĀKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA, 1996. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. Dotisk 1. vyd. Praha: Marvil. ISBN 8594031505280.

BERGEY, D. H., William B. WHITMAN, Paul DE VOS, George M. GARRITY a D. JONES, 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. 2nd edition. New York: Springer. ISBN 9780387950419.

BEUMER, Rijkelt R a Wilma C HAZELEGER, 2003. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. FEMS Immunology & Medical Microbiology [online]. 35(3), 191-197 [cit. 2023-04-07]. ISSN 09288244. Dostupné z: doi:10.1016/S0928-8244(02)00444-3

BIERNE, H el ene a Pascale COSSART, 2007. *Listeria monocytogenes* Surface Proteins: from Genome Predictions to Function. Microbiology and Molecular Biology Reviews [online]. 71(2), 377-397 [cit. 2023-04-19]. ISSN 1092-2172. Dostupn e z: doi:10.1128/MMBR.00039-06

BLAŽKOVÁ, Martina, Ludmila KARAMONOVÁ, Ladislav FUKAL a Pavel RAUCH, 2005. *Listeria monocytogenes* – NEBEZPEČN PATOGEN A JEHO DETEKCE V POTRAVINÁCH. Chemicke Listy. 99(7), 467 – 473.

BOHAČENKO, Ivan a Jitka PINKROVÁ, 2014. Stanovení obsahu fruktanů metodou HPLC s refraktometrickou detekcí. LISTY CUKROVARNICK A ŘEPAŘSK. 13(1), 28-32.

BORUCKI, Monica K. a Douglas R. CALL, 2003. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. Journal of Clinical Microbiology [online]. 41(12), 5537-5540 [cit. 2023-04-08]. ISSN 0095-1137. Dostupn e z: doi:10.1128/JCM.41.12.5537-5540.2003

BRYCHTA, Josef, 2018. Výskyt *Listeria monocytogenes* v potravinách a riziko onemocnění pro člověka. Praha: Potravinrsk komora esk republiky, esk technologick platforma pro potraviny. ISBN 978-80-88019-31-2.

CORONA, Laura, Anna LUSSU, Alice BOSCO, Roberta PINTUS, Flaminia CESARE MARINCOLA, Vassilios FANOS a Angelica DESS, 2021. Human Milk Oligosaccharides: A Comprehensive Review towards Metabolomics. Children [online]. 8(9) [cit. 2023-04-11]. ISSN 2227-9067. Dostupn e z: doi:10.3390/children8090804

CUPÁKOVÁ, Šrka, Renáta KARPŠKOV a Lenka NECIDOVÁ, 2010. Mikrobiologie potravin - praktick cvicn II.: metody stanoven mikroorganismů v potravinách. Brno: Veterinrn a farmaceutick univerzita. ISBN 978-80-7305-126-6.

DAVANI-DAVARI, Dorna, Manica NEGAHDARIPOUR, Iman KARIMZADEH, Mostafa SEIFAN, Milad MOHKAM, Seyed MASOUMI, Aydin BERENJIAN a Younes GHASEMI, 2019. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. Foods [online]. 8(3) [cit. 2023-04-08]. ISSN 2304-8158. Dostupn e z: doi:10.3390/foods8030092

DEUTSCHER, Josef, Francine Moussan Désirée AKÉ, Meriem DERKAOUI, et al., 2014. The Bacterial Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 78(2), 231-256 [cit. 2023-04-18]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00001-14

DOUMITH, Michel, Carmen BUCHRIESER, Philippe GLASER, Christine JACQUET a Paul MARTIN, 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 42(8), 3819–3822. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.42.8.3819–3822.2004

ERMOLAEVA, Svetlana, Tatyana KARPOVA, Susana NOVELLA, Martin WAGNER, Mariela SCORTTI, Igor TARTAKOVSKII a Jose A VAZQUEZ-BOLAND, 2003. A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 82(1), 87-94 [cit. 2023-04-11]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1605(02)00399-9

EUZÉBY Jean P. 1997. Genus: *Listeria*. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [online]. Available from <https://lpsn.dsmz.de/genus/listeria> (accessed March 27, 2023).

FAN, Songtao, Zhihong ZHANG, Yansheng ZHAO, et al., 2023. Recent advances in targeted manipulation of the gut microbiome by prebiotics: from taxonomic composition to metabolic function. *Current Opinion in Food Science* [online]. 49 [cit. 2023-04-08]. ISSN 22147993. Dostupné z: doi:10.1016/j.cofs.2022.100959

FARBER, J M a P. I. PETERKIN, 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* [online]. 55(3), 476-511 [cit. 2023-04-10]. ISSN 0146-0749. Dostupné z: doi:10.1128/mr.55.3.476-511.1991

FUJISAWA, T a M MORI, 1994. Evaluation of media for determining hemolytic activity and that of API *Listeria* system for identifying strains of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 32(4), 1127-1129 [cit. 2023-04-07]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/jcm.32.4.1127-1129.1994

GASANOV, Uta, Denise HUGHES a Philip M. HANSBRO, 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 29(5), 851-875 [cit. 2023-04-11]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsre.2004.12.002

GAWADE, Lata, S. B. BARBUDDHE a S. BHOSLE, 2010. Isolation and Confirmation of *Listeria* Species from Seafood off Goa Region by Polymerase Chain Reaction. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 50(4), 385-389 [cit. 2023-04-21]. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-011-0064-y

GIBSON, Glenn R., 2004a. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements* [online]. 1(2), 25-31 [cit. 2023-04-20]. ISSN 17441161. Dostupné z: doi:10.1016/j.clnu.2004.09.005

GIBSON, Glenn R., Hollie M. PROBERT, Jan Van LOO, Robert A. RASTALL a Marcel B. ROBERFROID, 2004b. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* [online]. 17(2), 259-275 [cit. 2023-04-20]. ISSN 0954-4224. Dostupné z: doi:10.1079/NRR200479

GODERSKA, Kamila, NOWAK, Jacek, CZARNECKI, Zbigniew. Comparison of growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium Bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.*, 2008, 7.2: 5-20.

GRAY, M L a A H KILLINGER, 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological Reviews* [online]. 30(2), 309-382 [cit. 2023-04-09]. ISSN 0005-3678. Dostupné z: doi:10.1128/br.30.2.309-382.1966

GUNATHILAKE, KMD, RR RATNAYAKE, SA KULASOORIYA a DN KARUNARATNE, 2013. Evaluation of cellulose degrading efficiency of some fungi and bacteria and their biofilms. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* [online]. 41(2), 155-163 [cit. 2023-04-21]. ISSN 2362-0161. Dostupné z: doi:10.4038/jnsfsr.v41i2.5710

HANAU, Stefania, Shawgi Hago ALMUGADAM, Eugenia SAPIENZA, Barbara CACCIARI, Maria Cristina MANFRINATO, Alessandro TRENTINI a John Frederick KENNEDY, 2020. Schematic overview of oligosaccharides, with survey on their major physiological effects and a focus on milk ones. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* [online]. 1 [cit. 2023-04-11]. ISSN 26668939. Dostupné z: doi:10.1016/j.carpta.2020.100013

HEINRICH, Kasper, 2015. *Výživa v medicíně a dietetika* [online]. Překlad 11. vydání. Praha: Grada Publishing [cit. 2023-04-11]. ISBN 9788024796581.

HE, Liwen, Feiran ZHANG, Zhengyang JIAN, Jiachen SUN, Jiamin CHEN, VUEKHANG LIAPAO a Qing HE, 2020. Stachyose modulates gut microbiota and alleviates dextran sulfate sodium-induced acute colitis in mice. *Saudi Journal of Gastroenterology* [online]. 26(3) [cit. 2023-04-18]. ISSN 1319-3767. Dostupné z: doi:10.4103/sjg.SJG_580_19

HE, Tao, Marion G. PRIEBE, Roel J. VONK a Gjalte W. WELLING, 2005. Identification of bacteria with β -galactosidase activity in faeces from lactase non-persistent subjects. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 54(3), 463-469 [cit. 2023-04-11]. ISSN 01686496. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsec.2005.06.001

CHIARA, Matteo, Marta CARUSO, Anna Maria D'ERCHIA, et al., 2015. Comparative Genomics of *Listeria Sensu Lato*: Genus-Wide Differences in Evolutionary Dynamics and the Progressive Gain of Complex, Potentially Pathogenicity-Related Traits through Lateral Gene Transfer. *Genome Biology and Evolution* [online]. 7(8), 2154-2172 [cit. 2023-04-07]. ISSN 1759-6653. Dostupné z: doi:10.1093/gbe/evv131

CHIBBAR, R. N. a M. BÅGA, 2003. GENETIC MODIFICATION OF PRIMARY METABOLISM | Carbohydrates. In: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* [online]. Elsevier, 2003, s. 449-459 [cit. 2023-04-11]. ISBN 9780122270505. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-227050-9/00171-X

JANAKIRAMAN, Vanitha, 2008. Listeriosis in Pregnancy: Diagnosis, Treatment, and Prevention. *REVIEWS IN OBSTETRICS & GYNECOLOGY* [online]. 1(4), 179–185 [cit. 2023-04-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2621056/>

JARADAT, Ziad W. a Arun K. BHUNIA, 2002. Glucose and Nutrient Concentrations Affect the Expression of a 104-Kilodalton *Listeria* Adhesion Protein in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 68(10), 4876-4883 [cit. 2023-04-19]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.68.10.4876-4883.2002

JOHNSON, Stuart K., Jonathan CLEMENTS, Casiana Blanca J. VILLARINO a Ranil COOREY, 2017. Lupins: Their Unique Nutritional and Health-Promoting Attributes. In: *Gluten-Free Ancient Grains* [online]. Elsevier, 2017, s. 179-221 [cit. 2023-04-11]. ISBN 9780081008669. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100866-9.00008-X

KELLS, J. a A. GILMOUR, 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 91(2), 167-174 [cit. 2023-04-21]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1605(03)00378-7

LIU, Dongyou, 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 55(6), 645-659 [cit. 2023-04-08]. ISSN 0022-2615. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.46495-0

LIU, Dongyou, Mark L. LAWRENCE, Lisa GORSKI, Robert E. MANDRELL, A. Jerald AINSWORTH a Frank W. AUSTIN, 2006. *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Strains Belonging to Lineages I and III Possess Distinct Molecular Features. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 44(1), 214–217. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.44.1.214–217.2006

LOCKYER, S. a S. STANNER, 2019. Prebiotics – an added benefit of some fibre types. *Nutrition Bulletin* [online]. 44(1), 74-91 [cit. 2023-04-08]. ISSN 1471-9827. Dostupné z: doi:10.1111/nbu.12366

LOW, J. C. a W. DONACHIE, 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal* [online]. 153(1), 9-29 [cit. 2023-04-08]. ISSN 10900233. Dostupné z: doi:10.1016/S1090-0233(97)80005-6

MEI, Zhaojun, Jiaqin YUAN a Dandan LI, 2022. Biological activity of galacto-oligosaccharides: A review. *Frontiers in Microbiology* [online]. 13 [cit. 2023-04-18]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2022.993052

MITMESSER, S. a M. COMBS, 2017. Prebiotics: Inulin and Other Oligosaccharides. In: *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology* [online]. Elsevier, 2017, s. 201-208 [cit. 2023-04-11]. ISBN 9780128040249. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804024-9.00023-9

MORENO, Juan a Rafael PEINADO, 2012. Sugars. In: *Enological Chemistry* [online]. Elsevier, 2012, s. 77-93 [cit. 2023-04-18]. ISBN 9780123884381. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-388438-1.00006-6

MUDGIL, Deepak, 2017. The Interaction Between Insoluble and Soluble Fiber. In: *Dietary Fiber for the Prevention of Cardiovascular Disease* [online]. Elsevier, 2017, s. 35-59 [cit. 2023-04-11]. ISBN 9780128051306. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805130-6.00003-3

NOTERMANS, S. H., J. DUFRENNE, M. LEIMEISTER-WÄCHTER, E. DOMANN a T. CHAKRABORTY, 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 57(9), 2666-2670 [cit. 2023-04-11]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.57.9.2666-2670.1991

OLIVEIRA, Leandro da Conceição, Maurício OLIVEIRA, Volnei Luiz MENEGHETTI, Simone MAZZUTTI, Luciane Maria COLLA, Moacir Cardoso ELIAS a Luiz Carlos GUTKOSKI, 2012. Effect of drying temperature on quality of β -glucan in white oat grains. *Food Science and Technology* [online]. 32(4), 775-783 [cit. 2023-04-18]. ISSN 1678-457X. Dostupné z: doi:10.1590/S0101-20612012005000105

ORSI, Renato H. a Martin WIEDMANN, 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 100(12), 5273-5287 [cit. 2023-04-07]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-016-7552-2

OWEN, Gareth, 2018. CHEBI:147155 - 2'-fucosyllactose. EMBL-EBI [online]. Cambridgeshire [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:147155>

PARK, Simon F. a Rohan G. KROLL, 1993. Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule

cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* [online]. 8(4), 653-661 [cit. 2023-04-19]. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01609.x

PETERBAUER, T., U. KARNER, J. MUCHA, L. MACH, D. A. JONES, C. L. HEDLEY a A. RICHTER, 2003. Enzymatic control of the accumulation of verbascose in pea seeds. *Plant, Cell & Environment* [online]. 26(8), 1385-1391 [cit. 2023-04-18]. ISSN 01407791. Dostupné z: doi:10.1046/j.0016-8025.2003.01063.x

PHE (Public Health England) (2018) Calorie reduction: the scope and ambition for action. Available at: www.gov.uk/government/publications/calorie-reduction-the-scope-and-ambition-for-action (accessed 11 December 2018)

PINE, L., G. B. MALCOLM, J. B. BROOKS a M. I. DANESHVAR, 1989. Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 35(2), 245-254 [cit. 2023-04-10]. ISSN 0008-4166. Dostupné z: doi:10.1139/m89-037

PREMARATNE, R. J., W. J. LIN a E. A. JOHNSON, 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 57(10), 3046-3048 [cit. 2023-04-07]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.57.10.3046-3048.1991

QUEREDA, Juan J., Alexandre LECLERCQ, Alexandra MOURA, et al., 2020. *Listeria valentina* sp. nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 70(11), 5868-5879 [cit. 2023-04-07]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.004494

RADA, Vojtěch, 2010. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní medicína pro praxi*. 12(2), 92–97.

RICCI, Antonia, Ana ALLENDE, Declan BOLTON, et al., 2018. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal* [online]. 16(1) [cit. 2023-04-08]. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2018.5134

ROČKOVÁ, Š., NEVORAL, J., RADA, V., MARŠÍK, P., SKLENÁŘ, J., HINKOVÁ, A., VLKOVÁ, E. a M. MAROUNEK. Factors affecting the growth of bifidobacteria in human milk. *INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL*, 2011, roč. 21, č. 7, s. 504-508. ISSN: 0958-6946.

SAQIB, Shaima, Attiya AKRAM, Sobia Ahsan HALIM a Raazia TASSADUQ, 2017. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech* [online]. 7(1) [cit. 2023-04-11]. ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-017-0645-5

SAUER, John-Demian, Anat A. HERSKOVITS, Mary X. D. O'RIORDAN, et al., 2019. Metabolism of the Gram-Positive Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes*. *Microbiology Spectrum* [online]. 7(4) [cit. 2023-04-10]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0066-2019

SEKAR, Sudharshan, Surianarayanan MAHADEVAN, Sathish Sundar Dhilip KUMAR a Asit Baran MANDAL, 2011. Thermokinetic responses of the metabolic activity of *Staphylococcus lentus* cultivated in a glucose limited mineral salt medium. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [online]. 104(1), 149-155 [cit. 2023-04-12]. ISSN 1388-6150. Dostupné z: doi:10.1007/s10973-010-1121-1

SHARMA, Resham, Renu BHARDWAJ, A. K. THUKRAL, Neha HANDA, Ravdeep KAUR a Vinod KUMAR, 2014. Osmolyte Dynamics. In: *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance* [online]. Elsevier, 2014, s. 405-430 [cit. 2023-04-11]. ISBN 9780128008751. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800875-1.00017-X

SCHARDT, Jakob, Grant JONES, Stefanie MÜLLER-HERBST, Kristina SCHAUER, Sarah E. F. D'ORAZIO a Thilo M. FUCHS, 2017. Comparison between *Listeria sensu stricto* and *Listeria sensu lato* strains identifies novel determinants involved in infection. *Scientific Reports* [online]. 7(1) [cit. 2023-04-07]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-17570-0

SCHUCHAT, A, B SWAMINATHAN a C V BROOME, 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 4(2), 169-183 [cit. 2023-04-08]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.4.2.169

SLUKOVÁ, Marcela, Kateřina VACULOVÁ a Pavel SKŘIVAN. Přehled o beta-glukanech (nejen obilných). *Obiloviny v lidské výživě 2017*. 2017, s. 14–21

SPÍŽEK, Jaroslav, 2016. *Boj s rezistencí na antibiotika: výzkumný program Potravin y pro budoucnost*. Praha: Středisko společných činností AV ČR, v.v.i., pro Kancelář Akademie věd ČR. Strategie AV21. ISBN 978-80-200-2631-6.

SWAMINATHAN, Bala a Peter GERNER-SMIDT, 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* [online]. 9(10), 1236-1243 [cit. 2023-04-09]. ISSN 12864579. Dostupné z: doi:10.1016/j.micinf.2007.05.011

TUNGLAND, Bryan, 2018. *Human Microbiota in Health and Disease* [online]. Elsevier [cit. 2023-04-11]. ISBN 9780128146491. Dostupné z: doi:10.1016/C2017-0-01893-1

VÁZQUEZ-BOLAND, José A., Michael KUHN, Patrick BERCHE, et al., 2001. *Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants*. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 14(3), 584-640 [cit. 2023-04-10]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.14.3.584-640.2001

WAITES, W, 1990. Foodborne illness: an overview. *The Lancet* [online]. 336(8717), 722-725 [cit. 2023-04-14]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/0140-6736(90)92213-2

WANG, Shumin, Yue XIAO, Fengwei TIAN, Jianxin ZHAO, Hao ZHANG, Qixiao ZHAI a Wei CHEN, 2020. Rational use of prebiotics for gut microbiota alterations: Specific bacterial phylotypes and related mechanisms. *Journal of Functional Foods* [online]. 66 [cit. 2023-04-08]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2020.103838

WANG, Yvonne, Brenna A. BLACK, Jonathan M. CURTIS a Michael G. GÄNZLE, 2014. Characterization of α -galacto-oligosaccharides formed via heterologous expression of α -galactosidases from *Lactobacillus reuteri* in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 98(6), 2507-2517 [cit. 2023-04-18]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-013-5145-x

WATSON, D., M. O'CONNELL MOTHERWAY, M. H. C. SCHOTERMAN, R. J. Joost VAN NEERVEN, A. NAUTA a D. VAN SINDEREN, 2013. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 114(4), 1132-1146 [cit. 2023-04-18]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.12105

WU, Mengjie, Qingli DONG, Yue MA, Shuo YANG, Muhammad ZOHAIB ASLAM, Yangtai LIU a Zhuosi LI, 2022. Potential antimicrobial activities of probiotics and their derivatives against *Listeria monocytogenes* in food field: A review. *Food Research International* [online]. 160 [cit. 2023-04-18]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2022.111733

YOU, Siyong, Yuchen MA, Bowen YAN, Wenhui PEI, Qiming WU, Chao DING a Caoxing HUANG, 2022. The promotion mechanism of prebiotics for probiotics: A review. *Frontiers in Nutrition* [online]. 9 [cit. 2023-04-08]. ISSN 2296-861X. Dostupné z: doi:10.3389/fnut.2022.1000517

ZHAO, Yang, Hui-Ming ZHOU, Ze-Hua HUANG a Ren-Yong ZHAO, 2020. Different aggregation states of barley β -glucan molecules affects their solution behavior: A comparative analysis. *Food Hydrocolloids* [online]. 101 [cit. 2023-04-19]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105543

ZHU, Qi, Ravi GOONERATNE a Malik HUSSAIN, 2017. *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods* [online]. 6(3) [cit. 2023-04-08]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods6030021