



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Antimikrobiální aktivita lišejníku**

***Cladonia coniocraea***

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	Bc. Lucie Gramesová
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2022

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Lucie Gramesová
Název práce	Antimikrobiální aktivita lišejníku <i>Cladonia coniocraea</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	Diplomová práce se zabývá stanovením antimikrobiální aktivity v celkovém extraktu a frakcích lišejníku <i>Cladonia coniocraea</i> . Vzorky byly aktivní výhradně vůči grampozitivním bakteriím, zejména pak těm anaerobním. Nejaktivnější byla frakce RP10 (získ SPE frakcionací na reverzní fázi), která byla aktivní vůči mikroorganismům <i>Streptococcus mutans</i> (0,188 mg/ml), <i>Lactobacillus acidophilus</i> (0,188 mg/ml), <i>Bacillus cereus</i> (0,375 mg/ml), <i>Schaalia odontolytica</i> (0,188 mg/ml) a <i>Clostridium perfringens</i> (0,375 mg/ml). V aktivní frakci RP10 byla pomocí UHPLC-QTOF-MS předběžně identifikována kyselina fumarprotocetrarová a kyselina protocetrarová, jakožto sekundární metabolity lišejníku <i>C. coniocraea</i> , které pravděpodobně přispívají k antimikrobiální aktivitě.
Klíčová slova	Antimikrobiální aktivita, <i>Cladonia coniocraea</i> , lišejník, mikrodiluční metoda, UHPLC-QTOF-MS
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Lucie Gramesová
Title of thesis	Antimicrobial activity of <i>Cladonia coniocraea</i> lichen
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>The diploma thesis focuses on antimicrobial activity determination in crude extract and fractions of the lichen <i>Cladonia coniocraea</i>. The samples were active solely towards gram-positive bacteria, especially towards the anaerobic ones. The most active fraction was RP10 (obtained by SPE fractionation on a reversed phase) that was active towards microorganisms <i>Streptococcus mutans</i> (0,188 mg/ml), <i>Lactobacillus acidophilus</i> (0,188 mg/ml), <i>Bacillus cereus</i> (0,375 mg/ml), <i>Schaalia odontolytica</i> (0,188 mg/ml), and <i>Clostridium perfringens</i> (0,375 mg/ml). The analysis by UHPLC-QTOF-MS of active fraction RP10 resulted in the preliminary identification of several secondary metabolite including protocetraric and fumarprotocetraric acids that supposedly contribute to the overall antimicrobial activity of <i>C. coniocraea</i> extract.</p>
Keywords	Antimicrobial activity, <i>Cladonia coniocraea</i> , lichen, microdilution method, UHPLC-QTOF-MS
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jiřího Grúze, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

.....

Bc. Lucie Gramesová

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D. za věnovaný čas, cenné rady, odborné vedení, přátelský přístup a trpělivost během tvorby diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Lucii Koplíkové za veškerou pomoc a rady v laboratoři a také RNDr. Lucii Janovské, Ph.D. za veškeré rady při testování antimikrobiální aktivity.

Tato diplomová práce byla řešena s podporou interního grantu IGA\_PrF\_2022\_077.

# Obsah

Seznam použitých zkratek .....	8
1 ÚVOD A CÍLE .....	9
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1 Lišejníky .....	10
2.1.1 Výskyt a růst lišejníků.....	11
2.1.2 Význam lišejníků a jejich využití člověkem.....	12
2.1.3 Sekundární metabolity.....	14
2.1.3.1 Biosyntéza sekundárních metabolitů.....	16
2.1.4 <i>Cladonia coniocraea</i> (Flörke) Spreng.....	17
2.1.4.1 Sekundární metabolity lišejníku <i>Cladonia coniocraea</i> .....	20
2.1.4.1.1 Kyselina fumarprotocetrarová.....	20
2.1.4.1.2 Kyselina protocetrarová.....	21
2.2 Přírodní antimikrobiální molekuly.....	22
2.2.1 Přírodní antimikrobiální látky produkované houbami a využívané ve zdravotnictví.....	24
2.2.1.1 Další vybrané látky s prokázanou antimikrobiální aktivitou.....	25
2.2.2 Antimikrobiální rezistence .....	27
2.3 Použité metody.....	28
2.3.1 SPE frakcionace .....	28
2.3.2 Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS).....	28
2.3.3 Diluční testy.....	30
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	31
3.1 Biologický materiál .....	31
3.2 Použité chemikálie .....	32
3.3 Kultivační půdy.....	32
3.4 Přístrojové vybavení.....	32
3.5 Metody.....	34
3.5.1 Sběr biologického materiálu.....	34
3.5.2 Extrakce.....	35
3.5.3 SPE frakcionace .....	36
3.5.4 UHPLC – QTOF - MS analýza.....	37

3.5.5	Testování antimikrobiální aktivity mikrodiluční metodou.....	38
4	VÝSLEDKY .....	39
4.1	Aktivita extraktu lišejníku <i>Cladonia coniocraea</i> .....	39
4.2	SPE frakcionace .....	40
4.3	Antimikrobiální aktivita .....	41
4.4	UHPLC-QTOF-MS analýza aktivní frakce RP10 .....	43
5	DISKUZE .....	48
5.1	UHPLC-QTOF-MS .....	48
5.2	Antimikrobiální aktivita .....	50
6	ZÁVĚR.....	52
7	LITERATURA .....	53

## Seznam použitých zkratek

DMSO	dimethylsulfoxid
DW	hmotnost suchého materiálu
ESI	ionizace elektrosprejem
ESI-	ionizace elektrosprejem v negativním módu
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS spektrum	fragmentační spektrum
QTOF	kvadrupól s průletovým analyzátozem
RP	reverzní fáze
RT	retenční čas
SPE	extrakce na tuhé fázi
TOF	průletový analyzátoz
UHPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie



# 1 ÚVOD A CÍLE

Lišejníky jsou symbiotické organismy, sestávající z mykobionta (houbové složky) a fotobionta (řasy či sinice), které se vyskytují po celém světě napříč všemi podnebnými pásmy. Využívají se v lichenometrii, jako bioindikátory kvality ovzduší, zdroj potravy, v kosmetice, parfumerii a také tradiční medicíně (Kalina & Váňa, 2005). Lišejníky produkují druhově specifické sekundární metabolity, které se hromadí ve stélkách a slouží jako ochrana před vnějšími vlivy. Nejčastěji se jedná o fenoly, terpeny, depsidy a depsidony (Erb & Kliebenstein, 2020).

Vlivem rozšířené antimikrobiální rezistence se v medicíně potýkáme s nedostatkem nových látek s antimikrobiálními účinky. Potencionálními zdroji těchto látek by mohly být rostliny nebo právě lišejníky, které řadíme do říše hub a bylo prokázáno, že některé druhy vykazují antimikrobiální vlastnosti (Iwu et al., 1999; Shrestha & St. Clair, 2013; Tiwari et al., 2021).

Cílem teoretické části diplomové práce bylo vypracovat rešerši zabývající se lišejníky, sekundárními metabolity a také problematikou antimikrobiálních látek. Cílem experimentální části bylo posoudit antimikrobiální aktivitu extraktu z lišejníku *Cladonia coniocraea* a pomocí metabolomické LC-MS analýzy se pokusit identifikovat sekundární metabolity, včetně složky potenciálně zodpovědné za tuto aktivitu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Lišejníky

Lišejníky jsou unikátní složené organismy, pro které je charakteristický symbiotický vztah houby (mykobionta) a řasy či sinice (fotobionta). Fosilní záznamy lišejníků a hub jsou velice ojedinělé. První fosilní nález naznačující symbiózu mezi hyfami a řasou či sinicí byl nalezen v jižní Číně ve Weng'anu, ve formaci Doushantuo, jejíž stáří je odhadováno na 531 až 635 miliónů let. Z tohoto objevu vyplývá, že symbióza mezi houbami a řasami či sinicemi je starší než začátek evoluce cévnatých rostlin (Yuan et al., 2005). Lišejníky, neboli lichenizované houby tak neřadíme mezi rostliny, ale jsou klasifikovány na základě jejich houbové složky do říše hub. V literatuře jsou lišejníky často definovány jako houby, které jsou obligátně vázány na určité řasy nebo sinice svou výživou, a které s nimi tvoří morfologicko-fyziologickou jednotku (Rosypal, 1992).

Ve většině případů je převládající složkou ve stélce lišejníků mykobiont. Nejčastěji jimi bývají zástupci vřekovýtrusných hub (kmen Ascomycota), popřípadě stopkovýtrusných hub (kmen Basidiomycota). Jejich houbová vlákna neboli hyfy se oplétají kolem buněk fotosyntetizující řasy či sinice. Následně jsou vyslány haustoria z hyf mykobionta přímo do odumřelých nebo živých buněk fotobionta. Ten, jakožto zelená složka schopná fotosyntézy, obstarává organické látky a vlákna mykobionta zajišťují přísun vody a v ní rozpuštěných anorganických látek. V tomto případě hovoříme o mutualistickém principu symbiózy, který je prospěšný pro oba partnery. U některých druhů lišejníků byl prokázán komenzalistický vztah, kdy jeden partner má ze soužití větší prospěch než druhý, avšak druhý z partnerů není ovlivněn. Dalším typem je antagonistický parazitismus, kdy fotobiont odumírá či je postižen nekrózou (např. u rodů *Collema* a *Leptogium*). Problematika vztahů mezi mykobiontem a fotobiontem je však mnohem složitější, a ne zcela jednoznačná. V některých případech může lišejník utvářet hned několik fotobiontů nebo naopak několik mykobiontů. Pro přibližně 15 000 běžně se vyskytujících druhů lišejníků platí mutualistický typ symbiózy (Czarnota, 2009; Kalina & Váňa, 2005).

Fotobionty jsou v 8 % zástupci sinic. Řadíme zde přibližně 15 různých rodů jako například *Chroococcus*, *Gloeocapsa*, *Nostoc*, *Scytonema*, *Stigonema* aj. Převážně jsou fotobionty zelené řasy, které jsou zastoupeny až 23 různými druhy. V polovině případů jde o rod *Trebouxia*. Dále jsou to rody *Coccomyxa*, *Myrmecia*, *Trentepohlia* aj. Zástupci

fotobiontů jsou v převážné většině schopni vyskytovat se v přírodě samostatně na rozdíl od většiny mykobiontů, kteří samostatně v přírodě nepřežijí (Kalina & Váňa, 2005).

Pokrok ve vědě ukazuje, že řada běžně vyskytujících se lišejníků je tvořena také třetí složkou, kterou jsou specifické basidiomycetové kvasinky. Tyto mikroorganismy jsou zabudovány v kůře (kortexu) lišejníků a podílí se na struktuře a celkovém vzhledu stélky (thallusu) (Spribille et al., 2016).

### 2.1.1 Výskyt a růst lišejníků

Naprostá většina lišejníků jsou kosmopolitní organismy, vyskytující se od pólu až k rovníku. Nacházejí se na místech, která jsou nehostinná pro ostatní skupiny organismů nebo je na nich snižena mezidruhová konkurence (Kalina & Váňa, 2005). Stanoviště, která osidlují jsou velice rozmanitá. Nejčastěji je nacházíme na souši, a to především na odumřelém tlejícím dřevě, na kamenech, na skalách, na kůře stromů, či dokonce na holé půdě. Drobné lišejníky vyskytující se v tropech a subtropích kolonizují také listy jiných rostlin. Poměrně vysoká druhová rozmanitost lišejníků je evidována na Antarktidě (Sancho et al., 1999). Není však podmínkou, aby osidlovaly pouze pevninu. Mohou se vyskytovat také v sladkovodních tocích (např. *Peltigera hydrothyria*) či mořských přílivových zónách (např. *Lichina* spp.) (Nash, 2008).

Růst lišejníků je značně závislý na klimatických podmínkách v oblasti jejich výskytu. Obecně je pro lišejníky vhodnější vlhké prostředí s dostatečným množstvím světla. Růst je také závislý na samotném stáří organismu, kdy s postupem let se rychlost zpomaluje. Lišejník s korovitou stélkou, jehož stanovištěm bývají často skalní povrchy, roste velice pomalu. Příkladem je rod *Rhizocarpon*, jež během jednoho roku vyroste (zvětší se v průměru) přibližně o 0,4 mm během prvních 100 let a následně se jeho růst zpomalí a roční přírůstek činí 0,016 mm (Rodbell, 1992). Jiný zdroj uvádí hodnoty průměrného přírůstu na malé stélce 0,8 mm/rok a na starším lišejníku 0,64 mm/rok (Bradwell & Armstrong, 2007). U lišejníků se stélkou lupenitou se průměrný přírůstek uvádí asi 2 až 3 mm za rok. Některé lišejníky však během jednoho roku mohou navýšit množství své biomasy až o 40 %. Tyto druhy jsou pak významným zdrojem potravy v místech, kde je nouze o rostlinné druhy (Kalina & Váňa, 2005; Nash, 2008; Rosypal, 1992).

### 2.1.2 Význam lišejníků a jejich využití člověkem

Lichenometrie je technika využívající k určování stáří skalního povrchu, který je kolonizován lišejníky. Významné místo zaujímá tato metoda v polárních a alpských oblastech, kde je možnost datování prostřednictvím jiných metod značně omezena (McCarthy, 2013). Lichenometrie vychází z předpokladu, že největší jedinec, který kolonizuje daný skalní povrch, je zároveň nejstarší. Jestliže známe rychlost růstu konkrétního druhu lišejníku, je pak možné určit minimální stáří substrátu. Nejvýznamnějším zástupcem lišejníků, který se díky jeho radiálnímu růstu hojně využívá v lichenometrii je *Rhizocarpon geographicum* (Bradley, 2014). Tento druh může žít až 10 000 let, ale prakticky nejvyšší věk pro aplikaci v lichenometrii je 4000 až 5000 let (Benedict, 2009).



Obr. 1: *Rhizocarpon geographicum* (Mapovník zeměpisný) na skalním podkladu.  
(Převzato od Marek Velechovský)

Dále se lišejníky využívají jako bioindikátory kvality ovzduší. Uplatňují se především dvě základní metodiky. První metodika je pasivní. Jde o floristickou metodu, která vychází z toho, že jsou lišejníky značně citlivé na obsažené plynné látky v ovzduší, a to zejména na SO<sub>2</sub>, fluoridy, či silné oxidující sloučeniny (např. ozon). Provádí se mapování expanze druhů v konkrétní lokalitě nebo se sledují celá společenstva lišejníků. Při vyhodnocování je nutná přítomnost znalého lichenologa, a také starší záznamy mapování. Porovnává se, zda došlo ke změnám ve výskytu konkrétních druhů a uplatňují se další matematické postupy. Druhým způsobem je aktivní biomonitoring, který zaznamenává výskyt kovů v atmosféře. Tato metoda je založena na biologických, fyzikálních a chemických vlastnostech lišejníků a jejich schopnosti akumulovat stopové prvky ve větší

míře, než skutečně potřebují pro svůj růst (Jeran et al., 2002). Nejčastěji monitorovanými stopovými prvky je Pb, As, Zn, Cd, Cu a Ni (Ng et al., 2006).

V oblastech Severní Ameriky a na severu Evropy a Asie jsou lišejníky nepostradatelnou potravou pro soby (Rosypal, 1992). Lišejníky jsou zdrojem živin nejen pro soby, ale překvapivě také pro některé primáty. *Rhinopithecus roxellana* žijící v národní přírodní rezervaci Shennongjia v Číně konzumují lišejníky v době, kdy je nouze o jiné rostlinné druhy (Liu et al., 2013). Nejen živočichové, ale také lidé konzumují lišejníky. V literatuře se uvádí, že se lišejníky živili indiáni v Severní Americe, a to například druh *Bryoria fremontii* a jemu příbuzné druhy, které využívali mimo jiné jako materiál pro výrobu oděvů a léčivých přípravků (Turner, 1977).

Díky řadě sekundárních metabolitů, které lišejníky produkují, nachází své místo také v kosmetice či medicíně. Mimo to jsou využívána barviva obsažená v lišejnících, která po extrakci mohou nabývat oranžového, žlutého, modrošedého, purpurového a hnědého pigmentu. Odstíny závisejí na použité metodě extrakce barviva. Využívá se metoda extrakce varem (BWM), dále metoda kdy se stélky lišejníků nakládají do amoniaku po dobu několika týdnů (AFM) a metoda extrakce dimethylsulfoxidem (DEM) (Shukla et al., 2014). Lišejník *Rocella tinctoria* obsahuje látku zvanou orcein a společně s řadou dalších lišejníkových extraktů (zejména rod *Rocella*) vytváří tzv. lakmus, který je využíván jako indikátor v lakmusových papírcích (Doherty et al., 2014; Yusuf, 2018). Barvení pomocí lišejníků mělo své důležité postavení v historii, ale v dnešní době bylo nahrazeno syntetickými barvami.

V kosmetickém průmyslu, zejména pak v parfumerii, jsou hojně využívány esenciální oleje získané z celé řady lišejníků. Jsou ceněny zejména pro svou lesní vůni a slouží jako jejich stabilizační složka. Příkladem lišejníku, který je využíván v parfumerii je *Evernia prunastri*, známý také jako dubový mech. Některé studie však uvádějí, že se může jednat o alergen. Proto se jeho užívání značně omezilo (Calchera et al., 2019; Nardelli et al., 2011).

Lišejníky mají stále své místo v tradiční medicíně, která je v dnešní době mnohem častěji vyhledávaným, a také více uznávaným odvětvím medicíny. V tradiční medicíně se využívá 60 druhů lišejníků, které napomáhají zejména při léčbě ran, kožních poruchách, dýchacích a zažívacích potížích, a také při porodnických a gynekologických problémech (Crawford, 2019). Nejznámějším lišejníkem, který je hojně využíván v lidovém léčitelství je *Cetraria islandica* (L) neboli puklérka islandská či islandský mech. *Cetraria islandica* je využívána bezmála 200 let a v dnešní době je součástí přípravků proti kašli, astmatu a

kataru. Dříve měl své místo při léčbě tuberkulózy, otoků, žaludečních, trávicích a dýchacích obtíží (Podterob, 2008). V současnosti jde o hojně prozkoumávanou oblast zejména pro jejich potencionální přínos ve farmaceutickém průmyslu, neboť se v souvislosti s lišejníky hovoří o antioxidační, antibakteriální, anti-HIV, antiproliferativní a protirakovinné aktivitě (Shrestha & St. Clair, 2013).

### 2.1.3 Sekundární metabolity

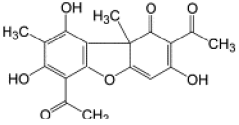
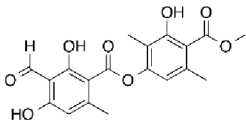
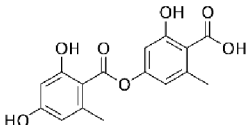
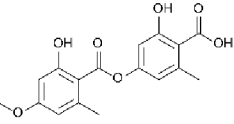
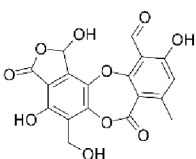
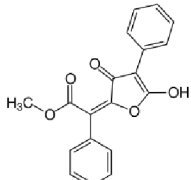
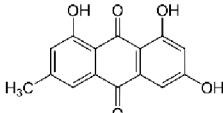
Rostliny a lišejníky jsou schopny syntetizovat mnoho látek, které využívají ve svůj prospěch. Sloučeniny, které potřebují rostliny či lišejníky pro svůj růst a vývoj se nazývají primární metabolity. Naopak sekundární metabolity jsou sloučeniny, které jsou specifické pro daný druh či rod a pomáhají rostlinám přizpůsobit se a interagovat s biotickým a abiotickým prostředím. Nejčastěji jsou takovými látkami fenoly, terpeny a sloučeniny obsahující dusík (Erb & Kliebenstein, 2020).

U lišejníků jsou metabolity produkovány nejčastěji houbovou složkou, ale mohou být produkovány také prostřednictvím fotobionta (řasy či sinice). Některé metabolity jsou vytvářeny výhradně synergickým působením obou partnerů. Největší množství sekundárních metabolitů je nahromaděno ve stélce lišejníku. Sloučeniny tak slouží zejména jako ochrana před býložravci, pro které mohou být některé druhy toxické (Müller, 2001).

V současnosti je známo více než 800 sekundárních metabolitů, z nichž většina je přítomna výhradně v lišejnících a u přibližně 700 látek je také identifikována struktura. Z toho asi 200 látek jsou depsidy, což jsou sloučeniny sestávající z 2 až 4 zbytků kyseliny hydroxybenzoové, které jsou spojeny esterovými vazbami. Dalších přibližně 100 látek jsou převážně depsidony, které jsou charakteristické právě pro lišejníky a mají navíc mezi aromatickými kruhy ještě etherovou vazbu (Podterob, 2008; Ranković & Kosanić, 2019).

Přehled některých nejčastějších sekundárních metabolitů lišejníků, včetně jejich účinků je uveden v *Tab. 1*.

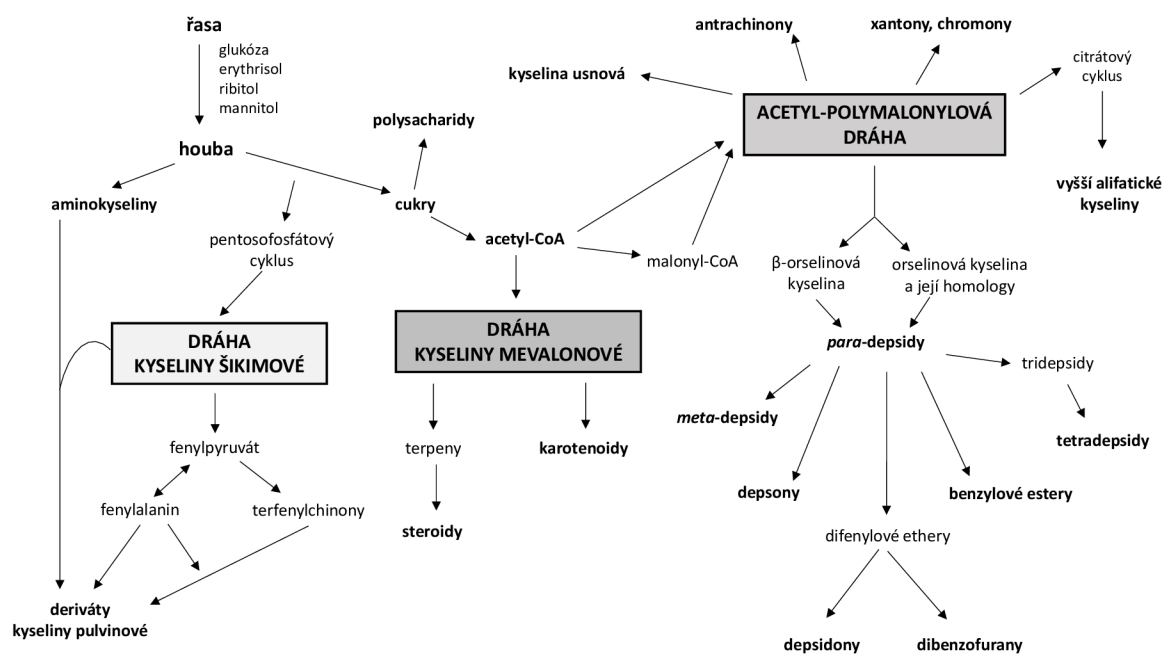
Tab. 1: Výběr nejčastějších sekundárních metabolitů v lišejnicích a jejich účinky.

Sekundární metabolit	Vzorec	Účinek
Kyselina usnová		antimikrobiální, antivirová, antiprotozoální, antiproliferativní, protizánětlivá a analgetická aktivita (Ingólfssdóttir, 2002)
Atranorin		analgetická, antibakteriální, antimykotická, protizánětlivá, antioxidační, cytotoxická, antivirová a imunomodulační aktivita (Studzinska-Sroka et al., 2017)
Kyselina lekanorová		antioxidační aktivita (Luo et al., 2009)
Kyselina evernová		protirakovinné, antifungální, antimikrobiální, neuroprotektivní a protizánětlivé účinky (Lee et al., 2021)
Kyselina salazinová		antimikrobiální aktivita (Candan et al., 2007), modulátor drah Nrf2, NF-κB a STAT3 u kolorektálního karcinomu (Papierska et al., 2021)
Kyselina vulpinová		antiproliferativní, antiangiogenní, antimikrobiální a ochranné účinky proti UV paprskům v rakovinných buňkách (Sahin et al., 2019)
Emodin		protirakovinná, hepatoprotektivní, protizánětlivá, antioxidační, antimikrobiální (Dong et al., 2016) a antivirová aktivita vůči SARS (Ho et al., 2007)

### 2.1.3.1 Biosyntéza sekundárních metabolitů

Biosyntéza sekundárních metabolitů lišejníků není dostatečně prozkoumána, je však odvozena z biosyntézy fylogeneticky příbuzných druhů hub. Byly navrženy tři základní dráhy, které jsou stručně znázorněny na Obr.2.

Největší množství lišejníkových sekundárních metabolitů je odvozeno z acetyl-polymalonylové dráhy, ze které vznikají *para*-depsidy, které hrají klíčovou roli, jakožto potencionální prekurzory řady dalších chemických látek. Významnými jsou zejména depsidy a depsidony, které jsou nejhojněji zastoupenými skupinami sekundárních metabolitů v lišejnících. Z dráhy kyseliny mevalonové vznikají zejména karotenoidy a steroidy. Deriváty kyseliny pulvinové jsou pak odvozeny z dráhy kyseliny šikimové (Nash, 2008).



Obr. 2: Pravděpodobné dráhy biosyntézy hlavních lišejníkových metabolitů. (Převzato a upraveno od Elix&Stocker-Wörgötter z publikace od Nash, 2008)



#### 2.1.4 *Cladonia coniocraea* (Flörke) Spreng.

*Cladonia coniocraea* česky nazývána dutohlávka kuželovitá, popřípadě také jehlicovitá je lišejník z čeledi Cladoniaceae, rodu *Cladonia*, který byl poprvé popsán v roce 1821 Heinrichem Gustavem Flörkem pod názvem *Cenomyce coniocraea*. Následně byl v roce 1827 Kurtem Polycarphem Joachimem Sprengelem klasifikován pod rod *Cladonia* (Sprengel, 1827). Čeleď Cladoniaceae řadíme mezi vřeckovýtrusné houby (Ascomycota), řád Lecanorales. Jde o jednu z největších čeledí lichenizovaných hub, kam spadá celkem 15 různých rodů čítajících celkem až 500 různých druhů lišejníků, které rostou nejčastěji na vlhkých a slunných stanovištích (Hammer, 2001; Stenroos et al., 2019).

Jednotlivé druhy čeledi Cladoniaceae jsou morfologicky variabilní, jako důsledek enviromentálních faktorů zahrnujících světlo, teplotu a vlhkost. Stélka je často dvoutvará, kdy horní část (podecium) je jednoduchá či keříčkovitá s plodnicemi a spodní část je šupinovitá a přisedlá k podkladu (Pino-Bodas et al., 2011; Rosypal, 1992).



Obr. 3: Lišejník *Cladonia coniocraea* (Flörke) Spreng.

*C. coniocraea* je jeden z nejhojněji se vyskytujících druhů lišejníků v Evropě (rozšíření ve světě a v Evropě je znázorněno na Obr. 4 a 5). V České republice jde o druhý nejhojnější druh z rodu *Cladonia*, který tak není zařazen mezi ohrožené druhy lišejníků.



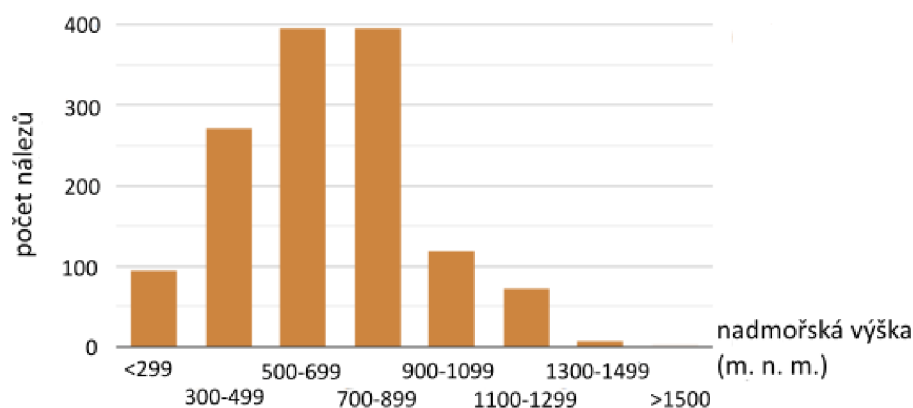
Obr. 4: Rozšíření lišejníku *Cladonia coniocraea* ve světě. (Převzato a upraveno z CNALH <https://lichenportal.org/cnalh/taxa/index.php?taxon=53390&clid=1048>)



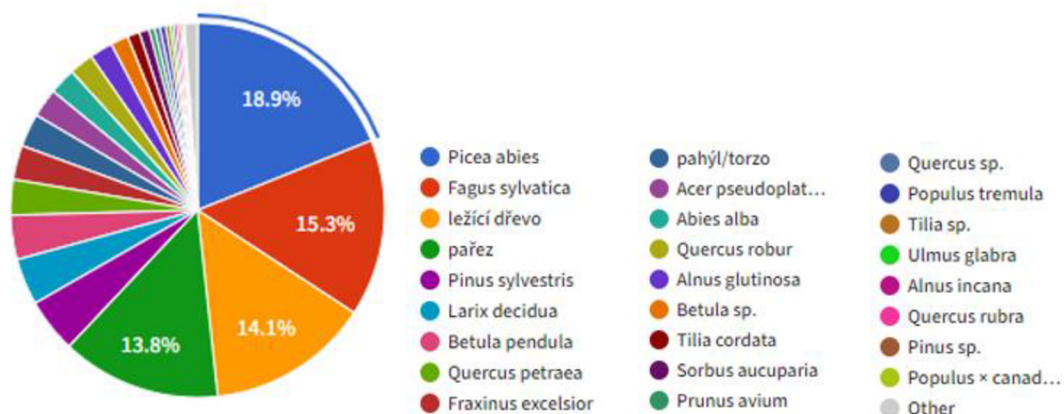
Obr. 5: Rozšíření lišejníku *Cladonia coniocraea* v Evropě. (Převzato a upraveno z CNALH <https://lichenportal.org/cnalh/taxa/index.php?taxon=53390&clid=1048>)

Lišejník *C. coniocraea* se vyskytuje v České republice od nížin až po horské oblasti, nejčastěji v nadmořské výšce od 500 do 900 m. n. m. Počet nálezů tohoto lišejníku v závislosti na nadmořské výšce je uveden v Obr. 6. Nejčastější substráty lišejníku *C. coniocraea* (Obr. 7) jsou zejména stromy jako smrk ztepilý či buk lesní a následuje ležící dřevo a pařezy (Malíček et al., 2022).

### Preference nadmořské výšky



Obr. 6: Preference nadmořské výšky lišejníku *Cladonia coniocraea* v ČR. (Převzato a upraveno z Botanický ústav AV ČR. <https://dalib.cz/taxon/info/Cladonia%20coniocraea>)



Obr.7: Grafické znázornění nejčastějších substrátů pro růst lišejníku *Cladonia coniocraea* v ČR (Převzato a upraveno z Botanický ústav AV ČR. (<https://dalib.cz/taxon/info/Cladonia%20coniocraea>))

*C. coniocraea* je nitrofilní druh, který se vyskytuje v lokalitách s vyšším obsahem dusičnanů, navíc některé studie dokazují, že tento druh lišejníku se vyskytuje ve větší míře na místech s vyšší koncentrací  $\text{NH}_4^+$  ve vzduchu (Mitchell et al., 2005; Segal, 2013). Je tolerantní vůči kyseljším půdám, přičemž preferuje pH půdy a kůry stromů v rozmezí hodnot 3,3 – 5,6 a byla také prokázána snášenlivost vůči většímu množství  $\text{SO}_2$ . Popsaná odolnost souvisí s obsahem kyseliny fumarprotocetrarové, která je hlavním sekundárním metabolitem lišejníku *C. coniocraea* (Hauck & Jürgens, 2008; Hauck et al., 2009). Mezi další sekundární metabolity patří kyselina protocetrarová a quaesicitová (Sicilia et al., 2009).

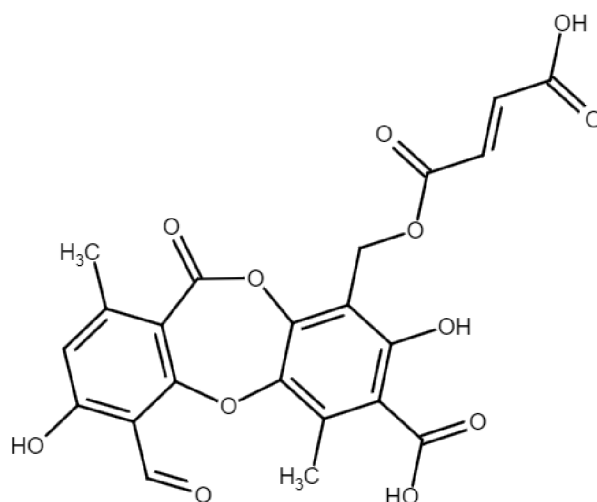
*C. coniocraea* je ze 100 % kolonizována endofytickými houbami. Jedná se o druhy *Chaetomium globosum* Kunze (13,3 %), *Scopulariopsis* sp. (53,3 %) a *Trichoderma* sp. (33,3 %) (Li et al., 2007). Fotobiontem rodu *Cladonia* je rod jednobuněčné zelené řasy *Trebouxia* (Beiggi & Piercey-Normore, 2007).

Lišejník *C. coniocraea* vykazoval antifungální, larvicidní a antiproliferační aktivitu (Kocakaya et al., 2018; Kocakaya et al., 2021; Nanayakkara et al., 2005).

#### 2.1.4.1 Sekundární metabolity lišejníku *Cladonia coniocraea*

##### 2.1.4.1.1 Kyselina fumarprotocetrarová

Kyselina fumarprotocetrarová (4-[[*E*]-3-carboxyprop-2-enoyl]oxymethyl]-10-formyl-3,9-dihydroxy-1,7-dimethyl-6-oxobenzo[*b*][1,4]benzodioxepine-2-carboxylic acid) je depsidon s molekulovou hmotností 472,4. Strukturální vzorec je uveden na *Obr. 8*.



*Obr. 8: Struktura kyseliny fumarprotocetrarové.*

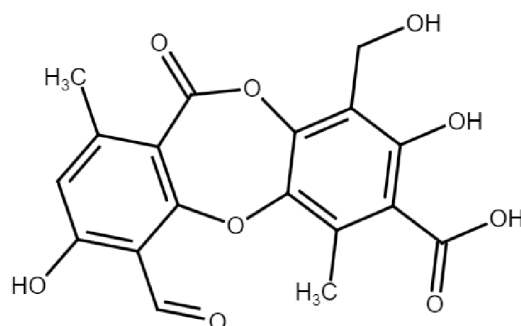
Lišejníky, které obsahují kyselinu fumarprotocetrarovou jsou nejčastěji z rodu *Bryoria* a *Cladonia*, ale můžeme ji najít například v lišejníku *Cetraria islandica* (Hauck et al., 2009; Nash, 2008). K tomu, aby se zjistilo, zda lišejník tuto kyselinu produkuje se využívá parafenyldiaminu, který zbarvuje vzorek oranžově až červeně (Malíček, 2012).

Některé studie dokazují, že kyselina fumarprotocetrarová vykazuje poměrně silnou antimikrobiální aktivitu vůči bakteriím, ale také kvasinkám (Ranković & Mišić, 2008). Depsidony mají oproti depsidům navíc etherovou vazbu, což se ukázalo jako klíčové pro schopnost depsidonů inhibovat HIV-1 integrázu (Müller, 2001). Dále se o kyselině

fumarprotocetrarové píše jako o vhodném lékovém kandidátovi v terapii neurodegenerativních poruch, neboť je pravděpodobně schopna zapojovat cytoprotektivní dráhy Nrf2 a také vykazuje významnou cytoprotekci proti apoptóze zprostředkované  $H_2O_2$  (Fernández-Moriano et al., 2017).

#### 2.1.4.1.2 Kyselina protocetrarová

Kyselina protocetrarová (10-formyl-3,9-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)-1,7-dimethyl-6-oxobenzo[b][1,4]benzodioxepine-2-carboxylic acid) je depsidon s molekulovou hmotností 374,3. Strukturální vzorek je uveden na *Obr. 9*.



*Obr. 9: Struktura kyseliny protocetrarové.*

Kyselina protocetrarová je prekurzorem pro vznik kyseliny fumarprotocetrarové a hypoprotocetrarové (Fontaniella et al., 2000). Jedná se o sekundární metabolit některých lišejníků jako například rod *Parmelia* či *Cladonia*, který vykazuje antimikrobiální a protirakovinnou aktivitu (Manojlović et al., 2012). Konkrétně kyselina protocetrarová vykazovala cytotoxickou aktivitu vůči melanomovým buněčným liniím UACC-62, díky čemuž je vhodným kandidátem pro další studie (Brandão et al., 2013).

## 2.2 Přírodní antimikrobiální molekuly

Antimikrobiální látka je látka, která působí na mikroorganismus baktericidně (zabíjí mikroorganismus) nebo bakteriostaticky (zpomaluje nebo zastavuje růst mikroorganismu). Podle toho, na jaký organismus substance působí rozdělujeme antimikrobiální látky na antibiotika (bakterie), antimykotika (houby, plísňe), antivirotika (viry) a antiparazitika (parazitě). Antimikrobiální látky mohou být syntetické nebo přírodní (diplomová práce se zabývá pouze přírodními antimikrobiálními látkami).

V medicíně se používají přírodní antimikrobiální látky produkované výhradně bakteriemi a houbami, jde zejména o rody *Streptomyces* a *Penicillium*. Antimikrobiální aktivitu vykazují také některé druhy rostlin, čehož se využívá v lidovém léčitelství, avšak látek, které jsou schváleny a registrovány jako léčiva je velice málo a rostlinné druhy mezi nimi téměř nenajdeme (Samuelsson & Bohlin, 2017). Většina rostlinných substancí je obvykle používána pouze jako součást doplňků stravy, kvůli nedostatečnému množství vědecky podložených informací o příznivých účincích, a také kvůli nedostatku klinických studií. Přehled látek registrovaných jako léčiva je zobrazen v *Tab. 2*.

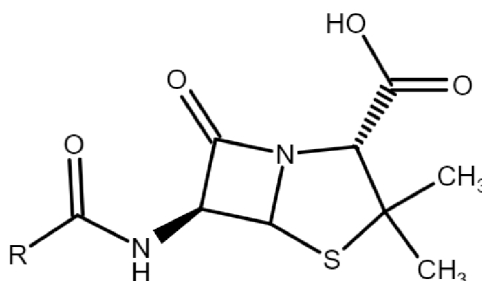
Tab. 2: Přehled přírodních antimikrobiálních látek registrovaných jako léčiva, včetně jejich původu a využití. Tučně jsou znázorněny látky houbového původu (Převzato a upraveno od Gramesová, 2020; Samuelsson & Bohlin, 2017).

<b>Antimikrobiální látka</b>	<b>Původní organismus</b>	<b>Využití</b>
amikacin a kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	antibiotikum
amphotericin B	<i>Streptomyces nodosus</i>	antimykotikum
artemisinin	<i>Artemisia annua</i>	antimalarikum
<b>cefalosporin</b>	<i>Acremonium chrysogenum</i>	antibiotikum
cefamycin	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	antibiotikum
erythromycin A (deriváty clarithromycin a azithromycin)	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	antibiotikum
gentamicin	<i>Micromonospora purpurea</i>	antibiotikum
gramicidin S	<i>Bacillus brevis</i>	antibiotikum
<b>griseofulvin</b>	<i>Penicillium griseofulvum</i>	antimykotikum
chinin	<i>Cinchona officinalis</i>	antimalarikum
ivermektin (ze skupiny avermektinů)	<i>Streptomyces avermitillis</i>	antimalarikum
neomycin	<i>Streptomyces fradiae</i>	antibiotikum
nystatin	<i>Streptomyces noursei</i>	antimykotikum
<b>penicilin</b>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	antibiotikum
rifamycin	<i>Amycolatopsis rifamycinica</i>	antibiotikum
spiramycin	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	antibiotikum antiparazitikum
streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	antibiotikum
tetracyklin	<i>Streptomyces sp.</i>	antibiotikum
vancomycin	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	antibiotikum

### 2.2.1 Přírodní antimikrobiální látky produkované houbami a využívané ve zdravotnictví

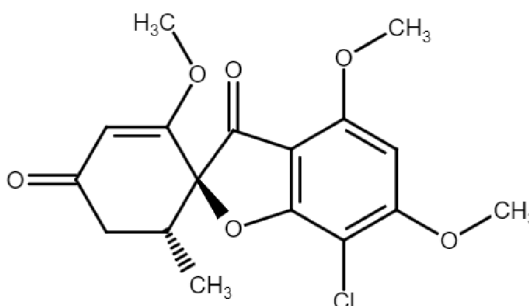
Ve zdravotnictví se používají přírodní antimikrobiální látky, které pocházejí zejména z bakterií a hub, ve velice ojedinělých případech jsou produkovány rostlinami. Antimikrobiální látky, které jsou registrovány jako léčiva a jsou produkovány organismy z říše hub jsou uvedeny v následujících odstavcích.

Prvním objeveným antibiotikem byl v roce 1928 penicilin, který byl Alexandrem Flemingem izolován z plísně *Penicillium notatum*. Penicilin se však vyskytuje i v dalších druzích hub rodu *Penicillium* (např. *Penicillium chrysogenum*) (Nathwani & Wood, 1993). Peniciliny se využívají pro léčbu bakteriálních infekcí způsobených zejména streptokoky a stafylokoky (Votava, 2001).



Obr. 10: Obecná struktura penicilinů, kde *R* je variabilní skupinou.

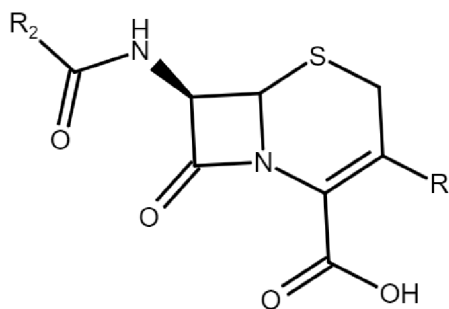
Griseofulvin je antimykotikum izolované roku 1939 z houby *Penicillium griseofulvum*. Ve zdravotnictví je využíván k léčbě dermatofytóz, zejména k léčbě plísni nehtů a pokožky hlavy. Užívá se perorálně v případech, když je lokální léčba neúčinná (Develoux, 2001).



Obr. 11: Strukturální vzorec griseofulvinu.



Poslední registrovanou antimikrobiální látkou produkovanou houbou je cefalosporin. Cefalosporin je beta-laktamové antibiotikum produkováno plísní *Acremonium chrysogenum*, které bylo objeveno roku 1945. Léčba těmito antibiotiky bývá nasazena proti bakteriálním infekcím způsobeným stafylokoky a streptokoky, a to především u lidí alergických na penicilin. Vůči enterokokům jsou tato antibiotika neúčinná (Thompson & Wright, 1983; Torok et al., 2009).

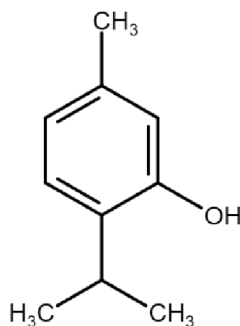


Obr. 12: Základní struktura cefalosporinů, kde R1 a R2 jsou variabilní skupiny.

#### 2.2.1.1 Další vybrané látky s prokázanou antimikrobiální aktivitou

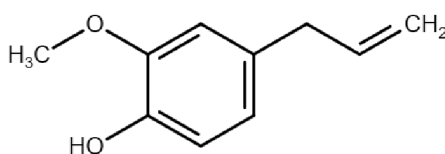
Antimikrobiální aktivitu vykazují také některé rostliny. Níže jsou popsány vybrané antimikrobiální látky pocházející z rostlin, avšak nejedná se vždy o látky registrované jako léčiva.

Thymol, což je fenolický monoterpen vyskytující se zejména v tymiánu, vykazuje silné antibakteriální, antimykotické a antivirotické působení. Používá se ve stomatologii jako dezinfekční prostředek. Mimo jiné je součástí léku pro včelstva proti roztoči *Varroa destructor* (Giacomelli et al., 2016; Kowalczyk et al., 2020).



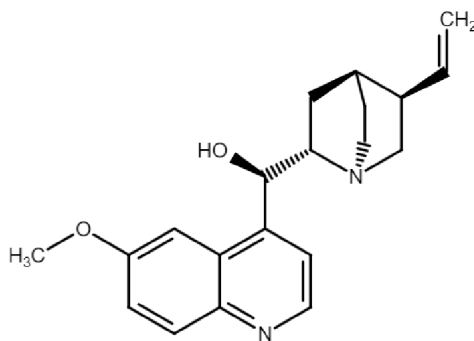
Obr. 13: Strukturní vzorec thymolu.

V zubním lékařství je využíván eugenol. Tato fenolová sloučenina je obsažena v hřebíčku, ale také v muškátovém oříšku, bazalce, skořici a bobkovém listu. Vykazuje antimikrobiální, protizánětlivé i analgetické účinky a působí jako lokální anestetikum. Ve stomatologii se používá v kombinaci s oxidem zinečnatým jako zubní výplň. Dále se jím léčí zubní kaz, paradontóza a krvácející dásně. Kromě toho je eugenol součástí řady zubních past a ústních vod (Mosquera et al., 2019).



Obr. 14: Strukturální vzorec eugenolu.

Chinin je alkaloid z kůry chinovníku, ale může být obsažen také v kůře vrb. Tato látka se využívá již téměř 300 let pro léčbu malárie, což je infekční onemocnění způsobeno parazitickými prvky z rodu *Plasmodium* a je přenášena na člověka komáry rodu *Anopheles*. Chinin je účinné antimalarikum, ze kterého byla odvozena řada syntetických derivátů, které jsou ve světě užívány (Jones et al., 2015).



Obr. 15: Strukturální vzorec chininu.

## 2.2.2 Antimikrobiální rezistence

Světové ekonomické fórum vyhlásilo antimikrobiální rezistenci jako globální problém, který ztěžuje léčbu běžných onemocnění. Riziková je zejména mnohočetná léková rezistence (MDR), kdy dochází k necitlivosti alespoň na jednu látku ve třech a více antimikrobiálních třídách. Největší hrozbu představují patogeny označeny jako ESKAPEE, kam patří druhy *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* a *Escherichia coli*. Jedná se o kriticky rezistentní kmeny, a proto se velice často testují potencionální antimikrobiální látky právě na některých z těchto druhů (Tiwari et al., 2021; Yu et al., 2020).

Problematika antimikrobiální rezistence je mnohem závažnější u gramnegativních bakterií, které mají vnitřní i vnější membránu na rozdíl od bakterií grampozitivních, které mají pouze vnitřní membránu. Právě proto antibiotikum mnohem obtížněji prochází do buňky bakterie, neboť je lék vnější membránou vypuzován. Je tak potřeba větších dávek, ovšem pak dochází k problémům s toxicitou (Theuretzbacher et al., 2020).

Dříve se antimikrobiální rezistence týkala zejména lidí, kteří byli oslabeni jiným onemocněním, postihla je následná infekce a byli vůči lékům rezistentní. V posledních několika letech, kdy došlo k propuknutí pandemie COVID-19 nastávají nové problémy. Jde zejména o nadužívání antibiotik v domnění, že se jedná o bakteriální infekci, nikoliv o virovou. Dále COVID-19 způsobuje plicní onemocnění, které je následně léčeno antibiotiky, a to často v opakujících se intervalech. To vede k rezistenci na léčbu a propuknutí infekce, která může mít až fatální následky. Proto je potřeba stále hledat nové antimikrobiální látky (Knight et al., 2021).

## 2.3 Použité metody

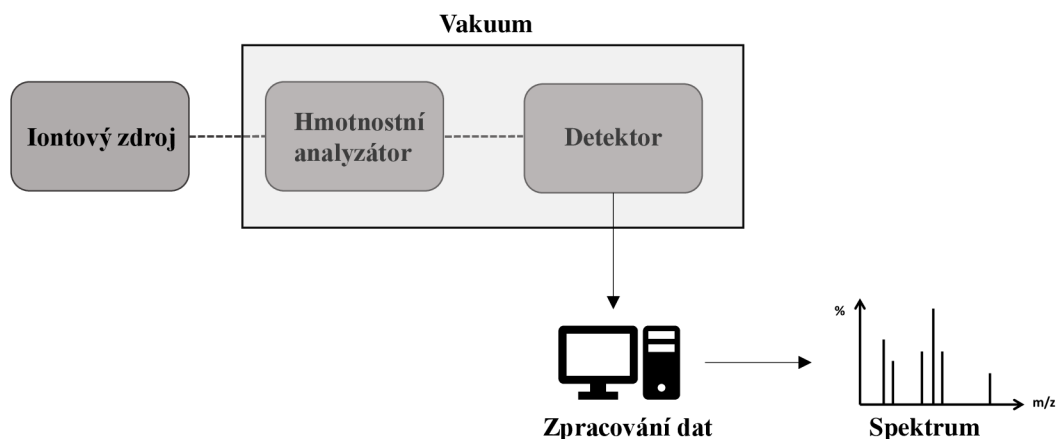
### 2.3.1 SPE frakcionace

Extrakce na tuhé fázi (SPE) je separační metoda, která je určena pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Dochází k selektivnímu zadržování skupin látek na tuhé fázi, jež je umístěna v krátké kolonce ve formě membrány či sloupce. Analyt je pak extrahován mezi pevnou fází (SPE patrona) a kapalnou fází (vzorek). Klíčový je výběr sorbentu, který je vysoce závislý na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu. Mezi nejčastěji používané sorbenty patří chemicky vázaný oxid křemičitý (C18, C8), polymerní materiály, iontoměničové materiály (např. aniontoměnič), monolitní sorbenty či materiály s omezeným přístupem (Nováková, 2013). Separaci na SPE lze využít i pro částečnou frakcionaci v kombinaci s korelační metabolomikou (LC-MS) pro určení aktivní složky v extraktu (Heger et al., 2022; Rárová et al., 2019).

### 2.3.2 Ultravysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS)

UHPLC-MS je analytickou metodou, která je hojně využívána zejména v metabolomice, ale lze ji aplikovat v mnoha dalších oborech. Charakteristická je pro tuto moderní metodu vysoká specifita, citlivost a rychlost analýzy. Principiálně jde o zadržení analytu na základě různé afinity k pevné stacionární fázi, která je umístěna v chromatografické koloně. Následně dochází k eluci kapalnou mobilní fází v různých retenčních časech prostřednictvím vysokého tlaku (Guillarme & Luc Veuthey, 2012).

Hmotnostní spektrometr převádí molekuly analytu do ionizovaného (nabitého) stavu a následně analyzuje ionty (či jejich fragmenty) na základě jejich poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). Existuje několik typů iontových zdrojů a hmotnostních analyzátorů. Nejčastěji využívaná je ionizace elektrosprejem (ESI), kdy je na kovové kapiláře napětí 1 – 5 kV a kapalný vzorek je rozprašován na špičce kapiláry, čímž se vytváří jemný sprej nabitých kapiček. Kapky se rychle odpaří vlivem tepla a zbytkový elektrický náboj se přenesou na analyty, které pak přes vakuum dopadají na detektor. Měření může probíhat v pozitivním (detekujeme kladné ionty) nebo negativním (detekujeme záporné ionty) módu. Dalším typem může být například ionizace laserovou desorpcí za účasti chemické matrice (MALDI), ionizace za vysokého atmosférického tlaku (APCI) či fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) (Pitt, 2009).



Obr. 16: Schéma hmotnostního spektrometru (Inspirováno Hoffmann & Stroobant, 2007).

Hmotnostní analyzátoři využívají různých fyzikálních vlastností, na základě kterých jsou schopny rozdělit ionty v plynné fázi podle poměru hmotnosti a náboje. Mezi nejčastěji používané analyzátoři řadíme kvadrupólový analyzátor (Q), jež je složen ze čtyř rovnoběžných kovových tyčí, kdy jsou ionty odděleny na základě stability trajektorií v oscilujících elektrických polích, která jsou přiváděna na tyče. Dalším typem analyzátoru je iontová past (IT), kdy se ionty zachycují v trojrozměrném prostoru pomocí statického a vysokofrekvenčního napětí a následně se vypouštějí podle jejich  $m/z$ . Využívají se tři hyperbolické elektrody. Posledním nejčastějším typem analyzátoru je analyzátor doby letu (TOF), kdy jsou ionty urychlovány vysokým napětím. Rychlost iontů, která je rovna času potřebnému na průlet trubicí závisí na  $m/z$ , kdy čím menší  $m/z$ , tím dříve, a tedy i rychleji dopadají ionty na detektor.

V současnosti jsou také hojně využívány hybridní hmotnostní analyzátoři, a to nejčastěji spojení kvadrupólového analyzátoru a analyzátoru doby letu (QTOF). Namísto třetího kvadrupólu je umístěn TOF. Toto spojení je výhodně pro kombinaci s kapalinovou chromatografií a poskytuje také možnost další fragmentace a hmotnostní analýzy (Hoffmann & Stroobant, 2007; Pitt, 2009).

### 2.3.3 Diluční testy

Diluční metody se využívají při stanovování citlivosti, popřípadě rezistence bakterií. Určuje se hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC), která ukazuje míru citlivosti bakterie ke konkrétnímu antibiotiku. Využívá se odstupňované koncentrace antibiotika, které je ředěno geometrickou řadou, a to v tekutých nebo tuhých půdách. Testy se realizují na referenčních kmenech bakterií a po inkubaci se pozoruje, při kterém nejmenším množství antibiotika došlo k zástavě viditelného růstu bakteriální populace.

Řadíme zde diluční mikrometodu, která je v současné době nejpoužívanější, a která se provádí v jamkách mikrotitrační destičky. Jako živná půda je využíván bujón. Druhou variantou je agarová diluční metoda, která probíhá na pevných půdách v Petriho misce a využívá se vzestupné koncentrace jednoho antibiotika (Koukalová, 2013).

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Biologický materiál

- *Cladonia coniocraea* (Flörke) Spreng. – sběr pod skalním útvarem Medůvka na území katastru obce Valašské Meziříčí - Podlesí (okres Vsetín), určení – Jan Vondrák
- *Staphylococcus aureus* - CCM 3953, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Enterococcus faecalis* - CCM 4224, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Streptococcus mutans* - CCM 7409, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Lactobacillus acidophilus* - CCM 4833, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Bacillus cereus* - CCM 2010, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Pseudomonas aeruginosa* - CCM 3955, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Escherichia coli* - CCM 3954, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Schaalia odontolytica* - CCM 4740, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Clostridium perfringens* - CCM 5744, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně

### 3.2 Použité chemikálie

- Methanol, Merck, Darmstadt, Německo
- Kyselina mravenčí, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- DMSO (Dimethyl sulfoxide), Merck, Darmstadt, Německo
- Methanol pro HPLC, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- $\geq 99,9\%$  acetonitril pro LC-MS, LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Německo
- $\geq 99,9\%$  kyselina mravenčí pro LC-MS, VWR Chemicals, UK
- Ethanol, Merck, Darmstadt, Německo
- $\text{NH}_4\text{OH}$  (hydroxid amonný), Sigma Aldrich, St. Louis, USA

### 3.3 Kultivační půdy

- Infuze mozkové a srdeční tkáně (Brain heart infusion broth) – BHI (kat. č. M210-100G), HiMedia, Indie
- Columbia agar s 7% ovčí krví (kat. č. PB5008A), Oxoid, UK
- Anaerobní krevní agar (WILKINS CHALGREN) (kat. č. PB0111), Oxoid, UK

### 3.4 Přístrojové vybavení

- Lyofilizátor FreeZone 2,5 L, LABCONCO, Kansas City, USA
- Analytická váha, OHAUS PIONEER, Parsippany, USA
- Kávový mlýnek KM1310S, Tarrington House, Kanada
- Oscilační kulový mlýnek MM400, Retsch® & Co. KG, Haan, Německo
- Ultrazvuková lázeň Ultrasonic cleaner, VWR International s.r.o., Radnor, USA
- Centrifuga 5424, Eppendorf, Hamburg, Německo
- Automatické pipety labopette®, Hirschmann-Laborgeräte, Německo
- Dusíková odparka TurboVap, Biotage, Uppsala, Švédsko
- Minitřepačka Vortex V-1 plus, bioSan, USA
- Multikanálová automatická pipeta Eppendorf Xplorer, Eppendorf, Německo
- Flowbox, Alpina, Německo
- $\text{CO}_2$  Inkubátor, Sanyo Gallenkamp, UK
- Biohazard Clean Air flow-box, Schoeller instruments, Německo
- DEN-1B McFarland denzitometr, bioSan, USA
- Laboratorní inkubátor (termostat) Ecocell, BMT, Německo
- MIC inokulátor (ježek) kalibrovaný na 1  $\mu\text{l}$  (na zakázku, Trios), Kennewick, USA

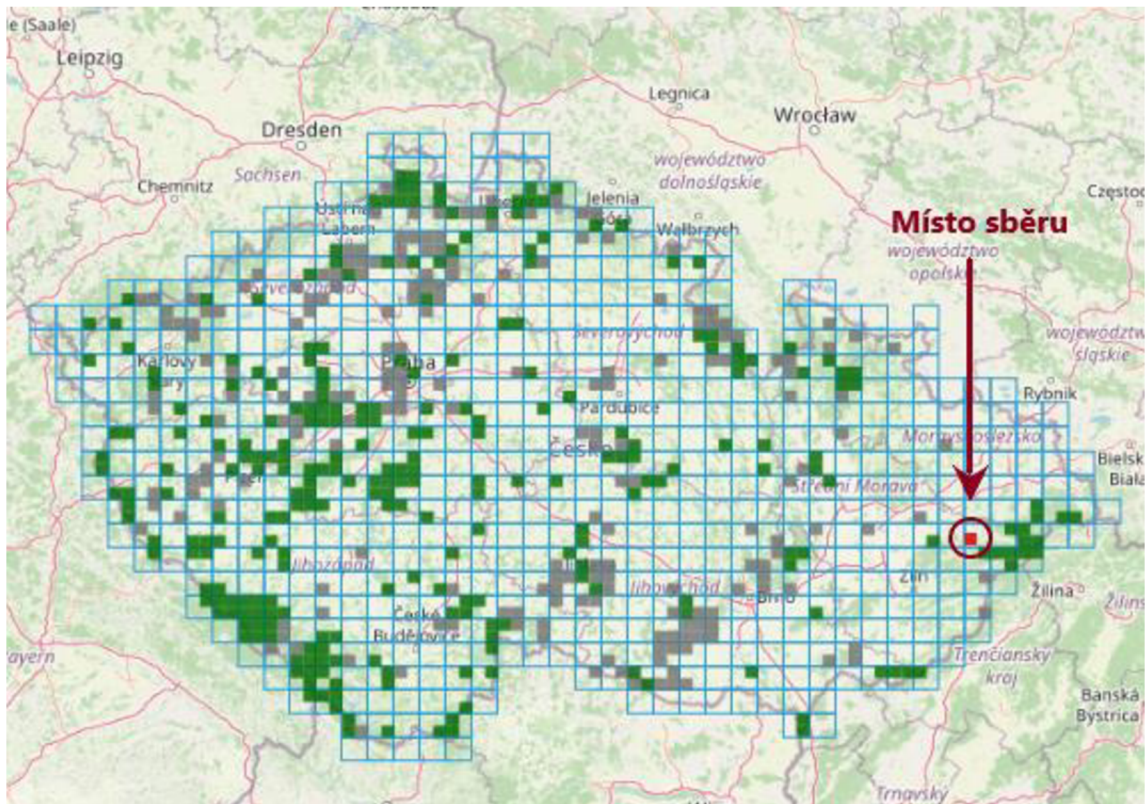


- LAS<sup>TM</sup> – Látalův anaerobní systém, Trios s.r.o., Kennewick, USA
- Spe-ed SPF Cartridges octadecyl C18/18%, 500 mg/6mL, Applies Separations Inc., Allentown, USA
- Oasis MAX 6cc (150 mg) extraction cartridges, Waters, Milford, Massachusetts, USA
- Membránové mikrofiltry z recyklované celulózy Micro Spin Filter s póry 35 o průměru 0,2 μm, Ciro Manufacturing Corp., Deerfield Beach, USA
- Hmotnostní spektrometr Synapt G2-Si s hybridním hmotnostním analyzátozem QqTOF s ESI ionizací, Waters, Milford, Massachusetts, USA
- PDA detektor Acquity Ultra Performance, Waters, Milford, Massachusetts, USA
- Kolona na RP Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm, 2,1 x 150 mm, Waters, Milford, Massachusetts, USA
- Sample manager FTN Acquity UPLC, Waters, Milford, Massachusetts, USA
- Pumpy (Quaternary Solvent manager Acquity UPLC Class H), Waters, Milford, Massachusetts, USA
- Program MassLynx, verze 4.0, Waters, Milford, Massachusetts, USA

## 3.5 Metody

### 3.5.1 Sběr biologického materiálu

V první polovině října byly sesbírány stélky lišejníku *Cladonia coniocraea* z lokality Hostýnsko – vsetínské hornatiny nacházející se v blízkosti Moravskoslezských Beskyd. Konkrétně byl lišejník sesbírán pod skalním útvarem Medůvka, který náleží do katastru obce Valašské Meziříčí – Podlesí, okres Vsetín. Přibližná nadmořská výška byla 535 m. n. m. Správnost určení druhu *C. coniocraea* byla zkontrolována s lichenologem Janem Vondrákem.



Obr. 17: Mapa ČR s označením místa sběru lišejníku *Cladonia coniocraea*. Zelenými (ověřený zdroj) a šedými (neověřený zdroj) čtverci je znázorněno rozšíření lišejníku *C. coniocraea* v rámci ČR na základě údajů z Botanického ústavu AV ČR. (Převzato a upraveno od Botanický ústav AV ČR. <https://dalib.cz/taxon/info/Cladonia%20coniocraea>)

### 3.5.2 Extrakce

Vzorek lišejníku *C. coniocraea* byl očištěn od případných nečistot (hlína, zbytky mechu aj.), zhomogenizován v kávovém mlýnku a vysušen mrazem v lyofilizátoru. Na analytických vahách bylo do čtyř mikrozkušavek naváženo 30 mg vzorku lyofilizovaného lišejníku.

Do mikrozkušavek se vzorky byl přidán 1 ml extrakčního činidla (99,9% methanol a 0,1% kyselina mravenčí). Vzorky byly homogenizovány na kulovém oscilačním mlýnku s kovovými kuličkami (5 minut, 27 Hz), sonifikovány na ultrazvukové lázni (10 minut) a centrifugovány při 20 160 g (5 minut). Supernatant byl přepipetován do nových mikrozkušavek a odpařen na dusíkové odparce. Odparek určený pro testování antimikrobiální aktivity byl rozpuštěn ve 150  $\mu$ l DMSO a zbylé tři odparky určené pro SPE frakcionaci byly rozpuštěny v 1 ml 0,1% kyseliny mravenčí. Vzorky byly uchovávány v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro následné testování.

### 3.5.3 SPE frakcionace

Kolona na reverzní fázi C18 byla promyta 10 ml methanolu, ekvilibrována 2 ml 0,1% kyseliny mravenčí a byly na ni nanесeny dva připravené vzorky. Kolona byla promyta 2 ml 0,1% kyselinou mravenčí v redestilované vodě a zbytek byl zachycen do zkumavky jako frakce RP0. Následovala eluce jednotlivých frakcí methanolem o vzrůstající koncentraci (Tab. 3).

*Tab. 3: Postup eluce jednotlivých frakcí při SPE frakcionaci na reverzní fázi. Frakce byly eluovány 3 ml methanolu (10 - 100 %) okyseleného kyselinou mravenčí o výsledné koncentraci 0,1 %.*

<b>Frakce</b>	<b>Koncentrace methanolu (%)</b>
RP1	10
RP2	20
RP3	30
RP5	50
RP6	60
RP7	70
RP10	100

Iontoměničová kolona (Oasis MAX) byla promyta 10 ml methanolu, ekvilibrována 6 ml redestilované vody a 6 ml 5% hydroxidu amonného v redestilované vodě. Vzorek byl nanесen do 2 ml 5% hydroxidu amonného v redestilované vodě. Kolona byla promyta 5 ml 5% hydroxidu amonného v redestilované vodě a zbytek byl zachycen do zkumavky jako frakce A0. Následovala eluce 4 ml methanolu, kdy zachycený eluát byl zaznačen jako frakce A1 a frakce A2 byla získána elucí 4 ml methanolu s 2% kyselinou mravenčí.

Jednotlivé frakce byly odpařeny na dusíkové odparce a všechny odparky byly rozpuštěny ve 400 µl 20% methanolu, zfiltróvány přes membránový filtr z recyklované celulózy o velikosti pórů 0,2 µm a přeneseny do vialek (Heger et al., 2022; Rárová et al., 2019).

### 3.5.4 UHPLC – QTOF - MS analýza

Byl proveden nástřik vzorků, kdy nástřikový objem byl 2  $\mu$ l a teplota 4 °C. Kolona, na které byla provedena separace vzorků na reverzní fázi, byla vyhřívána na 30 °C. Vzorky byly separovány binární gradientovou elucí, kde mobilní fázi A byl  $\geq 99,9\%$  acetonitril a mobilní fázi B byla 5 mM kyselina mravenčí v deionizované vodě. Gradient byl následující: 0 minut 5 % (A), 0,1 minuty 5 % (A), 1 minuta 10 % (A), 12 minut 35 % (A), 17 minut 70 % (A), 17,5 minuty 100 % (A), 19 minut 100 % (A), 19,5 minuty 5 % (A) a 22 minut 5 % (A) s průtokem mobilní fáze 0,25 ml/min.

Detekce probíhala pomocí hmotnostního spektrometru Synapt G2-Si s ionizací elektrosprejem. Analyzátor byl kvadrupól a TOF s tandemovým uspořádáním (hybridní analyzátor QqTOF). Vzorky byly měřeny v negativním i pozitivním módu a iontový zdroj byl nastaven podle parametrů uvedených v *Tab. 4*. Zmlžujícím plynem a plynem na vstupní štěrbině byl dusík. Kolizní energie pro fragmentaci byla nastavena na 20 eV. Sběr dat probíhal v režimu DDA (Data Dependent Acquisition) a data byla zaznamenávána ve formátu centroid. Následovalo manuální zpracování a vyhodnocení dat v programu MassLynx, ver.4.0 (Heger et al., 2022; Rárová et al., 2019).

*Tab. 4: Nastavení parametrů pro detekci na hmotnostním spektrometru.*

<b>Parametr</b>	<b>Hodnota</b>
Rozsah měřených hmotností	50 – 1500 Da
Napětí na kapiláře	2 kV
Napětí na kóně	15 kV
Teplota iontového zdroje	120 °C
Desolvatační teplota	500 °C
Průtok desolvatačního plynu	600 l/h
Průtok plynu na kóně	30 l/h
Nebuliser	6 Bar

### 3.5.5 Testování antimikrobiální aktivity mikrodiluční metodou

Mikroorganismy byly oživeny z kryozkumavek, které byly uloženy při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ve sbírce mikroorganismů Ústavu mikrobiologie LF UP a FNOL. Pomocí sterilní bakteriologické kličky byla bakteriální kultura z kryozkumavky vyočkována na příslušný agar a následně kultivována v termostatu při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 24 hodin (anaerobní bakterie po dobu 48 hodin). Tato bakteriální kultura poté byla připravena k testování.

Testovaná látka byla  $50\times$  naředěna, aby koncentrace DMSO ve vzorku byla menší než 5 % (DMSO je antimikrobiální). Do jamek mikrotitrační destičky řad B – H bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  BHI bujónu a do řady A 100  $\mu\text{l}$  testované látky. Následovalo ředění  $2\times$ , kdy se multikanálovou pipetou nasálo 50  $\mu\text{l}$  z řady A, které byly připipetovány do řady B (tímto postupem byla naředěna celá destička).

Inokulum bylo připraveno tak, že byly sterilní bakteriologickou kličkou nabrány 1-2 vykultivované kultury, jež byly ve fyziologickém roztoku rozsuspendovány. Pomocí denzitometru byl změřen zákal a byla upravena hustota na hodnotu 0,5 McFarland. Pomocí MIC inokulátoru (tzv. ježka) byla provedena inokulace. MIC inokulátor byl nejprve sterilizován v plameni, a poté ponořen do připraveného inokula. Následně jím byly inokulovány jamky mikrotitrační destičky. Inokulované destičky byly inkubovány při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu uvedenou v *Tab. 5*.

Po inkubaci byla odečtena hodnota minimální inhibiční koncentrace. Jestliže byla testovaná látka aktivní, tak byla vizuálně stanovena také hodnota MBC (minimální bakteriocidní koncentrace) a MBS (minimální bakteriostatická koncentrace) a to tak, že byly jamky vyočkovány pomocí inokulátoru na příslušný agar (viz. *Tab. 5*).

*Tab. 5: Přehled podmínek kultivace použitých mikroorganismů.*

Mikroorganismus	Kmen	Zařazení	Podmínky kultivace			
			Agar	Teplota	Čas	Prostředí
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 3953	Aerobní grampozitivní bakterie	Krevní	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$	24 h	
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224	Aerobní grampozitivní bakterie	Krevní	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$	24 h	
<i>Streptococcus mutans</i>	CCM 7409	Aerobní grampozitivní bakterie	Krevní	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$	24 h	5% $\text{CO}_2$
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCM 4833	Anaerobní grampozitivní bakterie	Anaerobní krevní	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$	48 h	
<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010	Aerobní grampozitivní bakterie	Krevní	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$	24 h	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955	Aerobní gramnegativní bakterie	Krevní	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$	24 h	
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954	Aerobní gramnegativní bakterie	Krevní	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$	24 h	
<i>Schaalia odontolytica</i>	CCM 4740	Anaerobní grampozitivní bakterie	Anaerobní krevní	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$	48 h	5% $\text{CO}_2$
<i>Clostridium perfringens</i>	CCM 5744	Anaerobní grampozitivní bakterie	Anaerobní krevní	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$	48 h	anaerobní

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Aktivita extraktu lišejníku *Cladonia coniocraea*

Mikrodiluční metodou byla předběžně stanovena antimikrobiální aktivita celkového extraktu lišejníku *C. coniocraea* vůči vybraným mikroorganismům (Tab. 6). Tato aktivita je vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace.

Tab. 6: Předběžné stanovení minimální inhibiční koncentrace celkového extraktu lišejníku *C. coniocraea* na vybraných druzích mikroorganismů.

Mikroorganismus	MIC <sup>A</sup> (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA <sup>B</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i>	NA
<i>Streptococcus mutans</i>	1,00
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,00
<i>Bacillus cereus</i>	2,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA
<i>Escherichia coli</i>	NA
<i>Schaalia odontolytica</i>	1,00
<i>Clostridium perfringens</i>	2,00

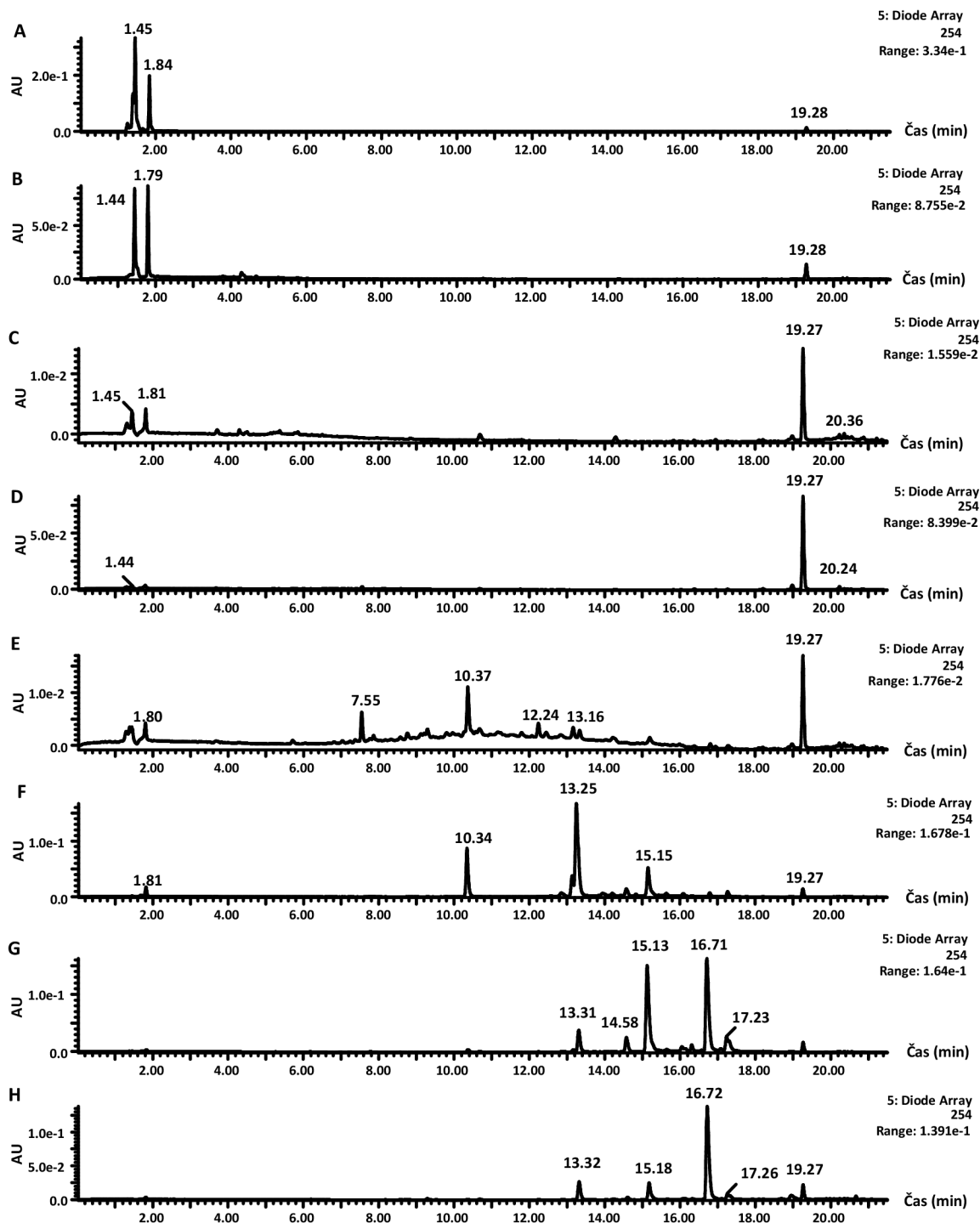
<sup>A</sup> minimální inhibiční koncentrace v mg DW<sub>lišejník</sub>/ml

<sup>B</sup> neaktivní vzorek

Celkový extrakt vykazoval antimikrobiální aktivitu vůči mikroorganismům *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus cereus*, *Schaalia odontolytica* a *Clostridium perfringens*. Minimální inhibiční koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 1 do 2 mg/ml.

## 4.2 SPE frakcionace

Frakcionací na SPE bylo izolováno celkem 8 frakcí. Složení frakcí a efektivita separace je znázorněna na *Obr. 18*.

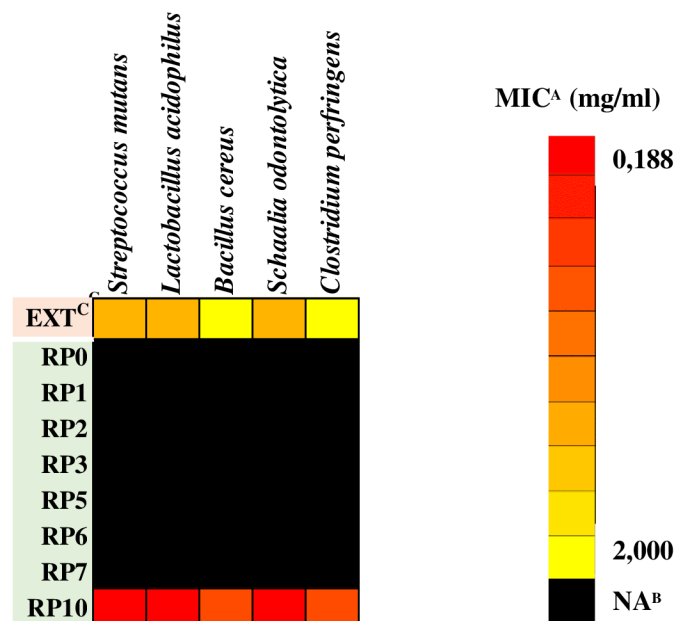


*Obr. 18:* LC-UV chromatogramy (254 nm) frakcí RP0 (A), RP1(B), RP2 (C), RP3 (D), RP5 (E), RP6 (F), RP7 (G) a RP10 (H) získaných SPE frakcionací na reverzní fázi. Frakce byly získány z lišejníku *C. coniocraea*, kdy méně polární metabolity byly eluovány v pozdějším retenčním čase a polárnější látky na počátku gradientu.



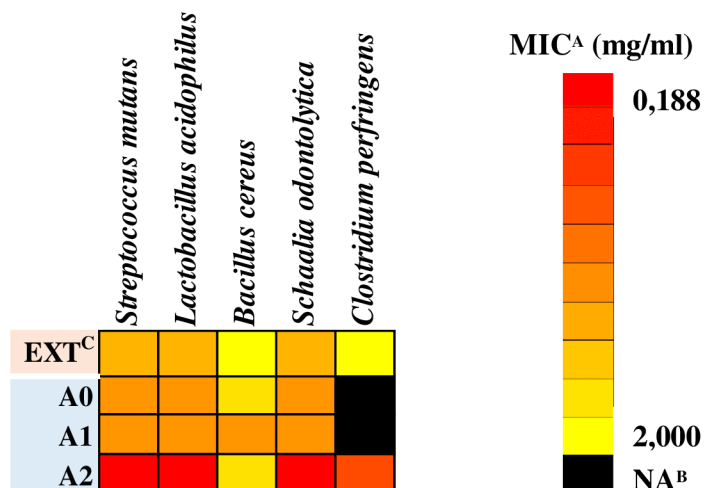
### 4.3 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita byla stanovena mikrodiluční metodou na mikroorganismech *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Schaalia odontolytica* a *Clostridium perfringens*. Touto metodou byla určena minimální inhibiční koncentrace (MIC). Na Obr. 19 jsou znázorněny výsledky testování, kdy jsou uvedeny pouze mikroorganismy vůči kterým, alespoň jeden vzorek vykazoval antimikrobiální aktivitu.



Obr. 19: Výsledky testování antimikrobiální aktivity mikrodiluční metodou znázorněné v podobě barevné škály. Testován byl celkový extrakt lišejníku *C. coniocraea* a frakce izolované pomocí RP SPE frakcionace. <sup>A</sup> minimální inhibiční koncentrace v mg DW<sub>lišejník</sub>/ml; <sup>B</sup> neaktivní vzorek; <sup>C</sup> celkový extrakt.

Antimikrobiální aktivitu vykazoval celkový extrakt lišejníku *C. coniocraea* a frakce RP10 izolovaná pomocí SPE (Obr. 19). Minimální inhibiční koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 0,188 do 2 mg/ml. Všechny vzorky byly účinné výhradně vůči gram pozitivním bakteriím, přičemž citlivější byly anaerobní bakterie.

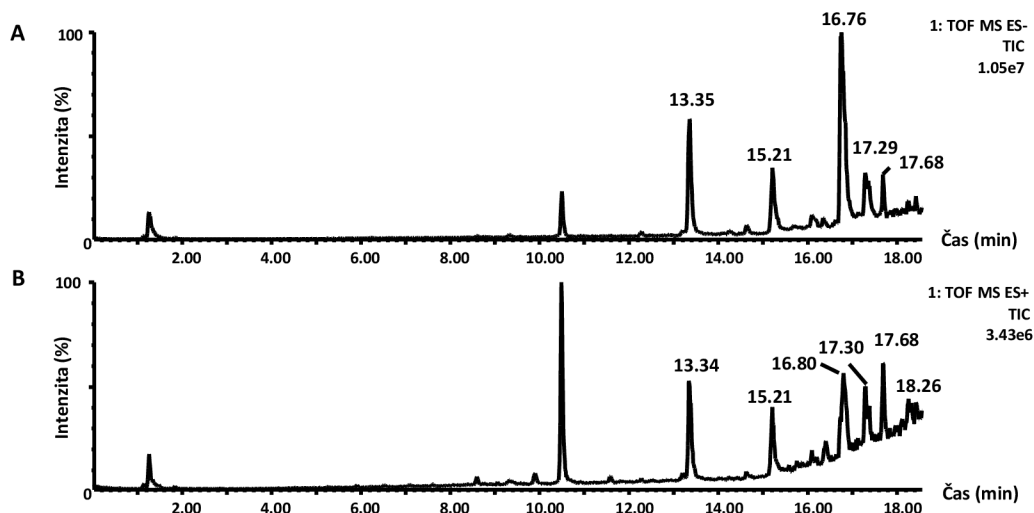


Obr. 20: Výsledky testování antimikrobiální aktivity mikrodiluční metodou znázorněné v podobě barevné škály. Testován byl celkový extrakt lišejníku *C. coniocraea* a izolované frakce získané SPE frakcionací na iontoměničové koloně Oasis MAX. <sup>A</sup> minimální inhibiční koncentrace v mg DW<sub>lišejník</sub>/ml; <sup>B</sup> neaktivní vzorek; <sup>C</sup> celkový extrakt.

Všechny frakce z SPE frakcionace na iontoměničové koloně Oasis MAX byly aktivní vůči alespoň čtyřem mikroorganismům. Celkově byla antimikrobiální aktivita stanovena pouze vůči grampozitivním bakteriím, zejména těm anaerobním (Obr. 20). Rozmezí hodnot minimální inhibiční koncentrace se pohybovalo od 0,188 do 2 mg/ml.

#### 4.4 UHPLC-QTOF-MS analýza aktivní frakce RP10

Frakce RP10, jakožto neaktivnější ze všech izolovaných frakcí, byla analyzována pomocí UHPLC-QTOF-MS v negativním a pozitivním módu.



Obr. 21: Chromatogramy frakce RP10 vzorku lišejníku *C. coniocraea* získaného RP SPE frakcionací a následná UHPLC-QTOF-MS analýza na reverzní fázi měřená v negativním (A) a pozitivním (B) módu.

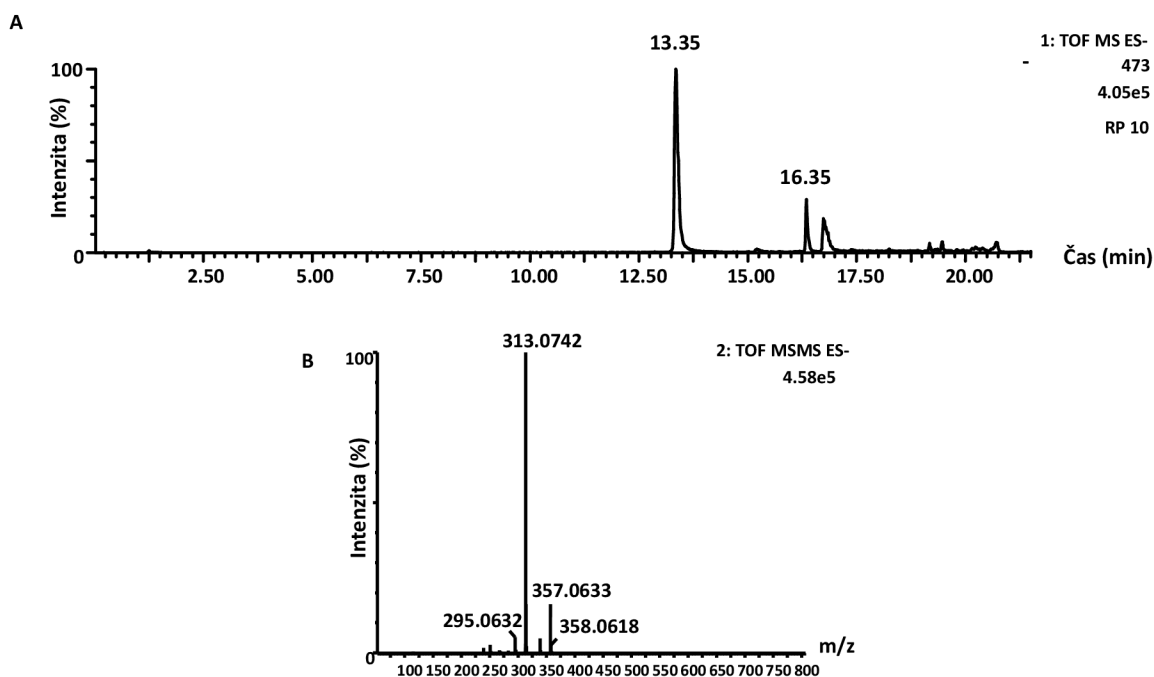
V pozitivním i negativním módu byly ve frakci RP10 detekovány nejintenzivnější píky (RT 13.35, 15.21, 16.76, 17.29 a 17.68 minut, ESI-) (Obr. 21). U těchto píků byla určena hodnota  $m/z$  a elementární složení (Tab. 7). U nejintenzivnějších detekovaných píků byla naměřena fragmentační spektra (Obr. 22 - 26) (prekurzor  $[M-H]^-$ ), ze kterých byla na základě porovnání elementárního složení a naměřených MS spekter s dostupnou literaturou předběžně identifikována struktura prekurzorových, (Tab. 7) případně produktových iontů.

Tab. 7: Vybrané molekulární ionty  $[M-H]^-$  s jejich fragmenty, předpokládaným elementárním složením, retenčním časem a předběžnou identifikací. Detekováno UHPLC-QTOF-MS v negativním módu ve frakci RP10 lišejníku *C. coniocraea* při kolizní energii fragmentace 20 eV.

Naměřená $m/z$	$\Delta$ ppm <sup>A</sup>	Předpokládaný sumární vzorec $[M-H]^-$	RT (min) <sup>B</sup>	Anotace	Fragmenty
473.0719	-0,2	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> O <sub>12</sub>	13.35	kyselina succinprotocetrarová	357; 313; 295
373.0572	3,2	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub>	15.21	kyselina protocetrarová	311; 267; 255; 229
471.0562	-0,4	C <sub>22</sub> H <sub>15</sub> O <sub>12</sub>	16.74	kyselina fumarprotocetrarová	355; 311; 283; 239
387.0728	3,1	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> O <sub>9</sub>	17.29	kyselina cryptostictická	343; 342
343.0463	2,6	C <sub>18</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub>	17.38	-	255; 229; 213

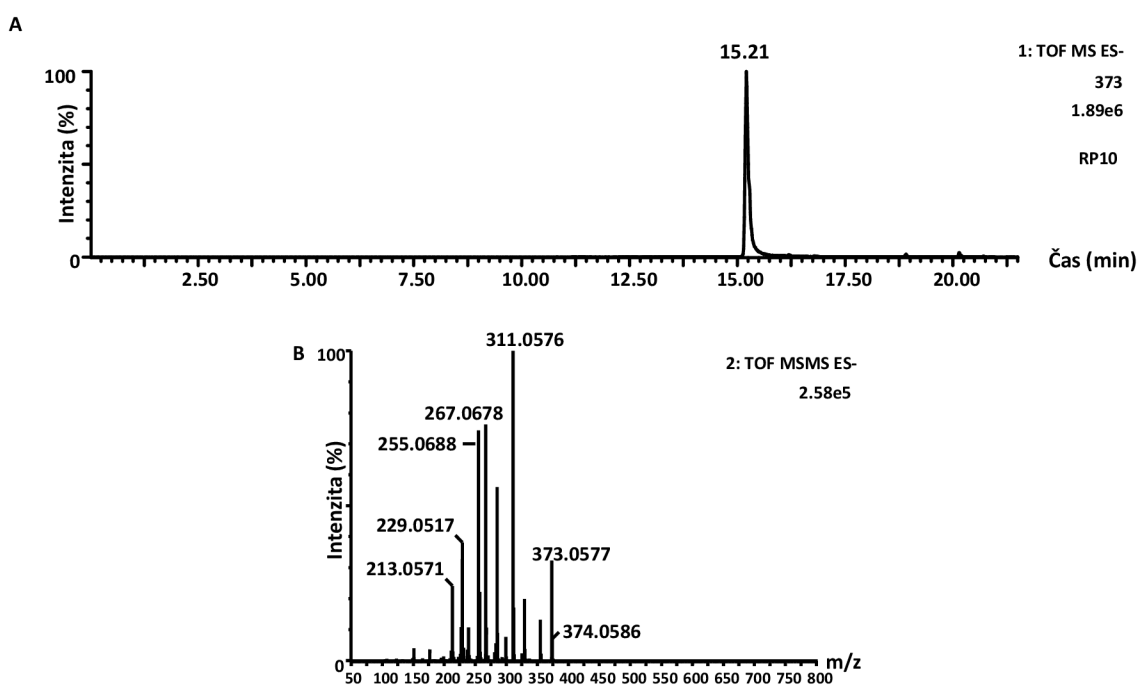
<sup>A</sup> odchylka naměřené hmoty  $m/z$  od teoretické hmoty  $m/z$

<sup>B</sup> retenční čas



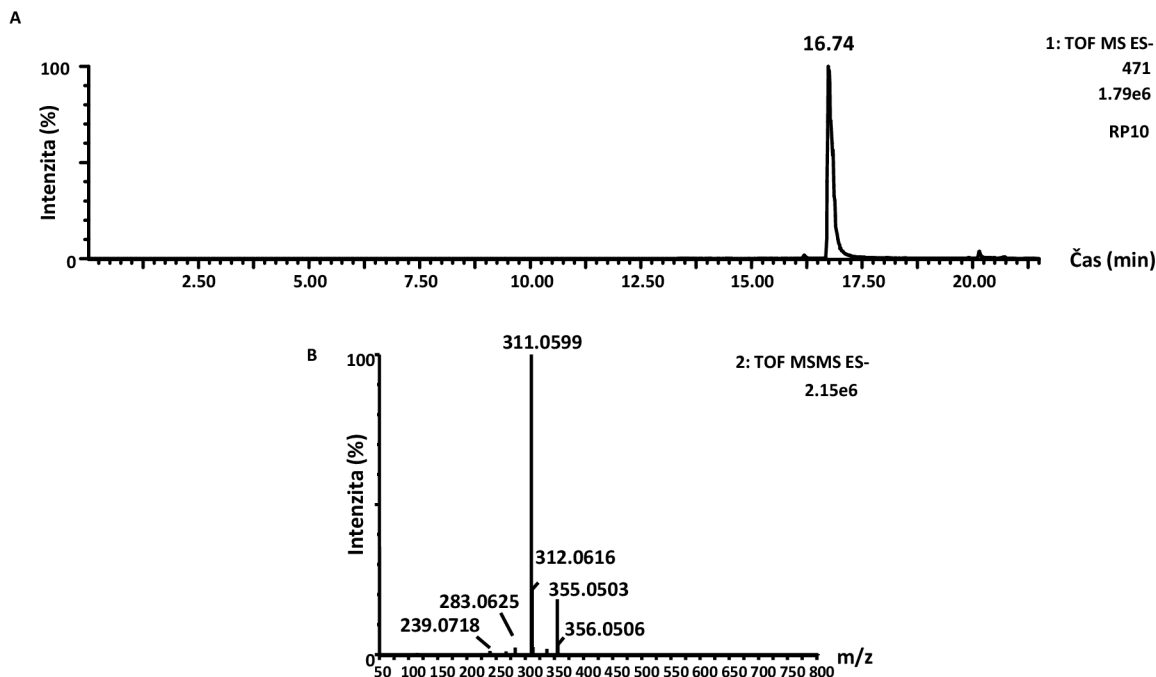
Obr. 22: Chromatogram (A) vybraného molekulárního iontu  $m/z$  473 detekovaného ve frakci RP10 lišejníku *C. coniocraea* prostřednictvím UHPLC-QTOF-MS analýzy na reverzní fázi v negativním módu (ESI-) a jeho fragmentační spektrum v negativním módu (B) při kolizní energii 20 eV.

Na fragmentačním spektru molekulárního iontu  $[M-H]^-$   $m/z$  473 (Obr. 22) měřeném ESI- se nachází nejintenzivnější fragmenty  $m/z$  357, 313 a 295.



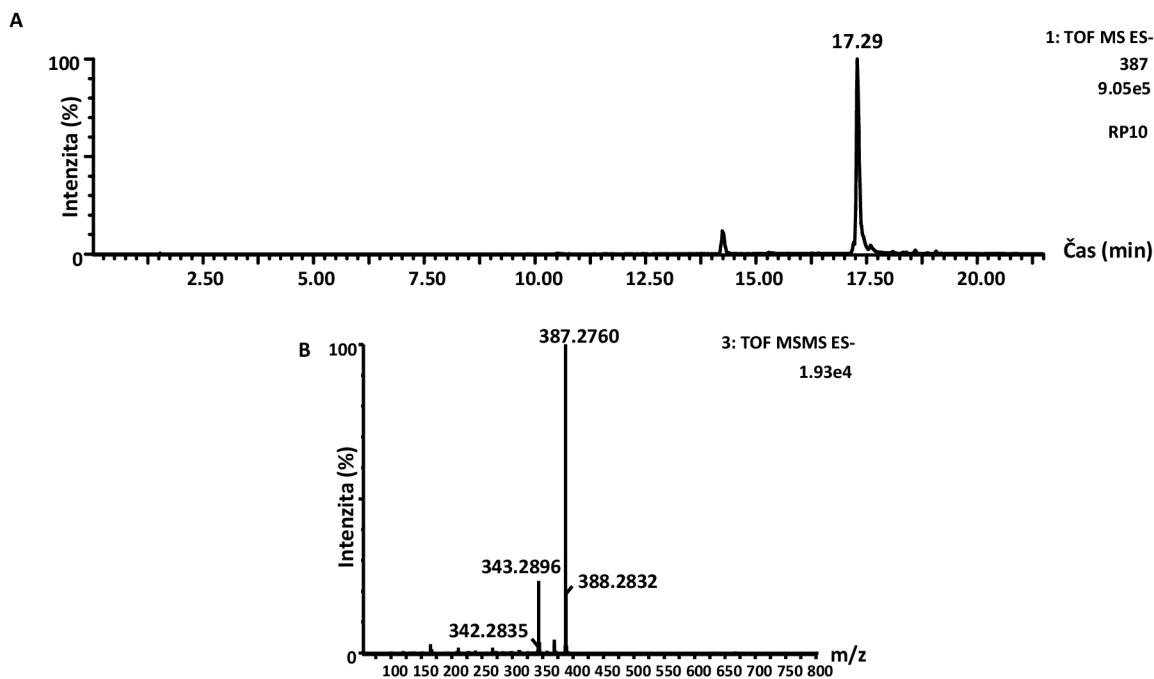
Obr. 23: Chromatogram (A) vybraného molekulárního iontu  $m/z$  373 detekovaného ve frakci RP10 lišejníku *C. coniocraea* prostřednictvím UHPLC-QTOF-MS analýzy na reverzní fázi v negativním módu (ESI-) a jeho fragmentační spektrum v negativním módu (B) při kolizní energii 20 eV.

Na fragmentačním spektru molekulárního iontu  $[M-H]^-$   $m/z$  373 (Obr. 23) měřeném ESI- se nachází intenzivní fragmenty  $m/z$  311, 267, 255 a 295. Fragment  $m/z$  311 se vyskytuje také u molekulárního iontu  $[M-H]^-$   $m/z$  421 (Obr. 24) a fragment  $m/z$  255 a 229 u molekulárního iontu  $[M-H]^-$   $m/z$  343 (Obr. 26).



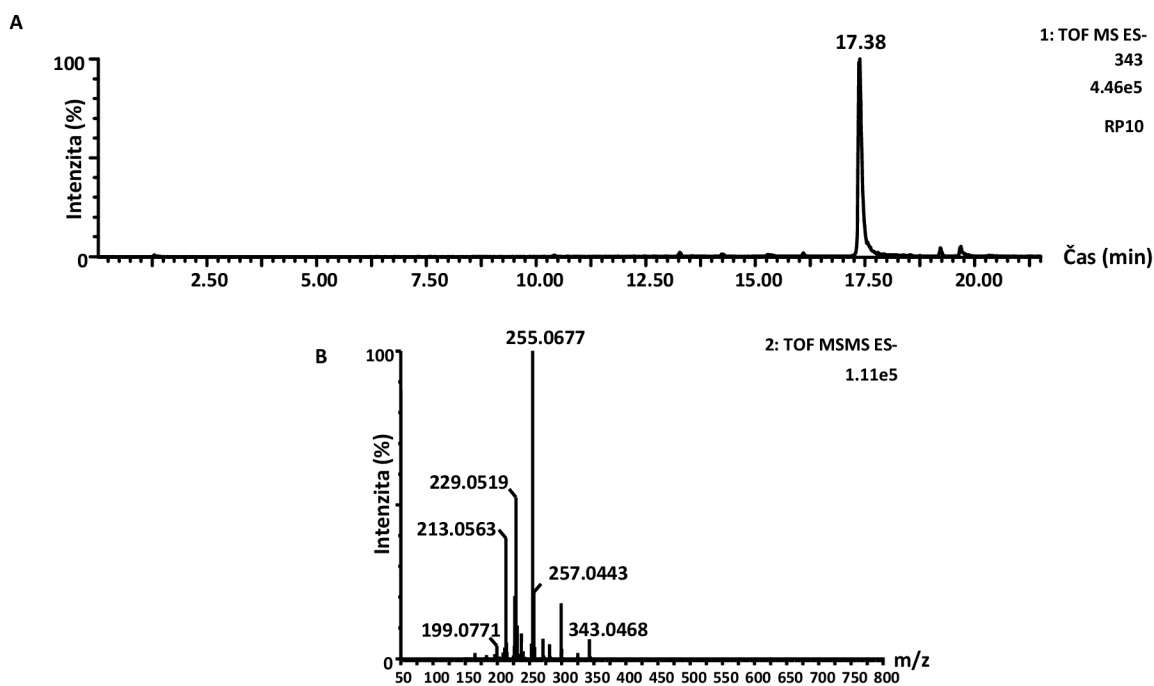
Obr. 24: Chromatogram (A) vybraného molekulárního iontu  $m/z$  471 detekovaného ve frakci RP10 lišejníku *C. coniocraea* prostřednictvím UHPLC-QTOF-MS analýzy na reverzní fázi v negativním módu (ESI-) a jeho fragmentační spektrum v negativním módu (B) při kolizní energii 20 eV.

Molekulární ion  $[M-H]^-$   $m/z$  421 měřený ESI- má ve svém fragmentačním spektru (Obr. 24) má nejintenzivnější fragmenty  $m/z$  355, 311, 283 a 239. Fragment  $m/z$  311 se nachází také ve fragmentačním spektru molekulárního iontu  $[M-H]^-$   $m/z$  373 (Obr. 23).



Obr. 25: Chromatogram (A) vybraného molekulárního iontu  $m/z$  387 detekovaného ve frakci RP10 lišejníku *C. coniocraea* prostřednictvím UHPLC-QTOF-MS analýzy na reverzní fázi v negativním módu (ESI-) a jeho fragmentační spektrum v negativním módu (B) při kolizní energii 20 eV.

Na fragmentačním spektru molekulárního iontu  $[M-H]^-$   $m/z$  387 (Obr. 25) měřeném ESI- se nachází samotný ion  $m/z$  387 a jeho fragmenty  $m/z$  343 a 342. Fragment  $m/z$  343 odpovídá vybranému molekulárnímu iontu  $[M-H]^-$   $m/z$  343, jehož fragmentační spektrum je znázorněno na Obr. 26.



Obr. 26: Chromatogram (A) vybraného molekulárního iontu  $m/z$  343 detekovaného ve frakci RP10 lišejníku *C. coniocraea* prostřednictvím UHPLC-QTOF-MS analýzy na reverzní fázi v negativním módu (ESI-) a jeho fragmentační spektrum v negativním módu (B) při kolizní energii 20 eV.

Na fragmentačním spektru posledního vybraného molekulárního iontu  $[M-H]^-$   $m/z$  343 (Obr. 26) měřeném ESI- se nachází samotný iont  $m/z$  343 a jeho nejintenzivnější fragmenty  $m/z$  255, 229 a 213. Fragment  $m/z$  255 a 229 se shoduje s fragmenty vybraného molekulárního iontu  $[M-H]^-$   $m/z$  373, jehož fragmentační spektrum je znázorněno na Obr. 23.

## 5 DISKUZE

Tato diplomová práce vznikla v návaznosti na bakalářskou práci, která se zabývala antimikrobiální a cytotoxickou aktivitou přírodních extraktů, z čehož vzešel lišejník *Cladonia coniocraea* jako nejslibnější zdroj antimikrobiálních látek, a proto byl použit pro další experimenty.

### 5.1 UHPLC-QTOF-MS

Pomocí UHPLC-QTOF-MS byly detekovány nejintenzivnější píky a odpovídající molekulární ionty  $[M-H]^-$ .

Molekulární ion  $[M-H]^-$  detekovaný v RT 13.35 minut s hodnotou  $m/z$  473 byl na základě struktury a elementárního složení předběžně identifikován jako succinprotocetrarová kyselina (Obr. 27B) (Sepúlveda et al., 2022) U této látky byly detekovány fragmenty s  $m/z$  357, 313 a 295 (Obr. 22). V čase 15.21 minut byl detekován molekulární ion  $[M-H]^-$   $m/z$  373 poskytující intenzivní produktové ionty  $m/z$  311, 267, 255, 229 a 213 (Obr. 23). Elementární složení a hodnoty  $m/z$  jednotlivých fragmentů byly porovnány se studií od Xu et al., 2018, ve které byly acetonové extrakty lišejníku *Cetraria islandica* podrobeny ESI- UHPLC-QTOF-MS analýze. Dále byla fragmentační spektra porovnána se spektrem dostupným v knihovně GNPS a na základě všech zjištění byla tato látka předběžně identifikována jako kyselina protocetrarová (Obr. 27D). Tato kyselina pravděpodobně sdílí strukturní základ s dalším metabolitem ( $m/z$  343) detekovaným v RT 17.38 minut. Nejintenzivnější fragmenty ( $m/z$  255, 229 a 213) tohoto prekurzorového iontu ( $m/z$  343) se překrývají s fragmenty protocetrarové kyseliny (Obr. 23 a 26).

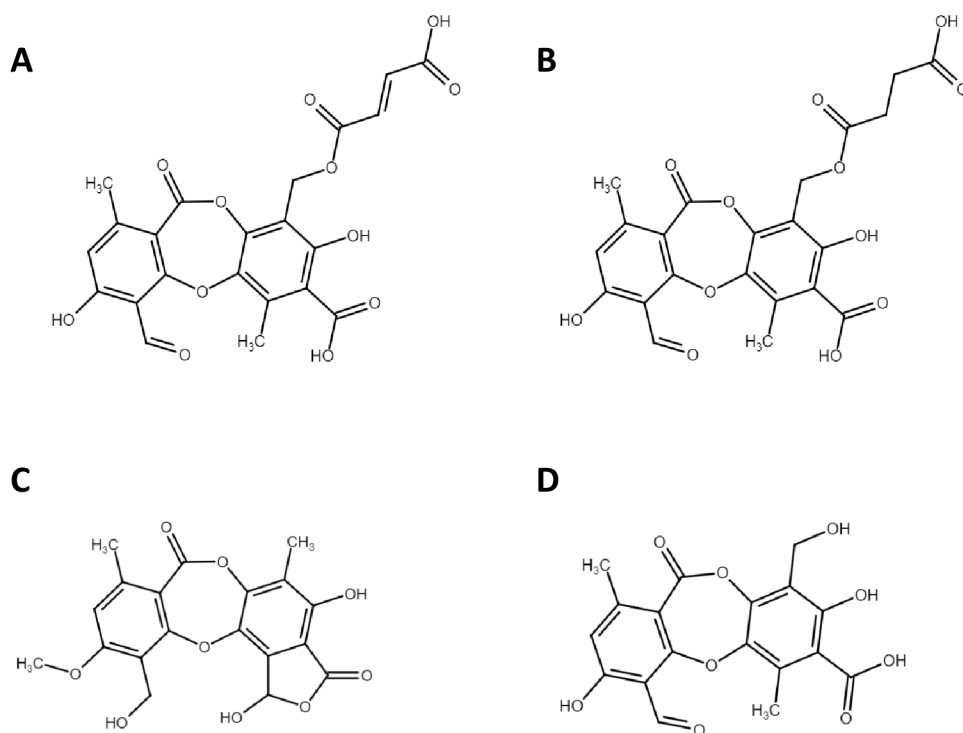
Molekulární ion  $[M-H]^-$  detekovaný v RT 16.74 minut s hodnotou  $m/z$  471 byl porovnán s výsledky studií od Sepúlveda et al., 2022 a Xu et al., 2018. Fragmentační spektrum bylo porovnáno se spektrem dostupným v knihovně GNPS a po srovnání elementárního složení a fragmentačních spekter byla látka s  $m/z$  471 identifikována jako kyselina fumarprotocetrarová (Obr. 27A). U této látky byly detekovány fragmenty s  $m/z$  355, 311, 283 a 239, kdy fragment  $m/z$  311 se překrývá s fragmentem kyseliny protocetrarové (Obr. 24).

V RT 17.29 minut byl detekován molekulární ion  $[M-H]^-$   $m/z$  387 poskytující intenzivní fragmenty  $m/z$  343 a 342 (Obr. 25). Na základě porovnání elementárního složení s výsledky studie od Sepúlveda et al., 2022, která se zabývala UHPLC-Orbitrap-ESI analýzou methanolových extraktů arktického lišejníku *Cladonia*



*metacorallifera*, byla tato látka předběžně identifikována jako cryptostictická kyselina (Obr. 27C).

Při vzájemném porovnání struktur na Obr. 27 a fragmentů jednotlivých molekulárních iontů [M-H]<sup>-</sup> můžeme předpokládat, že všechny látky mají společný strukturní základ, který je charakteristický pro depsidony, skládající se ze dvou kruhů kyseliny 2,4-dihydroxybenzoové, které jsou vzájemně spojeny etherovými a esterovými vazbami. Jde o metabolity, které jsou přirozeně produkovány lišejníky, houbami, či některými rostlinami a byla u nich prokázána biologická aktivita (Ibrahim et al., 2018).



Obr. 27: Předpokládaná struktura látek, které jsou pravděpodobně obsaženy v lišejníku *Cladonia coniocraea*. **A** kyselina fumarprotocetrarová ( $m/z$  471), **B** kyselina succinprotocetrarová ( $m/z$  473), **C** kyselina cryptostictická ( $m/z$  387), **D** kyselina protocetrarová ( $m/z$  373).

Předběžné určení kyseliny fumarprotocetrarové a protocetrarové, coby sekundárních metabolitů lišejníku *C. coniocraea* se shoduje s vědeckými poznatky od Hauck et al., 2009; Sicilia et al., 2009; Hauck & Jürgens, 2008; Kocakaya et al., 2021 a řadou dalších autorů.

Studie od Hauck et al., 2009 uvádí, že kyselina fumarprotocetrarová je zodpovědná za toleranci vůči kyselému substrátu, ve kterém lišejník *C. coniocraea* nejčastěji nacházíme, a to v rozmezí pH od 3,3 do 5,6. Je tedy možné, že čím kyselejší půda, na které lišejník roste, tím vyšší koncentrace fumarprotocetrarové kyseliny a jejich strukturně podobných látek obsahuje.

## 5.2 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita, která byla testována mikrodiluční metodou byla zaznamenána výhradně vůči grampozitivním bakteriím (*Obr. 19 a 20*). Grampozitivní bakterie mají pouze vnitřní membránu složenou z peptidoglykanu a vnější membránu zcela postrádají (Silhavy et al., 2010). Na rozdíl od nich gramnegativní bakterie mají vnitřní membránu z fosfolipidů a peptidoglykanu mnohem tenčí, ale chrání je vnější vrstva, která obsahuje zejména lipopolysacharidy (Decad & Nikaido, 1976; Silhavy et al., 2010). Antimikrobiální látka může být vnější membránou gramnegativní bakterie vypuzena, což by mohlo být vysvětlení, proč byl vzorek aktivní pouze vůči grampozitivním bakteriím (Theuretzbacher et al., 2020).

Nejnižší hodnoty minimální inhibiční koncentrace (0,188 mg/ml) byly stanoveny vůči mikroorganismům *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* a *Schaalia odontolytica*. Jde vyjma druhu *S. mutans* o anaerobní bakterie, které jsou citlivější k antimikrobiálním látkám, a proto mohl být účinek výraznější. Obecně můžeme říci, že lepší účinky vykazovaly frakce RP10 a A2 (*Obr. 19 a 20*). Lze tedy předpokládat, že látka zodpovědná za antimikrobiální aktivitu se během SPE frakcionace eluovala až jako poslední. Šlo tedy o nepolární látku.

Kyselina protocetrarová byla testována na antimikrobiální aktivitu (Tay et al., 2004). Ovšem dle jejich výsledků nebyla aktivní vůči žádnému druhu bakterií, pouze vůči kvasinkám *Candida albicans* a *Candida glabrata*. Na základě tohoto experimentu lze předpokládat, že kyselina protocetrarová není hlavní látkou, která přispívá k antibakteriální aktivitě, ale mohla by mít svůj podíl na antifungální aktivitě lišejníku *C. coniocraea* (Nanayakkara et al., 2005). Naproti tomu kyselina fumarprotocetrarová vykazovala v několika studiích antimikrobiální aktivitu vůči všem testovaným druhům grampozitivních a gramnegativních bakterií, ale také kvasinek. Tato aktivita izolované kyseliny fumarprotocetrarové byla detekována ve velice nízkých koncentracích (0,031 – 0,25 mg/ml) (Kosanić et al., 2014; Ranković & Mišić, 2008; Yilmaz et al., 2004). Na základě výsledků a porovnání s literaturou je velice pravděpodobné, že kyselina fumarprotocetrarová významně přispívá k celkové antimikrobiální aktivitě lišejníku *C. coniocraea*. Bližší porovnání s výsledky experimentů jiných autorů nelze provést, neboť prováděli experimenty s izolovaným vzorkem kyseliny fumarprotocetrarové avšak v případě experimentu v rámci diplomové práce se jednalo o celkový extrakt lišejníku. V lišejníku *C. coniocraea* se nachází zřejmě větší množství strukturně podobných látek, ovšem ne všechny byly v rámci experimentů jiných autorů testovány. Testování v rámci diplomové práce nebylo prováděno

na standardech, a proto nelze s jistotou posoudit, která látka zodpovídá za antimikrobiální aktivitu. Avšak lze se domnívat, že vzhledem k velice podobné struktuře látek má každá z nich svůj podíl na celkové antimikrobiální aktivitě lišejníku. Minimální inhibiční koncentrace celkového extraktu lišejníku *C. coniocraea* mohou být výrazně variabilní v závislosti na enviromentálních faktorech jako například pH půdy.

Jedním z nejcitlivějších patogenů, vůči kterým byl lišejník při testování antimikrobiální aktivity účinný byl mikroorganismus *Streptococcus mutans*, který je původcem zubního kazu, což je jedno z nejrozšířenějších onemocnění na světě (Ajdić et al., 2002). Některé přírodní látky, jako například eugenol, jsou v zubním lékařství již využívány (Mosquera et al., 2019). Extrakt z lišejníku *C. coniocraea*, popřípadě samotná kyselina fumarprotocetrarová by mohla být další možnou antimikrobiální látkou, potenciálně využitelnou jako součást zubních past či ústních vod. Samozřejmě za předpokladu průkazu zdravotní nezávadnosti a bezpečnosti této látky.

## 6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo v rámci teoretické části vypracovat rešerši zabývající se lišejníky, jejich sekundárními metabolity a antimikrobiálními látkami. V experimentální části pak posoudit antimikrobiální aktivitu extraktu z lišejníku *Cladonia coniocraea* a pomocí metabolomické LC-MS analýzy se pokusit identifikovat sekundární metabolity, včetně složky potenciálně zodpovědné za tuto aktivitu. Všechny tyto cíle byly v rámci diplomové práce naplněny.

Bylo zjištěno, že lišejník *C. coniocraea* vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči grampozitivním bakteriím. K antimikrobiální aktivitě zřejmě přispívá kyselina fumarprotocetrarová, případně některý z detekovaných strukturně podobných derivátů (protocetrarová, succinprotocetrarová či cryptostictická kyselina) nebo kombinace s dalšími látkami.

Jedním z nejcitlivějších mikroorganismů byla grampozitivní bakterie *Streptococcus mutans*, což je patogen u člověka způsobující zubní kaz. Extrakt z lišejníku by tak mohl být potenciálně využit jako součást zubních past a ústních vod, což však vyžaduje další výzkum. Je zde prostor pro jednoznačnou identifikaci konkrétních složek lišejníku, což se neobejde bez izolace a případné syntézy látek obsažených v lišejníku. Pak by mohl být lišejník *C. coniocraea* potenciálně využit také v průmyslových antimikrobiálních přípravcích nebo v kosmetickém průmyslu.

## 7 LITERATURA

- Ajdić, D., McShan, W. M., McLaughlin, R. E., Savić, G., Chang, J., Carson, M. B., ... Ferretti, J. J. (2002). Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.172501299>
- Beiggi, S., & Piercey-Normore, M. D. (2007). Evolution of ITS ribosomal RNA secondary structures in fungal and algal symbionts of selected species of *Cladonia* sect. *Cladonia* (Cladoniaceae, Ascomycotina). *Journal of Molecular Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s00239-006-0115-x>
- Benedict, J. B. (2009). A review of lichenometric dating and its applications to archaeology. *American Antiquity*. <https://doi.org/10.1017/S0002731600047545>
- Bradley, R. S. (2014). Paleoclimatology: Reconstructing Climates of the Quaternary: Third Edition. In *Paleoclimatology: Reconstructing Climates of the Quaternary: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-18310-1>
- Bradwell, T., & Armstrong, R. A. (2007). Growth rates of *Rhizocarpon geographicum* lichens: A review with new data from Iceland. *Journal of Quaternary Science*. <https://doi.org/10.1002/jqs.1058>
- Brandão, L. F. G., Alcantara, G. B., De Fátima Cepa Matos, M., Bogo, D., Dos Santos Freitas, D., Oyama, N. M., & Honda, N. K. (2013). Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. <https://doi.org/10.1248/cpb.c12-00739>
- Calchera, A., Dal Grande, F., Bode, H. B., & Schmitt, I. (2019). Biosynthetic Gene Content of the 'Perfume Lichens' *Evernia prunastri* and *Pseudevernia furfuracea*. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24010203>
- Candan, M., Yilmaz, M., Tay, T., Erdem, M., & Türk, A. Ö. (2007). Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Parmelia sulcata* and its salazinic acid constituent. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-827>
- Crawford, S. D. (2019). Lichens Used in Traditional Medicine. In *Lichen Secondary Metabolites*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8_2)
- Czarnota, P. (2009). Symbiozy porostowe w świetle interakcji pomiędzy grzybami i fotobiontami. *Kosmos*, 58(1–2), 229–248. Retrieved from <http://kosmos.icm.edu.pl/PDF/2009/229.pdf>
- Decad, G. M., & Nikaido, H. (1976). Outer membrane of gram negative bacteria. XII. Molecular sieving function of cell wall. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.128.1.325-336.1976>
- Develoux, M. (2001). Griséofulvine. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*.

- Doherty, B., Gabrieli, F., Clementi, C., Cardon, D., Sgamellotti, A., Brunetti, B., & Miliani, C. (2014). Surface enhanced Raman spectroscopic investigation of orchil dyed wool from *Rocella tinctoria* and *Lasallia pustulata*. *Journal of Raman Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1002/jrs.4543>
- Dong, X., Fu, J., Yin, X., Cao, S., Li, X., Lin, L., & Ni, J. (2016). Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.5631>
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy1[OPEN]. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/PP.20.00433>
- Fernández-Moriano, C., Divakar, P. K., Crespo, A., & Gómez-Serranillos, M. P. (2017). In vitro neuroprotective potential of lichen metabolite fumarprotocetraric acid via intracellular redox modulation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.12.020>
- Fontaniella, B., Legaz, M. E., Pereira, E. C., Sebastián, B., & Vicente, C. (2000). Requirements to produce fumarprotocetraric acid using alginate-immobilized cells of *Cladonia verticillaris*. *Biotechnology Letters*. <https://doi.org/10.1023/A:1005673715916>
- Giacomelli, A., Pietropaoli, M., Carvelli, A., Iacoponi, F., & Formato, G. (2016). Combination of thymol treatment (Apiguard®) and caging the queen technique to fight *Varroa destructor*. *Apidologie*. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0408-4>
- Gramesová, L. (2020). Antimikrobiální a cytotoxická aktivita přírodních extraktů. Olomouc. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
- Guillarme, D., & Luc Veuthey, J. (2012). UHPLC in Life Sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6475-8>
- Hammer, S. (2001). Lateral growth patterns in the Cladoniaceae. *American Journal of Botany*. <https://doi.org/10.2307/2657031>
- Hauck, M., & Jürgens, S. R. (2008). Usnic acid controls the acidity tolerance of lichens. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.12.033>
- Hauck, M., Jürgens, S. R., Huneck, S., & Leuschner, C. (2009). High acidity tolerance in lichens with fumarprotocetraric, perlatolic or thamnolic acids is correlated with low pKa1 values of these lichen substances. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.022>
- Heger, T., Zatloukal, M., Kubala, M., Strnad, M., & Grúz, J. (2022). Procyanidin C1 from *Viola odorata* L. inhibits Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Scientific Reports*, 12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-022-11086-y>

- Ho, T. Y., Wu, S. L., Chen, J. C., Li, C. C., & Hsiang, C. Y. (2007). Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Research*. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.04.014>
- Hoffmann, E. De, & Stroobant, V. (2007). Mass Spectrometry Principles and Applications Third Edition. In *Mass spectrometry reviews*.
- Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., Al Haidari, R. A., El-Kholy, A. A., Zayed, M. F., & Khayat, M. T. (2018). Biologically active fungal depsidones: Chemistry, biosynthesis, structural characterization, and bioactivities. *Fitoterapia*. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.04.012>
- Ingólfssdóttir, K. (2002). Usnic acid. *Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00383-7)
- Iwu, M. M., Duncan, A. R., & Okunji, C. O. (1999). New antimicrobials of plant origin. Perspectives on new crops and new uses. *Perspectives on New Crops and New Uses, 1999*.
- Jeran, Z., Jaimovi, R., Batič, F., & Mavsar, R. (2002). Lichens as integrating air pollution monitors. *Environmental Pollution*. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00133-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00133-1)
- Jones, R. A., Panda, S. S., & Hall, C. D. (2015). Quinine conjugates and quinine analogues as potential antimalarial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.002>
- Kalina, T., & Váňa, J. (2005). *SINICE, ŘASY, HOUBY, MECHOROSTY a podobné organismy v současné biologii* (1. vydání). Praha: Karolinum.
- Kinghorn, A. D. (2010). Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1211/0022357011775334>
- Knight, G. M., Glover, R. E., McQuaid, C. F., Olaru, I. D., Gallandat, K., Leclerc, Q. J., ... Chandler, C. I. R. (2021). Antimicrobial resistance and covid-19: Intersections and implications. *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.64139>
- Kocakaya Z. , Şeker Karatoprak G., K. M. (2018). *Cytotoxic Effects of Methanolic Extracts from Different Cladonia Species on Human Lung Carcinoma (A549) Cell Line*.
- Kocakaya, Z., Kocakaya, M., & Karatoprak, G. Ş. (2021). *Comparative Analyses of Antioxidant , Cytotoxic , and Anti-inflammatory Activities of Different Cladonia Species and Determination of Fumarprotocetraric Acid Amounts Farklı Cladonia Türlerinin Antioksidan , Sitotoksik ve Antiinflamatuvar Aktivitelerinin K. 4(6), 1196–1207*.
- Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T., Rančić, A., & Manojlović, N. (2014). Cladonia lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.047>

- Koukalová, D. (2013). *Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie I*. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules25184125>
- Lee, S., Suh, Y. J., Yang, S., Hong, D. G., Ishigami, A., Kim, H., ... Lee, J. (2021). Neuroprotective and anti-inflammatory effects of evernic acid in an MPTP-induced parkinson's disease model. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms22042098>
- Li, W. C., Zhou, J., Guo, S. Y., & Guo, L. D. (2007). Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity*.
- Liu, X., Stanford, C. B., Yang, J., Yao, H., & Li, Y. (2013). Foods Eaten by the Sichuan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellana*) in Shennongjia National Nature Reserve, China, in relation to nutritional chemistry. *American Journal of Primatology*, 75(8), 860–871. <https://doi.org/10.1002/ajp.22149>
- Luo, H., Yamamoto, Y., Kim, J. A., Jung, J. S., Koh, Y. J., & Hur, J. S. (2009). Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from Umbilicaria antarctica in maritime Antarctica (King George Island). *Polar Biology*. <https://doi.org/10.1007/s00300-009-0602-9>
- Malíček, J. (2012). *Sekundární metabolity lišejníků a jejich význam pro taxonomii*. 249–250.
- Malíček, J., Palice, Z., Bouda, F., Knudsen, K., Šoun, J., Vondrák, J. & Novotný, P. (2022): Atlas českých lišejníků. - dalib.cz [30. 04. 2022]
- Manojlović, N., Ranković, B., Kosanić, M., Vasiljević, P., & Stanojković, T. (2012). Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.07.012>
- McCarthy, D. P. (2013). Lichenometry. In *Encyclopedia of Quaternary Science: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53643-3.00055-8>
- Mitchell, R. J., Truscot, A. M., Leith, I. D., Cape, J. N., Van Dijk, N., Tang, Y. S., ... Sutton, M. A. (2005). A study of the epiphytic communities of Atlantic oak woods along an atmospheric nitrogen deposition gradient. *Journal of Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2005.00967.x>
- Mosquera, J. E., Goñi, M. L., Martini, R. E., & Gañán, N. A. (2019). Supercritical carbon dioxide assisted impregnation of eugenol into polyamide fibers for application as a dental floss. *Journal of CO2 Utilization*. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.04.016>
- Müller, K. (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s002530100684>



- Nanayakkara, C., Bombuwela, K., Kathirgamanathar, S., Adikaram, N. K. B., Wijesundara, D. S. A., Hariharan, G. N., ... Karunaratne, V. (2005). Effect of some lichen extracts from Sri Lanka on larvae of *Aedes aegypti* and the fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*. <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v33i2.2345>
- Nardelli, A., Drieghe, J., Claes, L., Boey, L., & Goossens, A. (2011). Fragrance allergens in “specific” cosmetic products. *Contact Dermatitis*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2011.01877.x>
- Nash, T. H. (2008). *Lichen Biology* (2nd ed.; T. H. Nash III, Ed.). New York: Cambridge University Press.
- Nathwani, D., & Wood, M. J. (1993). Penicillins: A Current Review of their Clinical Pharmacology and Therapeutic Use. *Drugs*. <https://doi.org/10.2165/00003495-199345060-00002>
- Ng, O. H., Tan, B. C., & Obbard, J. P. (2006). Lichens as bioindicators of atmospheric heavy metal pollution in Singapore. *Environmental Monitoring and Assessment*. <https://doi.org/10.1007/s10661-005-9120-6>
- Nováková, L. (2013). Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.087>
- Papierska, K., Krajka-Kuźniak, V., Paluszczak, J., Kleszcz, R., Skalski, M., Studzińska-Sroka, E., & Baer-Dubowska, W. (2021). Lichen-derived depsides and depsidones modulate the nrf2, nf- $\kappa$ b and stat3 signaling pathways in colorectal cancer cells. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules26164787>
- Pino-Bodas, R., Burgaz, A. R., Martín, M. P., & Lumbsch, H. T. (2011). Phenotypical plasticity and homoplasmy complicate species delimitation in the *Cladonia gracilis* group (Cladoniaceae, Ascomycota). *Organisms Diversity and Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0062-2>
- Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist. Reviews*.
- Podterob, A. P. (2008). Chemical composition of lichens and their medical applications. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. <https://doi.org/10.1007/s11094-009-0183-5>
- Ranković, B., & Mišić, M. (2008). The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspersa*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. <https://doi.org/10.1080/13102818.2008.10817601>
- Ranković, B., & Kosanić, M. (2019). Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites. In *Lichen Secondary Metabolites*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8_1)

- Rárová, L., Ncube, B., Van Staden, J., Fürst, R., Strnad, M., & Gruz, J. (2019). Identification of Narciclasine as an in Vitro Anti-Inflammatory Component of *Cyrtanthus contractus* by Correlation-Based Metabolomics. *Journal of Natural Products*. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00973>
- Rodbell, D. T. (1992). Lichenometric and Radiocarbon Dating of Holocene Glaciation, Cordillera Blanca, Perú. *The Holocene*. <https://doi.org/10.1177/095968369200200103>
- Rosypal, S. (1992). *Fylogeneze, systém a biologie organismů* (1. vydání). Praha: Státní pedagogické nakladatelství.
- Sahin, E., Dabagoglu Psav, S., Avan, I., Candan, M., Sahinturk, V., & Kopalal, A. T. (2019). Vulpinic acid, a lichen metabolite, emerges as a potential drug candidate in the therapy of oxidative stress-related diseases, such as atherosclerosis. *Human and Experimental Toxicology*. <https://doi.org/10.1177/0960327119833745>
- Samuelsson, G., & Bohlin, L. (2017). *Drugs of natural origin: a treatise of pharmacognosy* (No. Ed. 7; G. Samuelsson & L. Bohlin, Eds.). London: CRC Press Inc.
- Sancho, L. G., Schulz, F., Schroeter, B., & Kappen, L. (1999). Bryophyte and lichen flora of South Bay (Livingston Island: South Shetland Islands, Antarctica). *Nova Hedwigia*, 68(3–4), 301–337. <https://doi.org/10.1127/nova.hedwigia/68/1999/301>
- Segal, S. (2013). *Ecological Notes on Wall Vegetation*. Springer.
- Sepúlveda, B., Cornejo, A., Bárcenas-pérez, D., Cheel, J., & Areche, C. (2022). Two New Fumarprotocetraric Acid Lactones Identified and Characterized by UHPLC-PDA/ESI/ORBITRAP/MS/MS from the Antarctic Lichen *Cladonia metacorallifera*. *Separations*. <https://doi.org/10.3390/separations9020041>
- Shrestha, G., & St. Clair, L. L. (2013). Lichens: A promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9283-7>
- Shukla, P., Upreti, D. K., Nayaka, S., & Tiwari, P. (2014). Natural dyes from Himalayan lichens. *Indian Journal of Traditional Knowledge*.
- Sicilia, D., Hernández, C., & Burgaz, A. R. (2009). The genus *Cladonia* in Garajonay National Park, la gomera, Canary Islands. *Cryptogamie, Mycologie*.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Sprengel, K. P. J. (1827). *Systema Vegetabilium*.
- Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M. C., ... McCutcheon, J. P. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8287>
- Stenroos, S., Pino-Bodas, R., Hyvönen, J., Lumbsch, H. T., & Ahti, T. (2019). Phylogeny of the family Cladoniaceae (Lecanoromycetes, Ascomycota) based on sequences of multiple loci. *Cladistics*. <https://doi.org/10.1111/cla.12363>

- Studzinska-Sroka, E., Galanty, A., & Bylka, W. (2017). Atranorin - An Interesting Lichen Secondary Metabolite. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170425105727>
- Tay, T., Türk, A. Ö., Yilmaz, M., Türk, H., & Kivanç, M. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-5-617>
- The Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS). GNPS Library Spectrum CCMSLIB00004751292. <https://gnps.ucsd.edu/> [2. 05. 2022]
- The Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS). GNPS Library Spectrum CCMSLIB00005718951. <https://gnps.ucsd.edu/> [2. 05. 2022]
- Theuretzbacher, U., Outtersson, K., Engel, A., & Karlén, A. (2020). The global preclinical antibacterial pipeline. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0288-0>
- Thompson, R., & Wright, A. (1983). Cephalosporin antibiotics. *Mayo Clinic Proceedings*.
- Tiwari, P., Khare, T., Shriram, V., Bae, H., & Kumar, V. (2021). Plant synthetic biology for producing potent phyto-antimicrobials to combat antimicrobial resistance. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107729>
- Torok, E., Moran, E., & Cooke, F. (2009). Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology. In *Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology*. <https://doi.org/10.1093/med/9780198569251.001.0001>
- Turner, N. J. (1977). Economic importance of black tree lichen (*Bryoria fremontii*) to the Indians of western North America. *Economic Botany*. <https://doi.org/10.1007/BF02912559>
- Votava, M., (2001). *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-2-2.
- Xu, M., Heidmarsson, S., Thorsteinsdottir, M., Kreuzer, M., Hawkins, J., Omarsdottir, S., & Olafsdottir, E. S. (2018). Authentication of Iceland Moss (*Cetraria islandica*) by UPLC-QToF-MS chemical profiling and DNA barcoding. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.073>
- Yilmaz, M., Türk, A. Ö., Kivanç, M., & Tay, T. (2004). The Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Cladonia foliacea* and Its (-)-Usnic Acid, Atranorin, and Fumarprotocetraric Acid Constituents. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-3-423>
- Yu, Z., Tang, J., Khare, T., & Kumar, V. (2020). The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: Can essential oils come to the rescue? *Fitoterapia*. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104433>

Yuan, X., Xiao, S., & Taylor, T. N. (2005). Lichen-like symbiosis 600 million years ago. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1111347>

Yusuf, M. (2018). Handbook of renewable materials for coloration and finishing. In *Handbook of Renewable Materials for Coloration and Finishing*. <https://doi.org/10.1002/9781119407850>