

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Antimikrobiální aktivita a chemické složení silic lípy
srdčité**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Anna Štětinová

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce: Ing. Pavel Nový, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Antimikrobiální aktivita a chemické složení silic lípy srdčité jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 16.7.2020

Poděkování

Ráda bych tímto způsobem poděkovala Ing. Pavlu Novému, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost, ochotu a především za jeho čas.

Můj dík patří také mým rodičům a prarodičům za podporu během celého studia a sourozencům za pomoc s cizojazyčnými překlady.

Dech síly jaksi neuvědoměné
a dobráctví, jež medu plno, vane
z koruny její hmyzem opěvané,
když nad snem květů pohoda se klene.

V jich vůni zlatem nebes nasycené,
s níž pozdrav slunce dolů ve stín kane,
mdlý poutník tuší kraje požehnané
a kvetoucí kdes v budoucnosti sněné.

Až sladká moudrost vejde v srdce lidská,
jak v úly med ze sterých snesen květů,
a práce bude radost harmonická,

jak pohanské a slavné kolonády
lip aleje ve chvílích velkých vznětů
tančící páry přilákají rády.

S. K. Neumann, Lípa

Antimikrobiální aktivita a chemické složení silic lípy srdčité

Souhrn

Cílem této práce bylo vytěžit silice z listů a květů lípy srdčité, pro srovnání byly použity vzorky lípy velkolisté. U těchto silic zjistit, zdali mají antibakteriální aktivitu či nikoliv a dále zanalyzovat jejich chemické složení.

Oba druhy lip (*Tilia cordata* Mill. a *Tilia platyphyllos* Scop.) patří v České republice k původním dřevinám, které jsou využívány v tradičním lidovém léčitelství. Používá se hlavně jejich odvar nebo nálev z květů nebo květenství při obtížích jako je: nachlazení, zánětlivé a horečnaté stavy, onemocnění ledvin i močového měchýře.

Silice byly vytěženy ze všech vzorků pomocí vodní destilace s poměrně malou výtěžností (0,002 – 0,008 %). U vytěžených silic bylo zanalyzováno chemické složení prostřednictvím plynové chromatografie. Dále byly provedeny testy antimikrobiální aktivity pomocí mikrodiluční bujónové metody proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím (konkrétně *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) a kvasinkám (konkrétně *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*).

Lipové silice nevykazovaly v koncentracích 8-1024 µg/ml proti vybraným mikroorganismům antimikrobiální aktivitu. Výjimkou byl pouze slabý antifungální účinek pozorovaný u silice z listů *T. cordata* proti *C. albicans*.

Složení silic bylo velmi různé i u listů a květů ze stejné rostliny, i mezidruhově, ovšem nejhojněji zastoupené látky se u silic shodovaly. Mezi hlavní látky u silice z květů *T. cordata* patřily tricosan (25,07 %), pentacosan (12,16 %) a kauren (17,81 %). U silice z listů *T. cordata* to byla hlavně látka phytol s obsahem 69,55 %. Další méně zastoupené látky byly β-Ionone (5,347 %) a α-Ionone (3,5 %). Silice z květů *T. platyphyllos* obsahovala nejvíce tricosane (19,31 %), pentacosane (14,56 %), dále 2-pentadecanon-6,10,14-trimethyl (12,84 %). Silice z listů *T. platyphyllos* měla nejvíce obsahových látek. Mezi majoritní patřily tricosane (9,06 %), pentacosane (5,32 %) a 2-pentadecanon-6,10,14-trimethyl (8,10%).

Podle dostupných zdrojů byly poprvé testovány na antimikrobiální aktivitu silice z listů obou druhů lip a poprvé bylo analyzováno chemické složení silice z listů *T. cordata*. Do budoucna může znalost obsahových látek v silicích napomoci osvětlit princip jejich biologické aktivity a jejich fungování na lidský organismus.

Klíčová slova: *Tilia platyphyllos*, *Tilia cordata*, silice, antimikrobiální aktivita, chemické složení

Antimicrobial activity and chemical composition of *Tilia cordata*

Summary

The purpose of this research was to distill essential oils from leaves and blooms of *Tilia cordata* Mill. with a comparison of *Tilia platyphyllos* Scop. To test those essential oils for their potential antibacterial activity and analyze their chemical composition.

Both species (*T. cordata* and *T. platyphyllos*) originating in the Czech Republic are commonly used in traditional folk medicine. Most commonly used is their infusion from blooms for health complications including cold, inflammation, fever, kidney disease and bladder disease.

The essential oils were distilled from all samples using water distillation with a relatively small percentage (0,002 – 0,008 %). The chemical composition of the distilled essential oils was analysed via gas chromatography. Furthermore, the test for antimicrobial activity was made using microdilution broth method against gram-positive and gram-negative bacteria (specifically *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) and yeast (specifically *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*).

The linden's essential oils in concentrations 8-1024 µg/ml did not report any antimicrobial activity against given microorganisms. Potentially antifungicidal were the essential oils from the leaves of *T. cordata* against *C. albicans*.

The composition of essential oils was very different in leaves and blooms of the same plant and interspecies as well, but the substances in highest concentrations were the same. The main substances in essential oils of blooms of *T. cordata* were tricosan (25,07 %), pentacosan (12,16 %), kauren (17,81 %). In essential oils of leaves of *T. cordata* it was mainly phytol in concentration of 69.55%. Other less represented substances were β-Ionone (5,347 %), α-Ionone (3,5 %). The essential oils from blooms of *T. platyphyllos* contained tricosane (19,307 %), pentacosane (14,56 %) and 2-pentadecanon-6,10,14-trimethyl (12,84 %). The essential oils from leaves of *T. platyphyllos* had the most of contents. The once with largest contents were tricosane (9,06 %), pentacosane (5,32 %) and 2-pentadecanon-6,10,14-trimethyl (8,10 %).

The essential oils of the leaves from both types of lindens were tested to antimicrobial activity for the first time based on the all available resources, as well as the analysis of the chemical composition of essential oil from *T. cordata* leaves.

In the future, the knowledge of composition of essential oils can help us better understand the principles of their biological activity and their functioning in relation to the human body.

Keywords: *Tilia cordata*, *Tilia platyphyllos*, essential oil, antimicrobial activity, chemical composition

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Charakteristika vybraných druhů dřevin	11
3.1.1	Botanická charakteristika vybraných druhů dřevin	12
3.1.1.1	Lípa srdčitá (<i>Tilia cordata</i>)	12
3.1.1.2	Lípa velkolistá (<i>Tilia platyphyllos</i>)	12
3.1.2	Tradiční využití vybraných dřevin.....	13
3.1.3	Využití vybraných dřevin v léčitelství a jejich účinky	16
3.1.4	Biologicky aktivní látky vybraných dřevin	17
3.2	Silice.....	18
3.3	Antimikrobiální látky	19
3.4	Charakteristika vybraných mikroorganismů.....	20
3.4.1	<i>Bacillus cereus</i>	21
3.4.2	<i>Candida albicans</i>	22
3.4.3	<i>Escherichia coli</i>	22
3.4.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.5	Mikrodiluční bujónová metoda	23
3.6	Plynová chromatografie.....	24
4	Metodika	26
4.1	Použité přístroje a pomůcky	26
4.1.1	Přístroje	26
4.1.2	Pomůcky	26
4.2	Použité chemikálie.....	27
4.2.1	Rozpouštědla.....	27
4.2.2	Antibiotika	27
4.2.3	Kultivační média.....	27
4.3	Testované mikroorganismy	27
4.4	Rostlinný materiál.....	28
4.5	Extrakce a příprava vzorků silic	28
4.6	Použitá kultivační média a jejich příprava.....	30
4.6.1	MHB a pufrovaný MHB	30
4.6.2	RPMI médium.....	30
4.7	Příprava inokula.....	30
4.8	Příprava kontrolních antibiotik.....	31
4.9	Testování mikrobiální aktivity bujónovou mikrodiluční metodou	31

4.10	Chemické složení lipových silic	34
5	Výsledky	35
5.1	Extrakce silic	35
5.1.1	<i>T. cordata</i> květ	35
5.1.2	<i>T. cordata</i> list	36
5.1.3	<i>T. platyphyllos</i> květ	36
5.1.4	<i>T. platyphyllos</i> list	36
5.2	Antimikrobiální aktivita silic	37
5.3	Chemické složení silic	39
5.3.1	<i>T. cordata</i> květ	39
5.3.2	<i>T. cordata</i> list	39
5.3.3	<i>T. platyphyllos</i> květ	39
5.3.4	<i>T. platyphyllos</i> list	39
6	Diskuze	45
6.1	Extrakce silic	45
6.2	Antimikrobiální aktivita silic	46
6.3	Chemické složení silic	47
7	Závěr	50
8	Seznam literatury	51
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	57
10	Seznam obrázků	58
11	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Léčivé stromy, keře a rostliny, kterých v České republice není málo, protože tu máme flóru celkově velmi bohatou, byly odpradáвна využívány v lidovém léčitelství. Nejčastěji v podobě nálevu z květů, listů anebo plodů vybraných rostlin. Lípa v tomto ohledu hraje v léčitelství významnou roli a využití čaje z ní má velmi široké použití.

Literatura tvrdí, že se dříve používaly i lipové listy k inhalacím (Janča 1995). To by mohla být známka toho, že se v nich vyskytují silice.

Silice obecně obsahují velké množství biologicky aktivních látek, jejich složení bývá předmětem zkoumání v mnohých studiích. Pokud by se podařilo objasnit, které látky jsou za onu aktivitu odpovědné, mohl by být rozpleten složitý mechanismus jejich účinků. Těchto studií je stále více, protože silice obsahují také antimikrobiální látky, které by mohly být využity v lékařství, kde v současnosti začíná boj s rezistentními kmeny mikroorganismů (Conway 2002).

Věřím, že tyto výzkumy o empirických tvrzeních o léčivých rostlinách zanechaná našimi předky mají velikou budoucnost a možná i to je cesta k poznání nových látek. Ta nám může určit budoucí směr, ukázat nové metody léčení a v neposlední řadě dokázat, že člověk je stále velmi spjatý s přírodou.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Květenství lípy srdčité i lípy velkolisté obsahuje silice a používá se od nepaměti jako droga při nachlazení a jiných onemocněních. Je možné, že tyto silice vykazují antimikrobiální aktivitu. Je možné, že i listy těchto druhů lip obsahují silice s možnou antimikrobiální aktivitou.

Cíle práce: Cílem práce je vydestilovat silice dvou dřevin v ČR a to lípy srdčité (*Tilia cordata* Mill.) a lípy velkolisté (*Tilia platyphyllos* Scop.), konkrétně z jejich listů a květenství a otestovat jejich případnou antimikrobiální aktivitu.

Práce si také klade za cíl zanalyzovat složení těchto silic.

U silice z listů *T. cordata* nebylo dosud analyzováno její složení a žádná silice z listů nebyla testována na antimikrobiální aktivitu.

3 Literární rešerše

Rostliny jsou na naší planetě daleko starším organismem, než je člověk. Bez rostlin bychom vůbec nemohli žít, je to náš zdroj potravy, dávají nám materiál na stavby našich obydlí a díky stromům lidstvo mohlo vystavět lodě a překonávat oceány. Tyto zaoceánské plavby byly důležitým milníkem v lidské historii. Přinášely změny myšlení, rozšiřovaly celosvětový obchod, přinášely nové zboží, informace a příležitosti. Toto objevování světa se ovšem neobešlo bez válek nebo nových nemocí. Je jasné, že bez nich by lidstvo nebylo tam, kde je a je jasné, že bez kmenu stromů by tyto cesty ani nezačaly (Conway 2002). Jak dokládá i Hora (1981): od pravdávna lidé užívaly stromů a keřů pro své vlastní účely a potřeby, sloužily jim kmeny stromů, listy a plody. Jsou naprostou samozřejmostí ve světě okolo nás.

Samozřejmostí v našem světě je i kyslík, který dýcháme z ovzduší, a za který jsou zodpovědné právě rostliny ale i mikroorganismy. Prvními organismy, které na planetě vytvořily kyslík, byly sinice. Díky rostlinnému zelenému barvivu v listech je možná fotosyntéza, což je děj, kdy rostliny z oxidu uhličitého a vody syntetizují jednoduché cukry (energie pro jejich životní děje) a kyslík. Dalo by se říci, že kyslík je vedlejší produkt této důležité rovnice, ale je nepostradatelný (Lenton et al. 2016). Současné chování lidí je v rozporu s tím, jak důležité stromy pro život jsou. Jedná se o neustálé odlesňování za účelem orné půdy, kácení stromů pro rozšiřování měst a vesnic, ale také kvůli výdělku, stále větší zabetonované plochy, kde rostliny nemají své místo. Přitom poskytují, například ve městech, velmi důležitý stín a stálejší vlhkost ovzduší (Hora 1981).

To, že stromy jsou odpradáвна součástí lidstva, a že je lidé vždy vnímaly ve svých životech, dokládají také mýty a legendy, které se o existenci stromů opírají. Ve většině kultur se hovoří o stromech jako symbolech (bříza – symbol přicházejícího jara, dub – symbol boha blesku a hromu Peruna), o „stromu života“ a o posvátných stromech (ty které umí uzdravovat, nebo odvádějí duše do říše mrtvých). S příchodem křesťanství bylo mnoho těchto tradic a legend o stromech vymýceno, možná proto s nimi v současnosti necítíme žádné spojení a nemáme potřebu rozšiřovat a zachraňovat lesní porosty (Hagender 2008). Můžeme jen doufat, že část zbývajících starých lesních porostů přežije do doby, než se o ně začne zajímat dostatečné množství lidí, kteří je budou obdivovat. Způsob, jakým budeme stromy využívat k jejich nesčetným účelům, sehraje důležitou roli v tom, jak budou světové lesy v budoucnu vypadat (Kingsbury 2015).

3.1 Charakteristika vybraných druhů dřevin

V naší republice jsou přirozeně rozšířeny dva druhy lípy: lípa srdčitá (*Tilia cordata*) a lípa velkolistá (*Tilia platyphyllos*) (Hlavová 2005). Proto byly pro tuto práci vybrány právě tyto dvě původní dřeviny.

Lípy se v minulosti sázely jako rodové stromy nebo stromy, které mají odkazovat na památku významné události. Z tohoto důvodu se k některým stromům váží legendy a pověsti připomínající nám časy minulé (Černý 2005).

3.1.1 Botanická charakteristika vybraných druhů dřevin

Tyto stromy patří do čeledi slézovité (*Malvaceae*), dříve označované také jako lípovité (*Tiliaceae*) (Málek et al. 2012).

3.1.1.1 Lípa srdčitá (*Tilia cordata*)

Lípa srdčitá, synonymem též malolistá, je rozložitý strom dosahující výšky až 25-30 m, průměru kmene až 1 m a věku 150 let. Pokud lípa roste volně a na vhodném podloží, může mít průměr kmenu až 3 m a dosahovat délky i 300 let. Lípa srdčitá nedosahuje takových rozměrů a věku jako lípa velkolistá (Koblížek 2009). Listy má orkouhle srdčité, krátce zašpičatělé, jemně a ostře pilovitého tvaru. Na rubu jsou modrozelené, v úhlech v okolí řapíku a okolo žilnatiny mají rezavě hnědé svazečky chlupů. Květy jsou žlutavě bílé, silně voňavé, oboupohlavné a kvetou od června do července (Horáček 2007). Květenství se skládá z 5-11 listů a zespoda je opatřené podpůrným listenem. Lipové drobné a tenkostěnné oříšky, jakožto plody opadávají na podzim (Hora 1981).

Stanoviště lípy srdčité je příznivé na vlhkost, chladné a zastíněné. Na půdu má střední nároky a ve srovnání s lípou velkolistou jsou to spíše půdy chudší na živiny. Je typickou příměsí dubohabřin, suťových lesů, lipových bučin. Roste téměř v celé Evropě, výjimkou jsou nejjihnější a nejsevernější části kontinentu. Odolné jedince můžeme nalézt i na Sibiři nebo na Kavkaze. V Česku ji můžeme nalézt v nížinách a její pás se táhne až po úpatí nižších hor.

Často ji můžeme vidět vysazenou v alejích a také jako součást městské zeleně. Je totiž velmi odolná, snáší přesazování, nešetrné zacházení, výkopy kolem kmene a kořenů, je ovšem citlivá na solení (Koblížek 2009).

Už od pradávna je lípa srdčitá vysazována v kulturní krajině, při lidských sídlech jako strom návesní, rodový, památný, v minulosti byla také sázena do blízkosti poutních míst (Černý 2005).

Červený seznam IUCN (2017) přiřadil lípu srdčitou k druhům s malým ohrožením. (LC). Ale zvláštní ochranu mají některé vybrané exempláře, které jsou označovány jako stromy památné (Kyzlík 2005).

3.1.1.2 Lípa velkolistá (*Tilia platyphyllos*)

Lípa velkolistá (někdy bývá nazývána také jako širolistá (Hlavová 2005)) je strom velkých rozměrů, s válcovitým kmenem a košatou rozvětvenou korunou. Dosahuje výšky až 30 m, průměru kmene 1,5 m a může mít věk až 200 let (Hora 1981). Většina památných starých lip bývá tohoto druhu (Koblížek 2009).

Listy jsou okrouhle srdčité, spíše vejčitého tvaru a dlouhé 7-12 cm. Mají delší tvar, jsou více zašpičatělé, pilovité, někdy až laločnaté, jejich tvar je celkově více asymetrický. Na rubu u žilek je bělavé chmýří (Horáček 2007). Opadané listy s měkkou strukturou v půdě a na ní dobře zetlívá a přispívá proto k vytváření vhodné vrstvy živného humusu.

Raší a rozkvétá zhruba o 14 dní dříve, než lípa srdčitá, a její květenství visí dolů pod listy, na rozdíl od květenství, která jsou spíše nad listy, jako je tomu u lípy srdčité (Koblížek

2009). Květenství je složeno z 2-5 květů, barva je nažloutlá a listen zůstává na stopce i za plodu. Plody oříšky jsou větší než u lípy srdčité, jsou vlnaté a setrvávají na stromě i přes zimu (Volák a Stodola 1987).

Lípa velkolistá dobře snáší zastínění, potřebuje však více světla než lípa srdčitá. Často se udrží pod jinými dřevinami alespoň jako keř. Naproti tomu v podrostu pod lípou vydrží málokterá rostlina, má husté a velmi bohaté olistění. Lípa se snadno vyrovná s nedostatkem vláhy, potřebuje ale živné horniny jako vápenec, čedič aj., jinak je na půdu středně náročná (Koblížek 2009). Ovšem Němec (2005) zmiňuje, že je náročnější než *T. cordata*.

Z toho vyplývá, že vhodným stanovištěm lípy velkolisté jsou suťové a roklinové lesy. Vyskytuje se v klenových a lipových bučinách. Její rošíření je v celé Evropě, podobně jako u lípy srdčité, výjimkou jsou velmi teplé oblasti a horské vegetační pásy. Některé izolované lokality jejího růstu jsou v malé Asii a ve Švédsku. V Česku roste tato lípa roztroušeně po celém území od pahorkatin do podhůří (Koblížek 2009).

Stejně jako lípa srdčitá dobře snáší městskou zástavbu, seřezávání aj., ale je citlivá na solení. Tento druh je také náročný na vyšší vzdušnou vlhkost a je více citlivý k pozdním mrazům (Koblížek 2009).

3.1.2 Tradiční využití vybraných dřevin

Lípa je ceněna jako okrasný strom a jak bylo zmíněno výše, často se s ní můžeme setkat i ve městech. Stala se nedílnou součástí lidských obydlí, je to významná medonosná dřevina (Koblížek 2009). Díky své vůni, půvabné koruně i vlídnému stínu se stala symbolem ochrany, pomoci a lásky (Český rozhlas Radiožurnál 2014).

Využití lípy je známo už z prehistorické kultury. Jak uvádí Pigott (2012) bylo dřevo, kůra i lýko z lípy významným materiálem v různých etapách lidského vývoje až po současnost. V období střední a mladší doby kamenné se z kmenů lípy stavěly lodě, i když častěji se k tomuto účelu využívala olše. Lýko, používané až v době železné, se využívalo jako vázací materiál anebo z něj byly vyráběny jednoduché boty. Lipové dřevo je měkké, lehké a dobře obrobitelné a proto se využívalo na výrobu nádob na pití (pohárů), lžic, naběraček, případně k výrobě uměleckých předmětů. Změny lipového dřeva nejsou při vysychání výrazné, proto je toto dřevo k sochařství využíváno dodnes. Koblížek (2009) toto potvrzuje s tím, že lipové dřevo je řezbáři vyhledávané a vyzdvihuje jeho velkou trvanlivost. Černý (2005) zmiňuje dřevěné sošky v barokních kostelech, které jsou součástí výzdoby a nejčastěji pocházejí z lípy.

Tradiční užití lipového dřeva v Evropě a v Česku potvrzuje Kolář et al. (2019), který dokládá studii o materiálu, z něhož bývaly vyráběny kolovraty. Z této studie vyplývá, že v Česku více než v celé střední Evropě převládala ve výrobě kolovratů lípa, narozdíl od sousedních států, které upřednostňovaly jiné druhy stromů s vyšší hustotou dřeva (jako např. buk nebo javor).

Lipové dřevo je oblíbené při výrobě úlů, včelařských potřeb a také se z něj vyrábějí tradiční zápalky. Největší objem lipového dřeva je ale v současnosti využíván na výrobu klasických tužek, nebo hudebních nástrojů, nejčastěji pian a klavírů. Běžné využití tohoto dřeva bývá na kancelářské potřeby, především rýsovací prkna (Černý 2005).

Pro Germány ve středověku byla pravděpodobně nejdůležitějším stromem lípa (o preferenci stromů se spíše spekuluje, někdy se uvádí také dub). Lipové stromy byly vysazovány na okrajích vesnic a měst a okolo nich byla vystavěna v půlkruhu zídka nebo plot. Toto místo pak bylo používáno k soudním přelíčením, ale i k lidovým slavnostem. V době slavnosti se lípy zdobily a pod nimi se tancovalo (obr. č. 1). Někdy byla pro tyto účely vytvořena taneční dřevěná podlaha. Tyto „vesnické“ lípy bývaly častěji *T. platyphyllos*, protože lípa velkolistá zpravidla kvete ještě v letním slunovratu (20. června) kdy se tyto velkolepé slavnosti a oslavy konaly (Pigott 2012).



Obrázek č. 1: dobový tanec pod lípou – vyobrazení Hieronymus Bock

Slovanské země a Česká republika není výjimkou, mají k lípě větší vztah než jiné národy. Je to jejich národní strom. Lipové listy zdobí českou prezidentskou standartu, lípa se jako symbol objevuje i na státní pečeti a na některých bankovkách, v minulosti byla na rubu mincí. Slované měli v minulosti kromě lípy vztah také k dubu. Tyto stromy tvořily významnou dvojici, spolu s lípou se doplňovaly, byly něco jako ženský a mužský symbol. V době národního obrození ovšem začal dub nabývat symbolu německého. Začal být více spojován s germány, čehož si slovanští vlastenci začali všimnout a na Všeslovanském sjezdu v Praze v roce 1848 prohlásili za oficiální strom slovanů právě lípu (Český rozhlas Radiožurnál 2014).

Jako symbol vyjadřuje lipový list, jenž je podobný svým tvarem srdci, štěstí, lásku a pravdu (Kyzlík 2005).

Tento strom se od starověku do současnosti používá v lidovém léčitelství, ale i v oficiální medicíně (Janča 1995). Druhy sbírané pro tento účel na našem území jsou *T. cordata*, *T. plathyphyllos*, objevují se zmínky i o *T. europea* (lípa obecná; která je pravděpodobně hybridní druh, kříženec *T. cordata* a *T. plathyphyllos* (Janča 1995)). Na americkém kontinentě je to hojně zmiňovaná *T. americana* (lípa americká) (Conway 2002).

3.1.3 Využití vybraných dřevin v léčitelství a jejich účinky

Obě dřeviny, kterým se věnuje tato práce – *T. cordata* a *T. platyphyllos* se využívají v léčitelství, mají i stejné léčebné využití.

V oficiálním evropském lékopisu jsou tyto dvě dřeviny uvedeny. Německá lékařská komise schválila lipovou rostlinu (s listeny nebo bez) jako prostředek proti nachlazení a kašli (Radulescu a Oprea 2008).

Janča (1995) i jiné zdroje (Korbelář a Endris 1968; Conway 2002; Koblížek 2009) uvádějí, že sbíranou částí lípy bývá květenství i s listenem (listen je listovitý útvar z jehož paždí vyrůstají větvíčky květenství (Conway 2002)).

Květenství se sbírá v průběhu června a července, na počátku rozkvétání, za suchého počasí a ihned by se měl sušit. Doporučuje se sušení ve stínu a v průvanu, nikoliv u topných těles anebo na slunci (Korbelář a Endris 1968). Kyzlík (2005) doporučuje lipové květy trhat každý rok nové, protože po roce ztrácí většinu svých účinných látek a tím pádem svou léčivou sílu.

Janča (1995) zmiňuje, že se mohou sbírat i listy, které se používají k inhalacím v aerofytoterapii. O listech dále tvrdí, že se používaly na puchýře v ústech. Pravděpodobně se přikládaly čerstvé přímo na ránu.

Mattioliho herbář praví, že lipový nálev podporuje růst vlasů a že vodu z lipového květu používají ženy na skvrny ve tváři a proti otokům (Koblížek 2009). Kadlíková (2004) tvrdí, že se vodou spařené listy smíchané s vínem používaly jako obklad na končetiny proti křečím a také na popáleniny.

Suché lipové dřevo bylo dříve páleno a takto vzniklé dřevěné uhlí bylo používáno vnitřně při překyselení žaludku, nadýmání, chorobách žlučníku a jater a také po požití jedů (Volák a Stodola 1987).

V dnešní době se droga užívá na mnohé neduhy, tradičně ve formě nálevu ze sušených květenství (Janča 1995).

Nálev nebo odvar z lípy vykazuje dobrou antimikrobiální aktivitu, jak dokládá Aksoy et al. (2012), proto je čaj jako medikament z lípy prospěšný a výluh v horké vodě dobře extrahuje požadované léčivé látky.

Mezi obtíže, na něž se doporučuje pít lipový čaj, patří: nachlazení, zánětlivé a horečnaté stavy, onemocnění ledvin i močového měchýře, jelikož nálev působí močopudně. Také podporuje vylučování žaludečních a střevních šťáv a reguluje jejich tvorbu. Celkově takto připravená droga uklidňuje (Janča 1995). Velmi se shoduje s novější studií od Radulescu a Oprea (2008), která nálevu z lipového květu připisuje následující účinky: antispasmodické, diuretické, potopudné a sedativní. Také napomáhá při obtížném vykašlávání.

Obě tato tvrzení potvrzuje Buchbauer et al. (1992), který zkoumal sedativní účinky silic z lipových květů na myších. Po čichání lipových silic byla u myši zjištěna snížená pohyblivost a to až na 55 % oproti normálu.

Účinnost lipového nálevu při zánětech dýchacích sliznic ale i při angíně nebo zánětu nosohltanu je prokázána i díky Czerwińske et al. (2018). Z lipového květenství byly izolovány porokyanidy (deriváty flavan-3-olu), které jsou schopné potlačovat zánětlivou odpověď organismu.

Conway (2002) doporučuje popíjet 3-4 šálky denně na potlačení důsledků stresu. Také popisuje psychické a fyzické stavy, při kterých je vhodné užívat lípu, jsou to např. úzkosti, nespavost, neklid, migréna, zažívací potíže, ale také vysoký krevní tlak a hyperaktivita u dětí. Nálev je celkově u dětí i dospělých velmi dobře přijímán pro svou lahodně medovou chuť, a většina nemocných snáší i dlouhodobé podávání (Janča 1995).

Čaje (nálevy a odvary) z různých léčivých rostlin obsahují pozoruhodné množství biologicky aktivních látek, které jsou pravděpodobně zodpovědné za jejich léčivé účinky a jsou nezbytné pro zdraví lidského těla (Farcas et al. 2015).

Farmaceutické vlastnosti lipového květu jsou připisovány chemickým sloučeninám, jako jsou flavonoidy, éterický olej, taniny a slizové polysacharidy (Radulescu a Oprea 2008).

V České republice je pití a užívání lipového čaje velmi zakořeněným zvykem. Dokládá to studie od Knotek et al. 2012. Ten ve svých výsledcích tvrdí, že výřez populace v České republice, na které byla studie prováděna, by si z 56 % vybrala na léčení svých neduhů právě lipový čaj (mezi dalšími nabízenými byl čaj z máty, meduňky aj.). Mezi obtíže, na které by respondenti lípu využili, se řadily: nachlazení hlavy nebo hrudníku (zánětlivé stavy), nemoci žaludku nebo střev, podpora imunity, celková regenerace (Knotek et al. 2012).

Podobný výzkum na používání bylinných extraktů (nálevů atd.) byl ze středomoří. Zde respondenti ohodnotili lípu jako jistou pomoc při poruchách trávení a při zánětlivých stavech horních cest dýchacích. V případě těchto obtíží by lidé zvolili *T. cordata* 100 % případů (Ouelbani et al. 2016). Celkem byli lidé dotazováni na 102 druhů rostlin patřících do 90 rodů.

3.1.4 Biologicky aktivní látky vybraných dřevin

Co se týká účinných látek, tak v květenství lip je nejdůležitější biologicky aktivní látkou silice, která má jako hlavní látku ve svém složení farnesol. Lípy také obsahují slizy, glykosidy a látky blízké vitaminu E (tokoferoly) (Korbelář Endris 1968). Obsah glykosidů má pravděpodobně rozhodující vliv na potopudný účinek lipové drogy. Lípa dále obsahuje také flavonoidy, hlavně kvercetin a kemferol (Volák a Stodola 1987).

Zde se shodují s Farcas et al. (2015), který zkoumal nálevy z lípy, máty, třezalky a černého a zeleného čaje. Analýza prokázala, že lipový nálev obsahuje 16,2 mg GAE/100 ml fenolických látek, a 8,66 mg QE/100 ml flavonoidních látek, což je téměř dvakrát tolik co v černém nebo v zeleném čaji. Byla na třetím místě s obsahem kofeinu (za černým a zeleným čajem): 5,25 mg/100 ml, a je proto možné se domnívat, že lipový čaj bude vykazovat také antioxidační aktivitu.

Výzkum, který byl prováděn Buchbauerem et al. (1992) potvrzuje sedativní (tj. uklidňující) účinky éterického oleje z lipových květů, přímo na zvířatech (myších). Po čichání silice z lipových květů byla jejich pohyblivost snížena na 55% a tímto bylo dokázáno, že lipový olej může hrát významnou roli v aromaterapii.

Kowalski et al. (2017) analyzovali nejbohatší složky éterického oleje z květů lípy srdčité (*T. Cordata*). Hmotnostně nejvíce procent je v silici zastoupen 6,10,14-trimethyl-2-pentadekanon (11-20%), trikosan (6-17%), henikosan (3-9%), nonanal (7%), a oktadeka kyselina-9,12-dienová (7%). Mezi terpenoidy patřily nejhojněji: E-anethol (8%), linalool (4%), mentol (3%), terpinen-4-ol (1%), p-cymen-8-ol (2%), karvon (6%), thymol (3%).

Podle Oniszczyk a Podgorski (2015) je pro květenství lip charakteristický vysoký obsah polyfenolů. Tento rostlinný materiál obsahuje flavonoidy (zde panuje shoda s Farcaset al. (2015), i s Volák a Stodola(1987)), zejména kvercetinové glykosidy (rutin, quercitrin a isoquercitrin), kempferol glykosidy a fenolové kyseliny (kofeinové, p-kumarové a chlorogenové kyseliny). Zároveň bylo zjištěno, že extrakce pomocí ultrazvuku je nejúčinnější a nejrychlejší metoda izolace polyfenolů z lipových květů.

3.2 Silice

Silice, někdy též nazývané éterické oleje, jsou složité chemické sloučeniny. Obsahují látky jako terpeny, alkoholy, aldehydy, fenoly, estery a étery. Obvykle se extrahují parní destilací. Tyto chemické látky mimo jiné způsobují, že rostliny, ve kterých jsou obsažené, voní. Všechny éterické oleje jsou do jisté míry antiseptické. Působí silně antibakteriálně a fungicidně, některé působí dokonce i proti virům (Conway 2002).

Costa et al. (2020) ve své studii zmiňuje silici z rostliny *Eugenia stipitata*, jejíž účinky a složení z ní dělají slibný přírodní zdroj chemických sloučenin s nízkými vedlejšími účinky a protizánětlivým potenciálem.

Silice rostlin mají léčebné účinky, což je prokázáno jejich používáním po tisíciletí a také vědecky. Mohou se užívat zevně i vnitřně. Aplikují se nejčastěji zevně přes tkáň (kůže, sliznice) a odtud se dostávají do krevního řečiště (Hemzal 2016). Dle italské publikace *Journal of Ethnopharmacology* se v Itálii mezi lety 1850 a 1950 běžně používaly éterické oleje z rostlin na kožní problémy způsobené bakteriemi (Mazzei et al. 2020).

Po nanesení na kůži silice pronikají hlouběji do pokožky a zde jejich látky působí na buňky, poté se látky dostávají do krve a jsou roznášeny po celém těle, kde interagují s organismem a ovlivňují orgány. Obdobně silice působí při inhalaci, kde pronikají nosní sliznicí do plic a následně do krve.

Silice mají tři základní způsoby účinku – farmakologický (látky v krevním řečišti chemicky reagují s hormony, enzymy atd.), fyziologický (zde mají obsahové látky silic vliv na tělesný systém), psychologický (organismus reaguje na vůni, popř. barvu silice) (Hemzal 2016).

Jejich získávání je většinou poměrně obtížné, protože ani aromatické rostliny silic neobsahují mnoho. Toto těžení silic se provádí, jak uvádí Janča (1995) destilací, kde se využívá voda či pára, případně lisováním nebo extrakcí. S tím se shoduje Baser a Buchbauer (2015). Uvádějí ale více možných postupů, a zmiňují, že lisování éterických olejů probíhá výhradně za studena. Jedním z těchto postupů získávání silic je hydrodestilace, což je vodní destilace. Zde se v nádobě, pod kterou je zdroj tepla, ohřívá materiál, který je ponořen do vody. Jak se voda zahřívá a následně odpařuje tak s sebou unáší těkavé látky z destilovaného materiálu. Páry spolu se silicí pokračují do chladiče, který je součástí destilační aparatury. Silice se zde ochlazuje a projevuje se jako olejovitá tekutina, která se usazuje na povrchu vody v chladiči. Tato metoda je pravděpodobně nejstarší způsob získávání silic, ale často se využívá dodnes (Hemzal 2016). Dalším z postupů jak vyextrahovat silice je destilace vodní parou. Tato metoda je velmi podobná vodní destilaci, ale v destilační aparatuře koluje pouze pára, která na sebe váže vyextrahované silice. Opět je na konci aparatury chladič, který silice

ochlazuje, a ty se v něm sráží. Pára koluje po celou dobu destilace v systému. Tato metoda je velmi výhodná pro svou jednoduchost, efektivitu a cenovou dostupnost. Mohou se tak destilovat téměř všechny rostlinné části jako jsou květy, listy, oddenky ale i například plody nebo kořeny (Baser a Buchbauer 2015). Dalším postupem jak z rostlin vytěžit silice je již zmíněné lisování. To se nejčastěji provádí u citrusových plodů, kde se silice vyskytují na povrchu kůry. Nejjednodušší způsob je tlakem stlačit plod, čímž se poruší siličnaté váčky a éterické oleje se uvolní. Je nutné je před používáním prefiltrovat. Tato metoda probíhá za studena a poskytuje velmi kvalitní silice. Další hojně využívanou metodou je macerace v oleji nebo v jiné na tuk bohaté sloučenině (Baser a Buchbauer 2015).

Působení éterických olejů je účinné v mnoha směrech – díky svým vlastnostem podporují obranyschopnost organismu, uklidňují, podporují oběhový systém (Conway 2002).

Uklidňující účinky, konkrétně lipové silice z květů (*T. Cordata*), dokazuje Buchbauer et al. (1992). Sedativní účinky potvrzuje i Radulescu a Oprea (2008). Podle jejich studie je tato zklidňující aktivita lipového květu přičítána těkavým složkám, ačkoli obsah éterických olejů je nízký (0,02–0,1%). Podle Conway (2002) mají silice mnoho dalších účinků, mezi nimi také antimikrobiální účinky.

3.3 Antimikrobiální látky

Některé látky mají tak specifické chemické složení, že mají přímý vliv na mikroorganismy. Tyto látky se podle účinku dělí na mikrobistatické (pouze potlačují růst mikroorganismů) a mikrobicidní (hubí celý mikroorganismus). Další dělení těchto látek může být na základě toho, na jaký druh buněk mají vliv. Baktericidní a bakteriostatické v případě bakterií a fungicidní a fungistatické v případě kvasinek a plísní. Po chemické stránce lze antimikrobiální látky rozdělit do tří základních skupin. První jsou látky, které působí na určitou strukturu buňky nebo na její funkci (například poškozují její buněčnou stěnu - penicilin, nebo cytoplazmatickou membránu – chloroform, formaldehyd). Druhá skupina jsou látky, které působí na mikrobiální enzymy (organoměďnaté sloučeniny, monojodoctová kyselina). Do třetí skupiny patří látky, které reagují s DNA (chemické mutageny, mytomicin C) (Šilhánková 2002).

Mnoho antimikrobiálních látek je obsaženo v rostlinách, tyto sloučeniny se vzájemně ovlivňují, a jsou mezi nimi látky s rozdílným chemickým složením (Cowan 1999). Mezi tyto důležité bioaktivní látky patří skupiny alkaloidů, flavonoidů, taninů, fenolických látek, steroidů, pryskyřic aj. Tyto sloučeniny mají přímý fyziologický účinek na lidské tělo (Dahiya a Purkayastha 2012).

Rostliny (různá zelenina, ovoce, koření) s vyšším obsahem silic se zdají být výborným zdrojem nám přirozených látek, které vynikají svou antimikrobiální a biologickou aktivitou (Nazzaro et al. 2013). Ovšem kvůli vzájemnému ovlivňování látek a velmi rozdílnému složení jednotlivých éterických olejů v rostlinách je problematické určit mechanismus, na jehož principu antibakteriální aktivita funguje (Cowan 1999). Nazzaro et al. (2013) zmiňuje, že antibakteriální aktivita závisí na složení jednotlivých olejů a také na množství sloučenin v nich obsažených. Jejich kombinace jsou různé, a často se látky mohou navzájem ovlivňovat

V roce 2012 proběhla studie různých bylinných extraktů, které se využívají v Turecku coby rostlinné léky. Tyto látky byly testovány ve formě odvaru, nálevu a extraktu v methanolu. Lipový extrakt v methanolu úspěšně inhiboval *S. aureus*. Její odvar také inhiboval *B. cereus* (Aksoy et al. 2012).

Doughari (2012) potvrzuje, že antimikrobiální aktivita je dokonce přímo závislá na geografické poloze sbírané rostliny (stejně rostliny z různých částí země/světadílů se velmi liší ve složení silic), stejně tak závisí na části rostliny, ze které je éterický olej extrahován (různé vlastnosti mají silice z květu a z listů stejné rostliny). Dále záleží na metodách extrakce, na způsobu testování antimikrobiální aktivity, na podloží odkud rostlina pochází, v neposlední řadě to je také věk rostliny.

Sloučeniny, které v rostlině odpovídají za antimikrobiální aktivitu, mohou být rostlinami vylučovány neustále. Další případ tvorby silic může být obranný – pokud se rostlina setká s nějakým patogenem nebo škůdcem, tak zahájí své obranné mechanismy, které mohou vést k vylučování silic. Tyto mechanismy mohou být také aktivovány enzymy, které organismus vylučuje v případě stresové situace (Nazzaro et al. 2013).

Lze brát jako obecné, že silice jsou inhibitory růstu mikroorganismů, ale také fungují proti produkci toxinů, které mikroorganismy vytvářejí. Mnohé tyto silice fungují lépe proti gramnegativním bakteriím, než proti grampozitivním. Tuto rozdílnost způsobuje složení buněčné stěny (De Martino et al. 2009). Gramnegativní bakterie mají v buněčné stěně pouze tenkou vrstvu peptidoglykanů a neobsahují teichoovou kyselinu. Ta u grampozitivních bakterií vytváří „tmel“ v silné peptidoglykanové vrstvě (Cempírková et al. 1997). Calo et al. (2015) zmiňuje, že je mnoho výzkumů, které potvrzují pronikání látek přes buněčnou stěnu a tím inhibují funkční vlastnosti dané buňky. Fenolické složky silic způsobí narušení buněčné membrány, to se projevuje propouštěním důležitých látek z buňky. Buňka tím ztrácí schopnost udržovat stále prostředí a ztrácí své intracelulární složky.

3.4 Charakteristika vybraných mikroorganismů

Pro testování antimikrobiální aktivity silic byly vybrány 4 druhy mikroorganismů. Tři zástupci z rodu bakterií a jedna kvasinka.

Bakterie jsou prokaryotické, jednobuněčné organismy, jejich jádro není odděleno jadernou membránou. Nemají organely, pouze ribozomy, ve kterých dochází k syntéze bílkovin. Rozmnožují se příčným dělením a jejich tvar je velmi různorodý. Nejčastější tvar je tyčinkovitý, méně častější pak tvar koku (kulovitý), mezi další patří fuziformní tvary (vřetenovité), zakřivené tvary (vibria), slabě zvlňené (spirily), nebo šroubovitě stočené (spirochety) (Cempírková et al. 1997).

Dva mikroorganismy zastupují grampozitivní bakterie, což jsou bakterie, které mají silnou peptidoglykanovou vrstvu s teichoovou kyselinou. Na tuto vrstvu se navazují polysacharidy, které jsou specifické pro skupiny bakterií a zodpovídají za imunochemické reakce. Buněčná stěna těchto bakterií zadržuje použité barvivo i po moření jodovým roztokem a odbarvování ethanolem, proto se nazývají grampozitivní, toto rozdělení vymyslel CH. Z. Gram a nazývá se diferenciatní barvení bakterií (Cempírková et al. 1997).

Jeden mikroorganismus zastupuje gramnegativní bakterie, tyto bakterie se po použití jodu a ethanolu odbarví. Je to proto, že mají ve své vrstvě pouze tenkou vrstvu peptidoglykanů. Součástí jejich buněčné stěny je ještě tzv. vnější membrána, která obsahuje fosfolipidy a lipopolysacharidy. Tyto lipopolysacharidy jsou u patogenů důležité pro jejich endotoxiny, kterými vyvolávají u živočichů příznaky onemocnění (Cempírková et al. 1997).

Jeden vybraný mikroorganismus zastupuje rod kvasinek. Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, které se řadí mezi houby (*Fungi*). Mají schopnost zkvašovat monosacharidy, některé i di- či trisacharidy na ethanol a oxid uhličitý. Jejich tvar je nejčastěji vejčitý, kulovitý nebo elipsoidní a souvisí úzce s rozmnožováním kvasinek, které se děje pučením nebo dělením (Šilhánková 2002).

3.4.1 *Bacillus cereus*

Bacillus je silná tyčinka, která dosahuje velikosti 2-5 mm. Může vytvářet spory a řadí se mezi grampozitivní bakterie (Helgason et al. 2000). Yusuf et al. (2018) zmiňuje, že tato bakterie je fakultativně aerobní, což potvrzuje i Cempírková et al. (1997), která tvrdí, že tyčinka je aerobní, ale roste dobře i za anaerobních podmínek. Vyskytuje se jednotlivě, nebo v řetězcích.

Roste dobře na standardních kultivačních médiích, nárůst se projevuje velkými a drsnými koloniemi s krémovým až nahnědlým zbarvením (Helgason et al. 2000).

B. cereus je široce rozšířen v přírodě a může být izolován z rostlin, půdy, prachu i odpadních vod. Ze svého přirozeného prostředí se snadno dostává do potravin a surovin na výrobu potravin (Cempírková et al. 1997), při růstu na polysacharidových substrátech totiž dochází k tvorbě toxinů, které mohou být příčinou otrav. Nejčastější příčinou otrav je požití potravin bohatých na sacharidy jako obiloviny, nebo škrob (polévky, rýže, pudíng) (Šilhánková 2002). Otravy bývají dvou typů, průjmové a emetické, liší se svými syndromy. Emetický toxin způsobuje zvracení, patří mezi peptidy a zpravidla se musí požít přímo s potravinou, ve které se nachází. Průjmový průběh otravy je způsoben více toxiny, původu bílkovinného, ale je nutné požít přímo sporu nebo vegetativní buňky *B. cereus* (Arnesen et al. 2008).

Otravy způsobené *B. cereus* bývají poměrně náhlé ale u člověka mají rychlý a většinou lehký průběh (Schindler et al. 1999). Studie od Yanget al. (2017) dokonce prokázala, že rod *Bacillus* izolovaný z vřetenky mandarín (*Synchiropus splendidus*) může mít pozitivní účinek na regulaci změny střevní mikroflóry. Tyto výzkumy jsou ovšem teprve na počátku.

B. cereus dobře reaguje na antibiotika vancomycin, chloramfenikol a gentamycin, ale nebývá téměř vůbec inhibován penicilinem (Yusuf et al. 2018). To potvrzuje i Helgason et al. (2000) a zmiňuje, že rezistence tohoto mikroorganismu je zcela přirozená, protože produkuje β -laktamázu.

3.4.2 *Candida albicans*

Candida je růstově nenáročná kvasinka. Optimální prostředí na agaru je pro ní 37 °C, ale roste i při 20 °C. Štěpí cukry glukózu, maltózu a sacharózu. Tvoří bílé kolonie, někdy naředlé, které jsou hladké a mazlavé. Tvar buněk je oválný až kulatý (Schindleret al. 1999).

C. albicans je podmíněný patogen. Ve standardním prostředí za normálních podmínek se nachází v lidském střevě, na sliznicích a také na kůži. Pokud je toto prostředí porušeno (užíváním kortikoidů, antibiotik, cytostatik) nebo z nějakého důvodu nefunguje normálně (oslabená imunita, cukrovka) kvasinka se přemnoží a způsobuje nemoc kandidózu. Toto onemocnění má tolik příznaků (např. bílé povlaky jazyka, „plíseň“ nehtů a kůže) a může se projevovat tak různě, že lékař často napoprvé neodhalí jako původce kvasinku (Tong a Tang 2017). Pokud se jedinec včas neléčí, může kvasinka zachvátit také vnitřní orgány a jejich postupné selhávání může vést až ke smrti. Toto se však stává zřídka, například u pacientů s rakovinou, kterým se podávají imunosupresivní látky (Šilhánková 2002). Toto potvrzuje také Bennet et al. (2015), který dokládá toto onemocnění u lidí po transplantaci, u lidí, kteří jsou dlouho v nemocničním prostředí a užívají imunosupresiva případně antibiotika. *C. albicans* může napadat téměř každý orgán a většinu protetických materiálů.

Tato kvasinka si v průběhu let vyvinula rezistenci na běžně používaná antimykotika, proto je zapotřebí najít novou účinnou látku na pomoc v boji proti ní (Zida et al. 2017).

3.4.3 *Escherichia coli*

Tento mikroorganismus patří do skupiny enterobakterií a je také jejím nejčastějším patogenem (Bennet et al. 2015). *E. coli* je gramnegativní bakterie, která nesporuluje. Je fakultativně anaerobní, dokáže se dobře přizpůsobit prostředí. Její tvar je tyčinkovitý a má bičík (Killer 2019). Tato bakterie je pravděpodobně nejprozkoumanější a nejdéle studována v různých laboratorních podmínkách a také je k pokusům a výzkumům v laboratoři nejčastěji používána (Russo et Johnson 2003).

Běžně se vyskytuje v zažívacím traktu jako součást střevní mikroflóry u lidí i u zvířat. Může být izolována ze syrového masa, z mléka, z povrchu vajec a občas i z vody. Potravin jsou kontaminovány při nedodržení hygienických pravidel (to se týká jak zacházení se surovinou tak hygieny pracovníků) nebo při balení a při skladování (Cempírková et al. 1997). Voda může být znečištěna výkaly obsahující *E. coli*, stejně tak může být kontaminována půda nebo hnůj. Proto se tato bakterie označuje také jako indikátor fekálního znečištění (Schindler et al. 1999). Označení této bakterie za ukazatele kontaminace nejen vod, ale také potravin a mléčných výrobků potvrzuje Mladenović et al. (2018). Mražení a chlad bakterie přežívá, spolehlivým zničením se jeví pasterace nebo vyšší tepelný záhřev.

Klinické příznaky nakažení tímto mikroorganismem se projevují nejčastěji průjmy, ty mohou být s příměsí krve nebo hlenu. Po několika dnech obtíže odeznívají, potíže se mohou vyskytnout u oslabených jedinců a u dětí, kterým může hrozit dehydratace (Cempírková et al. 1997). *E. coli* je také nejčastější původce zánětu močového měchýře a infekcí vylučovacího ústrojí. Při oslabené imunitě může osídlit sliznice, které jsou zanícené nebo poškozené. (Bélanger et al. 2011).

V posledních letech u této bakterie rapidně roste antibiotická rezistence, zejména vůči antibiotikům podávaným proti zánětům vylučovací soustavy (Russo a Johnson 2003).

3.4.4 *Staphylococcus aureus*

S. aureus je grampozitivní bakterie, která má tvar koku – kulaté bakterie. Tyto nepohyblivé bakterie mohou tvořit páry, nebo větší či menší nepravidelné řetízkoité shluky. Tvoří zlatý, béžový nebo nahnědlý pigment (Cempírková et al. 1997). Schopnost stafylokoků přilnout k určitým strukturám a tvořit vrstvu biofilmu (slizu) hraje důležitou roli v patogenezi stafylokokových infekcí (Ay et al. 2010).

Stafylokoky se vyskytují ve vzduchu i ve vodě. U člověka a u zvířat je častým přirozeným mikroorganismem, osidluje nosní i ústní dutinu a je součástí mikroflóry kůže a srsti. Rubabet al. (2018) potvrzuje výskyt *S. aureus* v potravinách živočišného původu jako maso, mléko, vejce.

Jejich životní nároky jsou velmi přizpůsobivé prostředí, a proto se z nich stal velmi odolný organismus, často až rezistentní. Odolávají vysychání (přežijí i několik týdnů, pokud mají dostatek bílkovin), vyšším koncentracím chloridu sodného (Schindler et al. 1999), vypořádají se s hypertonickým prostředím, a v mražených výrobcích mohou přežívat až 8 měsíců. Co se týče odolnosti teplotě, tak pasterační teplota 85 °C ho ničí, ale některé odolné kmeny mohou být odolné vůči šetrné pasteraci (72-74 °C) (Cempírková et al. 1997).

Schindler et al. (1999) zmiňuje zásadní patogenitu *S. aureus* proto, že tvoří enterotoxiny. To potvrzuje Šilhánková (1995), která dodává, že tyto enterotoxiny jsou tvořeny v potravinách. Jsou to látky bílkovinné povahy, které mohou způsobit vážnou otravu až smrt. Suroviny a potraviny jsou kontaminovány zejména kontaktem s pracovníky, kteří nedodržují hygienické předpisy, mají na kůži drobná hnisavá poranění a trpí na katary horních dýchacích cest (Cempírková et al. 1997). Příznaky otravy těmito toxiny se porjevují jako náhlé nevolnosti, křeče v žaludku, případně zvracením a průjmy (Šilhánková 1995).

S. aureus je v současné době rezistentní na methicilin a je velkým problémem ve zdravotnictví, protože se stává rezistentním i vůči běžně používaným dezinfekčním prostředkům a pro nemocniční prostředí je typický (Bennett et al. 2015).

3.5 Mikrodiluční bujónová metoda

Mikrodiluční bujónová metoda patří mezi diluční metody, které kvantitativně měří antimikrobiální aktivitu. U těchto metod se setkáváme s výsledky MIC, případně MBC. MIC znamená minimální inhibiční koncentrace, což lze vysvětlit jako nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která inhibuje nárůst testovaného mikroorganismu. MBC znamená nejnižší koncentraci antimikrobiálního činidla, které je schopné zahubit většinu (99,9 %) bakterií z inokula. Obě tyto hodnoty jsou uváděny v hodnotě mg / ml, tzn. počet miligramů na jeden mililitr (Schwalbe et al. 2007).

Mikrodiluční bujónová metoda se provádí v mikrotitračních destičkách s 96 jamkami z plastového materiálu. Na rozdíl od makrodiluční metody, při které se používají zkumavky, je mikrodiluční metoda vhodná k použití malých objemů (nejčastěji 100 µl) (CLSI 2012).

Destička má tvar obdélníku, může v nich být testováno nanejvýš 12 látek o 8 koncentracích (Jorgensen a Ferraro 2009).

Do jamek v destičce se napipetuje potřebné množství bujónu, spolu s antimikrobiální látkou, která je v bujónu rozpuštěná. Tato látka se poté geometrickou řadou v jamkách ředí (CLSI 2012). Test obsahuje také kontrolní jamky – kontrolu nárůstu a kontrolu čistoty. Kontrola nárůstu obsahuje bujón a mikroorganismus, který by měl narůst jako záruka toho, že kultivační podmínky jsou pro test vhodné. Kontrola čistoty obsahuje pouze bujón, zde by neměl být žádný nárůst, jako záruka sterilní práce a vyloučení kontaminace testu.

Po přípravě destičky následuje zaočkování destičky ježkovým inokulátorem vysterylizovaným plamenem a následně namočeným v bakteriálním inokulu, které má koncentraci 0,5 McFarlanda. Jamky kontroly čistoty se neočkují.

Takto zaočkováná destička se dává inkubovat do žádoucího prostředí podle druhu mikroorganismu, za standardních podmínek (Schwalbe et al. 2007).

Vyhodnocení testu se dělá po určité době, kdy je předpokládáno, že se mikroorganismy dostatečně rozmnožily. Jejich růst se projevuje jako zákal v jamce, nebo jako sediment u dna, který je okem viditelný. V jamce s MIC nenalzáme žádný nárůst mikroorganismů a tuto hodnotu dále porovnáváme s MIC referenčních kmenů a s literaturou (Jorgensen a Ferraro 2009).

Výhodou této metody je, že je poměrně jednoduchá na obsluhu a manipulaci a je vhodná ke skladování většího počtu vzorků i v laboratorních podmínkách. K jejímu provedení je dostačující pouze malé množství materiálu, ale zároveň lze otestovat poměrně velký počet vzorků (Schwalbe et al. 2007).

3.6 Plynová chromatografie

Chromatografie je separační metoda, kde je principem rozdělování látek obsažených ve vzorku mezi dvě nemísitelné fáze (mobilní-pohyblivou a stacionární-nepohyblivou). Plynová chromatografie (GC– Gas chromatography) má jako mobilní fázi plyn, tato fáze se nazývá také nosný plyn (Klouda 2003). V systému chromatografických metod má plynová chromatografie velmi významné místo. V průběhu let se stala velmi rozšířenou metodou v analytické chemii (Smolková a Feltl 1991).

Plynová chromatografie je jedna z nejdůležitějších technik v analytické chemii a jí příbuzných odvětvích. V kombinaci s jedním z mnoha citlivých detektorů, které jsou k dispozici, poskytuje plynová chromatografie prostředek pro zkoumání ultravysokých hladin sloučenin, i když jsou přítomny v komplexní směsi (Clement 1990).

Nosné plyny musí být chemicky inertní, proto se používá nejčastěji dusík, argon nebo helium. Méně často i oxid uhličitý. Volba nosného plynu závisí na mnoha faktorech, jako je například viskozita plynu, chemická čistota, cena a důležitým faktorem výběru je detektor (Sankar 2005).

Pro analýzu je žádoucí, aby látky byly tepeně stálé a jejich relativní molekulová hmotnost byla menší než 1000 Daltonů. V opačném případě je možné převést látku na její deriváty a ty analyzovat (Klouda 2003).

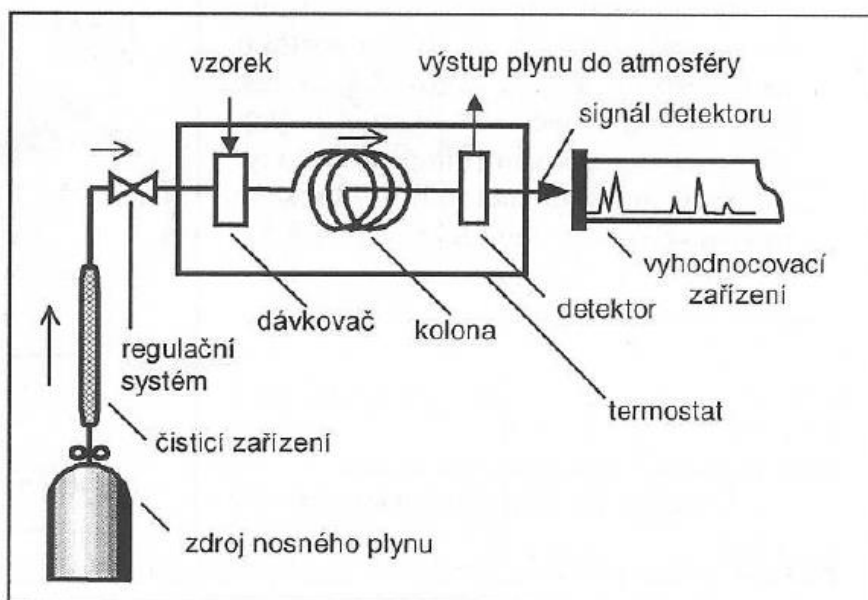
Vzorek, který chceme analyzovat je dávkován (vstříkován) do proudu mobilní fáze (do nosného plynu). Nástřik je možný bez děliče toku nebo s děličem toku. V prvním případě se jedná o vzorky, které nejsou moc koncentrované a jejich objem je 0,5-5 μl . Druhý případ, tedy dělič toku využijeme, pokud je vzorek více koncentrovaný a je do kolony nastříkován v menším množství (0,1-2 μl) a toto množství je děličem roztrženo na menší zlomky.

Takto nastříknutý vzorek se v koloně mění na plyn. Na základě svých vlastností, se váže na stacionární fázi a dochází tak k separaci jednotlivých látek (Klouda 2003).

Součástí systému GC je tlaková láhev, jež obsahuje nosný plyn. Regulační systém zajišťuje stálý tok plynu a kontrolu nad čerpadlem. Důležitou částí je také termostat, který udržuje teplotu na úrovni, kdy je vzorek ponechán v plynném stavu. Tyto teploty se pohybují od 50 $^{\circ}\text{C}$ do 300 $^{\circ}\text{C}$.

Celý systém ukončuje detektor, jehož signál se vyhodnocuje. Podle délky času, jakou pobývaly látky v koloně, se vykresluje chromatogram, ze kterého lze díky retenčním časům, ploše a výšce píků určit kvantitativní zastoupení látek v analyzovaném vzorku a také provést jejich identifikaci (Sankar 2005). Celé schéma chromatografu ukazuje přehledně obrázek č. 2.

Jakožto metoda, která sleduje fyzikálně chemické pochody a vlastnosti, umožňuje plynová chromatografie sledovat sorpční děje, mechanismus a kinetiku reakcí, katalytické procesy a určovat termodynamické veličiny. Ve všech těchto oblastech je bezkonkurenční v jednoduchém aparaturním vybavení a v rychlosti, ve které je možné analýzy provádět (Smolková a Feltl 1991).



Obrázek č. 2 – schéma plynového chromatografu

4 Metodika

4.1 Použité přístroje a pomůcky

4.1.1 Přístroje

- Topné hnízdo (LTHS)
- Analytické váhy (FR-200 MK II, AND)
- Předvážky Kern EMB 600-2 (Verkon; Česká republika)
- Laminární box (Tiestar 16152)
- Hořák Fuego-basic (WLD-TEC)
- Denzitometr Biosan DEN-1B (Dynex; Česká republika)
- Inkubátor KBC G-100/250
- Termostat BT 120
- Autokláv 3850 EL (Tuttnauer; Nizozemsko)
- Magnetické míchadlo (Variomag; Florida, USA)
- Vortex (Chromservis; Česká republika)
- Sonikátor (Logic ultrasonic PE cleaner)
- pH metr (XS)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex (Bandelin; Německo)
- Plynový chromatograf Agilent 7890A GC (Agilent; Kalifornie, USA)
- Hmotnostní spektrometr Agilent 5975C MSD (Agilent; Kalifornie, USA)
- Kolona HP-5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (Agilent; Kalifornie, USA)

4.1.2 Pomůcky

- Laboratorní sklo (destilační baňky, Erlenmayerovy baňky, varné baňky, kádinky, penicilínky, odměrný válec o různých objemech)
- Clevengerova aparatura
- Automatické pipety (Eppendorf; Česká republika) o objemech 20, 100 a 1000 μl , multikanálová pipeta 200 μl
- Mikrotitrační destičky (Gama group; Česká republika)
- Petriho misky
- Vialky šroubovací
- Inserty do vialek
- Injekční stříkačky o objemech 1, 5, 10 ml
- Stříkačka Hamilton o objemu 1 a 10 μl
- Vanička pro multikanálové pipety (Costar, Česká republika)
- Mikrozkmavky (Verkon, Česká republika)
- Stojany na zkumavky
- Inokulátor (ježek)

4.2 Použité chemikálie

4.2.1 Rozpouštědla

- Tween 80 (Sigma-Aldrich; Česká republika)
- Hexan (Penta; Česká republika)
- Ethanol 96 %, 70 % (Penta; Česká republika)
- Deionoziovaná voda
- KCl (Penta; Česká republika)
- NaCl (Dorapis; Česká republika)
- HCl 35 % (Lach-Ner; Neratovice, Česká republika)

4.2.2 Antibiotika

- Tetracyklin (Sigma-Aldrich), čistota 88 %
- Tioconazol (Sigma-Aldrich), čistota 96,5 %

4.2.3 Kultivační média

- RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 médium (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika)
- MOPS (3-(N-morpholino)propansulfonová kyselina) (VWR, Taiwan)
- Tris Base (tris(hydroxymethyl)aminomethan) (Roth; Karlsruhe, Německo)
- Mueller-Hinton Broth (MHB) (Oxoid; Basingstoke, Velká Británie)

4.3 Testované mikroorganismy

Byly testovány 4 mikroorganismy, z toho 3 bakterie a 2 kvasinky. Bakterie byla vybrána jedna gramnegativní: *E. coli*, a dvě grampozitivní: *B. cereus*, *S. aureus*. První testovaná kvasinka byla *C. albicans*.

Vzhledem k domněnce po prvním testování, že silice způsobují lehkou inhibici růstu *C. albicans*, byla v poslední fázi testování antimikrobiální aktivity přidána ještě jedna kvasinka - *Saccharomyces cerevisiae*

Všechny mikroorganismy byly kultivovány ze standartních sbírkových kmenů American type culture collection (ATCC):

- *Bacillus cereus* ATCC1177
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2548
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

4.4 Rostlinný materiál

Pro tuto práci byly vybrány k testování dva druhy dřevin - lípa srdčitá (*T. cordata*) a lípa velkolistá (*T. platyphyllos*), jelikož jsou oba původní stromy české krajiny.

Z obou lip se odebíral vzorek listů a květů v období od 15.5.2019 do 28.6.2019.

Lípa srdčitá – list, byla nasbírána v Královéhradeckém kraji, v Kostelci nad Orlicí. Květy lípy srdčité byly sesbírány ve Středočeském kraji v blízkém okolí Dobříše. Listy a květy lípy velkolisté byly nasbírány v Praze v městské části Krč.

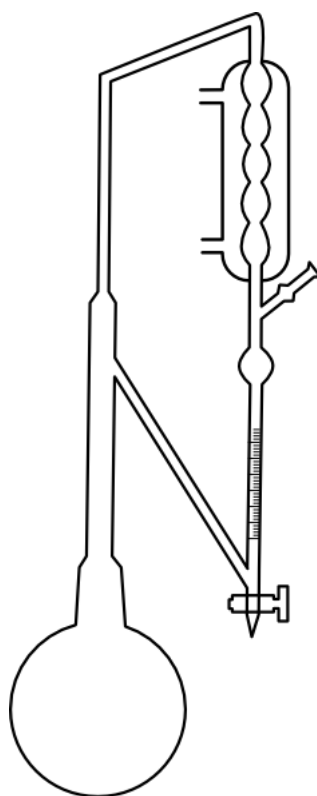
Všechny nasbírané části byly usušeny na stinném místě za přístupu vzduchu při teplotě 20-24 °C. Poté byly uchovány v papírové krabici bez přístupu světla po cca 14 dní až do jejich destilace.

4.5 Extrakce a příprava vzorků silic

Všechny silice byly destilovány ze sušeného materiálu.

Do 2l varné destilační baňky bylo odváženo určité množství materiálu (navážky viz tabulka č. 1 v kapitole výsledky) a následně proběhla destilace, která trvala 3 hodiny.

K destilaci se použil nástavec typu Clevenger (obr. č. 3). Clevengerův nástavec byl napojen na přívod a odvod studené vody, a tudíž chladil vydestilované silice, které se srážely na vodním sloupci a na skle přístroje, protože jsou lehčí než voda.



Obrázek č. 3 – destilační aparatura s Clevengerovým nástavcem

Jelikož výtěžnost silic nebyla velká, bylo použito 800 μl hexanu jako rozpouštědla na jímání silic. Po smísení s hexanem se silice vypustila do vialky. Ty byly uloženy v lednici při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno, abychom získali čistou silici. Odpařování probíhalo v digestoři za pokojové teploty a za přítupu proudu vzduchu. Celý proces odpařování trval 9-10,5 hodiny, podle toho, kolik silice bylo ve vialce obsaženo. Odpařování se kontrolovalo vážením, pokud se váhový úbytek vzorku neměnil, byl všechen hexan odpařen.

Výsledná výtěžnost silice byla kontrolována jak váhově, tak objemově, pomocí hamiltonky. Hmotnost byla minimálně 3x kontrolována na váze a prostým aritmetickým průměrem vypočítána. Objem byl kontrolován pomocí stupnice na hamiltonce. Díky hmotnosti a objemu, který se dal změřit, je možné vypočítat hustotu vyextrahovaných silic.

Silice byly rozpuštěny ve směsi ethanolu a tweenu 80 (v poměru 2:1) na koncentraci 102,4 mg/ml, což bude 100x vyšší koncentrace než nejvyšší testovací koncentrace. Obě části roztoku byly pipetou převedeny do mikrozkušavky a následně zahřáty na 40 $^{\circ}\text{C}$, protože všechny silice tuhly při pokojové teplotě. Tato směs stále nebyla dostatečně homogenní, a tak byla vložena na 2 x 4 minuty do ultrazvukové lázně vyhřívané opět na 40 $^{\circ}\text{C}$. Po vyjmutí se ještě mikrozkušavka se směsí zvortexovala. Tento postup se opakoval do úplného rozpuštění a smíchání silic s rozpouštědlem.

Takto připravené mikrozkušavky se daly zamrazit.

Před každým novým testováním byly tyto zásobní vzorky zředěny ve vypočítaném množství bujónu.

4.6 Použitá kultivační média a jejich příprava

Byla použita dvě kultivační média: pufrovaný MHB pro bakterie a RPMI médium pro kvasinky. Na inokula byl použit MHB.

4.6.1 MHB a pufrovaný MHB

Tento bujón byl připravován podle návodu od výrobce. Bylo použito 21 g prášku na 1 l destilované vody. Požadované množství prášku se odvážílo a rozmíchalo v určitém množství vody. Poté byla média sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Po vychladnutí byla tato tekutina skladována v lednici.

Pro stabilizaci pH MHB média se musel zvlášť připravit pufr. Pro tento účel bylo potřeba 8 g NaCl, 0,2 g KCl, a 6,1 g Trisbase. Takto navážená směs se zalila destilovanou vodou. Za neustálého míchání na magnetickém míchadle, se do směsi přidávala 35% HCl a pomocí pH metru jsme sledovali změnu, dokud nebylo dosaženo pH 7,6. Tímto byl pufr hotov a přidalo se do něj dle návodu 21 g práškového bujónu.

Tato směs se řádně promíchala a dala se opět autoklávkovat při 121 °C po dobu 20 minut. Po vychladnutí byla tato tekutina rovněž skladována v lednici.

4.6.2 RPMI médium

Podle pokynů výrobce na obalu bylo potřeba na výrobu RPMI média navážit 10,4 g prášku a doplnit toto množství 1 l destilované vody. Směs byla řádně promíchána a k roztoku se přidalo 34,4 g MOPS (morfolinopropansulfonové kyseliny). Tento roztok se pomocí magnetického míchadla a pH metru za současného přidávání 1 molárního NaOH namíchal tak, aby výsledné pH bylo 7. Když bylo této pH hodnoty dosaženo, tak se médium přes vystyrovovaný mikrofiltr zbavilo nežádoucích mikroorganismů a v aseptickém prostředí (flow-boxu) bylo převedeno do sterilní infuzní láhve se septem. Takto upravené médium se skladovalo v lednici.

4.7 Příprava inokula

Před každým testováním se zakládalo nové inokulum, to bylo připravováno ve flow-boxu ve sterilním prostředí. Nejprve do sterilní 15 ml zkumavky bylo odměřeno 10 ml média (MHB, nebo RPMI bujón, dle typu organismu) a poté se do něj jehlou přeneslo několik kapek zásobní kultury testovaného mikroorganismu.

Po zaočkování byla zkumavka do druhého dne inkubována v termostatu. Teplota byla nastavena na 25 +/- 0,2 °C pro inkubaci kvasinky a na 35 +/- 0,2 °C pro inkubaci bakterií. Takto připravená čerstvá mikrobiální kultura byla použita pro standardizaci inokula na požadovanou koncentraci.

Do další sterilní zkumavky o objemu 15 ml bylo odměřeno 10 ml média. Tento roztok se změřil na denzitometru, a následně do něj byl postupně přidáván nově narostlý zásobní roztok, dokud se naměřená hodnota nezvýšila o 0,5. Tím vznikl standardní roztok o hodnotě 0,5 Mc Farlanda, a to znamená, že výsledná koncentrace bakterií a kvasinek byla cca 10^8 respektive 10^6 KTJ (kolonie tvořících jednotek)/ml.

4.8 Příprava kontrolních antibiotik

Pro každé testování byly připraveny kontrolní roztoky antibiotik.

Pro mikroorganismy *E. coli*, *S. aureus* a *B. cereus* bylo zvoleno antibiotikum tetracyklin o čistotě 88 %. Kvůli odchylce měření a přesnosti vah bylo naváženo 100x větší množství antibiotika a smícháno s odpovídajícím množstvím rozpouštědla – 96% lihem. V tomto případě bylo naváženo 2,4 mg antibiotika a toto množství bylo smícháno s 1,32 ml lihu. Abychom dosáhli požadované koncentrace (8 $\mu\text{g/ml}$) bylo potřeba 14 μl tohoto roztoku smíchat s 1386 μl pufrovaným MHB. Vše bylo zvortexováno a z nově vzniklého roztoku bylo opět odebráno 700 μl a smícháno s 700 μl média. Po zvortexování směsi vzniklo kontrolní antibiotikum o koncentraci 8 $\mu\text{g/ml}$ pro první jamku testovací destičky.

Pro kvasinky *C. albicans* a *S. cerevisiae* bylo zvoleno antibiotikum tioconazol o čistotě 96,5 %. Opět bylo odváženo 100x větší množství antibiotika a to bylo smícháno s dimethylsulfoxidem (DMSO), tzn. že konkrétně bylo naváženo 1,9 mg antibiotika a smícháno s 1,145 ml DMSO. Abychom dosáhli požadované koncentrace (8 $\mu\text{g/ml}$) bylo odebráno 10 μl roztoku a to bylo smícháno s 990 μl RPMI média. Tímto se dosáhlo koncentrace 16 $\mu\text{g/ml}$, takže se vzniklý roztok ještě musel naředit 1 ku 1 s RPMI médiem, tzn. 500 μl roztoku antibiotika a 500 μl média. Tento roztok byl použit pro první jamku v testovací destičce.

4.9 Testování mikrobiální aktivity bujónovou mikrodiluční metodou

Testování silic na antimikrobiální aktivitu probíhalo pomocí bujónové mikrodiluční metody. Veškerá testování se prováděla ve třech opakováních ve třech nezávislých testech v případě kvasinky *C. Albicans*, v jednom nezávislém testu u *S. cerevisiae*, a ve dvou nezávislých testech v případě bakterií. Destičky na testy byly 96ti jamkové a vzhledem k počtu silic byly používány na výšku. Schéma uspořádání silic a antibiotik v destičce viz tabulka č. 2.

Tabulka č. 2: usporádání mikrotitrační destičky + koncentrace jednotlivých látek µg/ml

Rozložení testovaných látek	Jamky (řádky)	Jamky (sloupce)*							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Kontrola nárůstu	1	Kontrola nárůstu							
ATB	2	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
X	3								
TP list	4	1024	512	256	128	64	32	16	8
X	5								
TP květ	6	1024	512	256	128	64	32	16	8
X	7								
TC list	8	1024	512	256	128	64	32	16	8
X	9								
TC květ	10	1024	512	256	128	64	32	16	8
X	11								
Kontrola čistoty	12	Kontrola čistoty							

* čísla udávají koncentraci látek v µg/ml

Destičku bylo nutné zaplnit zásobními roztoky silic, kontrolních antibiotik a médiem. Do jamek (sloupců) 2-8 v každém řádku bylo napipetováno multikanálovou pipetou 100 µl příslušného média.

Do 1. jamky 2. řádku bylo odpipetováno 200 µl roztoku s antibiotikem, tento roztok měl koncentraci 8 µg/ml. Do 1. jamky 4., 6., 8., a 10. řádku bylo napipetováno 200 µl zásobního roztoku silic s médiem. Jejich koncentrace byla 1024 µg/ml. Do destičky se dávaly v pořadí: 4. řádek-*T. platyphyllos* list, 6. řádek-*T. platyphyllos* květ, 8. řádek-*T. cordata* list, 10. řádek-*T. cordata* květ.

Do 1. jamky 1. a 12. řádku bylo odpipetováno 200 µl média (MHB pufrovaný anebo RPMI médium). Řádek č. 1 sloužil jako kontrola nárůstu mikroorganismů. Řádek č. 12 sloužil jako kontrola čistoty, tento řádek se mikroorganismem nezaočkovával.

Protože u silic může v důsledku jejich těkavosti dojít k ovlivnění výsledků v sousedních jamkách mikrotitrační destičky (Nový et al. 2014) byla mezi jednotlivé vzorky (řady) vložena

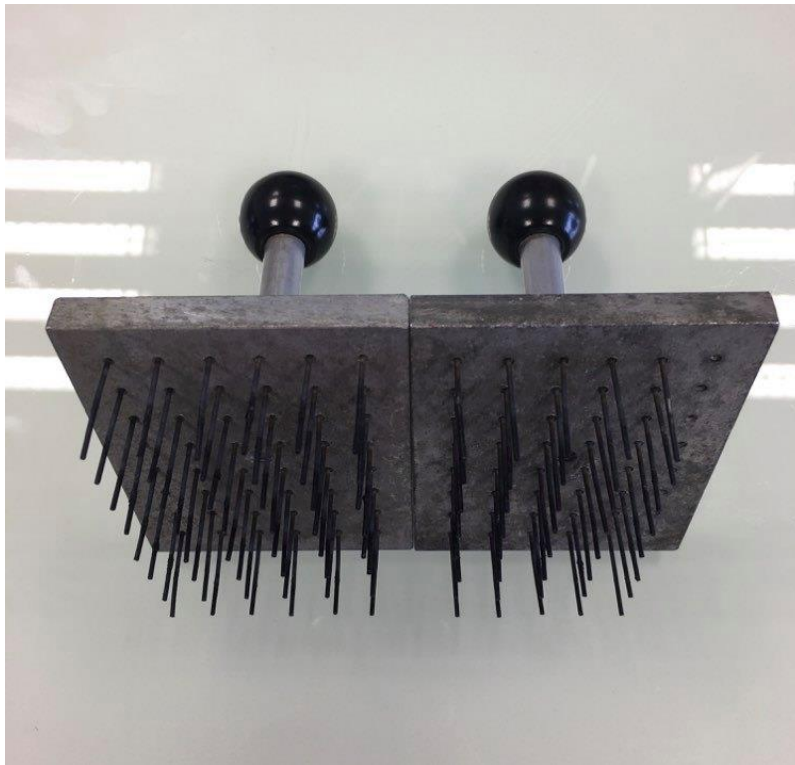
řada s pozitivní kontrolou bakteriálního nárůstu (zaočkovné médium bez silice/antibiotika). Pokud by zde byla pozorována inhibice, znamenalo by to vzájemné ovlivnění výsledků a znehodnocení testu.

Když byl celý tento proces hotov, bylo provedeno dvojitě ředění. Pomocí multikanálové pipety bylo odebráno z 1. sloupce 100 μl a tento objem byl přenesen do 2. sloupce. Pipeta se zde vyprázdnila, byl promíchán obsah a opět se odebralo 100 μl . Toto množství bylo převedeno dále do 3. sloupce destičky a tímto způsobem se postupovalo až do 8. sloupce. Zde po promíchání bylo odebráno 100 μl roztoku a znehodnoceno. Tímto způsobem vznikla ředící řada s dvojitým ředěním podle standardního laboratorního postupu, vyzkoušeném a potvrzeném na ČZU.

Do takto připravené destičky bylo nutné následně zaočkovat mikroorganismy.

Připravené standardizované inokulum, které mělo koncentraci bakterií přibližně $1-2 \times 10^8$ KTJ/ml, bylo vylito do petriho misky. Do druhé petriho misky se připravil 96% líh na dezinfekci inokulátoru. Inokulátor (tzv. ježek – viz foto č. 1) se nejprve ponořil do lihu a následně se ožehl nad kahanem. Poté byl ponořen do petriho misky s inokulem, a následně se vložil do jamek testovací destičky tak, aby pouze 12. řádek zůstal bez zaočkování (kontrola čistoty média). Tím bylo dosaženo přibližné koncentrace 4×10^5 KTJ/ml v každé jamce.

Takto zaočkové destičky se daly na 24 h do termostatu nastaveného na $37 \pm 0,2$ °C v případě bakterií, a na 48 h do termostatu na $25 \pm 0,2$ °C v případě kvasinek. Poté byl vizuálně určován nárůst kultur, který se obvykle projevuje jako bílý zákal.



Fotografie č. 1: Kovový inokulátor (ježek)

4.10 Chemické složení lipových silic

Složky silic byly identifikovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem.

K chemické analýze byly vzorky silic naředěny hexanem v poměru 1:1000. Tento roztok byl ve skleněných 2 ml vialkách (viz foto č. 2). 1 μl tohoto roztoku byl nastříknut do nástřikové jednotky při teplotě 250 °C ve splitovém poměru 12:1.

Teplotní program byl nastaven na 60 °C po dobu 3 minut, po této době se teplota začala zvyšovat rychlostí 3-5 °C za 1 minutu až do hodnoty 231 °C. Tato finální teplota byla dále ještě 10 minut v přístroji udržována.

Tato analýza trvala 70 minut.

Identifikace látek byla provedena na základě porovnání retenčních indexů a hmotnostních spekter s knihovnou NIST (National Institute of Standards and Technology Library, USA) a literaturou (Adams 2007). Látky byly také porovnány s hmotnostními spektry chemických standardů.

Kvantifikace byla provedena na základě relativního procentického zastoupení ploch píků.



Fotografie č. 2: Vzorky připravené k analýze na plynovém chromatografu

5 Výsledky

Byly vydestilovány čtyři silice z květů a listů dvou druhů lip. Jejich výtěžnost se pohybovala od 0,004 % do 0,008 %. U těchto silic byly provedeny testy na jejich antimikrobiální aktivitu a také bylo na plynovém chromatografu analyzováno jejich složení.

5.1 Extrakce silic

Navážka sušeného materiálu pro extrakci silic, jejich výsledná výtěžnost a vypočítaná hustota jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Silice ulpávaly na skle Clavengerova nástavce (viz foto č. 3) odkud byly jímány do hexanu.



Fotografie č. 3: Silice v Clavengerově nástavci při destilaci

5.1.1 *T. cordata* květ

Z květu lípy srdčité bylo vydestilováno 13,20 μ l silice, což odpovídá nejvyšší výtěžnosti 0,0086 %. Tato silice měla velmi výraznou, medovo-sladkou vůni. Nebyla průhledná a její barva byla velmi jasně až svítivě žlutá. Květová silice z *T. cordata* rychle tuhla při pokojové teplotě, její konzistence připomínala až tuhý vosk a místy se dělila na

menší fragmenty. V hexanu se rozpouštěla velmi pomalu. Její hustota, která je nejvyšší ze všech vydestilovaných silic, byla $0,864 \text{ g.cm}^{-3}$.

5.1.2 *T. cordata* list

Této silice se podařilo vydestilovat nejméně, konkrétně $4,25 \mu\text{l}$, což odpovídá výtěžnosti $0,0043 \%$. Voněla po trávě a lese a tato vůně nebyla tolik výrazná jako u silice z květů, spíše zemitější a jemnější. Její barva byla temně žlutá, místy přecházela do světle hnědé, silice nebyla čirá, spíše zakalená. Při pokojové teplotě připomínala konzistencí hustý olej, byla kompaktní a lehce tekutá. Její hustota byla $0,800 \text{ g.cm}^{-3}$.

5.1.3 *T. platyphyllos* květ

Silice z květů lípy velkolisté se vydestilovalo $10,30 \mu\text{l}$. Její výtěžnost činila $0,0065 \%$. Oproti *T. cordata* měla vůni velmi slabou, spíše připomínající lipové listy než květy. Její barva byla žlutá a neprůhledná. Měla více tekutou konzistenci než druhá květová silice, a to i při pokojové teplotě, v hexanu se rozpustila téměř okamžitě. Hustota této silice byla $0,806 \text{ g.cm}^{-3}$.

5.1.4 *T. platyphyllos* list

Listové silice z lípy velkolisté se vydestilovalo $8,30 \mu\text{l}$, její výtěžnost byla $0,0045 \%$. Vůně této silice byla nejslabší ze všech silic. Voněla slabě jako posekaná tráva. Její barva byla bledě žlutá, spíše nevýrazného odstínu, ale opět nebyla čirá. Konzistence silice byla celistvá, držela pohromadě a nerozdělovala se, byla spíše tekutá za pokojové teploty. Hustota této silice činila $0,843 \text{ g.cm}^{-3}$.

Tabulka č. 1: výtěžnost silic z jednotlivých vzorků a jejich hustota

Materiál	Navážka (g)	Výtěžnost (%) ^a	Hustota (g.cm^{-3}) ^b
<i>Tilia cordata</i> květ	154,05000	0,00857	0,86400
<i>Tilia cordata</i> list	161,02000	0,00264	0,80000
<i>Tilia platyphyllos</i> květ	157,64000	0,00653	0,80600
<i>Tilia platyphyllos</i> list	184,97000	0,00449	0,84300

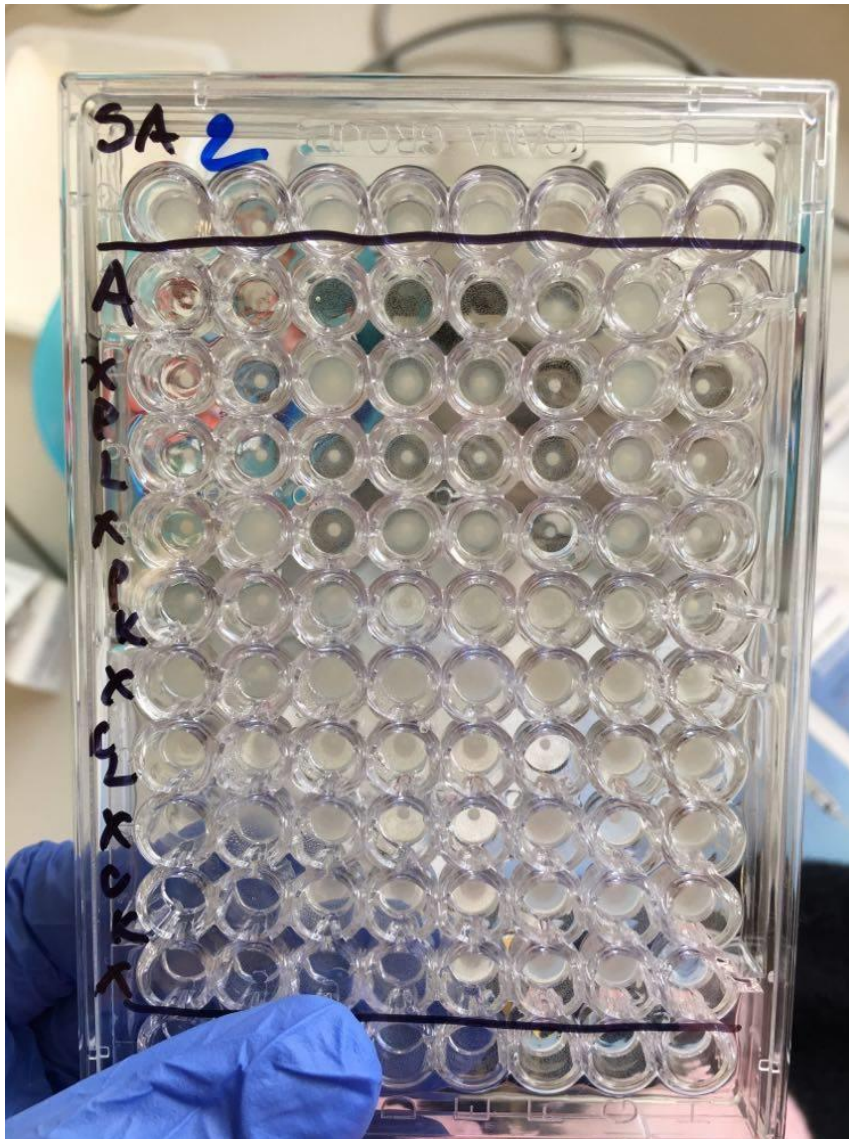
^avýtěžnost = poměr objemu vydestilované silice k navážce vynásobený 100

^bhustota byla vypočítána na základě objemu a hmotnosti (gravimetricky)

5.2 Antimikrobiální aktivita silic

Antimikrobiální aktivita nebyla ani u jedné silice jednoznačně potvrzena.

U bakterií *E. Coli*, *S. aureus*, a *B. cereus* byla po dvou opakováních antimikrobiální aktivita silic vyloučena (viz foto č. 4).



Fotografie č. 4 – Nárůst *S. aureus* po 24 hodinách

Během testování docházelo k lehkým náznakům antifugální aktivity u některých silic. Po 48 hodinách žádná ze silic nevykazovala antimikrobiální aktivitu vůči kvasinkám. Silice z květů *T. cordata* vykazovala inhibici po 48 hodinách v nejvyšší koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$ ale pouze v jednom ze tří opakování. Při dalších opakováních byla zaznamenána

částečná inhibice, v průměru byl procentní nárůst pouze 36% u koncentrace 1024 µg/ml a 76% u koncentrace 512 µg/ml).

Po 24 hodinách vykazovala inhibiční vlastnosti i silice *T. cordata* list v nejvyšší koncentraci 1024 µg/ml, která pravděpodobně způsobovala zpomalení růstu kvasinek. Po 48 hodinách ovšem její fungistatická aktivita nebyla prokázána.

Zajímavý jev byl pozorován po 24 hodinách u silic *T. platyphyllos* list a květ. Nejvyšší koncentrace zde vykazovaly nejsilnější nárůst mikroorganismů, který se s klesající koncentrací viditelně snižoval, což neodpovídá předpokladu nárůstu kolonií mikroorganismů od nejnižší koncentrace.

U všech testovaných silic byla pozorována inhibice kvasinky *S. cerevisiae* v nejvyšší koncentraci 1024 µg/ml po 24 hodinách. Po 48 hodinách ovšem silice žádné známky antimikrobiální aktivity nepotvrdily.

Účinnost antibiotik vůči kmenům vybraných mikroorganismů odpovídala daným koncentracím dle CLSI (2013). Tyto koncentrace jsou shrnuty v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: MIC antibiotik^a na jednotlivé mikroorganismy

Mikroorganismus	MIC (µg/ml)
<i>B. cereus</i>	0,125
<i>C. albicans</i>	0,0625
<i>E. coli</i>	1
<i>S. cerevisiae</i>	- ^b
<i>S. aureus</i>	0,25

^a pro kvasinky bylo antibiotikum tioconazol, pro bakterie tetracyklin

^b pro *S. cerevisiae* byla MIC pravděpodobně méně než 0,0625 µg/ml, protože nebyl pozorován žádný nárůst

Kontrola čistoty a kontrola nárůstu ve všech testech vždy odpovídaly předpokladu.

V žádném testu nedošlo ke znehodnocení nebo ovlivnění výsledků důsledkem těkavosti silic.

5.3 Chemické složení silic

Celkem bylo identifikováno ve vzorcích 41 látek. Jejich kompletní přehled je shrnut v tabulce č. 3.

5.3.1 *T. Cordata* květ

Hlavními složkami silice z květů *T. cordata* byly n-alkany. Největší zastoupení měl tricosane (25,07 %) a pentacosane (12,16 %). Z dalších látek byl hojně přítomný kaurene (17,81 %) a neidentifikovaná látka č. 6 (16,98 %). Hmotnostní spektrum této látky je uvedeno v příloze č. VI na konci práce. V této silici bylo obsaženo nejméně chemických látek, celkem 11. Identifikovat se podařilo 69,46 % z nich.

5.3.2 *T. Cordata* list

V listové silici *T. cordata* byl jednoznačně nejvíce zastoupen phytol (69,55 %). Mezi dalšími látkami byly například β -Ionone (5,35 %), α -Ionone (3,50 %) a trans-3-hexen-1-ol benzoate (4,23 %). Celkem obsahovala 17 složek. Z této silice se podařilo identifikovat 94,12 % obsažených látek, což je nejvíce ze všech vzorků.

5.3.3 *T. Platyphyllos* květ

Majoritními složkami silice z květů *T. platyphyllos* byly opět n-alkany a stejně jako u květů *T. cordata* největší zastoupení měl tricosane (19,31 %) a pentacosane (14,56 %). Další významně zastoupenou látkou byl 2-pentadecanon-6,10,14-trimethyl (12,84 %). Celkový počet sloučenin byl 26. U silice bylo identifikováno 72,88 % chemických sloučenin.

5.3.4 *T. Platyphyllos* list

Silice z listů *T. platyphyllos* byla na chemické sloučeniny nejbohatší. Obsahovala celkem 55 sloučenin, z toho nejhoněji n-alkany tricosane (9,06 %) a pentacosane (5,32 %). Ve větším množství se zde vyskytoval 2-pentadecanon-6,10,14-trimethyl (8,10 %), dále trans-geranylacetone (7,89 %), a neidentifikovaná látka č. 3 (5,43 %). Chromatografické spektrum této látky je uvedeno v příloze č. III na konci práce. Identifikovat se podařilo 72,82 % sloučenin.

Tabulka č. 3: procentuální chemické složení testovaných silic

RI	identifikovaná látka	<i>T.</i> <i>cordata</i> květ	<i>T.</i> <i>cordata</i> list	<i>T.</i> <i>platyphyllos</i> květ	<i>T.</i> <i>platyphyllos</i> list	Identifikace ^a
1102	Nonanal	-	1,58	0,83	1,91	MS,RI
1192	2-Decanone	-	0,52	-	-	MS,RI
1206	Decanal	-	-	-	0,44	MS,RI
1218	β -Cyclocitral	-	0,64	-	0,46	MS,RI
1341	CiUal <dimethoxy-(E)->	-	0,6	-	0,67	MS,RI
1380	(E)- β -Damascenone	-	-	-	0,66	MS,RI
1407	2-Undecanone, 6,10-dimethyl-	-	-	-	0,26	MS,RI
1412	Dodecanal	-	-	-	1,49	MS,RI
1421	α -Ionone	-	3,5	-	5,8	MS,RI
1440	Furan, 2-methyl-5-(1,1,5-trimethyl-5-hexenyl)-	-	-	-	1,12	MS,RI
1445	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (Z)-	-	-	0,55	-	MS,RI
1452	trans-Geranylacetone	-	-	-	7,89	MS,RI
1462	Tetradecane, 4,11-dimethyl-	-	-	0,59	1,25	MS,RI

Tabulka č. 3: procentuální chemické složení testovaných silic – pokračování

RI	identifikovaná látka	<i>T.</i> <i>cordata</i> květ	<i>T.</i> <i>cordata</i> list	<i>T.</i> <i>platyphyllos</i> květ	<i>T.</i> <i>platyphyllos</i> list	Identifikace ^a
1473	neidentifikovaná látka č. 1 ^b (viz příloha č. I)	-	-	4,21	2,32	MS,RI
1482	β-Ionone	-	5,35	-	4,26	MS,RI
1497	Methyl undecyl ketone	-	-	-	1,5	MS,RI
1507	α-Farnesene	-	2,45	-	-	MS,RI
1513	neidentifikovaná látka č. 2 ^b (viz příloha č. II)	-	-	-	3,91	MS,RI
1519	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	-	-	2,62	2,47	MS,RI
1522	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	-	-	-	0,9	MS,RI
1542	α-Calacorene	-	-	-	1,11	MS,RI
1571	3-Hexen-1-ol, benzoate, (Z)-	-	4,23	-	-	MS,RI
1581	3,5,9-Undecatrien-2-one, 6,10-dimethyl-	-	-	-	0,47	MS,RI
1614	Tetradecanal	-	-	-	0,46	MS,RI
1642	Cubenol	-	-	-	1,85	MS,RI
1644	1-Naphthalenol, 1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, [1R-(1.alpha.,4.beta.,4a.beta.,8a.beta.)]-	-	-	1,97	1,36	MS,RI

Tabulka č. 3: procentuální chemické složení testovaných silic - pokračování

RI	identifikovaná látka	<i>T.</i> <i>cordata</i> květ	<i>T.</i> <i>cordata</i> list	<i>T.</i> <i>platyphyllos</i> květ	<i>T.</i> <i>platyphyllos</i> list	Identifikace ^a
1653	α-Cadinol	-	-	1,61	1,11	MS,RI
1717	Pentadecanal	-	0,69	-	-	MS,RI
1762	Benzyl benzoate	-	-	0,35	-	MS,RI
1801	1-Naphthalenol, 5,6,7,8-tetrahydro-2,5-dimethyl-8-(1-methylethyl)-	-	-	7,8	-	MS,RI
1818	neidentifikovaná látka č. 3 ^b (viz příloha č. III)	-	-	12,33	5,43	MS,RI
1847	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl	5,72	0,98	12,84	8,1	MS,RI
1858	Benzoic acid, phenethyl ester	-	-	1,693	-	MS,RI
1911	5,9,13-Pentadecatrien-2-one, 6,10,14-trimethyl-, (E,E)-	-	-	0,61	-	MS,RI
1921	5,9,13-Pentadecatrien-2-one, 6,10,14-trimethyl	-	-	-	3,24	MS,RI
2034	Kaurene	17,81	-	3,15	2,272	MS,RI
2100	Heneicosane	4,76	-	1,7	1,23	MS,RI,S
2111	Phytol	-	69,55	-	2,68	MS,RI
2144	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	-	-	-	1,02	MS,RI
2146	neidentifikovaná látka č. 4 ^b (viz příloha č. IV)	6,41	-	-	-	MS,RI

Tabulka č. 3: procentuální chemické složení testovaných silic - pokračování

RI	identifikovaná látka	<i>T.</i> <i>cordata</i> květ	<i>T.</i> <i>cordata</i> list	<i>T.</i> <i>platyphyllos</i> květ	<i>T.</i> <i>platyphyllos</i> list	Identifikace ^a
2200	Docosane	1,47	-	0,745	0,49	MS,RI,S
2300	Tricosane	25,07	-	19,31	9,06	MS,RI,S
2364	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	-	-	-	0,58	MS,RI
2400	tetracosane	2,47	1,91	1,95	1,39	MS,RI,S
2475	neidentifikovaná látka č. 5 ^b (viz příloha č. V)	5,79	-	-	-	MS,RI
2500	pentacosane	12,16	2,12	14,56	5,32	MS,RI,S
2550	neidentifikovaná látka č. 6 ^b (viz příloha č. VI)	16,98	-	-	-	MS,RI
celkem identifikováno (%)		69,46	94,12	72,88	72,82	

RI –retenční index

^a - identifikace provedena na základě: MS = porovnání hmotnostních spekter; RI = porovnání retenčních indexů; S = potvrzena použitím autentického standardu

^b - hmotnostní spektra neidentifikovaných látek jsou uvedeny v samostatných přílohách č I-VI

6 Diskuze

6.1 Extrakce silic

Výtěžnost silic byla u obou druhů lip podobná. Větší byla výtěžnost u silic z květů (*T. cordata* 0,00857 % a *T. platyphyllos* 0,00653 %) než z listů, což potvrzuje Miguel et al. (2004). Z jeho výzkumu vyplývá, že výtěžnost květové silice u rostliny *Thymus mastichina* je 3 % z celkového obsahu, na rozdíl od silice z listů, která měla výtěžnost 1,7-2 %. Takto vysoká výtěžnost silic může být způsobena tím, že silice byla extrahována z čerstvých vzorků. Srovnání se sušenými drogami bohužel není k dispozici.

Pokud se porovná výtěžnost silice z květů *T. cordata* s Kowalskiet al. (2017), který uvádí výtěžnost 0,07-0,08 %, tak je jasné, že výtěžnost silic při tomto experimentu je velmi malá. Není zde ovšem upřesněno, jestli byla silice izolována z čerstvého nebo sušeného materiálu.

Taktéž srovnání výtěžnosti silic obou druhů lip není k dispozici, je ale možné díky této práci říci, že květy z *T. cordata* obsahují větší množství silice než květy *T. platyphyllos*.

Výtěžnost silic z květů *T. platyphyllos* uvádí i Radulescu a Oprea (2008), a to 0,08 %.

U výtěžnosti silice z listů byl patrný větší rozdíl, u *T. platyphyllos* list byla téměř o polovinu větší (*T. cordata* 0,00264 % a *T. platyphyllos* 0,00449 %). Menší výtěžnost silic z listů stejné rostliny potvrzuje i Sun et al. (2014), který testoval výtěžnost silic v různých částech magnolie. Je možné tvrdit, že listy *T. platyphyllos* obsahují více silice než listy *T. cordata*.

Rozdílnost obou výtěžností u stejného rodu může být dána rozdílným datem sběru drogy (i když se sběry lišily o cca 20 dní), jak potvrzuje Miguel et al. (2004), který zaznamenal rozdílnou výtěžnost silic květů a listů u rodu *Thymus* v červenci a v září. Možným vysvětlením této rozdílnosti by mohla být i prodleva od usušení materiálu do destilace, jež činila u všech čtyř vzorků cca 14 dní.

6.2 Antimikrobiální aktivita silic

U žádné ze silic nebyla potvrzena opakovaním jasná antimikrobiální aktivita.

Bakterie grampozitivní i gramnegativní měly po 24 hodinách viditelný nárůst ve všech koncentracích u všech silic (viz foto č. 4).

Toto se neslučuje s výzkumem od Fitsiou et al. (2007), kde při testování antimikrobiální aktivity byla zjištěna aktivita silice z listů *T. cordata* proti gramnegativním bakteriím (konkrétně *B. cereus* a *S. aureus*).

Z tohoto stejného výzkumu ovšem vyplývá nulová aktivita silic z květů nebo listů *T. cordata* proti *C. albicans*, což neodpovídá výsledkům našeho testování po 48 hodinách inkubace, kde byla v prvním testování prokázána inhibice proti *C. albicans* v nejvyšší koncentraci u silice z květů *T. cordata*. Inhibice také vykazovala silice z listů *T. cordata*, ovšem pouze po 24 hodinách kultivace.

Tyto rozdílnosti mohou mít své vysvětlení, a to jak metodu, kterou Fitsiou et al. (2007) používaly při testování, což byla agarová difúzní metoda, tak dobu inkubace, která byla u všech mikroorganismů 24 hodin. Tento údaj se shoduje u inkubace bakterií, ale neshoduje se s inkubací kvasinky, která se vyhodnocovala v naší práci finálně až po 48 hodinách.

Silice z *T. platyphyllos* byly shledány jako neaktivní vůči testovaným mikroorganismům, ale vzhledem k rozdílnosti obsahu silic v různých obdobích, jedincích, v neposlední řadě orgánech, by bylo vhodné její testování zopakovat. Například vyzkoušet jiné druhy bakterií nebo kvasinek.

Jak dokládá Szucs et al. (2019) při posuzování biologické aktivity silic je nesmírně důležité zohlednit sezónní výkyvy vlastností a složení těchto látek.

Jiný literární zdroj – Gönül a Karapinar (1897) tvrdí, že díky éterickému oleji obsaženému v lípách mohou jejich silice vykazovat inhibiční vlastnosti vůči mikroorganismům, ovšem tato problematika není podrobně zkoumána. Což potvrzuje i poměrně nedostatečný zdroj informací na porovnání těchto testů. Je také možné, že antimikrobiální aktivita silic nebyla potvrzena díky jejich malé výtěžnosti, která mohla ovlivnit jejich vlastnosti.

Je možné se domnívat, že antimikrobiální aktivita odvaru z lípy, která byla zjištěna u Aksoy et al. (2012) nesouvisí s antimikrobiální aktivitou silic, ale jiných látek, nebo mohla být způsobena jiným rozpouštědlem (methanolem), případně jinou metodou studie (agarová jamková difúzní metoda)

Proto by bylo vhodné vlastnosti této drogy nadále studovat

6.3 Chemické složení silic

Analýza lipových silic se zčásti shoduje s dostupnou literaturou tam, kde již byly silice otestovány, konkrétně u silice z květů *T. cordata* i *T. platyphyllos* a u listů *T. platyphyllos*. Chemická analýza silice z listů *T. cordata* nebyla doposud podle dostupné literatury prováděna.

6.3.1 *T. Cordata* květ

Kowalski et al. (2017) analyzovali ve své studii silice z květů z pěti stromů *T. cordata*. Podařilo se jim analyzovat 80 sloučenin, v naší práci bylo analyzovaných sloučenin pouze 7. Může to být způsobeno rozdílným obdobím a časem sběru, nebo jinými podmínkami skladování materiálu.

Výsledky studie Kowalski et al. (2017) ukazují, že hlavní složka tohoto éterického oleje je 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanon (11-20 %). Toto tvrzení nebylo potvrzeno, protože v silici z květů *T. cordata* ho bylo pouze 5,72 %, což není majoritní složka.

Hlavní charakteristickou frakcí květových silic dle studie Kowalski et al. (2017) jsou dále n-uhlovodíky, jako tricosane (6-17 %), heneicosane (3-9%) a nonanal (přibližně 7%). Tyto výsledky se poměrně shodují, jiné je procentuální zastoupení. U heneicosane je to 4,76 %, u tricosane dokonce 25,07 %. Dále tetracosane s obsahem 2,47 % a pentacosane s 12,16 %.

Zde panuje shoda spíše s Fitsiou et al. (2007), kteří zjistili, že hlavními látkami v silici květů *T. cordata* je heneicosane (13.9 %) a tricosane (26.6 %).

Tyto výkyvy mohou plynout ze skutečnosti, že lípy pocházejí z různých zeměpisných oblastí, nebo že byly v rozdílné vegetační fázi, případně jiné výše uvedené vlivy, které hrají ve složení silic velkou roli.

Další bohatě obsaženou složkou v této silici je kaurene, v množství 17,81 %. Tato látka je podle Singh et al. (2019) příbuzná s látkou ent-kauren, což je diterpenový glykosid běžně známý jako steviosid, který je 150 až 300x sladší než cukr. To může být objasněním skutečnosti, proč silice z lípy voní sladce po medu a čaj z jejich květů je chuťově velmi oblíbený.

6.3.2 *T. Cordata* list

Dostupné zdroje na porovnání složení této silice chybí.

Přesto vykazuje jistou podobnost se složením silic z květů *T. cordata* i se složením listů *T. platyphyllos*.

Jako příklad lze uvést velké procentuální zastoupení n-alkanů (tetracosane 1,91 %, pentacosane 2,12 %), které bylo zjištěno u všech analyzovaných silic.

Podobnost s listy *T. platyphyllos* je jednoznačně viditelná na obsahu β -iononu (5,35 %), a α -iononu (3,50 %), které byly obsaženy pouze v listových silicích a to v relativně hojném množství.

Největší procentuální zastoupení zde má látka phytol, je to 69,55 %, což je opravdu majoritní zastoupení, které se nevyskytuje u žádné jiné analyzované silice. Silice z listů *T. platyphyllos* obsahuje phytolu pouze 2,68 %.

Ogunlesi et al. (2009) ve svém výzkumu o složení silic rostliny *Euphorbia hirta*, uvažují o možných vlastnostech phytolu jako o látce, která zmírňuje zánětlivé stavy. Tato rostlina obsahuje phytolu také relativně velké množství a to 8,29 %. Z tohoto důvodu je možné považovat listy z *T. cordata* jako účinnou doplňkovou léčbu při léčbě puchýřů v ústech, které jsou zánětlivého původu, jak zmiňuje Janča (1995) anebo jako vhodnou terapii na zánětlivé stavy dýchacích cest, pokud se bude droga inhalovat.

Podle Devi et al. (2018) je phytol významnou látkou, která obsažená v rostlinách, výborně napomáhá hojení ran. Dá se předpokládat, že díky vysokému procentu phytolu v listech *T. cordata* by při kládání lipových listů nebo jejich extraktů na poranění mohlo zmírnit průběh obtíží.

Že je phytol obsažen i v listech jiných stromů dokládá Nguyen et al. (2020). Jejich studie zkoumala antimikrobiální aktivitu stromu *Bouea macrophylla* a tvrdí, že phytol a jiné látky (např. polyfenoly a flavonoidy) jsou nejdůležitější pro biologickou aktivitu extraktů. Tyto extrakty, pokud obsahují výše zmíněné látky, mohou vykazovat antimikrobiální aktivitu. Díky tomuto tvrzení by bylo vhodné silice z listů *T. cordata* nadále testovat, protože by mohly díky phytolu vykazovat antimikrobiální aktivitu.

V této silici byl také detekován α -farnesene, v množství 2,45 %, kterému jsou při kládány vonné vlastnosti podle více nezávislých studií. Jedna z roku 2013 od Lin et al. tvrdí, že α -farnesene je hlavní látka odpovědná za vůni nálevu z čaje oolong. Toto by mohlo být důkazem, že tato látka bývá obsažena v listech rostlin, a že vykazuje vonnou aktivitu.

6.3.3 *T. Platyphyllos* květ

Složení této silice bylo více rozmanité ve srovnání se silicí z květů *T. cordata*. Zanalyzováno bylo celkem 16 látek.

Největší podobnosti se silicí z květů *T. cordata* vykazovala tato silice v obsaženém velkém množství tricosane (19,31 %) a pentacosane (14,56 %). Tricosane zde byla látka s největším obsahem. Radulescu a Oprea (2008) uvádějí v této silici jako látku s nejvyšším zastoupením 2-phenylethanol a to v množství 26,07 %. Tvrdí, že je zodpovědná za antimikrobiální a antiseptickou aktivitu. V naší analýze bohužel nebyla přítomnost této látky potvrzena. Možná z důvodu absence této látky silice nevykazovala antimikrobiální aktivitu.

Rozdílnosti se studií Radulescu a Oprea (2008) může být způsobena i tím, že jejich silice byla jímána do xylenu, místo do hexanu jak bylo použito v naší analýze, což může do jisté míry ovlivnit finální složení vytěžené silice. Stejně tak je u studie z roku 2008 jiný zeměpisný původ rostlin, pocházejí z botanické zahrady v Bukurešti.

Podobnost se silicí z listů z téhož druhu vykazovala nejvíce v množství neidentifikované látky č. 3 (jejíž chromatografické spektrum je uvedeno v příloze č. III na konci práce), její množství bylo 12,33 %. U silice z listů to bylo 5,43 % a tato látka naopak nebyla detekována v silicích *T. cordata*.

Látky 2-pentadecanone-6,10,14-trimethyl zde bylo obsaženo nejvíce z analyzovaných silic a to 12,84 %. Tato sloučenina je zodpovědná za antioxidační aktivitu (Yadav et al. 2018), a vzhledem k tomu, že byla obsažena ve všech lipových silicích, je možné se domnívat, že nálevy z těchto rostlin mohou tuto aktivitu vykazovat také. Bylo by ovšem nutné tuto

hypotézu ověřit a podrobit antioxidační vlastnost 2-pentadecanone-6,10,14-trimethyl ještě dalším zkoumáním.

Jednou z hlavních látek, které byly pro tuto silici typické a jinde se neprokázaly je 1-naphthalenol-5,6,7,8-tetrahydro-2,5-dimethyl-8-(1-methylethyl), v množství 7,80 %.

6.3.4 *T. Platyphyllos* list

Obsahových látek v silici z listů druhu *T. platyphyllos* bylo analyzováno nejvíce a to 32, což neodpovídá obsahovým látkám z listů *T. cordata*, kterých bylo podstatně méně. V jiné studii bylo látek v této silici analyzováno 94 (Kelmendi et al. 2020).

Tím, že bylo zastoupení látek tak rozmanité je jasné, že i obsah těchto látek byl v porovnání s jinými silicemi výrazně menší.

Toto tvrzení je možné demonstrovat na alkanu tricosane, kterého bylo v silici nejvíce a to 9,06 %. V porovnání s nejvíce obsaženou látkou v jiných silicích zde analyzovaných je to o řád menší číslo. Kelmendi et al. (2020) uvádí obsah této látky u 5 testovaných lip z Kosova v průměru 1,83 %, což se výrazně neslučuje.

Tyto rozdílnosti mohou být způsobeny různým zeměpisným umístěním, případně i tím, že u Kelmendi et al. (2020) byl použit k analýze methanolvý extrakt.

Podobnost s květinovou silicí ze stejného druhu vykazuje množstvím 2-pentadecanone-6,10,14-trimethyl, kterého je 8,10 %, a proto je silice na druhém místě co se obsahu této látky týče.

Za zmínku stojí opětovné velké množství n-alkanů, již zmiňovaný tricosane s obsahem 9,06 %, a pentacosane s 5,32 %.

Tato silice má větší obsah látek α -ionone (5,80 %) a β -ionone (4,26 %). Obě tyto látky jsou typické pro listové silice obou lip. Zajímavé je, že silice z *T. platyphyllos* obsahuje více α -ionone a méně β -ionone a není mezi těmito vztahy žádná přímá úměra.

Lima et al. (2019) se domnívají, že iononové sloučeniny, i ty které připomínají ionony svou strukturou, mají mnoho biologických vlastností. Jejich deriváty jsou surovinami pro syntézu mnoha přírodních produktů a meziproductů v metabolismu terpenoidů (například v biosyntéze karotenoidů). β -ionone se používá jako výchozí materiál při syntéze vitamínu A. Dokonce těmto sloučeninám připisují i protirakovinné účinky.

Je možné, že tyto látky obsažené v listech lip mají svůj význam v léčitelství, možná budou do budoucna více prozkoumány a tyto domněnky budou potvrzeny.

Studie od Lasekan et Lasekan z roku 2012 testovala látky obsažené v maté čaji a bylo zjištěno, že za jeho typické sladké listové aroma odpovídají pravděpodobně α - a β -ionone. Díky této studii je pravděpodobně objasněna vůně listových silic, které jsou velmi typické právě svým „travnatým“ a listovým jemným aromatem. Stejně tak za přírodní, jemně vonnou látku označuje α -ionone Legnani et al. (2008).

7 Závěr

Antimikrobiální aktivita silic vyextrahovaných z listů a květů stromů *T. cordata* a *T. platyphyllos* proti vybraným druhům mikroorganismů (konkrétně *B. cereus*, *C. albicans*, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *S. aureus*) *in vitro* nebyla potvrzena s výjimkou mírného antifugálního účinku silice z listů *T. cordata* proti *C. albicans*. Tímto se nepotvrdila hypotéza.

Silice byla vytěžena ze všech vzorků, a u všech byla provedena analýza složení. Složením se všechny silice podobají v zastoupení n-alkanů. V zastoupení dalších majoritních složek se lišily. Například v listech *T. cordata* byl nejvíce zastoupen phytol, který může být zodpovědný za zmírňování zánětlivých stavů, a může být hlavní aktivní látkou při inhalaci odvaru z lipového listí. V květech *T. cordata* a v květech a listech *T. platyphyllos* byl detekován kaurene, který pravděpodobně způsobuje sladkou chuť a vůni silice z lip. Mimo to se v lipových silicích vyskytovaly i další látky, které mají vonné vlastnosti. Jsou to zejména α -farnesene a α - a β -ionone. Sloučenina 2-pentadecanone-6,10,14-trimethyl je zodpovědná za antioxidační aktivitu a vyskytovala se ve všech lipových silicích. Je tedy možné se domnívat, že silice vykazují tuto aktivitu také. To by mohlo být předmětem dalších studií.

Podle dostupných zdrojů byly poprvé otestovány silice z listů obou lip na antimikrobiální aktivitu. Poprvé bylo analyzováno složení silice z listů *T. cordata*.

Vzhledem k velké variabilitě obsahových látek v silicích, z nichž mnohé vykazují biologickou aktivitu, by mohlo být zajímavé tyto a jiné stromové silice nadále zkoumat a testovat.

8 Seznam literatury

Adams RP. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, USA

Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, Albayrak S. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices in Turkey. *Journal of food biochemistry* **36**: 547-554

Arnesen LPS, Fagerlund A, Granum PE. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins: A review. *FEMS Microbiol Reviews* **32(4)**:579-606

Ay S, Guldur T, Tekerekoglu MS, Otlu B. 2010. Investigation of hydrophobic characteristics of biofilm producer and non-producer *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Mikrobiyoloji bulteni***44**: 221-230

Baser KHC, Buchbauer G. 2015. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Boca Raton: CRC Press, Florida

Bélanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois . 2011. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunology* **62**: 1-10

Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. 2015. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Elsevier/Saunders, Philadelphia

Buchbauer G, Jirovetz L, Jäger W. 1992. Passiflora and lime-blossoms: motility effects after inhalation of the essential oils and of some of the main constituents in animal experiment. *Arch Pharm (Weinheim)* **325(4)**: 247-8

Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control* **54**: 111-119

Cempírková R, Lukášová J, Hejlová Š. 1997. Mikrobiologie potravin. Jihočeská univerzita, České Budějovice.

Clement RE. 1990. Gas chromatography: biochemical, biomedical and clinical applications. Ontario Ministry of the Environment, Ontario.

CLSI. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI. 2013. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

Conway P. 2002. Tree Medicine: A Comprehensive Guide To The Healing Power Of Over 170 Trees. Piatkus, London

Costa WK, Saturnino de Oliveira JR, Macário de Oliveira A, Bianca da Salva Santos I, Xavier da Cunha R, Soares de Freitas AF, Menezes da Silva JW, Silva VBG et al. 2020. Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. *Industrial Crops and Products* **144** (112059) doi: 10.1016/j.indcrop.2019.112059

Cowan MM. 1999. Plant products as microbial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 564-582.

Czerwińska ME, Dudek MK, Pawłowska KA, Prus A, Ziaja M, Granica S. 2018. The influence of procyanidins isolated from small-leaved lime flowers (*Tilia cordata* Mill.) on human neutrophils. *Fitoterapia* **127**: 115-122

Černý J. 2005. Užitky, které nám poskytuje lípa. Pages 18-19 in *Lípa - dřevina roku 2005: seminář Hradec Králové 8. listopadu 2005*. Česká lesnická společnost, základní pobočka Hradec Králové, Hradec Králové

Český rozhlas Radiožurnál. 2014. Proč je lípa českým národním symbolem? Porazila totiž dub! Available from <https://radiozurnal.rozhlas.cz/proc-je-lipa-ceskym-narodnim-symbolem-porazila-totiz-dub-6235091> (Accessed březem 2020)

Dahiya P, Purkayastha S. 2012. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants Against Multi-drug Resistant Bacteria from Clinical Isolates. *Indian journal of pharmaceutical sciences* **74(5)**: 443-450.

De Martino L, De Feo V, Nazzaro F. 2009. Chemical composition and in vitro antimicrobial and mutagenic activities of seven Lamiaceae essential oils. *Molecules (Basel, Switzerland)* **14(10)**: 4213–4230

Devi DR, Lakshna SS, Parvathi SV, Hari BNV. 2018. Investigation of wound healing effect of topical gel of *Albizia amara* leaves extract. *African journal of botany* **119**: 400-409

Doughari JH. 2012. Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Venketeshwer Rao, IntechOpen, doi: 10.5772/26052

Farcas AC, Socaci SA, Tofana M, Muresan C, Cuceu A, Salanta L, Pop A. 2015. Comparative Evaluation of Biofunctional Compounds Content from Different Herbal Infusions. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca-Food Science And Technology* **72**: 237-241

Fitsiou I, Tzakou O, Hancianu M, Poiata A. 2007. Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of *Tilia tomentosa* Moench and *Tilia cordata* Miller Oils. *Journal of Essential Oil Research* **19(2)**: 183-185

Gönül ŞEA, Karapinar M. 1987. Inhibitory effect of linden flower (*Tilia* flower) on the growth of foodborne pathogens. *Food Microbiology* **4**: 97-100

Hagender F. 2008. *The Living Wisdom of Trees: Natural History, Folklore, Symbolism, Healing*. Duncan Baird Publishers, London

Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolstø AB. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-one species on the basis of genetic evidence. *Applied and environmental mikrobiology* **66(6)**:2627-30

Hemzal B. 2016. *Léčivé oleje*. Neptun, Brno

Hlavová Z. 2005. Problematika semenářství lípy. Pages 9-11 in *Lípa - dřevina roku 2005: seminář Hradec Králové 8. listopadu 2005*. Česká lesnická společnost, základní pobočka Hradec Králové, Hradec Králové

Hora B. 1981. *The oxford encyclopedia of trees of the world*. Oxford university press, Oxford.

Horáček P., 2007. *Encyklopedie listnatých stromů a keřů*. Computer press, a. s., Brno

Jorgensen JH, Ferraro MJ. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **49(11)**: 1749-1755.

Kadlíková L. 2004. Lípa srdčitá (malolistá) *Tilia cordata*. Available from <https://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=38> (Accessed únor 2020)

Kelmendi N, Behxhet M, Fitore Z, Dashnor N, Avni H. 2020. Essential Oil Composition of *Tilia platyphyllos* Scop. Collected from Different Regions of Kosovo. *Records of Natural Products***(14)5**: 366-371.

Killer J. 2019. *Potravinářská mikrobiologie*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.

Kingsbury N. 2015. *Hidden Natural Histories: Trees*. University of Chicago Press, Chicago

Klouda P. 2003. *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava

Knotek K, Verner V, Chaloupkova P, Kokoska L. 2012. Prevalence and use of herbal products in the Czech Republic: over-the-counter survey among adult pharmacies clients. *Complement therapies in medicine* **20(4)**:199-206

Koblížek J, Tichá S, Úradníček L, Maděra P. 2009. *Dřeviny české republiky*. Lesnická práce s. r. o., Brno.

Kolář T, Gryc V, Mayer K, Rybníček M, Vavřík H, Weber A, Grabner M, Noshiro S. 2019. Wood species analysis of traditional hand-operated spinning wheels from Central Europe. *Iawa Journal* **40**: 92-105

Korbelář J, Endris Z. 1968. *Naše rostliny v lékařství*. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha

Kowalski R, Baj T, Kalwa K, Kowalska G, Sujka M. 2017. Essential Oil Composition of *Tilia cordata* Flower. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **20**: 1137-1142

Kyzlík P. 2005. Lípy památné, významné a krásné. Pages 20-21 in *Lípa - dřevina roku 2005: seminář Hradec Králové 8. listopadu 2005*. Česká lesnická společnost, základní pobočka Hradec Králové, Hradec Králové

Lasekan A, Lasekan O. 2012. Flavour chemistry of mate and some common herbal teas. *Trends in food science & technology* **27**: 37-46

Legnani L, Luparia M, Zanoni G, Toma L, Vidari G. 2008. A full conformational characterization of natural ionones and irones, as well as 13-alkyl-substituted alpha-ionones. *European journal of organic chemistry* **2008**: 4755-4762

Lenton TM, Dahl TW, Daines SJ, Mills BJ, Ozaki K, Saltzman MR, Porada P. 2016. Earliest land plants created modern levels of atmospheric oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**: 9704-9709

Lima RS, Perez CN, da Silva CC, Santana MJ, Queiroz LHK, Barreto S, de Moraes, MO, Martins FT. 2019. Structure and cytotoxic activity of terpenoid-like chalcones. *Arabian journal of chemistry* **12**: 3890-3901

Lin SY, Chen YL, Lee CL, Cheng CY, Roan SF, Chen IZ. 2013. Monitoring volatile compound profiles and chemical compositions during the process of manufacturing semi-fermented oolong tea. *Journal of horticultural science & biotechnology* **88**: 159-164

Málek Z, Horáček P, Kiesenbauer Z. 2012. *Stromy pro sídla a krajinu*. Ing. Petr Baštan, Olomouc

Mazzei R, Leonti M, Spadafora S, Patitucci A, Tagarelli G. 2020. A review of the antimicrobial potential of herbal drugs used in popular Italian medicine (1850s–1950s) to treat bacterial skin diseases. *Journal of Ethnopharmacology* **250** (112443) doi:10.1016/j.jep.2019.112443

Miguel MG, Duarte FL, Venancio F, Tavares R. 2004. Variation in the main components of the essential oils from the leaves and flowers of Portuguese *Thymus albicans* over a single season. *Journal of essential oil research* **16**: 169-171

Miguel MG, Duarte FL, Venancio F, Tavares R. 2004. Comparison of the main components of the essential oils from flowers and leaves of *Thymus mastichina* (L.) L. ssp *mastichina* collected at different regions of Portugal. *Journal of essential oil research* **16**: 323-327

Mladenović KG, Muruzović MŽ, Petrović TŽ, Čomić LR. 2018. *Escherichia coli* identification and isolation from traditional cheese produced in Southeastern Serbia. *Journal of food safety* **38** (41010)doi: <https://doi-org.infozdroje.czu.cz/10.1111/jfs.12477>

Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)* **6(12)**:1451-74. doi: 10.3390/ph6121451

Němec L. 2005. Pěstování sadebního materiálu lípy. Pages 25-27 in *Lípa - dřevina roku 2005: seminář Hradec Králové 8. listopadu 2005*. Česká lesnická společnost, základní pobočka Hradec Králové, Hradec Králové

Neumann, SK. 1952. *Knihy lesů, vod a strání*. Československý spisovatel, Praha

Nguyen NH, Nguyen TT, Ma PC, Ta QTH, Duon, TH, Vo VG. 2020. Potential Antimicrobial and Anticancer Activities of an Ethanol Extract from *Bouea macrophylla*. *Molecules* **25**(8) doi: 10.3390/molecules25081996

Novy P, Kloucek P, Rondevaldova J, Havlik J, Kourimska L, Kokoska L. 2014. Thymoquinone vapor significantly affects the results of *Staphylococcus aureus* sensitivity tests using the standard broth microdilution method. *Fitoterapia*, **94**: 102–107

Ogunlesi M, Okiei W, Ofor E, Osibote AE. 2009. Analysis of the essential oil from the dried leaves of *Euphorbia hirta* Linn (*Euphorbiaceae*), a potential medication for asthma. *African Journal of biotechnology***8**:7042-7050

Oniszczyk A, Podgorski R. 2015. Influence of different extraction methods on the quantification of selected flavonoids and phenolic acids from *Tilia cordata* inflorescence. *Industrial crops and products* **76**: 509-514

Ouelbani R, Bensari S, Mouas TN, Khelifi D. 2016. Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology* **194**:196-218

Pigott D. 2012. Lime-trees and basswoods: a biological monograph of the genus *Tilia*. Cambridge University Press, Cambridge

Radulescu, V. and Oprea, E. (2008). Analysis of volatile compounds of officinal *Tiliae flos* by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Farmacia*. **56**(2): 129-138.

Rubab M, Shahbaz HM, Olaimat AN, Oh DH 2018. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. *Biosensors and Bioelectronics* **105**: 49-57

Russo TA, Johnson JR. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* **5**(5): 449-56

Sankar TV. 2005. Gas Chromatography - Principle and Applications. Central Institute of Fisheries Technology, Kochi, Kerala

Schindler J, Bednář M, Fraňková V, Souček A, Vávra J. 1999. Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie. Studio Marvil, Košice

Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. 2007. Antimicrobial susceptibility testing protocols. Crc Press, Boca Raton, Florida

Singh DP, Kumari M, Prakash HG, Rao GP, Solomon S. 2019 Phytochemical and Pharmacological Importance of Stevia: A Calorie-Free Natural Sweetener. *Sugar Tech* **21**: 227–234

Smolková E, Feltl L. 1991. Analýza látek v plynném stavu. SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha.

Sun GR, Du FG, Wang RJ. 2014. Comparison of Biomaterials from Essential Oils in Five Parts of *Magnolia sieboldii*. *Materials engineering and mechanical* **442**: 142-146

Szucs Z, Cziaky Z, Kiss-Szikszai A, Sinka L, Vasas G, Gonda S. 2019. Comparative metabolomics of *Tilia platyphyllos* Scop. bracts during phenological development. *Phytochemistry* **167**doi: 10.1016/j.phytochem.2019.112084

Šilhánková L., 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Academia, Praha

Tong Y, Tang J. 2017. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. *Microbiological Research* **198**: 27-35

Volák J, Stodola J. 1987. *Velká kniha léčivých rostlín*. Artia Praha, Praha

Yadav A, Yadav M, Kumar S, Sharma D, Yadav JP. 2018. In vitro Antioxidant Activities and GC-MS Analysis of Different Solvent Extracts of *Acacia nilotica* Leaves. *Indian journal of pharmaceutical sciences***80**: 892-902

Yang PZ, Zhu XX, Cao LL, Cheng JS, Zheng Z, Jiang ST. 2017. Safety evaluation of *Bacillus cereus* isolated from smelly mandarin fish. *Journal of food measurement and characterization* **11**: 726-735

Yusuf U, Kotwal SK, Gupta S, Ahmed T. 2018. Identification and antibiogram pattern of *Bacillus cereus* from the milk and milk products in and around Jammu region. *Veterinary World*, **11(2)**: 186-191

Zida A, Bamba S, Yacouba A, Ouedraogo-Traore R, Guiguemdé RT. 2017. AntiCandida albicans natural products, sources of new antifungal drugs: A review. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*. **27(1)**: 1-19

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

MHB -Mueller-Hinton broth (bujón)

KTJ - Kolonie tvořící jednotky

ATCC - American type culture collection

MIC - Minimální inhibiční koncentrace

MBC - Minimální baktericidní koncentrace

RPMI médium -Roswell Park Memorial Institute

GC - Gas chromatography (plynová chromatografie)

MOPS - 3-(N-morpholino)propansulfonová kyselina

10 Seznam obrázků

Obrázek č. 1 – Dobový tanec pod lipou

Zdroj: Hieronymus Bock, Kreüterbuch (1551)

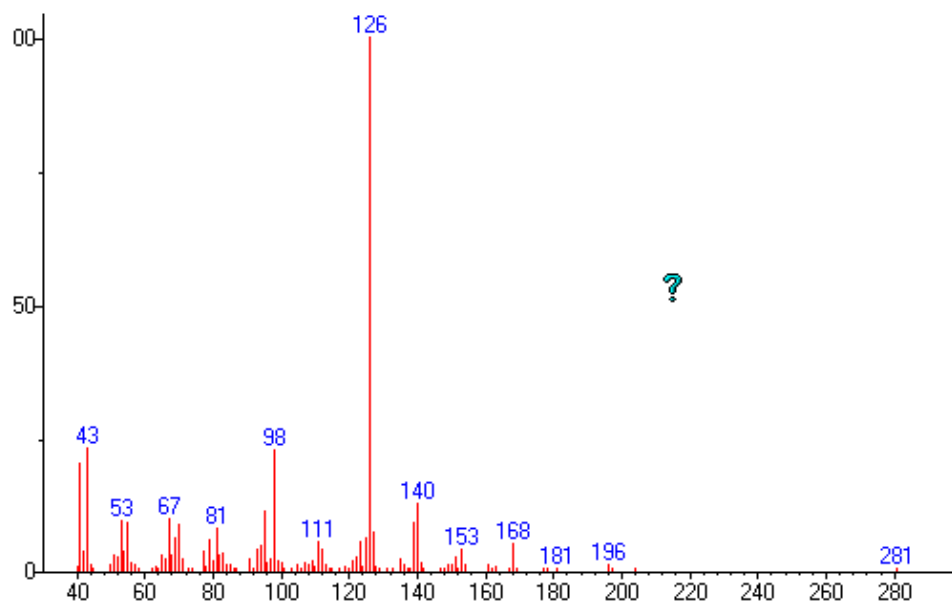
Obrázek č. 2 – schéma plynového chromatografu

Zdroj: Klouda P. 2003. Moderní analytické metody. Pavel Klouda, Ostrava

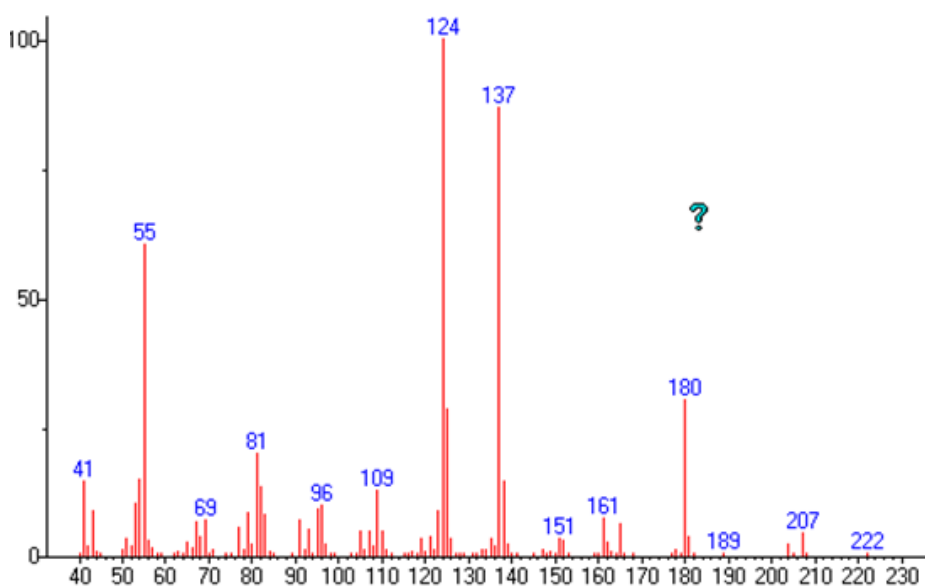
Obrázek č. 3 – Destilační aparatura s Clevengerovým nástavcem

Zdroj: www.verkon.cz

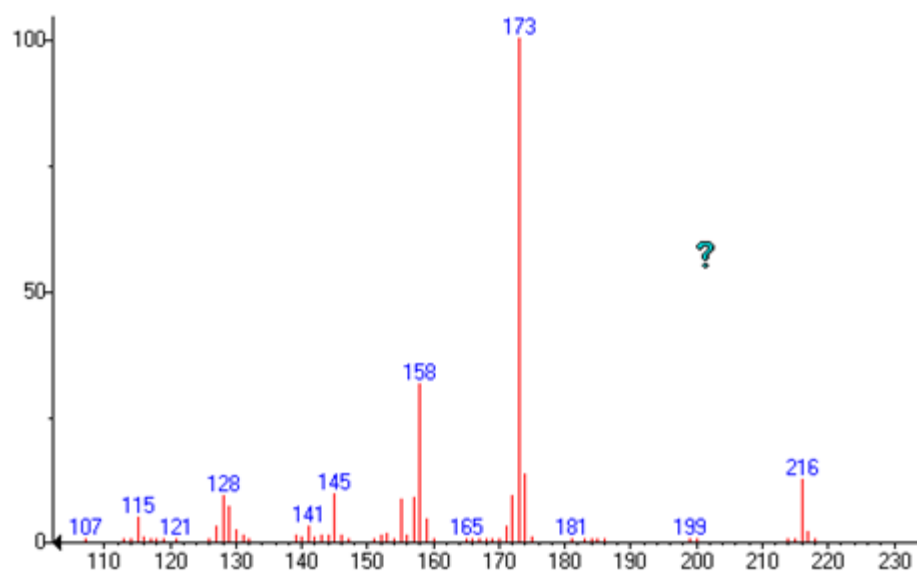
11 Samostatné přílohy



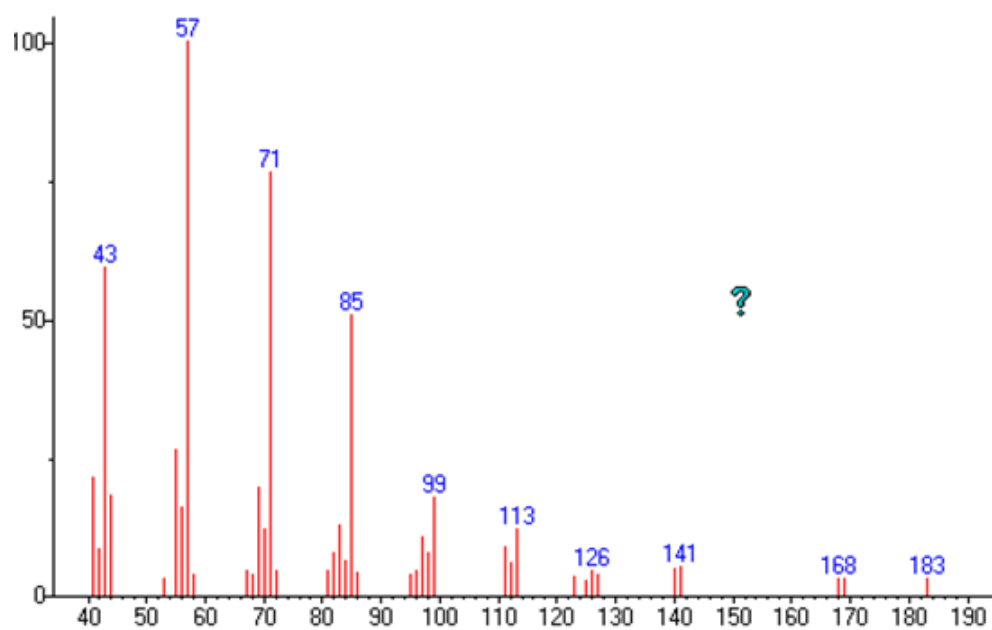
Příloha č. I – hmotnostní spektrum neidentifikované látky č. 1 (RT 29,7; RI 1473; vzorek *T. platyphyllos* květ obsah 4,21 %, vzorek *T. platyphyllos* list obsah 2,32 %)



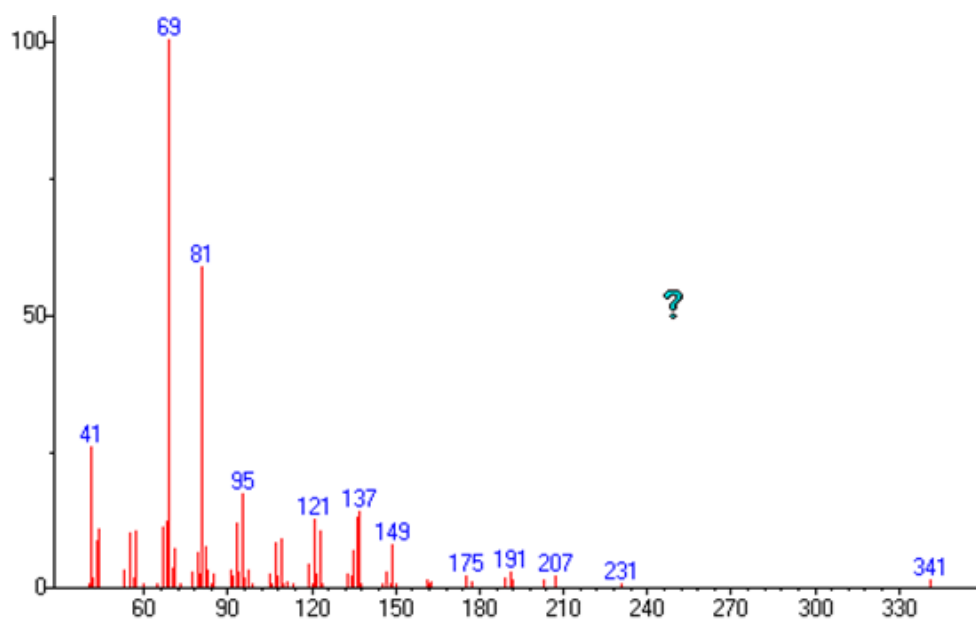
Příloha č. II – hmotnostní spektrum neidentifikované látky č. 2 (RT 31,33; RI 1513; vzorek *T. platyphyllos* list; obsah 3,91 %)



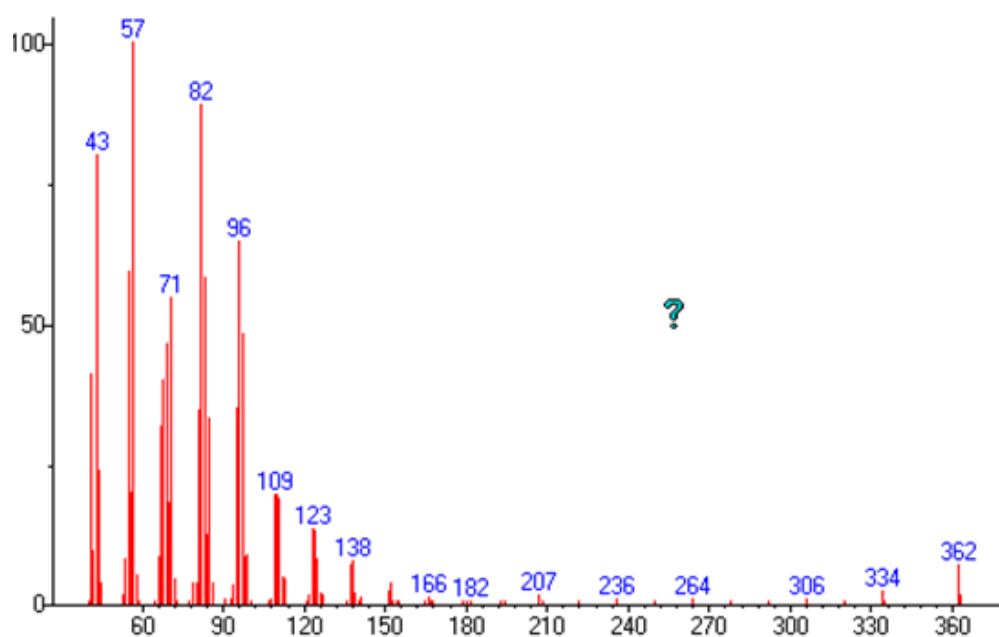
Příloha č. III – hmotnostní spektrum neidentifikované látky č. 3 (RT 42,67; RI 1818; vzorek *T. platyphyllos* květ obsah 12,33 %; vzorek *T. platyphyllos* list obsah 5,43 %)



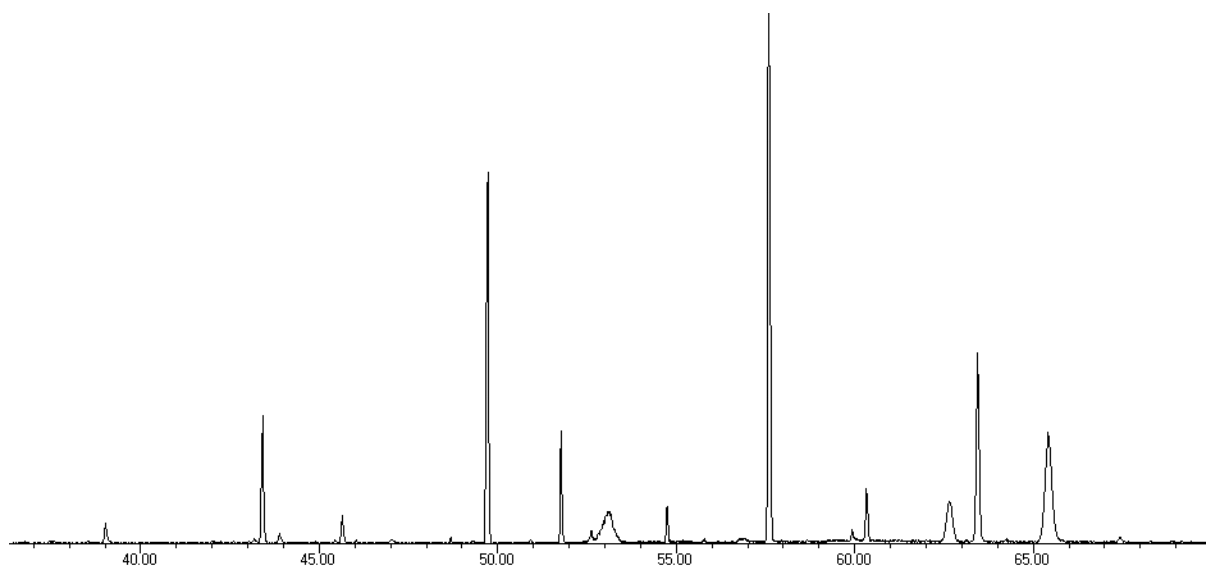
Příloha č. IV – hmotnostní spektrum neidentifikované látky č. 4 (RT 53,1; RI 2146; vzorek *T. cordata* květ; obsah 6,41 %)



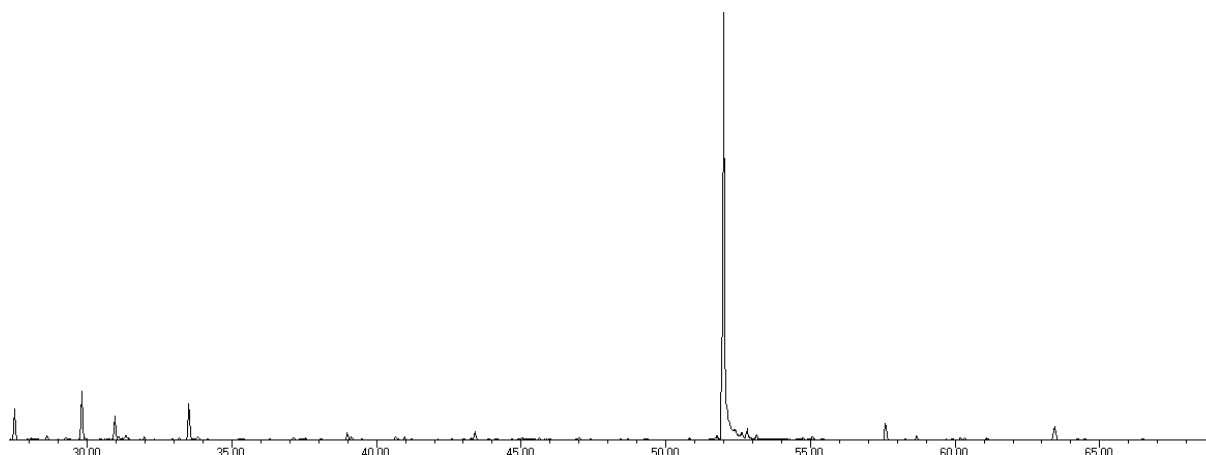
Příloha č. V – hmotnostní spektrum neidentifikované látky č. 5 (RT 62,6; RI 2475; vzorek *T. cordata* květ; obsah 5,79 %)



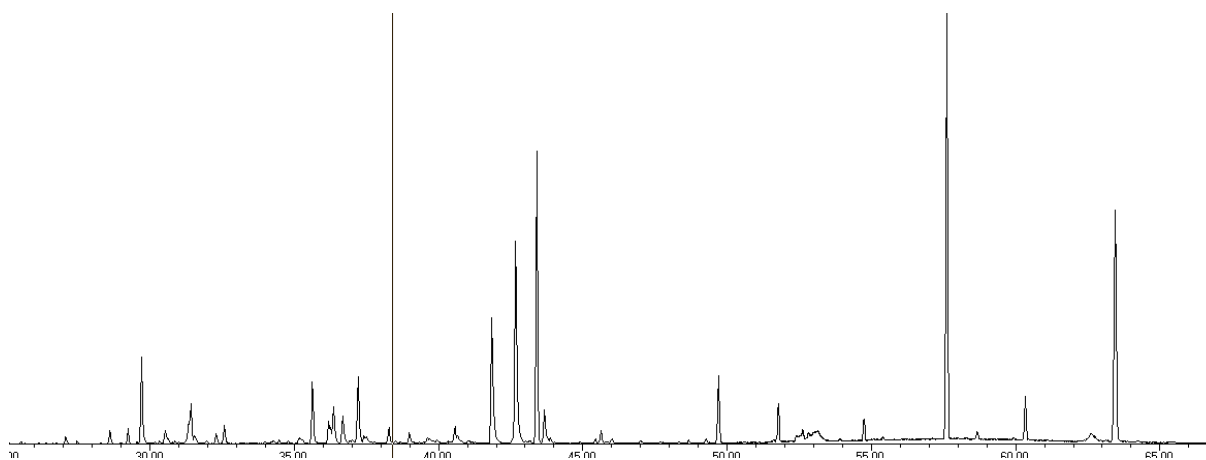
Příloha č. VI – hmotnostní spektrum neidentifikované látky č. 6 (RT 65,4; RI 2550; vzorek *T. cordata* květ; obsah 16,98 %)



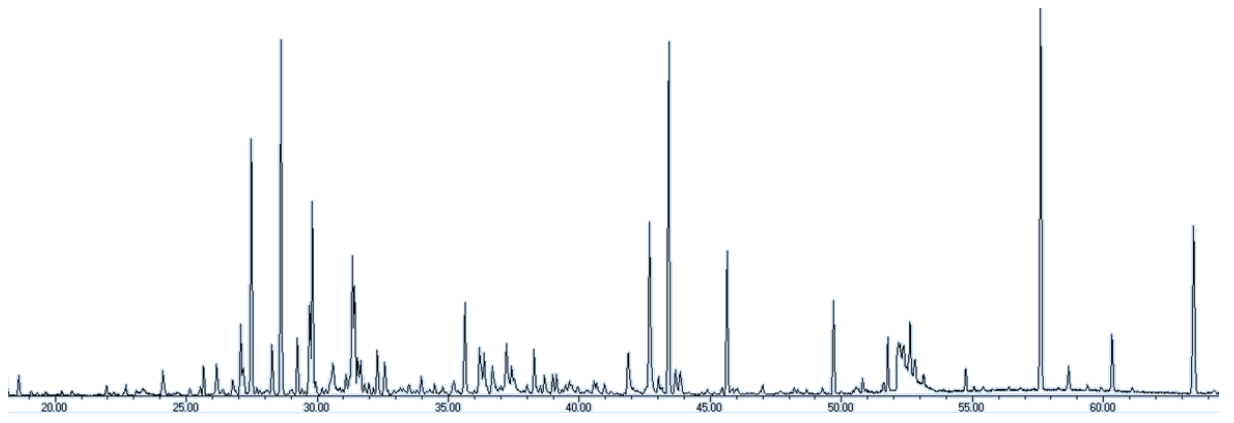
Příloha č VII – chromatogram vzorku *T. cordata* květ



Příloha č. VIII – chromatogram vzorku *T. cordata* list



Příloha č IX – chromatogram vzorku *T. platyphyllos* květ



Příloha č. X – chromatogram vzorku *T. platyphyllos* list