

Magyar fajtamézek antibakteriális aktivitásának változása a tárolási idő függvényében

Doktori (PhD) értekezés



Nagy-Radványi Lilla

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Programvezető: Prof. Dr. Deli József

Témavezető: **Dr. Farkas Ágnes**

Társtémavezető: **Dr. Kocsis Marianna**

Pécsi Tudományegyetem

OGYDHT, Pécs

2024

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
2.1. A bakteriális légúti fertőzések jelentősége	8
2.2. A bakteriális biofilmek jellegzetességei	10
2.2.1. Az érett biofilm kialakulása	11
2.2.2. A biofilmek felépítése	14
2.2.3. A biofilmek gátlásának nehézségei	17
2.3. A méz általános jellemzése	20
2.3.1. A méz összetétele	20
2.3.2. A méz érzékszervi és fizikai tulajdonságai.....	
2.3.3. A méz antibakteriális hatása	25
2.4. A kísérletekben szereplő légúti baktériumok jellemzése	29
2.4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
2.4.2. <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i>	31
2.4.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	32
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	34
3.1. A kutatásba bevont mézminták	34
3.2. Melisszopalinológiai analízis	34
3.3. Fajtamézek fizikokémiai paramétereinek meghatározása	35
3.4. Mikrobiológiai vizsgálatok.....	35
3.4.1. A vizsgált légúti baktériumok	35
3.4.2. Minimális gátló (MIC) és minimális baktericid (MBC) koncentráció meghatározása	36
3.4.3. A biofilmképződés gátlásának vizsgálata	36
3.4.4. A membrándegradáció tanulmányozása	37
3.4.5. Scanning elektronmikroszkópos (SEM) felvételek készítése	38
3.4.6. Statisztikai elemzés.....	38
4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	39
4.1. A mézminták botanikai eredete	39
4.2. A vizsgált fajtamézek fizikokémiai tulajdonságai.....	41
4.3. A mézminták MIC és MBC értékei.....	44

4.4. A vizsgált fajtamézek biofilmképződést gátló hatása	48
4.5. Mézminták membrándegradáló tulajdonsága.....	54
4.6. A SEM módszer eredményei.....	59
5. ÖSSZEFOGLALÁS	62
6. IRODALOMJEGYZÉK	64
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	82
8. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK.....	83
8.1. Az értekezés alapját képező publikációk.....	83
8.2. Egyéb publikációk	83
8.3. Konferencia szereplések.....	84

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABS₄₅₀₋₇₂₀: színintenzitás (450 és 720 nm-en mért nettó abszorbancia értékek különbsége)

ATCC: American Type Culture Collection (amerikai típusörzs-gyűjtemény)

BAP: biofilm-associated surface protein (biofilm-asszociált felszíni fehérje)

CdrA (PA4625): adhezin, amely közvetlenül kötődik a Psl-hez

CE: Conformité Européenne („európai megfelelés”): A CE-jelölés igazolja, hogy a forgalmazott terméket a gyártó megvizsgálta és az megfelel az uniós szintű biztonsági, egészségügyi és környezetvédelmi előírásoknak.

CFU: colony forming unit (telepképző egységek száma)

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute (Klinikai és Laboratóriumi Szabványügyi Intézet)

CV: crystal violet (kristályibolya)

DSM: Deutsche Sammlung von Microorganismen (német törzsgyűjtemény)

eDNS: extracelluláris DNS (dezoxiribonukleinsav)

ESKAPE: (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacterales* fajok)

FAD: flavin-adenin-dinukleotid

Hap: autotranszporter adhezin (non-pilus)

HGT: horizontal gene transfer (horizontális géntranszfer)

Hia: a szerotípusú *Haemophilus influenzae*

Hif: f szerotípusú *Haemophilus influenzae*

HMF: hidroximetil-furfurol

HMW: high-molecular-weight surface protein (nagy molekulatömegű felületi fehérje)

KatA: kataláz A enzim

LPS: lipopoliszacharid

mAU: milliabszorbancia egység

MBC: minimum bactericidal concentration (minimum baktericid koncentráció)

MDR: multidrog-rezisztencia

MGO: metilglioxál

MHB: Mueller-Hinton Broth (Mueller-Hinton tápoldat)

MIC: minimum inhibitory concentration (minimális gátló koncentráció)

MRSA: methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*

mS/cm: milli-Siemens per centiméter

NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid (V faktor)

NMR: nuclear magnetic resonance (mágneses magrezonancia)

NTHi: nontypeable *Haemophilus influenzae* (nem tipizálható *H. influenzae*)

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity (oxigéngyök elnyelő kapacitás)

P1: felszíni fehérje, többfunkciós adhezin

PA1804: hisztionszerű DNS-kötő fehérje

PAO: polyphosphate-accumulating organisms (polifoszfátot felhalmozó szervezetek)

PBP: penicillin binding protein (penicillinkötő fehérje/transzpeptidáz enzim)

PBS: phosphate buffer saline (foszfát-puffer oldat)

Pel: részlegesen dezacetilezett N-acetil-D-glükózamin és N-acetil-D-galaktózamin kationos poliszacharid polimerje

Ph.Hg.VIII.: VIII. Magyar Gyógyszerkönyv

Psl: semleges pentaszacharid

QQ: quorum quenching (QS rendszer blokkolása jelmolekulák kémiai lebontásával)

QS: quorum sensing (lokális denzitásérzékelés)

ROS: reactive oxygen species (reaktív oxigénszármazék/oxigéngyök)

RT: room temperature (szobahőmérséklet)

SEM: scanning electron microscope (pásztázó elektronmikroszkóp)

WHO: World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A bakteriális eredetű légúti infekciók manapság is nagy jelentőséggel bírnak, hiszen a légúti baktériumoknak tulajdonítható a krónikus (fertőzések) légzőszervi megbetegedések döntő többsége. A legfontosabb felső légúti infekciót okozó baktériumok rezisztenciaviszonyairól általánosságban elmondható, hogy jelentős a makrolid- és trimetoprim/szulfametoxazol-rezisztencia és növekszik a penicillin-rezisztens vagy mérsékelten érzékeny baktériumtörzsek száma. A megalapozatlan és felelőtlen antibiotikum alkalmazás megnövelte a rezisztens baktériumtörzsek előfordulását, így napjainkban az antibiotikum-rezisztencia jelenti az egyik legnagyobb megbíztsági kockázatot (Wei *et al.*, 2023). Ezen tények ismeretében még inkább aktuálissá válik a természetes eredetű anyagok antibakteriális hatásának megismerése.

Egy egészséges ember felső légútjainak mikrobiótájában is megtalálhatóak olyan potenciálisan fertőzőképes, biofilmképző baktériumok, mint a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Streptococcus pneumoniae* vagy a *Haemophilus influenzae*. A biofilmek kialakulásában fontos szerepet játszó extracelluláris poliszacharidok megakadályozhatják az antibiotikum eljutását a célmolekulához, ezzel szolgáltatva nagymértékű ellenállóképességet a biofilmben élő baktériumoknak. A méz biofilm-ellenes hatását több klinikai vizsgálatban igazolták, ezért kiegészítő terápiaként történő alkalmazása jelentős lehet a felső légúti fertőzések esetén is (Krishnakumar *et al.*, 2020). Minél magasabb az egyes fajtamézek H₂O₂ és összpolicenol-tartalma, annál jelentősebb az antibakteriális aktivitásuk (Bucekova *et al.*, 2019). Azonban a H₂O₂ idővel vízre és oxigénre bomlik, így mennyisége csökken a kataláz enzimnek köszönhetően. Ezek alapján feltételezhető, hogy az évekig tárolt mézek veszítenek a H₂O₂ tartalomból adódó antibakteriális hatásukból. Ennek eredményeképpen az aktivitás csökkenésének monitorozása is elengedhetetlenül szükséges.

Az egyes fajtamézek terápiás alkalmazásának létjogosultságát a komplex hatóanyag-összetételük adja. Más természetes anyagokkal ellentétben a méz antibakteriális tulajdonsága nem egy specifikus vegyületnek vagy hatóanyagának köszönhető, hanem azok kombinációjának, így a különböző baktériumtörzsek nem alakítanak ki vele szemben rezisztenciát.

Kutatásunk alapkérdése, hogy gyakori magyar fajtamézek (akác, aranyvessző, hárs, napraforgó) botanikai eredete és tárolási ideje mennyiben befolyásolja antibakteriális

hatásukat, illetve az egyes mézminták antibakteriális aktivitása mely biofilmképző baktériumtörzsekkel szemben érvényesül leginkább. Vizsgálatsorozatunk feltárja a gyógyászati célra alkalmas magyar fajtamézek minőségét, hatékonyságát, illetve eredményeink megfelelő alapot biztosítanak ezen mézek antibakteriális szerként való alkalmazásához.

Kutatásunk kezdetekor az alábbi célokat tűztük ki:

- A vizsgálatba bevont, hazai őstermelőktől vásárolt akác-, aranyvessző-, hárs- és napraforgómézek botanikai eredetének igazolása melisszopalinológiai analízissel.
- A három egymást követő évből (2020, 2021, 2022) származó mézminták színének, pH értékének és elektromos vezetőképességének monitorozása az évek elteltével.
- Az eltérő tárolási idővel rendelkező fajtamézek minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása légúti baktériumokra (*P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*) mikrodilúciós módszerrel a CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) irányelveknek megfelelően.
- A különböző években beszerzett mézminták minimális baktericid koncentrációjának (MBC) megállapítása.
- A fajtamézek biofilmképződést gátló hatásának tanulmányozása 96 cellás mikrotiter lemezekon (kristályibolya teszt) a tárolási idő függvényében.
- A mézek biofilm-ellenes aktivitása mögött álló hatásmechanizmus feltárása (membrándegradációs vizsgálat) a Gram-negatív *P. aeruginosa* és a Gram-pozitív *S. pneumoniae* baktériumok bevonásával.
- Scanning elektronmikroszkópos (SEM) felvételek készítése a biofilmképződést gátló hatás szemléltetése érdekében.

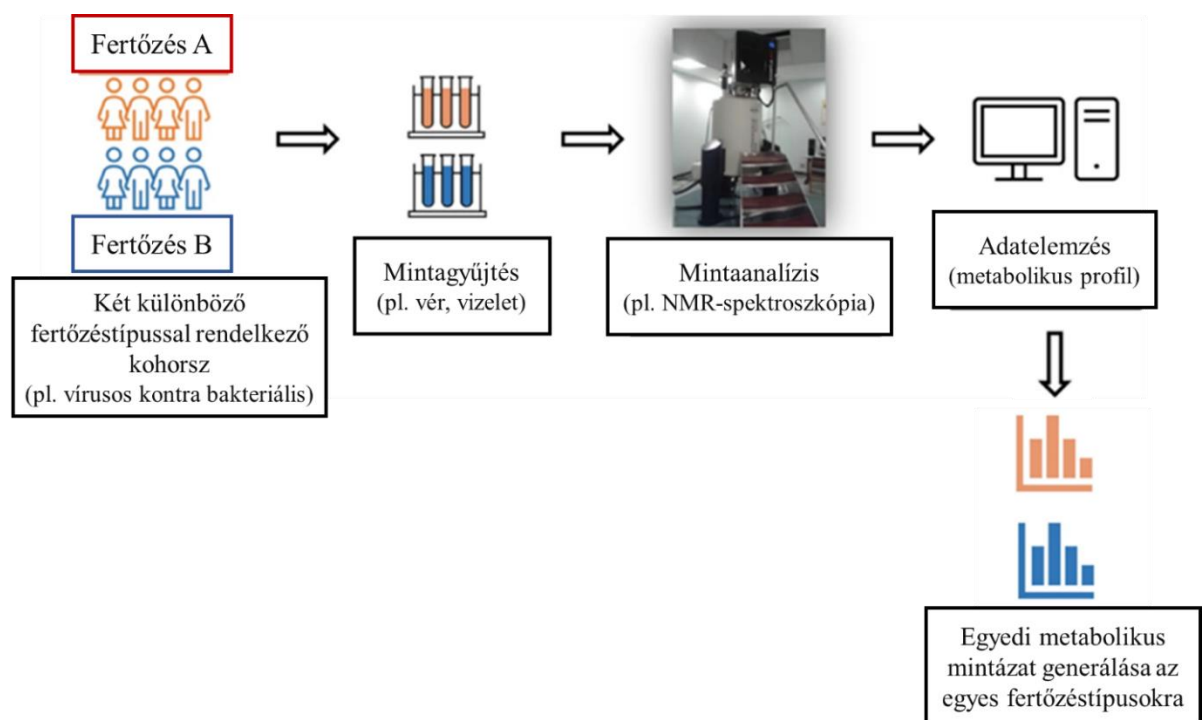
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A bakteriális légúti fertőzések jelentősége

A légúti infekciók rendkívül gyakoriak, a fertőzések eredetű megbetegedések és halálozások fő okai világszerte. A baktériumok a felső és alsó légutakat egyaránt kolonizálják, azonban a felső légúti traktusban találhatóak a baktériumok a legmagasabb csíraszámokban (Man *et al.*, 2017). A felső légúti fertőzések közé tartozik pl. a laryngitis, a pharyngitis/tonsillitis, az akut rhinitis, továbbá az akut rhinosinusitis és az akut otitis media. Alsó légúti fertőzések pl. az akut bronchitis, a bronchiolitis, a pneumonia, a pneumonitis és a tracheitis (Paul, 2024). Általában kezdetben vírusok váltják ki a tüneteket és ezt gyakran követi bakteriális felülfertőződés. Ebben az esetben a gyulladás okozói valójában a légutak természetes módon jelen lévő mikrobiótájának tagjai és elsősorban immunszupresszált állapotban okoznak megbetegedést. Primer bakteriális fertőzés csak kisebb arányban alakul ki, mint virális (Hakansson *et al.*, 2018; Paul, 2024). A felső légutakat kolonizáló patogén fajok közé tartozik a *Streptococcus* spp., a *Haemophilus* spp., a *Pseudomonas* spp., a *Staphylococcus* spp. és a *Moraxella* spp. (Paramasivan *et al.*, 2020). A németországi egészségügyi intézmények a 2022-es év végén szokatlanul sok súlyos, invazív bakteriális infekcióról számoltak be a vírusos légúti fertőzések magas előfordulásával összefüggésben. A megbetegedések rohamos növekedésének oka lehetett a légúti kórokozók fokozott előfordulása, illetve a lakosság nagymértékű fogékonysága a COVID-19 fertőzés megelőzésére tett intézkedések enyhítése után. Az invazív *H. influenzae*, *S. pneumoniae* és *Streptococcus pyogenes* fertőzések leginkább az 55 éves és idősebb felnőtteket, illetve az 5 évnél fiatalabb gyermekeket érintették (Singer *et al.*, 2024). A világ számos pontján a gyermekek és idősek vezető (fertőzéses eredetű) halálozási oka az akut alsó légúti fertőzés, különösen a tüdőgyulladás (Gupta *et al.*, 2016; Paul, 2024).

A súlyos és elhúzódó légúti bakteriális fertőzések esetén jelenleg az antibiotikum-terápia a leghatásosabb megoldás. A szükségtelen antibiotikum expozíció elkerülése érdekében rendkívül fontos a prevenció, illetve a klinikai tünetek alapján a felső légúti infekció pontos diagnózisának felállítása. A virális és bakteriális fertőzések elkülönítésében a beteg általános állapota és a különböző laboratóriumi vizsgálatok nyújtanak segítséget. Célzott antibiotikum-terápia esetén elengedhetetlen a mikrobiológiai mintavétel a kezelés megkezdése előtt (pl. torok-, fülváladék és köpet

bakteriológiai tenyésztése) (Li *et al.*, 2021). Emellett a legújabb klinikai kísérletek a metabolomika tudományát alkalmazzák a virális és bakteriális infekciók elkülönítésére (1. ábra). A metabolomika az élőlények anyagcseréjét vizsgálja és a kísérletek célja, hogy felvételeket készítsenek a szervezetben egy adott pillanatban aktív anyagcsere-útvonalokról. Az anyagcsere-vizsgálatok lehetnek célzottak, ahol előre meghatározott molekulák csoportját azonosítják a mintából vagy a mintában lévő összes molekulát identifkálják. Az eljárás során leggyakrabban használt technikák a tömegspektrometria és a mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia. Ezt követően elemzik az adatokat és minden fertőzéstípushoz metabolikus profilt készítenek, amelyet felhasználnak a betegek légúti infekcióinak kezelésében (Wildman *et al.*, 2023).



1. ábra: Alsó légúti fertőzések metabolomikai vizsgálatának sematikus ábrázolása

(Wildman *et al.*, 2023 munkája nyomán)

Előrejelzések szerint 2050-re jelentősen megnő a rezisztens baktériumokkal fertőzöttek száma, ezzel komoly veszélyt jelentve a globális egészségre (Ding *et al.*, 2022). Számos esetben a Gram-negatív légúti baktériumok által kiváltott nozokomiális infekciók kezelése jelenti a legnagyobb kihívást. Az antibiotikum rezisztens légúti fertőzések jelentősen megnövelik a kórházi kezelési időt és költséget, illetve az

elhalálozás valószínűségét (Oliveira & Reygaert, 2022; Khataybeh *et al.*, 2023). COVID-19 fertőzésen átesett, kórházban kezelt betegeknél a biofilmképző *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, és *Acinetobacter baumannii* törzseket izolálták a legnagyobb mennyiségben (Wei *et al.*, 2023; Antuori *et al.*, 2023). Egyes baktériumtörzsek közvetlenül a gyulladásos sejtekre és citokinekre hatnak, így károsítva a gyulladásos válaszreakciót (Kelly & McLoughlin, 2020). Emellett a megbetegedést előidéző baktériumok a légutak egyéb területeit vagy akár más szerveket is kolonizálhatnak, helyi gyulladást indukálva. A *H. influenzae*, a *H. parainfluenzae* és a *S. pneumoniae* törzsek a *Neisseria meningitidis*-hez hasonlóan a garatban és az orrgaratban kolonizálódnak, ennek ellenére általában középfülgyulladást okoznak. A *N. meningitidis* a központi idegrendszerbe jutva a sokkal súlyosabb lefolyású és számos esetben szövődményekkel járó agyhártyagyulladás gyakori kiváltója, leginkább 5 éven aluli gyermekeknél (Singer *et al.*, 2024). Az antibiotikum rezisztens baktériumtörzsek által okozott fertőzések kockázat-előrejelzési modellje várhatóan javulni fog, mivel egyre több kutatás irányul a természetes eredetű antibakteriális hatású szerekre.

2.2. A bakteriális biofilmek jellegzetességei

A földi élet legsikeresebb formái közé tartoznak a baktériumok, hiszen jelentős biomasszával rendelkeznek és alkalmazkodó képességük egyedülálló. Számos élőhelyet benépesítettek, beleértve a sós, az extrém hideg, a meleg, a savas és lúgos közegeket, illetve az erős ultraibolya (UV) vagy radioaktív sugárzásnak kitett területeket egyaránt. A baktériumsejtek biofilmbe rendeződése előnyt jelent a túlélés szempontjából a planktonikus formához képest (Rampelotto *et al.*, 2013; Yan & Bassler, 2019; Schmalz & Cieplik, 2021). A biofilmeket egy vagy több baktérium törzs alkotja, amelyek biotikus/abiotikus felületekhez vagy határfelületekhez tapadhatnak. Az újabb kutatások azt is felismerték, hogy a kitapadás folyamata nem előfeltétele a bakteriális biofilm létrejöttének (Van Hoecke *et al.*, 2016; Flemming *et al.*, 2021), a mikroba sejtek összekapcsolódása az extracelluláris polimer anyagok mátrixán keresztül zajlik. Emellett az anyagcsere is a sejtek közötti kötőanyag-mátrix csatornáin keresztül történik, de egyes baktériumok nanocsöves csatornákon át közvetlenül is kommunikálnak, citoplazmatikus komponenseket cserélnek. A biofilm kialakításában szerepet játszó génállomány eltérő lehet a különböző baktériumfajok esetén (Dubey *et al.*, 2016; Bhatt *et al.*, 2023). A biofilmbe rendezett életforma lehetővé teszi a genetikai anyag cseréjét is, illetve a

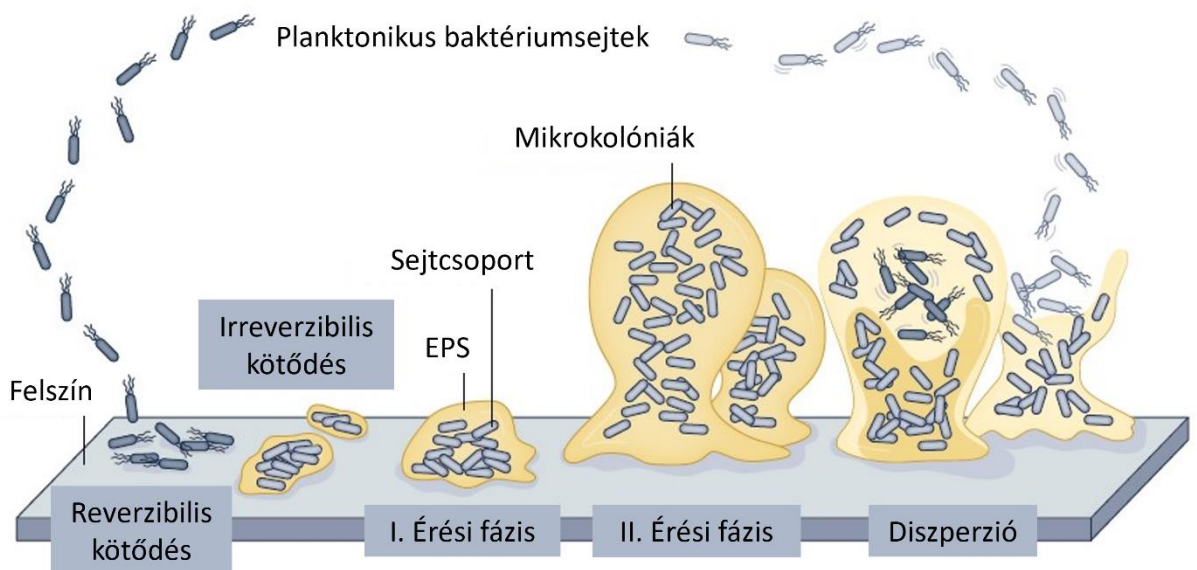
tápanyagok könnyebb felvételét. A bakteriális sejtek akár szintetikus szennyező anyagokat is képesek kizárólagos táplálékforrásként hasznosítani. A biofilmben rendeződés védelmet nyújt a baktériumtörzseknek az UV sugárzással, az extrém pH-val, a szélsőséges tápanyagszinttel és hőmérséklettel, továbbá a különböző toxikus vegyszerekkel és antibiotikumokkal szemben egyaránt (Schmalz & Cieplik, 2021; Bhatt *et al.*, 2023). Egyes biofilmképző baktériumfajokat xenobiotikumok környezetből való eltávolításához is alkalmaznak, az eljárás quorum sensing (QS) és quorum quenching (QQ) mechanizmusok segítségével szabályozható (Mishra *et al.*, 2021; Sonawane *et al.*, 2022). Ezzel ellentétben a bakteriális biofilmek beültetett eszközökön pl. katétereken, implantátumokon, illetve emberi szöveteken megtapadva súlyos tüneteket okozhatnak. Mindemellett ma már a felületekhez nem kapcsolódó bakteriális biofilmek jelentőségét is elismerik. Elsősorban a cisztás fibrózisban szenvedő betegeknél figyeltek fel erre a problémára és detektáltak *in vivo* biofilmet jelző baktérium-aggregátumokat. A tüdő mukociliáris clearance rendszerének nem megfelelő működése következtében sűrű váladék vonja be a tüdőhólyagocskák epithel sejtjeit, amely megfelelő közeget biztosít a baktériumok elszaporodásához. Hasonlóképpen a tartós légyszöveti fertőzéseknél vagy a savós középfülgyulladásban szenvedő gyermekeknél is megfigyelték a felülethez nem tapadó baktériumkolóniák megjelenését. Utóbbi esetben nemcsak a középfül nyálkahártyáján, hanem a középfül folyadékában is képződött bakteriális biofilm (Van HoECKE *et al.*, 2016; Sauer *et al.*, 2022).

2.2.1. Az érett biofilm kialakulása

A biofilmképződésért beindításért különböző környezeti és genetikai tényezők felelősek. A pH, a hőmérséklet, a tápanyag elérhetősége, illetve a környezeti stressz mind fontos szerepet játszanak ennek a védelmi mechanizmusnak az aktiválásában. A szabadon lebegő, planktonikus baktériumsejtek és a biofilmet alkotó sejtek génjei, illetve az általuk expresszált fehérjék eltérnek egymástól. Ez nem is meglepő, hiszen a biofilm érése egy rendkívül összetett és szabályozott folyamat (Rather *et al.*, 2021; Sauer *et al.*, 2022).

A jelenleg általánosan elfogadott modellben a biofilm kialakulása ciklikus, öt szakaszból áll és progresszív módon megy végbe (2. ábra). A fejlődési fázisok a következők: reverzibilis, majd irreverzibilis kötődés, ezt követi a biofilm érése (I. és II. fázis) és végül a diszperzió (Sauer *et al.*, 2002; Petrova & Sauer, 2009). A biofilmképződés első és egyik legfontosabb lépése a planktonikus baktériumsejtek adott

felületen történő kitapadása. A reverzibilis kötődés általában specifikus adhezineken keresztül zajlik, majd a longitudinális kapcsolódás következik. Az irreverzibilis kötődés során csökken a flagellumok génexpressziója és megkezdődik a biofilm mátrix komponenseinek előállítása (Gupta *et al.*, 2013). A *P. aeruginosa* esetén aktiválódik a *algC* gén, amely beindítja az alginát bioszintézist. Ebben a szakaszban további két poliszacharid, a Psl (pentaszacharid) és a Pel (glükózban gazdag poliszacharid) termelődése is megfigyelhető. Az antibiotikum-rezisztencia kialakulásában fontos szerepet játszó β -laktamáz és fenazin képződése szintén jelentős (Davies & Geesey, 1995; Bagge *et al.*, 2004; Colvin *et al.*, 2012). A biofilm érésének első stádiumában sejtcsoportok jönnek létre, amelyek beágyazódnak a biofilm mátrixába és idővel egyre több rétegből állnak. A biofilm kezdeti vastagsága kb. 10 μm , majd az érési folyamat végére, a mikrokolóniák kialakulásakor a biofilm akár a 100 μm -es vastagságot is elérheti (II. érési fázis). A diszperzió során elindul a mátrixkomponensek degradálódása, miközben baktériumsejtek vagy bakteriális biofilm darabok válnak le. A diszpergált sejtek mozgékonyak és már hordozhatják az adott antibiotikum-rezisztencia gént. A metabolikusan inaktív perzisztáló sejtek differenciálódása és a biofilm másodlagos helyekre való szétterjedése a krónikus, illetve visszatérő fertőzések fő oka a kezdeti fertőzés antibiotikumos kezelését követően (Petrova & Sauer, 2009; Gupta *et al.*, 2016).



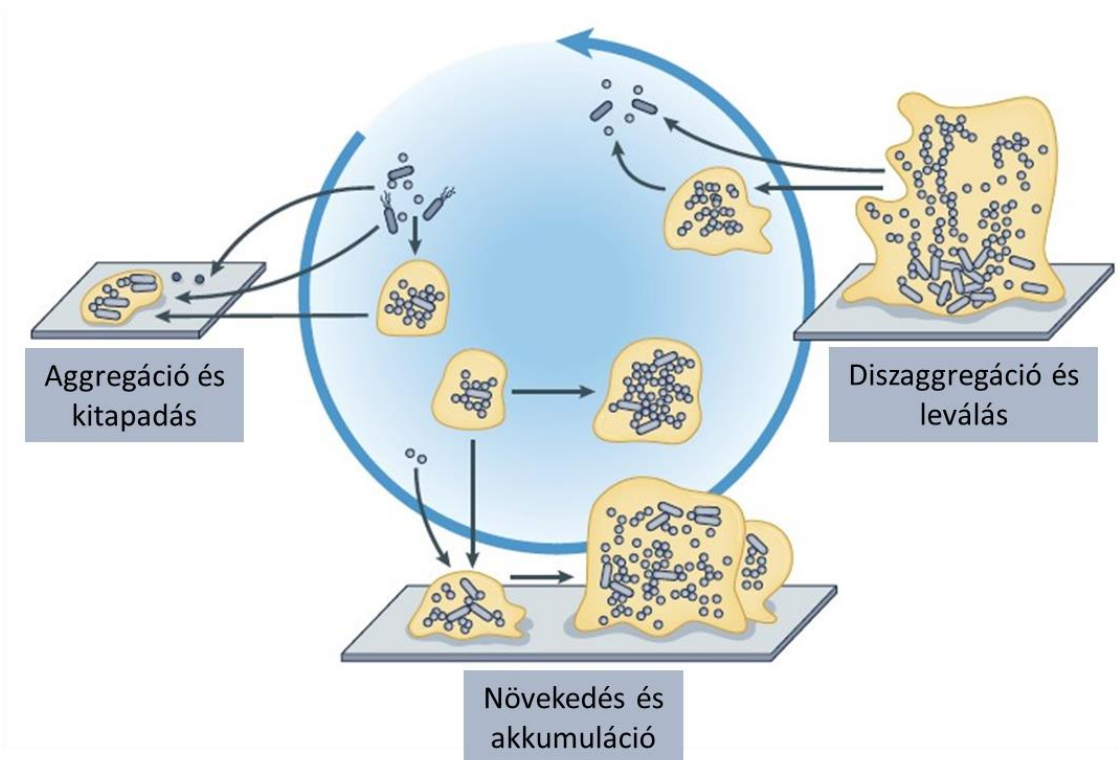
2. ábra: Az eredeti ötlépcsős biofilmérési modell (EPS: extracelluláris poliszacharid)

(Stoodley *et al.*, 2002 munkája nyomán)

A sematikus, *P. aeruginosa in vitro* biofilmérésén alapuló modell könnyen érthető és széles körben alkalmazzák a biofilmek kialakulásának leírásához, azonban a valós ipari, természeti és klinikai környezetben a biofilmek jelentősen összetettebbek és eltérő tulajdonságokkal rendelkezhetnek, mint mesterséges körülmények között. Egy vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a laboratóriumban tenyésztett tiszta baktériumtörzsekkel ellentétben a *K. pneumoniae* vagy *P. aeruginosa* biofilmek jelentősen vastagabbak voltak *in situ* körülmények között. Az élő szervezetben a biofilmképző baktériumtörzsek általában kevert biofilmekben vannak jelen (Liu *et al.*, 2017). Az ötlépcsős modell hiányossága, hogy nem veszi figyelembe a felülethez nem kapcsolódó aggregátumokat, amelyeket klinikai környezetben gyakran izolálnak. Mindemellett megkérdőjelezhető, hogy a biofilmképződés leírható-e valódi fejlődési folyamatként, hiszen *in vivo* környezetben nehezebb a mikrokolóniák tanulmányozása. Nincsenek beépíthető *in situ* érzékelők ezekben a komplex rendszerekben a biofilmek közvetlen monitorozására, a mintavételek során csak egy pillanatképet kapunk a mikrobaközösségek adott állapotáról (Sauer *et al.*, 2022).

A Sauer és munkatársai (2022) által kidolgozott új modell számol más baktériumsejtek beáramlásával, a felületektől függetlenül létrejövő aggregátumokkal, illetve az adott mikrokörnyezet változatosságával (3. ábra). Ennek köszönhetően az *in vitro*, *in vivo*, illetve *in situ* rendszerekben egyaránt alkalmazható a frissített biofilmérési modell. Megvalósul a baktériumsejtek cseréje a felszínhez rögzített (külső gyűrű) és a szabadon úszó (belső gyűrű) biofilmek között. A baktériumok bármely ponton beléphetnek a modellbe, ezzel kiküszöbölve a korábbi ötlépcsős változat limitációját.

Aggregáció és kitapadás: A baktériumsejtek kapcsolódnak egymással, vagy egy adott (biotikus vagy abiotikus) felülethez kötődnek. Növekedés és akkumuláció: Az aggregált és kitapadt baktériumkolóniákat egyre több baktériumsejt alkotja. Diszaggregáció és leválás: A baktériumok planktonikus formában vagy kisebb csoportokban leszakadnak az érett biofilmről. Ez a három esemény reprezentálja leginkább a biofilmek kialakulásának folyamatát.



3. ábra: A biofilmképződés újragondolt modellje
(Sauer et al., 2022 munkája nyomán)

2.2.2. A biofilmek felépítése

A biofilmen belül a baktériumsejtek egy extracelluláris mátrixba ágyazódnak be, amely különböző extracelluláris polimer anyagokból áll, beleértve az exopoliszacharidokat, fehérjéket, nukleinsavakat és lipideket. Az extracelluláris poliszacharidok gyakran meghatározzák a biofilm háromdimenziós szerkezetét és biztosítják annak integritását és kohézióját. Ezenkívül hozzájárulnak az antibiotikum-rezisztencia kialakításához és a biofilmképző baktériumok védelméhez. Az extracelluláris mátrix lehetővé teszi a tápanyagok felhalmozását a környezetből, illetve a baktériumok pusztulását követően a sejtanyag felszabadulását. A mátrixban jelen lévő extracelluláris DNS (eDNS) elősegíti a baktériumsejtek közötti koherencia megőrzését a biofilmképződés korai szakaszában (Flemming & Wingende, 2010; Lv et al., 2023). Ezekben a mikroközösségekben a baktériumsejtek pleiomorf viselkedést mutatnak, megváltoztatják a morfológiájukat, koordinálják a génexpressziót és heterogén módon differenciálják a metabolikus funkciókat. Ezek a folyamatok számos tényező hatására következnek be, a baktériumok populációsűrűsége és az ehhez kapcsolódó quorum

sensing mechanizmus szabályozza a génexpressziós kaszkádokat a környezeti stressz mellett. A kiváltó stressz lehet az immunrendszer, az oxigén és/vagy tápanyag ellátásban bekövetkezett változás, illetve valamilyen farmakon. A mikrokólóniák ellenállóképességét tovább fokozhatja a virulenciafaktor moduláció, az antimikrobiális szekvesztervegyületek megosztása, illetve az interspecifikus szinergikus kölcsönhatások létrejötte a különböző baktériumtörzsek sejtjei között (Weeks *et al.*, 2021).

Míg a bakteriális biofilm felépítését segítő mátrix specifikus egy adott baktériumfajra nézve, addig a funkciót tekintve a közösségbe szerveződés minden esetben a baktériumsejtek védelmét szolgálja. A biofilmek mikroszkópos vizsgálata felfedte, hogy az exopoliszacharidok megnyúlt vagy elágazó fonalakként segítik a baktériumsejtek összekapcsolódását vagy valamilyen felszínhez történő kitapadását. A poliszacharidok felhalmozódása molekuláris szuperragasztóként működik, elősegítve a kolonizációt. A streptococcusok biofilmjében található extracelluláris poliszacharidok különböznek a genus egyes tagjaira jellemző klasszikus tokpoliszacharidoktól. Különösen a pneumococcusokra jellemző, hogy a tokpoliszacharidok nagy mennyisége megzavarja a biofilmképződést, a tokot nem termelő törzsek sokkal jelentősebb mértékben képesek a biofilm képzésére, mint a tokkal rendelkezők (Nwodo *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2020). A legtöbb információ a *Streptococcus* genust tekintve, a *Streptococcus mutans* biofilmjének exopoliszacharidjairól áll rendelkezésre, ezek főként glükánokból állnak, amelyeket specifikus glikozil-transzferázok szintetizálnak (Koo *et al.*, 2010). Az eDNS nagyon hasonlít a biofilmben jelenlévő baktériumfajok genomiális DNS-éhez és a baktériumsejtek lízise során szabadul fel. Szerepet játszik a tapadásban és elengedhetetlen a biofilm stabilizálásában, illetve fenntartásában. Ezenkívül az eDNS védelmet nyújt az antimikrobiális peptidekkel szemben és kétértékű kationok ellen kelátképzés révén. Amikor nukleázokat (pl. DNáz I) adtak a streptococcusok (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes* és *S. viridans*) biofilmjéhez, megfigyelhető volt a már kialakult struktúra szétesése, illetve a biofilmképződés gátlása (Hall-Stoodley *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2020). A bakteriális biofilm szintén nélkülözhetetlen komponensei az extracelluláris fehérjék, amelyek strukturális szerepet töltenek be és segítik a mátrix lebomlását, szétesését és újraszerveződését. A Gram-pozitív baktériumok által expresszált fehérjék közös tulajdonsága az amiloidképző képességük, ilyen fehérje a *Staphylococcus aureus* esetén a BAP vagy a *S. mutans* baktériumnál a P1. Az amiloid fehérjék, amelyek oldhatatlan rostokká állnak össze, támogatják a sejtaggregációt a biofilmképződés során (Oli *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2020). A streptococcusoknál a fibrilláris fehérjék másik formája a

pilus, amely egy erősen strukturált sejtfelszíni függelék. A *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* vagy a *Streptococcus agalactiae* törzseknél egyaránt részt vesz az adhéziós és inváziós folyamatokban, kritikus virulenciafaktor. A biofilm mátrix azonban nem csak fibrilláris fehérjéket tartalmaz, a glükánköti fehérjék a *S. mutans*-ban jelentős szerepet játszanak a biofilmképzésben, mivel elősegítik az aggregációt és a biofilm-kohéziót (Matsumoto-Nakano, 2018). Az extracelluláris enzimfehérjék a mátrix lebontását végzik, majd segítik egy új biofilm életciklusának beindítását. A biopolimerek lebomlása energiát és szénforrást szolgáltat a biofilmeket alkotó baktériumsejteknek, különösen a tápanyagszegény időszakokban (Kaplan. *et al.*, 2003).

A *S. pneumoniae* és a *H. influenzae* törzsek egyaránt az emberi orrgarat kommenzálisai. A fertőzések felső légúti megbetegedések esetén több kutatás is kimutatta a két baktériumfaj kevert biofilmjének jelenlétét a fertőzött szöveteken. A köztük lévő kölcsönhatásokat befolyásoló konkrét tényezőket még nem azonosították, de a szinergikus kapcsolatnak köszönhetően, sokkal nehezebb ezen fertőzések felszámolása. A kolonizált szövetben együttesen hoznak létre kiterjedt extracelluláris mátrixot, amely mindkét baktérium számára előnyös (Tikhomirova & Kidd, 2013; Verme *et al.*, 2019). A *H. influenzae* biofilmképzésében a lipooligoszacharidok, illetve a Hap, HMW1 és HMW2 fehérjék vesznek részt aktívan, továbbá a IV-es típusú pilust is a baktérium mátrixának részeként azonosították. Ez a fehérjékből felépülő csőszerű képlet nagyban hozzájárul a biofilm stabilitásához, illetve DNS-kötő szerepe kulcsfontosságú az érett biofilm kialakulásában (Weeks *et al.*, 2021; Xiao *et al.*, 2023).

A *P. aeruginosa* baktériumnál detektálták először a biofilm jelenlétét (Høiby, 1977) és ennek köszönhetően felépítését számos kutatócsoport vizsgálta. A legtöbb információt a szerkezeti stabilitást biztosító poliszacharidokról tudjuk, ezek közé tartozik az alginát, a Psl és a Pel. Az alginát egy el nem ágazó polimerlánc, amely D-mannuronsavból és L-glükuronsavból áll. Ez a polimer elengedhetetlen a biofilm szerkezetének védelméhez, illetve hozzájárul a mátrix víz- és tápanyagtartalmának megőrzéséhez. A másik két poliszacharid szintén fontos szerepet játszik a biofilm kialakulásának kezdeti szakaszában, mivel elsődleges szerkezeti vázként szolgálnak. A Psl egy pentaszacharid, amely ismétlődő D-mannóz, L-ramnóz és D-glükóz maradékokból áll, míg a Pel egy glükózzal dúsított poliszacharid, de pontos összetétele még nem ismert (Thi *et al.*, 2020; Vetrivel *et al.*, 2021). Az alginát, Psl és Pel poliszacharidok szintézisét a bisz-(3-5)-ciklikus dimer guanozin-monofoszfát (c-di-GMP) szabályozza, amely egy intercelluláris másodlagos hírvivő és széles körben elterjedt a baktériumokban. A c-di-GMP magasabb

koncentrációja elősegíti az alginát és Pel poliszacharidok termelődését, alacsonyabb koncentrációja pedig fokozza a baktériumok mozgékonyágát. Azonban a pontos mechanizmus, amely szabályozza ezen poliszacharid prekursorok polimerizációját még feltárásra vár. A poliszacharidok a genom egyedi helyein kódoltak, az alginátot egy 12 génből, a Pel-t egy 7 génből, a Psl-t pedig egy szintén 12 génből álló operon kódolja (Lee *et al.*, 2007; Vetrivel *et al.*, 2021). A *P. aeruginosa* esetében az azonosított mátrixfehérjék körülbelül 30%-a külső membránfehérje. Nagy részük a külső membrán vezikuláiban termelődik, míg kisebb arányban a lizált sejtekből származnak. A CdrA (PA4625) fehérjéről megállapították, hogy biztosan a biofilm mátrix szerkezeti komponense. Mindemellett a PA1804 hisztionszerű DNS-kötő fehérje jelenléte a mátrix proteomban alátámasztotta azt az elképzelést, hogy a DNS a mátrix egyik fő alkotóeleme (Toyofuku *et al.*, 2012).

2.2.3. A biofilmek gátlásának nehézségei

Annak ellenére, hogy egyre több ismeret áll rendelkezésünkre a biofilmekről, eliminálásuk folyamatos kihívást jelent a gyógyászatban. A terápia során mindig fennáll annak a veszélye, hogy a biofilmet alkotó egy-egy baktériumsejt túléli a megfelelő hosszúságú kezelést az antibiotikum magas koncentrációjának alkalmazása ellenére is (Ciofu *et al.*, 2022; Grooters *et al.*, 2024). Sebészeti beavatkozásra is szükség lehet, amennyiben van erre lehetőség, azonban a műtét is hatástalannak bizonyulhat, aminek eredményeképpen jelentős a mortalitás. A biofilmképző baktériumtörzsek több mint 500 000 halálesetért felelősek évente csak az USA-ban (Charani & Holmes, 2019).

Immunszuppresszált betegek esetén a bakteriális biofilmek az egész emberi szervezetben előfordulhatnak, a légzőrendszeren és az emésztőrendszeren kívül akár a szívben, szemekben vagy fülekben is létrejöhetnek a mikrokolóniák (Perry & Tan, 2023). A bakteriális fertőzések 65%-a, a krónikus sebek kialakulásának 80%-a a biofilmeknek köszönhető és az ilyen jellegű megbetegedések száma folyamatosan nő. Egyre több biofilm ellenálló a tipikus antibiotikumokkal szemben, ezáltal késleltetve a gyógyulási időt és növelve az invazív beavatkozások szükségességét. A biofilmképző baktériumok eliminálásának nehézsége problémát jelent az invazív gyógyászati termékek és protézisek tervezésekor egyaránt. A katéterezett és intubált betegek körében sokkal gyakrabban okoznak komplikációkat a biofilmek (Ielapi *et al.*, 2020; Grooters *et al.*, 2024), így amennyiben a fertőzést nem sikerül felszámolni, akkor az adott eszközt (pacemaker,

ízületi protézis) el kell távolítani, amely nagy kockázatot jelent. A közelmúltban végzett elemzések 280 milliárd dollárra becsülik a biofilmképző baktériumok által okozott infekciók globális hatását, így a betegek kilátásainak javulása mellett a pénzügyi költségek csökkentését is figyelembe kell venni egy új terápia kutatása során (Cámara *et al.*, 2022).

A nagymértékű ellenállóképességért a biofilmet alkotó sejtek metabolikus változásai és a gyógyszerek permeabilitását befolyásoló strukturális jellemzők tehetők felelőssé. A kezelés hatékonyságát jelentősen befolyásolja, hogy az antimikrobiális szer képes-e behatolni a heterogén szerkezetű biofilmbe. Ez nagymértékben függ az adott baktériális biofilm felépítésétől, illetve a választott antibiotikumtól. Az exopoliszacharidok mellett az e-DNS lehet a váz másik fontos alkotóeleme, amely hozzájárul a rezisztencia kialakításához (Vestby *et al.*, 2020; Panlilio & Rice, 2021). Az extracelluláris mátrix előállítása adaptív mechanizmus, szintézisét a baktériumok stressznek való kitettsége indukálja, beleértve az antibiotikumok jelenlétét. Az antibiotikum diffúziós képessége és koncentrációja, a terápia időtartama, illetve a biofilm vastagsága mind befolyásolja a mátrixon történő áthatolás hatékonyságát (Vazquez-Rodriguez *et al.*, 2018; Pinto *et al.*, 2020). Nem ideális esetben az antibiotikum terjedése lelassul és csapdába esik a biofilmben, aminek eredményeként a jelenlévő enzimek hatástalanítják. A terápia során sok esetben csak a választott antibiotikum szubklinikai koncentrációja diffundál a biofilmbe, amely a baktériumsejtek elpusztításához nem elég, azonban fokozhatja az antibiotikum-rezisztencia gének megjelenését (Rodis *et al.*, 2020). A baktériumsejtek horizontális géntranszferen (HGT) keresztül képesek egymásnak átadni ezeket a géneket, így az adott szerrel szembeni ellenállást nem szükséges nemzedékről nemzedékre kialakítani. A HGT során a baktériumsejt egy szabad DNS darabot vesz fel a környezetéből, amely integrálódik a genomba, majd az anyagcsere révén kifejeződhet. A genetikai anyag nem rokon baktériumok között is mozoghat, de effektív transzformációra csak a kompetens sejtek képesek. Minél nagyobb a biofilm biomasszája és minél több baktériumfaj alkotja, annál nehezebb eliminálni a biofilmet (Thomas & Nielsen, 2005; Panlilio & Rice, 2021). Az egyre növekvő rezisztencia visszaszorítása, illetve az antibiotikum-terápia sikerességének biztosítása érdekében mindenképpen szükséges a biofilmképzés csökkentése és/vagy a már érett biofilm roncsolása. A prevenció, a toleranciához vezető mögöttes mechanizmusok megértése és az innovatív stratégiák kidolgozása kulcsfontosságú lesz a jövőben (Grooters *et al.*, 2024).

A zónamodell szerint mindegyik baktérium reagál a mikrokozonyzetére, amely eltérő fiziológiai állapotokat eredményez ugyanazon a biofilmen belül. Több kutatás is alátámasztja, hogy a biofilm legmélyebb rétegei jutnak a legkevesebb tápanyaghoz, mégis a tápanyaghiányos zónák az antibiotikum-rezisztencia elsődleges forrásai. A tápanyaghiány elősegíti a perzisztáló sejtek kialakulását, amelyek lassan szaporodnak és toleranciát mutatnak az adott antibiotikummal szemben. Emellett a különböző zónák létezése indukálja az egyedi anyagcsereutak létrejöttét, amelyek szintén hozzájárulnak a rezisztenciához (Kirketerp-Møller *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022). Az antibiotikum-rezisztenciáért általában egy (maximum néhány) gén felelős, amely pl. a különböző káros anyagot kijuttató efflux pumpákat kódolja és ezek a pumpák döntő szerepet játszanak a biofilm képződésében is. A biofilmeken belüli fiziológiai heterogenitás magyarázza az efflux pumpák génexpressziós mintázatait, a specifikus antibiotikum-rezisztencia pumpák felülszabályozása a biofilmek felső, míg alulszabályozása a középső régióban valósul meg (Nishino *et al.*, 2021). A *P. aeruginosa* esetén az oxigénhiányos környezet növeli a baktérium ellenállóképességét az antibakteriális szerekkel szemben az efflux pumpák összetételének megváltoztatásával. Multidrog rezisztens, megnövekedett efflux aktivitással rendelkező baktériumtörzsek antibiotikum rezisztenciájának megakadályozására efflux pumpa gátlókat alkalmaznak. Ezek a vegyületek lényegesen csökkentik a toleranciát, illetve a biofilmképződést és ennek köszönhetően fokozzák az antibiotikumok hatékonyságát (Babin *et al.*, 2017; Zimmermann *et al.*, 2019).

A biofilm képződésének szabályozásához a quorum sensing mechanizmus (lokális sejtsűrűség érzékelés) is nagyban hozzájárul. A baktériumsejtek annak érdekében, hogy növeljék a túlélésük esélyét, folyamatosan kommunikálnak egymással szignálmolekulák segítségével. Elsőként egy magyar kutató, Tomasz Sándor fedezte fel a jelenséget a 60-as években *S. pneumoniae* sejteknél (Tomasz & Beiser, 1965; Preda & Săndulescu, 2019). A folyamat során a sejtsűrűség függvényében a baktériumpopuláció viselkedése megváltozik, együttesen olyan feladatok ellátására is képesek, amelyekre planktonikus formában nem lennének, QS szignálok is jelezhetik a DNS felvételét az extracelluláris térből. Megfigyelték, hogy a QS mechanizmus közvetlenül befolyásolja az antibiotikum-rezisztencia kialakítását a különböző efflux pumpák expresszióján keresztül, illetve „önindukciós körként” egy jelmolekula pozitívan befolyásolja a saját termelődését (Wang *et al.*, 2019; Grooters *et al.*, 2024). Mindemellett a QS nélkülözhetetlen mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív biofilmek esetén, de ezek eltérő módon szabályozottak: míg a Gram-negatív baktériumoknál főként homoszerin laktonok, addig a Gram-pozitív

közösségek esetén oligopeptidek figyelhetőek meg a QS rendszerükön belül. Mind a két molekula szerepet játszik a biofilmképződésben, ezáltal csökkentve a különböző antimikrobiális faktorok hatását, ez a kommunikáció irányítja a sejtosztódást és az extracelluláris polimer anyagok termelésének sebességét, amelyek az érett biofilm szárazanyag-tartalmának több mint 90%-át teszik ki (An *et al.*, 2019; Asma *et al.*, 2022).

Az antibiotikumok más szerekkel történő kombinálása, pl. N-acetil-ciszteinnel és rekombináns dezoxiribonukleáz I-gyel elősegíthetik az antibiotikumok behatolását a biofilmbe. Bizonyos vegyületek, beleértve a katechint, a protokatekusavat, illetve a vanillinsavat, szinergikus hatást fejtenek ki az antibiotikumokkal, gátolják a bakteriális adhéziót és ezáltal a biofilm termelődését (Belfield *et al.*, 2017; Bernal-Mercado *et al.*, 2020). Azonban a hagyományos antibiotikum-terápia továbbra is kihívást jelent, mivel az egyre magasabb dózisoknak köszönhetően a káros mellékhatások előfordulása is nő, így aktuálissá vált az alternatív kezelések mélyebb megértése. A természetes hatóanyagok vizsgálata mindenképpen sok lehetőséget rejt magában.

2.3. A méz általános jellemzése

A méz a mézelő méhek (*Apis mellifera*) által a növényi nektárból vagy élő növényi részek nedvéből, illetve növényi nedveket szívó rovarok által az élő növényi részek kiválasztott anyagából (mézharmat) gyűjtött természetes édes anyag, amelyet a méhek begyűjtenek, saját anyagaik hozzáadásával átalakítanak, raktároznak, dehidrálnak és lépekben érlelnek (Magyar Élelmiszerkönyv, 2009a). Összetétele függ a méhek táplálkozásától, a botanikai és földrajzi eredettől, az időjárási viszonyoktól, a kaptáron belüli páratartalomtól, a kezelési és tárolási feltételektől. A méz egy túltelített cukoroldat, amely több mint 180 különböző komponenst is tartalmazhat, nagyobb mennyiségben szénhidrátokat, kisebb arányban fehérjéket, enzimeket, amino- és szerves savakat, lipideket, vitaminokat, ásványi anyagokat, ízanyagokat és polifenolos vegyületeket (Tafere, 2021).

2.3.1. A méz összetétele

A méz az egyszerű szénhidrátok forrása, amelyből a gyümölcscukor (fruktóz – kb. 40%) és a szőlőcukor (glükóz – kb. 35%) az össz-szénhidrát-tartalom körülbelül 60-80%-át teszi ki a méz fajtájától függően. Összetett cukrok (oligoszacharidok és

poliszacharidok) is megtalálhatóak benne, de jóval kisebb mennyiségben. Ezek közül a glükóz és fruktóz molekuláriszéből álló szacharóz (diszacharid) fordul elő leggyakrabban (Khan *et al.*, 2007). Az egyszerű cukrok arányát a mézben jelen lévő invertáz enzim is befolyásolja, mivel hatására a szacharóz idővel monoszacharid egységekre bomlik. Az enzim jelen van a nektárban, illetve a méhek testében egyaránt és mennyiségét jelentősen meghatározza a florális eredet. Minél magasabb az összetett szénhidrátok aránya a mézben, annál nagyobb a valószínűsége, hogy hamisított termékről van szó. Azonban a kisebb invertáz tartalommal rendelkező mézek teljesen természetes módon is rendelkezhetnek nagyobb diszacharid mennyiséggel, ebből fakadóan a cukortartalom alapján nagyon nehéz biztosan megállapítani az adott fajtamérről, hogy hamisított-e. Minden esetben több eltérő vizsgálat szükséges a mézek eredetének feltárásához (Di Pasquale *et al.*, 2013; Tafere, 2021). A mézben előforduló poliszacharidok részben nektár eredetűek, másik részük a méz érése során keletkezik a méhek által termelt enzimek vagy különböző savak hatására. A mézben megtalálható egyéb cukrok (a maradék kb. 20%): maltóz, izomaltóz, nigeróz, turanóz, maltulóz, α és β -trehalóz, laminaribióz, maltotrióz, 1-kesztóz, panóz, izopanóz, izomaltulóz, erlóz, izomaltozil-trióz, centóz stb. (Gündoğdu *et al.*, 2019).

A méz fehérjetartalma elsősorban a méhek garatmirigy váladékából, a szabad aminosavak nagy része pedig a virágporból származik. A mézek fehérjetartalma a 0,1%-tól egészen a 3,3%-ig terjedhet. A főként Európában jellemző *A. mellifera* méhek által feldolgozott és érlelt mézeknek kisebb a fehérjetartalma, ezek általában nektár eredetű mézek. Az Ázsiában őshonos *Apis cerana* méhek több mézharmatot gyűjtenek és magasabb fehérjetartalmú mézet állítanak elő. A mézben megtalálható aminosavakból nem tudunk következtetni a méz botanikai eredetére, mivel a pollenben előforduló aminosavakból a méhek a számukra esszenciálisakat felhasználják. Így lehetséges, hogy a prolin teszi ki az mézben előforduló aminosavak 50-60%-át (Won *et al.*, 2008; Machado De-Melo *et al.*, 2018). A méz akár az összes esszenciális aminosavat is tartalmazhatja és napjainkra már több mint 24 különböző aminosavat azonosítottak benne, de ezek aránya eltérő lehet a méz fajtájától függően. A mézben megtalálható aminosavak a következők lehetnek: aszparaginsav, glutamin, hisztidin, glicin, treonin, α -alanin, β -alanin, arginin, aminovajsav, prolin, tirozin, valin, metionin, cisztein, leucin, izoleucin, triptofán, fenilalanin, ornitin, lizin, szerin, aszparagin, alanin stb. (Hermosin *et al.*, 2003; Gündoğdu *et al.*, 2019). A mézben lezajló változásokért főként az enzimatis aktivitás tehető felelőssé, az enzimek mennyisége sok esetben meghatározhatja a gyógyászati célra

szánt mézek hatékonyságát. Fontosabb enzimek közé tartozik az invertáz, a diasztáz, a kataláz, illetve a glükóz-oxidáz enzim. A diasztáz a keményítőtartalom eliminálásáért felel, míg a kataláz a mézben jelen lévő hidrogén-peroxidot fogja vízre és oxigénre bontani, a glükóz-oxidáz a mézben található glükózt alakítja glükonsavvá.

A méz vitamin- és ásványianyag-tartalma nagyon alacsony és sok esetben mesterséges úton fokozzák ezeknek az összetevőknek a mennyiségét. A benne előforduló, vízben oldódó vitaminok közé tartozik pl. a C-vitamin (aszcorbinsav), illetve a B-vitaminok jelentős része. A kálium adja a méz teljes ásványianyag-tartalmának csaknem egyharmadát, de tartalmaz még nátriumot, vasat, rezet, szilíciumot, mangánt, illetve kalciumot és magnéziumot is kis mennyiségben (Alqarni *et al.*, 2014; Gündoğdu *et al.*, 2019). Az ásványianyag-tartalom a földrajzi eredet jelzőjeként játszhat szerepet, függetlenül a méz botanikai eredetétől. Megfigyelték, hogy a savanyú talajokról származó mézek ásványianyag-tartalma magasabb, ellentétben a bázikus területeken vizsgált mézmintákhoz képest. A környezetből vagy a tárolás és kezelés során toxikus nehézfémek (pl. ólom), peszticidek, illetve gyógyszermaradványok is belekerülhetnek a mézbe (Solayman és mtsai. 2016).

Összefüggést találtak a mézek ásványianyag-tartalma és antioxidáns hatása között, hasonlóan mint a polifenolos vegyületek jelenléte esetében. Minél magasabb a méz fenolos komponenseinek aránya, annál jelentősebb antioxidáns kapacitással rendelkezik. Az antioxidáns tulajdonság egy sötétebb színű méznél kifejezettebb, mivel ezek a növényi eredetű másodlagos anyagcsere-termékek nagyobb mennyiségben találhatóak meg benne, mint egy világosabb mézben (Moniruzzaman *et al.*, 2013). A polifenolos vegyületeket kemotaxonomiai markerként használják és a mézek florális eredetének igazolásában is szerepet játszhatnak, azonban a méz antioxidáns kapacitása több vegyület együttes hatásának eredménye. A polifenolos komponensek mellett pl. az aszcorbinsav és karotinoidszerű vegyületek is részt vesznek a reaktív oxigéngyökök (ROS) semlegesítésében (Gorjanović *et al.*, 2013; Tafere, 2021).

A méz illóanyagainak nagy hányada szintén a növényekből származik és csak minimális mértékben a méhekből. Ezek a komponensek meghatározzák a méz aromáját, illetve ugyancsak markervegyületként szolgálhatnak a mézek azonosítása során. A méz illékony anyagainak kutatása az 1960-as években kezdődött és azóta kb. 600 vegyületet identifikáltak és jellemeztek. Három fő csoportot különíthetünk el: terpén-származékok, nor-izoprenoidok és benzol-származékok (Bogdanov *et al.*, 2004; Peña és mtsai., 2004).

A hidroximetil-furfurol (HMF) egy hat szénatomból álló heterociklusos szerves vegyület, amely aldehid és alkohol funkciós csoportokat egyaránt tartalmaz. A mézben megtalálható hexózokra jellemző, hogy savas közegben hidroximetil-furfurollá bomlanak. Ez a szilárd, sárga színű, alacsony olvadáspontú és vízben jól oldó vegyület elsősorban a fruktóz bomlásterméke, szobahőmérsékleten lassan és természetes módon keletkezik a méz tárolása során, azonban melegítés hatására a termelődése felgyorsul. Már a 35°C-on történő tárolás is olyan HMF-szint növekedéshez vezet, amely lényegesen meghaladja a megengedett határértéket (40 mg kg⁻¹) (Mouhoubi-Tafinine *et al.*, 2018; Shapla *et al.*, 2018). Ezenkívül a méz hevítése során számos olyan összetevő is lebomlik, amely a méz értékét adja, köztük a polifenolos vegyületek. Minél magasabb a méz HMF értéke, annál gyengébb a minősége és a vegyületnek a magas koncentrációja invert cukorral való hamisításra is utalhat, nagy mennyiségben elfogyasztva citotoxikus lehet (da Silva *et al.*, 2016; Shapla *et al.*, 2018).

A szerves savak a méz 0,57%-át teszik ki és javarészt ennek köszönhető az enyhén savas pH. Már a nektár savtartalma is kimagasló, de a méz érlelése során még inkább feldúsul a mennyiségük. A méz glükonsav tartalma a legmagasabb, de kisebb mennyiségben ecetsav, citromsav, hangyasav, tejsav, maleinsav, almasav, oxálsav, piroglutaminsav, borostyánkősav is felhalmozódik benne (Puścion-Jakubik *et al.*, 2020). A pH érték kialakulásánál a szabad savtartalom mellett a foszfátok, karbonátok és az ásványi sók is fontos szerepet játszanak. A mézek pH értéke 3,2 és 4,5 között változik (Tafere, 2021).

2.3.2. A méz érzékszervi és fizikai tulajdonságai

Az érzékszervi ismertetőjegyek, mint például a méz színe, illata és íze is alapvetőek a minőség és az eredet meghatározásánál. Ezen sajátosságokat is számos tényező befolyásolja többek között, hogy milyen növényi eredetű komponenseket (polifenolos vegyületek, illóanyagok) tartalmaz az adott méz. A szín az egyik legváltozóbb paraméter, amely spektrofotometriásan, illetve színkoloriméter segítségével determinálható. Megkülönböztethetünk vízfehér, fehér, sárga, zöldessárga, világos borostyán, borostyánsárga, aranysárga, sötét aranysárga és fekete színek kategóriákat (Pontis *et al.* 2014). A magasabb ásványianyag-tartalmú, fenolos összetevőkben gazdag mézek sötétebb színűek, de ezek íze és illata is markánsabb, így a vásárlók többször választják a világosabb színű mézeket. A sötétebb színű mézekben a polifenolos vegyületek közül a

flavonoidok (pl. 6-flavonol, 4-flavonol, pinocembrin, pinobanksin, galangin, luteolin) a legfontosabb színezőanyagok és ennek köszönhetően gyógyászati értékük is magasabb lehet. A méz illatát az illékony vegyületek mellett a szerves savak és aminosavak típusa, illetve mennyisége is meghatározza (Pontis *et al.* 2014; Czipa *et al.*, 2015; da Silva *et al.*, 2016).

A mézszüret után a méz folyékony halmazállapotú, maximum mikrokristályokat tartalmaz. Idővel egyes fajtamézek kikristályosodnak és ezt a természetes folyamatot erősen befolyásolja a nektár forrása, a glükóz-fruktóz arány, illetve a tárolás időtartama és körülménye. A változás során a méz nem veszít a tápanyagértékéből, a fogyasztók mégis gyakran melegítik 40°C fölé a kristályos mézet, hogy újra folyékony állagot kapjanak, azonban ezzel egyidőben a jótékony komponensek aránya is csökken. A magasabb glükóz- és pollentartalom felgyorsítja az ikrásodást, ahogy a hidegebb hőmérsékleten történő tárolás is (da Silva *et al.*, 2016; Krishnan *et al.*, 2021). A leggyorsabban kristályosodó mézünk a repceméz: pergetés után 2-4 héttel már teljesen szilárd halmazállapotú lesz, ezzel szemben a fruktózban gazdag akácméz lassan ikrásodik, akár 1-2 évig is megőrzi állagát. A közepesen gyorsan kristályosodó napraforgóméz néhány hónapos tárolás után két fázisra válik szét: felül folyékony, alul kristályos (nagy, kemény kristályok jellemzik) (Ma *et al.*, 2017; Amariei *et al.*, 2020).

A méz alacsony víztartalma biztosítja a hosszú eltarthatóságát, a víztartalom nemzetközileg elfogadott határértéke 20% és amennyiben ennél nagyobb mennyiségben van jelen a víz, a méz romlásnak indul az élesztőgombáknak köszönhetően. A glükóz oldhatósága csekély, ennek eredményeképpen hamar kikristályosodik (25°C-on 909 g/l), míg a fruktóz 4,4-szer jobban oldódik vízben (25°C-on 4000 g/l), így az ikrásodás lelassul (Escuredo *et al.*, 2014; da Silva *et al.*, 2016). A 14% alatti víztartalom csak ritkán fordul elő, nagy szárazságok esetén jellemző. Ezzel szemben az ázsiai mézeknél a hamisítás egyik leggyakoribb oka a túlzottan magas páratartalom. Számos méhésznem engedi, hogy a méhek végezzék az átlagosnál nagyobb víztartalmú mézek szárítását, mivel ez hosszabb időt venne igénybe a kedvezőtlen méhészeti körülményeknek köszönhetően. Az éretlen, méznek még nem nevezhető anyag szárítása mesterségesen történik, az értékes összetevők nélkül (Chantawannakul *et al.*, 2018).

A mikroszkópos pollenanalízis és a pH érték meghatározása mellett az elektromos vezetőképesség megállapítása is segít a mézminták azonosításában, értéke összefügg az adott méz ásványianyag-tartalmával, ezért jelentős eltérések lehetnek az egyes fajtamézeknél. A méz elektromos konduktivitása pozitív korrelációt mutat a

káliumtartalommal, így a sötétebb, magasabb káliumtartalmú (és egyéb ásványi anyagokban is gazdag) mézeknél detektálták a legnagyobb értékeket. Amennyiben az elektromos vezetőképesség értéke az adott fajtaméznél jóval alacsonyabb a megszokottnál, abban az esetben felmerül a mézhamisítás gyanúja, hiszen a kémiai ionizálható komponensek (pl. ásványi anyagok, szerves savak) kisebb mennyisége utalhat cukorsziruppal történő „dúsításra”. A méz elektromos vezetőképessége a mézoldat 20 °C-on mért vezetőképességét jelenti és az eredményeket milli-Siemens per centiméter (mS/cm) egységben fejezzük ki (Persano Oddo & Bogdanov, 2004; Guler *et al.*, 2007; Yadata, 2014).

2.3.3. A méz antibakteriális hatása

Az Egészségügyi Világszervezet módosította a stratégiáját: a hagyományos orvoslást, illetve a természetes hatóanyagokat valódi alternatívának tartja a különböző betegségek kezelésében (WHO, 2013). A fejlett országokban is egyre többen választják a hagyományos orvoslást a modern helyett, de Kínában és Indiában ennek arányát 80%-ra becsülik. Az elmúlt években a gyógyszeripari termékek jelentős része is a modern orvoslásban alkalmazott olyan természetes anyagokból származott, amelyek biztonságosságát megerősítették, ilyen anyag például a méz (*Mel*, Ph.Hg.VIII.) (Khan *et al.*, 2018; Khataybeh *et al.*, 2023). Az emberiség korán felismerete a mézben rejlő lehetőségeket és már ősidők óta használja fertőzések, szív- és érrendszeri betegségek és égési sérülések esetén. Egészségünkre gyakorolt pozitív hatása főként antimikrobás, antioxidáns, gyulladáscsökkentő és sebgyógyító tulajdonságának köszönhető (Münstedt *et al.*, 2019; Ramsay *et al.*, 2019).

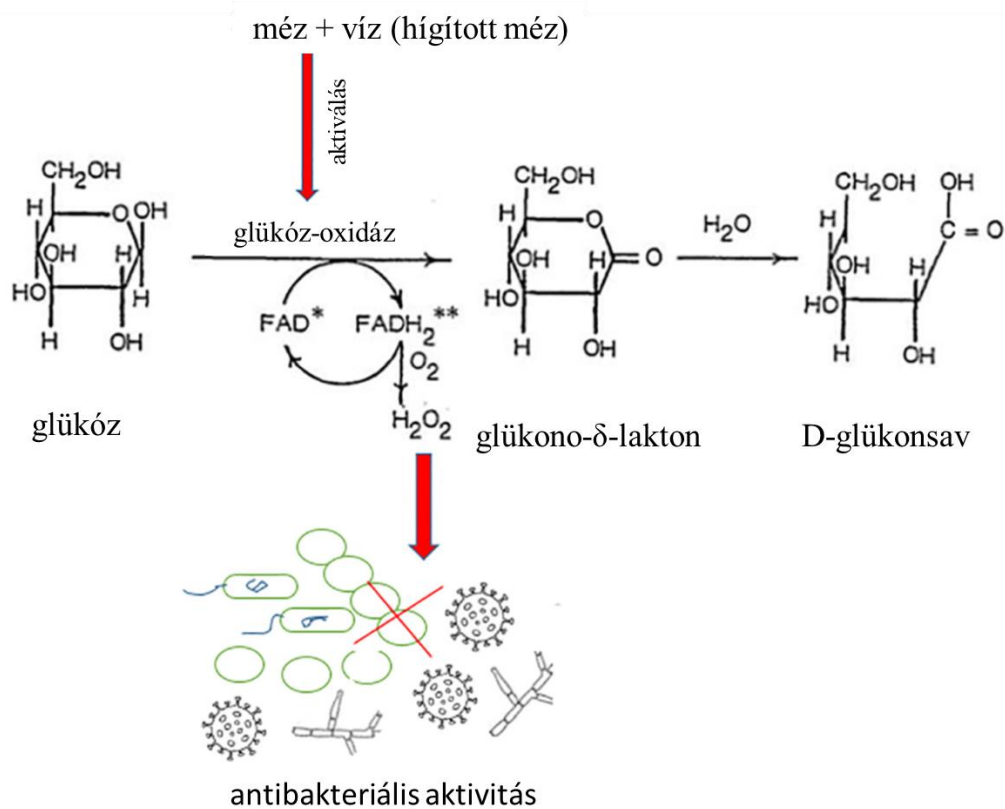
A méz koncentráltan tartalmazza a növények hatóanyagait, a méhek speciális enzimjeivel és hormonjaival keverten. Bizonyított antibakteriális aktivitása (Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok esetén egyaránt), illetve komplex hatóanyagösszetétele miatt ígéretes lehet egyes antibiotikum-rezisztens fertőzések felszámolásában. A baktériumtörzsek egyre több mechanizmust fejlesztenek ki az antibiotikum-rezisztencia gének megszerzése érdekében, ez pedig az alkalmazkodóképességük növekedéséhez vezet. Manapság világossá vált, hogy a komplexitás megnehezíti a baktériumok toleranciájának kialakulását, hiszen több különböző hatóanyaghoz való alkalmazkodás jóval időigényesebb és bonyolultabb feladat. Több kutatócsoport is beszámolt arról a tényről, hogy a baktériumok érzékenyek maradtak a mézzel szemben.

Egyik vizsgált törzs (pl. MRSA, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, streptococcusok) sem vált rezisztenssé a számos antibakteriális faktornak köszönhetően (Abuelgasim *et al.*, 2021; Holubová *et al.*, 2021).

A kutatók egyetértenek abban, hogy a méz antibakteriális hatásáért felelős fő komponensek a következők: hidrogén-peroxid (H_2O_2), polifenolos vegyületek (flavonoidok és fenolsavak) és a méh defenzin-1 peptid. A manuka méz az egyetlen fajtaméz, amely H_2O_2 helyett metilglioxál (MGO) vegyületet tartalmaz nagy mennyiségben. Ezenkívül a kifejezetten magas cukorkoncentráció (ozmotikus stresszt eredményez) és az alacsony pH egyaránt hozzájárul az antibakteriális aktivitáshoz. A különböző fajtamézek ezen tulajdonságait nagymértékben meghatározza a botanikai és földrajzi eredet, az adott terület éghajlati sajátossága és a tárolási idő (Kamal & Klein, 2011; Nolan *et al.*, 2019; Almasaudi, 2021).

A glükóz-oxidáz és a kataláz enzim szabályozza a hidrogén-peroxid termelődését, amelyet a méz fő antibakteriális hatóanyagaként tartanak számon. A glükóz-oxidáz enzimet a méh garatmirigy választja ki és feladata a glükóz glükonsavvá alakítása, amely folyamat melléktermékeként H_2O_2 keletkezik (4. ábra). A glükonsav hozzájárul a méz savasságához és ezáltal a mikrobák növekedésének gátlásához, míg a termelődő H_2O_2 jelentősen károsítja a baktériumsejteket (Khatami *et al.*, 2021). A glükóz-oxidáz enzim csak a méz hígítását követően aktiválódik, a maximális H_2O_2 -koncentrációt 15% és 50% (w/v) közötti mézhígításoknál figyelték meg. A baktericid hatásért felelős H_2O_2 idővel vízre és oxigénre bomlik, így mértéke csökken a növényi eredetű kataláz enzimnek köszönhetően. Ezek alapján feltételezhető, hogy az évekig tárolt mézek veszítenek a H_2O_2 tartalmából adódó antibakteriális hatásukból. Azonban a hidrolízis során keletkező oxigén reagálhat a polifenolokkal és felgyorsíthatja ezen vegyületek autooxidációját. Ennek köszönhetően a polifenolos vegyületek a baktériumok örökítőanyagának károsodásért felelős prooxidáns szerként működhetnek tovább. Az autooxidációs reakciói során keletkező ROS-ok a bakteriális DNS lebontásán keresztül gátolhatják a baktériumok szaporodását. A pH-érték is fontos paraméter, amely szintén meghatározhatja, hogy a polifenolok antioxidánsként viselkednek-e vagy antibakteriális hatásúak lesznek (Bucekova *et al.*, 2018; Brudzynski, 2020). Ezek a biológiailag aktív vegyületek a nektáron keresztül kerülnek a mézbe, aromás gyűrűvel és egy vagy több hidroxilcsoporttal rendelkeznek. A hidroxilcsoportok képesek kölcsönhatásba lépni a bakteriális sejmembránok molekuláival, amely a membrán foszfolipidjeinek és fehérjeinek részleges károsodását eredményezi. Ez a folyamat növeli a membrán

áthatolhatóságát és a sejtartalom kiömlését (sejtlízis), amely a baktériumsejt apoptózisához vezet (Liu *et al.*, 2020; Olas, 2020). A méz savassága is hatással van a membránfehérjékre, a permeabilitás megváltozásával létfontosságú ionok szivároghatnak ki (pl. káliumion) és ez egyaránt a baktériumsejtek pusztulását okozza. A kutatók a méhek több antimikrobiális peptidjét is azonosították, amely polimerek felelősek a méhállományok „immunitásáért”, képesek áthatolni a bakteriális membránon és megakadályozni a fehérjék feltekeredését. A defenzin-1 peptid a méhek nyálmirigyeiben szintetizálódik és a nektár feldolgozása során épül be a mézbe, jelenléte növeli a bakteriális membránok átteresztőképességét (pórusok létrehozásával) és ennek köszönhetően ugyancsak sejtlízis következik be (Borges *et al.*, 2013; Horak *et al.*, 2020). Amennyiben a mézet nem hígítják jelentős mértékben, addig a magas cukorkoncentráció okozta ozmózis is részt vesz az antimikrobás aktivitásban. Az ozmotikus nyomás hatására víz áramlik ki a baktériumsejtekből, amely azok kiszáradását és zsugorodását eredményezi. A baktériumok képtelenek túlélni a hipertóniás cukoroldatban. Egy fertőzés helyén jelentős lehet a testnedvek mennyisége, így a méz ezen tulajdonsága és az ebből adódó antibakteriális potenciálja csökken (Almasaudi, 2021).



4. ábra: Glükóz-oxidáz katalizálta hidrogén-peroxid (H₂O₂) termelődés a mézben
(Almasaudi *et al.*, 2021 munkája nyomán)

A méz biofilm-ellenes aktivitását is több kutatócsoport alátámasztotta, a hatóanyagok a biofilm mátrixba diffundálnak és a biofilm elpusztítása mellett megakadályozzák a további biofilmképződést az adhézión folyamatok gátlásával (Krishnakumar *et al.*, 2020; Khataybeh *et al.*, 2023). A H₂O₂ megzavarja a baktériumsejtek kitapadását és destabilizálja a mátrix szerkezetét, míg a defenzin-1 a kezdeti adhézió mellett az extracelluláris polimer anyagok termelődését is gátolja, amely végső soron a biofilmképződés szupressziójához vezet (Proaño *et al.*, 2021). A polifenolos komponensek megakadályozzák a baktériumsejtek egymáshoz kapcsolódását vagy adott felülethez (biotikus, abiotikus) történő rögzülését, ezzel megzavarva a biofilmképződés egyik legérzékenyebb lépését és gátolhatják az extracelluláris poliszacharidok szintézisét (Zamuz *et al.*, 2021). Sindi és munkatársai (2019) megfigyelték, hogy a méz képes csökkenteni a kevert biofilmen belül az életképes baktériumsejtek számát, illetve a mézes kezelés a metabolikus aktivitásra is jelentős hatással van.

A mézek terápiás felhasználásához elengedhetetlen a minőségük biztosítása. A méz szennyezett lehet különböző mikroorganizmusokkal, köztük a *Clostridium botulinum* és *C. tetani* endospóráival. Ezt a tényt sokszor figyelmen kívül hagyják, azonban egy esetleges fertőzés elkerülése érdekében fontos a gyógyászati célra szánt mézek sterilizálása (Chou *et al.*, 2018). A nektárt adó növényeket gyakran permetezik különböző gyomirtókkal és peszticidekkel, amely vegyületek a mézben is megjelennek, a környezetszennyezés, az ipari területekről származó nehézfémek, illetve a méhek antibiotikummal való kezelése szintén befolyásolhatja a méz minőségét. Ennek köszönhetően a méhészeknél vagy boltból vásárolt mézek biztonságosságára nincsen garancia, így terápiában alkalmazásuk előtt szükség lenne az „orvosi minőségű méz” egyértelmű meghatározására, amelyet globálisan elfogadnak (Hermanns *et al.*, 2019).

A különböző fajtamézek kataláz enzim mennyisége, hatóanyag-összetétele és ezzel összefüggésben komplex hatása is jelentős különbségeket mutathat aszerint, hogy mely növényfajról, illetve mely régióból származik az adott méz. Az antibakteriális és biofilm-ellenes aktivitást jelentősen befolyásolhatja a mézek kora, így elengedhetetlen annak a vizsgálata, hogy a tárolási idő milyen mértékben hat ezen tulajdonságokra. Ennek a meghatározásával választ kaphatunk arra a kérdésre, hogy a gyógyászati célra szánt mézeket meddig érdemes tárolni egy adott kezelés előtt. A méz biofilm-ellenes aktivitásának pontos hatásmechanizmusa további kutatómunkát igényel a bakteriális biofilmek komplexitása miatt.

2.4. A kísérletekben szereplő légúti baktériumok jellemzése

A leggyakrabban izolált, biofilmképzésre képes légúti baktériumok közé tartozik a *P. aeruginosa*, a *H. influenzae* és *H. parainfluenzae*, illetve a *S. pneumoniae* (Paramasivan *et al.*, 2020). A *P. aeruginosa* Gram-negatív opportunista patogén, a szerzett/nozokomiális tüdőgyulladások leggyakoribb oka, a betegeknél magas láz, köhögés és gennyes (sárgászöld) köpetürítés figyelhető meg. Amennyiben sikerrel jár az antibiotikum-terápia (az esetek többségében multirezisztens baktériummal szemben), a betegség szövődménye lehet a tüdőben kialakult üregek által elvesztett légzőfelület (Vetrivel *et al.*, 2021). A szintén Gram-negatív *Haemophilus* genus két speciose, a *H. influenzae* és a *H. parainfluenzae* is gyakori kolonizálói a légzőrendszernek, lokális és szisztémás fertőzéseket kiváltva komoly fenyegetést jelentenek az emberi szervezetre nézve. Biofilmtermelésüknek köszönhetően az antibiotikum-terápia számos esetben nem jár sikerrel (Wen *et al.*, 2020). Az eddig említett kórokozókkal ellentétben a *S. pneumoniae* Gram-pozitív baktérium és a megbetegedések tünetei elősorban a kialakuló gyulladásos reakcióknak köszönhetőek a mikroba invazivitása mellett (Sanchez *et al.*, 2010). A pneumococcus fertőzések során a baktérium megtapad a hörgők felületén és biofilmet hoz létre, ezáltal megnehezítve a fertőzés felszámolását. A biofilm struktúrák sokszor a tüdő egyes területein is megfigyelhetők (Domenech *et al.*, 2012).

2.4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Charles-Emmanuel Sédillot francia katonaoorvos volt az első, aki nagy valószínűséggel egy *P. aeruginosa* fertőzést írt le 1850-ben: megfigyelte, hogy a betegek sebészeti kötszerei mind a terepen, mind a kórházakban gyakran kékeszöld színűvé váltak és hársfa illatot árasztottak. A sebészeti bemetszések sokszor nyújtottak táptalajt a fertőzéseknek, főleg a legyengült immunrendszerű és alultáplált betegeknél. A *P. aeruginosa* törzsek több mint 90%-a termeli a kékeszöld színért felelős piocianin pigmentet. Harminc évvel később, 1882-ben egy francia gyógyszerész, Carle Gessard beszámolt a *P. aeruginosa* sikeres izolálásáról, amelyet eredetileg *Bacillis pyocyaneus*-nak nevezett el (Gessard, 1984). Az elmúlt 100 év során végzett számos taxonómiai felülvizsgálatot követően napjainkban a *P. aeruginosa* baktériumfaj azonosítása 16S rRNS és genomiális szekvencia összehasonlítások alapján történik, a celluláris zsírsavak és virulencia faktorok elemzése mellett (Wood *et al.*, 2023a).

A *P. aeruginosa* spórát nem képző, oxidáz- és katalázpozitív Gram-negatív pálcá, oxidatív anyagcserét folytat, általában képes a nitrátot a nitritformán túl is redukálni és acetamid lebontása során ammóniát termelni (Yoon *et al.*, 2002; Gellatly & Hancock, 2013). Képes a szerves molekulák széles skáláját katabolizálni a tápanyagokért, így biokémiaiilag ez az egyik legsokoldalúbb és mindenhol jelen lévő ubikviter baktérium. Megtalálható a talajban, a vízben, a növények felületén, illetve az emberi bőrön és nyálkahártyán egyaránt. Annak köszönhetően, hogy a *P. aeruginosa* számos környezetben képes a túlélésre, sokkal nagyobb eséllyel találkozik vele a szervezetünk, mint egyéb kórokozók (Cogen *et al.*, 2008). A kórházakban izolálták már légzőkészülékekről, fizioterápiás medencékből, mosogatókból és felmosóvízből. A virulenciafaktorok (pl. piocianin, citotoxin, proteázok, hemolizinek, szideroforok, exotoxin A, exoenzim U, exoenzim S stb.) arzenálja miatt a *P. aeruginosa* számos akut és krónikus fertőzés okozója. Immunszupresszált betegeknél súlyos és sok esetben életveszélyes állapotot idéz elő, egyes esetekben a halálozási arány elérheti a 40%-ot (Osmon *et al.*, 2004; Strateva & Mitov, 2011; Wood *et al.*, 2023b). A kemoterápiában részesülő neutropeniás betegek nagy százalékánál szepszis eredményez, illetve a kórházban szerzett tüdőgyulladás és a légzési elégtelenség egyik fő oka. Az általa létrehozott biofilmréteg csökkenti a légzésre alkalmas felületet a tüdőben, ezzel más mikrobák szaporodásához is optimális feltételeket kialakítva (Koch, 2002; Steindler *et al.*, 2009). A *P. aeruginosa* fertőzések gyakoriak a diabéteszes fekélyek, égési sebek, szaruhártya fekélyek és műtési sebek esetén is, amelyek kolonizálásában fontos szerepet játszik a baktérium biofilmképzése. Biofilmje rendkívül ellenálló az antibiotikumokkal és fertőtlenítőszerrel szemben, a legtöbb ma ismert törzse antibiotikum-rezisztens (Pang *et al.*, 2019; Chegini *et al.*, 2020). Ezeknek a tényeknek köszönhetően a *P. aeruginosa* baktériumot az ESKAPE néven ismert patogének közé sorolták (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacterales* fajok). A csoport fokozott figyelmet igényel, hiszen kevés eszköz áll rendelkezésre az általuk okozott fertőzések megállítására, különösképpen az immunhiányos betegeknél. A WHO is arra figyelmeztet, hogy a felsorolt patogének ellen sürgősen új antimikrobiális szerekre lesz szükség (Shrivastava *et al.*, 2018; Wood *et al.*, 2023a).

2.4.2. *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*

A *H. influenzae* és a *H. parainfluenzae* coccobacillusokat változatos megjelenés jellemzi, a tenyészetben és klinikai anyagokban időnként hosszú fonalakat vagy kerek alakokat is láthatunk. Tápanyagigényes biofilmképző baktériumok: a *H. influenzae* a szaporodáshoz hemint (X faktor) és NAD-ot (V faktor) is igényel, míg a *H. parainfluenzae* csak V faktort (Pál, 2013; King, 2012).

A *H. influenzae* baktériumot először Richard Pfeiffer német orvos és bakteriológus azonosította 1892-ben, aki tévesen azt hitte, hogy ez a patogén felelős az influenzás megbetegedésekért. A *H. influenzae* opportunista kórokozó, amely az enyhébb légúti infekciók mellett, invazív megbetegedést (pneumóniát, agyhártya- és hashártyagyulladást, szepszist és szeptikus ízületi gyulladást) egyaránt előidézhethet (King, 2012; Butler & Myers, 2018). Megkülönböztethetünk tokkal rendelkező és tok nélküli törzseket (nem tipizálható *H. influenzae* - NTHi). A tok virulenciafaktor, amely antifagocita és antikomplementer hatással rendelkezik. A tokantigénnek jelentős szerepe van a szerotípus meghatározásában (a-f) és ezáltal a prevencióban. Az invazív kórformákat általában a „b” poliszacharid (poliribizol-foszfát) tokkal rendelkező baktérium okozza. Cseppfertőzéssel terjed és ez a típus eredményezi a főleg gyermekeket érintő, akár halállal járó súlyos agyhártyagyulladást (Pál, 2013; Wahl *et al.*, 2018). A védőoltást ennek megelőzésére hozták létre és a baktérium „b” poliszacharid tokját tartalmazza. A Hib konjugált vakcina bevezetése jelentős változást hozott az érintett országokban, a *H. influenzae* által okozott súlyos fertőzések száma nagymértékben csökkent. Ennek köszönhetően a baktérium egyéb szerotípusaira is egyre kevesebb figyelem irányult, amely a tok nélküli törzsek veszélyességének alábecsüléséhez vezetett. Az antibiotikum-rezisztencia megjelenésével a *H. influenzae* újra a mikrobiológiai kutatások középpontjába került (Yang *et al.*, 2019; Xiao *et al.*, 2023).

Elsősorban az NTHi törzsek okozzák a légzőrendszer megbetegedését és rezisztenciájuk jelentősen hozzájárul a globális problémához. Kanadában a NTHi baktériumot sokkal több esetben izolálták a betegekből (74,2%), mint a Hia (8,9%) vagy a Hif (10,2%) szerotípust (McTaggart *et al.*, 2021). A *H. influenzae* teljes hordozási aránya a gyermekek (0-6 éves kor) körében 84,1%, ebből 96,7% NTHi (Bajanca-Lavado *et al.*, 2022). A Hib vakcina bevezetésével a *H. influenzae* fertőzés epidemiológiája megváltozott és az NTHi az alsó légúti fertőzések, illetve az invazív megbetegedések

elszámú kiváltója, ezért ez a baktérium ugyancsak nagy odafigyelést igényel (Xiao *et al.*, 2023).

A *H. parainfluenzae* a *H. influenzae*-hez hasonlóan a légutak mikrobiótájának tagja és az indukált betegségek skálája is nagyon hasonló. A betegekből izolált, tüdőt és urogenitális szerveket fertőző multidrog-rezisztens (MDR) törzseket vizsgálták leginkább az elmúlt években. Ezek ellenállóak a β -laktámokkal, kloramfenikollal, kotrimoxazollal, makrolidokkal, tetraciklinekkel és fluorokinolonokkal szemben (Pál, 2013; Sierra *et al.*, 2019). Az MDR kialakulásához nagyban hozzájárul, hogy a nemi úton terjedő fertőzéseket gyakran a *Chlamydia trachomatis* és *Neisseria gonorrhoeae* baktériumoknak tulajdonítják és empirikus antibiotikum-terápiát alkalmaznak. Általában intramuszkuláris ceftriaxont kombinálnak orális azitromicinnel vagy doxiciklinnel, anélkül hogy a fertőzést okozó baktériumfajt vagy fajokat azonosították volna. Ennek eredményeképpen egyre több MDR *H. parainfluenzae* törzs jelent meg (Magiorakos *et al.*, 2012; Sierra *et al.*, 2019).

Mindezek ismeretében a *H. influenzae* és *H. parainfluenzae* virulencia faktorainak megismerése, különös tekintettel a biofilm kialakulásának háttérében álló mechanizmusok feltérképezése, illetve a biofilm elleni stratégiák kidolgozása jelentős klinikai értékkel bír.

2.4.3. *Streptococcus pneumoniae*

A streptococcusokat Theodor Billroth német orvos írta le először gennyben (1874), ezt követően pedig Louis Pasteur gyermekági lázban szenvedő betegek vérében. A *S. pneumoniae* egy fakultatív anaerob baktérium, amely rövidebb-hosszabb láncok (köpetben, gennyben általában párosával) alakjában helyezkedik el. Számos betegség kiváltója lehet, beleértve a középfülgyulladást, tüdőgyulladást, vérmérgezést és agyhártyagyulladást. Az immunhiányos betegeknél, időseknél és az 5 éven aluli gyermekeknél súlyosabb lehet a fertőzés lefolyása (Pál, 2013; Xu *et al.*, 2023). Jelen lehet az emberi orrgaratban, a gyermekek (óvodás korban tetőzik) 30-40%-a, míg a felnőttek 10%-a hordozza tünetmentesen. A hordozók a fertőzések leggyakoribb forrásai és a különböző szerotípusú törzsekből egyszerre több is jelen lehet. A *S. pneumoniae* baktérium csaknem 100 szerotípusa ismert, amelyeket a poliszacharid tok biokémiai szerkezete alapján különítenek el egymástól. Az egyes szerotípusok elterjedtségükben és betegséget okozó hatásukban egyaránt különbségeket mutatnak (Messaoudi *et al.*, 2016;

Weiser *et al.*, 2018). Lázzal, légzési nehezítettséggel, köhögéssel járó lebenyes tüdőgyulladás a leggyakoribb formája, időseknél, legyengült szervezetben szövődményként keringési és légzési elégtelenség is kialakulhat. Az influenzajárványok, illetve a Covid19-járvány magas halálozási arányához a *S. pneumoniae* okozta felülfertőződés és annak szövődményei is nagyban hozzájárultak (Brooks & Mias, 2018; Zhu *et al.*, 2020).

Az első generációs vakcina ebben az esetben is egy poliszacharid oltóanyag volt (Pneumovax23). Előnye, hogy az invazív pneumococcus megbetegedéseket okozó szerotípusok 85-90%-át tartalmazza (23 szerotípust). Hátránya: nem hoz létre tartós immunmemóriát és csak 2 évesnél idősebbek esetén alkalmazható. A második generációban kidolgozták a fehérjéhez kötött (konjugált) vakcinákat. Előnyei közé tartozik a jobb immunogenitás, a tartós immunmemória, illetve 2 éven aluli gyermekek is megkaphatják, emellett az oltott személyben lecsökkenti a nazofaringeális pneumococcus-hordozást. Hátránya, hogy kevesebb szerotípus ellen ad védelmet. Ennek köszönhetően a két oltás kombinációját ajánlják felnőtteknek, attól függően, hogy megkapták-e az elsőgenerációs oltóanyagot vagy sem. Főleg a fejlődő országokban és azokban a nyugati országokban, ahol nem kötelező az oltás, számos 5 éven aluli kisgyermek halálát okozza *S. pneumoniae* tüdőgyulladás (Kim *et al.*, 2016; Masomian *et al.*, 2020; Willian de Alencar Pereira *et al.*, 2023).

A *S. pneumoniae* baktériumnál a biofilm kialakulás fordítottan korrelál a tokképződéssel. A tok jelenléte és a virulencia között határozott összefüggés van, azonban a toknélküli fajok biofilmbe rendeződése is megnehezíti a fertőzés felszámolását. Emellett ezen törzsek esetén is megfigyelték az invazív kórformákat (Domenech *et al.*, 2012; Marks *et al.*, 2013). A *S. pneumoniae* β -laktámokkal szembeni rezisztenciájának alapja a penicillin és az orális cephalosporinok kritikátlanul széles körben történő alkalmazása. A sejtfaleszintézisben szerepet játszó penicillinkötő fehérjék (PBP) megváltozása mellett a biofilm strukturális jellemzői és a baktériumsejtek kommunikációja is hozzájárul a rezisztencia kialakulásához (Pál, 2013; Yadav *et al.*, 2020).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A kutatásba bevont mézminták

Vizsgálatainkhoz három egymást követő évben (2020, 2021, 2022) ugyanazoktól a magyar őstermelőktől vásárolt akác- (*Robinia pseudoacacia*), aranyvessző- (*Solidago gigantea*), hárs- (*Tilia* spp.) és napraforgómézeket (*Helianthus annuus*) alkalmaztunk. A minták kiválasztása során figyelembe vettük a korábbi kísérleteink eredményeit az antibakteriális hatás tekintetében, illetve a vásárlók számára is könnyen beszerezhető fajtamézeket választottunk. Az invazív magas aranyvessző mézének elemzésével célunk a növény ilyen formájú terápiás hasznosításának feltérképezése volt. A mézek fizikokémiai paramétereinek és antibakteriális hatásának tanulmányozására 2022-ben került sor, nemcsak a 2022-es, hanem a 2020-as és 2021-es minták esetében is. A fajtamézek a dél-dunántúli régióból származtak, tárolásuk szobahőmérsékleten (20-21°C) és sötétben történt.

3.2. Melisszopalinológiai analízis

A fajtamézek botanikai eredetének megállapításához melisszopalinológiai analízist végeztünk Von der Ohe és munkatársai (2004) módszerét követve. A mézmintáinkból 10 g-ot 50 ml-es centrifugacsövekbe adagoltunk és 20 ml desztillált vízzel elegyítettük Combi-spin FVL-2400N vortex segítségével (Biocenter Kft.). Az ezt követő centrifugálás 10 percig tartott 8753x g sebességen Neofuge 15R centrifugával (Lab-Ex Kft.), majd leöntöttük a felülúszót. Ezt a lépést újabb centrifugálás (5 perc, 8753x g) és dekantálás követte, miután az első centrifugálásnál visszamaradt üledékhez 10 ml desztillált vizet mértünk. A második centrifugálást követően a centrifugacsőben maradó üledékhez 250 µl desztillált vizet adtunk és vortexelés után az így elkészített pollen-szuspenzióból 20 µl-t pipettáztunk egy tárgylemezre, amelyet ezután egy 40°C-ra beállított melegítőlapra (OTS 40, Tiba Kft.) fektettünk. A vizet elpárologtattuk, majd fukszinós glicerinzseléből (Merck Life Science Kft.) egy kis darabot helyeztünk minden pollenmintára, ezáltal megfestve a pollenszemeket. A zselé olvadásakor a preparátumokat fedőlemezzel fedtük le. A pollenpreparátumokat Nikon Eclipse E200 típusú, Michrome 20MP CMOS kamerával (Auro-Science Consulting Kft.) kapcsolt fénymikroszkóppal elemeztük, a mikrofotókat pedig 400x nagyításon Capture 1.2 szoftverrel készítettük el.

Mézmintánként legalább 500 pollent számoltunk le, jelezve, hogy hány pollenszem tartozik adott növényfajhoz vagy -családhoz. A pollentípusok relatív gyakoriságát az összes pollenszem százalékában adtuk meg.

3.3. Fajtamézek fizikokémiai paramétereinek meghatározása

A vizsgálatokba bevont fajtamézek színintenzitását Beretta és munkatársai (2005) kutatása alapján határoztuk meg. Az elkészített 50%-os (w/w) mézoldatokat ultrahangos vízfürdőbe (vízhőmérséklet: 45-50°C) helyeztük 5 percre, majd a minták átszűrése következett (pórusméret: 0,45 µm, Agilent Technologies). A Shimadzu UV-1800 spektrofotométer (Shimadzu Schweiz GmbH) segítségével 450 és 720 nm-en mért abszorbanciaértékek különbségéből származó színintenzitás eredményeket milliabszorbancia egységekben (mAU) fejeztük ki.

A pH-értékek és az elektromos vezetőképesség elemzésére DSZ-708 Multiparaméteres analizátort (Simex Mérnöki Kft.) alkalmaztunk. A mézminták pH-értékét a Magyar Élelmiszerkönyvben leírtak szerint határoztuk meg és a pH-mérőt minden alkalommal puffer oldatokkal kalibráltuk (Magyar Élelmiszerkönyv, 2009c). A méréshez 10 g mézet oldottunk fel 75 ml desztillált vízben, az elektromos vezetőképesség esetén pedig 20% méz-szárazanyagot tartalmazó desztillált vizes mézoldatot használtunk. Az eredményeket milli-Siemens per centiméter egységben (mS/cm) fejeztük ki (Bogdanov *et al.*, 1997).

3.4. Mikrobiológiai vizsgálatok

3.4.1. A vizsgált légúti baktériumok

A fajtamézek antibakteriális hatását Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok esetén is megvizsgáltuk. A *Haemophilus influenzae* (DSM 4690) és *H. parainfluenzae* (DSM 8978) törzseket speciális tápoldatban tenyésztettük. 3750 µl Mueller-Hinton II Broth (MHB, Reanal Laborvegyszer Kereskedelmi Kft.) táptalajhoz 500 µl *Haemophilus* supplement B-t (Diagon Kft.) és 750 µl (1 mg/ml) NAD oldatot pipettáztunk. A *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) és *Streptococcus pneumoniae* (DSM 20566) esetében 100 ml steril MHB táptalajt alkalmaztunk. A baktérium szuszpenziókat egy rázóinkubátorban (60 ford./perc sebességgel) 12 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) (Hindler & Jorgensen 2011).

3.4.2. *Minimális gátló (MIC) és minimális baktericid (MBC) koncentráció meghatározása*

A minimális gátló koncentrációkat (MIC) mikrodilúciós teszt segítségével határoztuk meg, amelyet a mikrobiológiai laboratóriumokban általánosan alkalmaznak a CLSI irányelveknek megfelelően (CLSI Document, 2012). Az eljárást 96 lyukú mikrotiter lemezekon kivitelezteük. Három hígítási sort használtunk, mivel az előzetes kísérletek alapján számítottunk rá, hogy az antibakteriális aktivitás csökken a tárolási idő növekedésével. A következő hígítási sorokat készítettük el (Mueller–Hinton tápoldat felhasználásával): 57,5; 55; 52,5; 50; 47,5; 45; 42,5% (w/w) (2020-as mézek), 40; 37,5; 35; 32,5; 30; 27,5; 25% (w/w) (2021-es mézek) és 25; 22,5; 20; 17,5; 15; 12,5; 10% (w/w) (2022-es mézek). Ezután a mézoldatokból és baktérium szuszpenziókból (10^5 CFU/ml) egyaránt 100 μ l-t mértünk be a mikrotiter lap egy lyukjába, majd inkubáció következett 37°C-on 24 órán át. Vizsgálatainkat 6 ismétléssel végeztük és azt a legalacsonyabb mézkoncentrációt tekintettük MIC-nek, amely esetben nem volt látható baktériumnövekedés a lyukakban.

A MIC meghatározást követően a mikrotiter lemez minden olyan cellájából, ahol nem tapasztaltunk szemmel látható növekedést, egy kacsnyi táptalajt emeltünk ki a minimális baktericid koncentráció (MBC) megállapításához. A mintákat ebben az esetben szilárd tápagon tenyésztettük tovább és az inkubáció szintén 37°C-on és 24 órán keresztül tartott. Az inkubációt követően leolvastuk azt a legkisebb koncentrációt, ahol már nem tapasztaltunk baktériumszaporodást az agaron (Tan *et al.*, 2009).

3.4.3. *A biofilmképződés gátlásának vizsgálata*

A biofilmeket 96 lyukú mikrotiter lemezeken alakítottuk ki, majd a mézes kezelést követően kristályibolya (CV) tesztet alkalmaztunk, ezáltal tanulmányozva a mézminták biofilm-ellenes hatását (Peeters *et al.*, 2008). A kezeléseket MIC/2 koncentrációjú mézmintákkal végeztük és pozitív kontrollként 10^8 CFU/ml csíraszámú baktérium szuszpenziós tápoldatot, negatív kontrollként sejtmentes, mézes tápoldatot használtunk. Első lépésként a mikrotiter lemez egy cellájába 200 μ l baktérium szuszpenziót mértünk és az ezt követő inkubáció 37°C-on négy órán keresztül tartott, ezáltal elősegítve a baktériumsejtek megtapadását. A ki nem tapadt sejteket fiziológiás sóoldattal történő mosással eltávolítottuk és csak ezután pipettáztuk bele a mézoldatokat az egyes lyukakba. Ebben az esetben az inkubáció 24 óra volt 37°C-on, majd újra a ki nem tapadt sejtek

kimosása következett fiziológias sóoldattal. A sejtek rögzítése céljából minden lyukba 200 µl metanolt mértünk (15 perc, szobahőmérséklet). A metanol leöntése után a bakteriális biofilm megfestése érdekében 200 µl 0,1%-os kristályibolya festéket alkalmaztunk. 20 perc elteltével (RT) a felesleges festéket víz segítségével eltávolítottuk, majd a biofilmhez kötődött kristályibolyát 200 µl 33%-os ecetsavval oldottuk ki. Az abszorbancia értékek meghatározása 590 nm-en SPECTROstar Nano mikrotiterlap olvasó (BMG Labtech) segítségével történt. A kristályibolya festék többek között kötődik a biofilmek kialakulásában fontos szerepet játszó extracelluláris poliszacharidokhoz, ezáltal lehetővé téve a biofilm teljes biomassájának becslését a mikrotiter lap cellájában. A gátlási rátát az alábbi képlet alapján határoztuk meg: $(1-S/C) \times 100\%$ (C a kontroll abszorbanciája, S a minta abszorbanciája) (Yanwei *et al.*, 2018).

3.4.4. A membrándegradáció tanulmányozása

A bakteriális DNS felszabadulás tanulmányozása során mindegyik baktérium szuszpenziót (10^8 CFU/ml) PBS-ben (foszfát-puffer oldat) készítettük el és kontrollként a mézzel nem kezelt baktériumsejteket használtuk. A sejtekhez 20, 40, 60 és 90% (w/w) koncentrációjú mézoldatokat adtunk (inkubációs idő: 1 óra). Emellett a membrándegradáció időfüggését is vizsgáltuk, ennél a tesztnél a baktériumsejteket 60% (w/w) mézet tartalmazó PBS-ben szuszpendáltuk. A kezelések 0, 20, 40, 60 és 90 percig tartottak. Ezeket a lépéseket mind a két esetben centrifugálás követte (Neofuge 15R, Lab-Ex Kft.) $12000 \times g$ sebességgel 2 percig. A nukleinsavat tartalmazó felülúszó folyadék abszorbanciáját 260 nm-en Metertech SP-8001 (Abl&e-Jasco Kft.) spektrofotométerrel határoztuk meg, az eredményeket a kontrollhoz viszonyítva százalékos értékben fejeztük ki (Bennis *et al.*, 2004).

3.4.5. Scanning elektronmikroszkópos (SEM) felvételek készítése

A mézek biofilmre kifejtett gátló hatásának bemutatása és a szerkezeti változások szemléltetése céljából SEM felvételeket készítettünk. Az eljárás során a biofilmeket zsírtalanított és sterilizált fedőlemezeken alakítottuk ki, miután a lemezeket 4 órán át 37°C-on inkubáltuk 5 ml baktérium szuszpenzióban (10^8 CFU/ml). A kitapadást követően fiziológiás sóoldattal történő mosás következett, majd a három különböző évből származó hársmézet MIC/2 (5ml) koncentrációban alkalmaztuk. Kontrollként a kezeletlen fedőlemezek szolgáltak. 24 óra inkubációs idő (37°C) elteltével a ki nem tapadt sejteket újból lemostuk és ezt 2 óra inkubáció követte (szobahőmérsékleten) 2,5%-os glutáraldehidben a biofilm rögzítése érdekében. A minták víztelenítése etanolsorozatban (50%, 70%, 80%, 90%-os oldatok és abszolút etanol) történt 2 x 15 percig. Következő lépésként a fedőlemezeket terc-butil-alkohol és abszolút etanol 1:2, 1:1 és 2:1 arányú keverékébe raktuk. A mintát ezután áthelyeztük 1-1 órára abszolút terc-butil-alkoholba, majd 1 éjszakás fagyasztva szárítás következett. Az aranymembránnal bevont biofilmek vizsgálatát JEOL JSM IT500-HR pásztázó elektronmikroszkóppal (Jeol Kft.) végeztük el (Kerekes *et al.*, 2013).

3.4.6. Statisztikai elemzés

A statisztikai analízist az Excel® (Microsoft Corp.) és a PAST programokkal (verzió: 3.11⁵¹) kivitelezte a Shapiro–Wilk teszttel végzett normalitás ellenőrzés után. Az adatokat a fajtamézek színintenzitás értékei (2. táblázat), illetve a membrándegradációs eredmények (5. és 6. táblázat) esetén átlag \pm szórás formájában fejeztük ki. A biofilm-ellenes aktivitás vizsgálatnál kapott adatokat (6. ábra) mediánként (minimumtól a maximumig) jelenítettük meg a dobozdiagramokban. A fajtamézeket egyutas ANOVA segítségével, egy adott paraméter alapján hasonlítottuk össze egymással. Az ANOVA nullhipotézisét elvetettük és Student-féle *t*-próbával állapítottuk meg a két csoportpár (fajtaméz) közötti különbséget. Az 1%-os ($p \leq 0,01$) vagy 5%-os ($p \leq 0,05$) *p*-értékeket szignifikánsnak tekintettük.

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1. A mézminták botanikai eredete

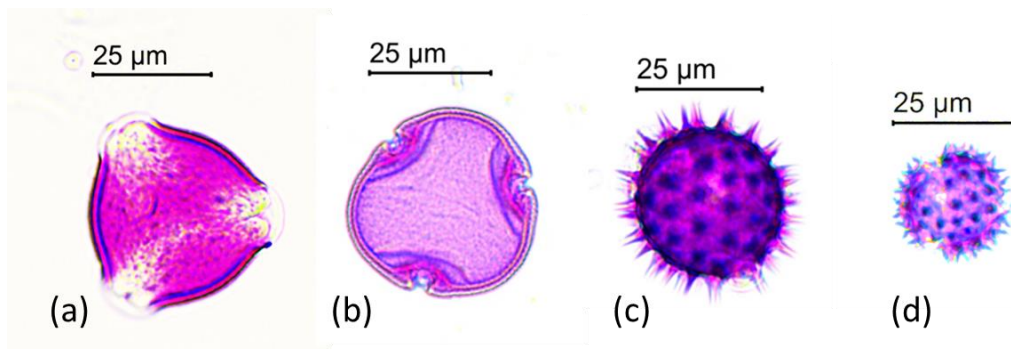
A mézminták valódi típusának megállapításához kulcsfontosságú a pontos botanikai eredetük tisztázása, ami behatárolja mind a méz piaci értékét, mind a gyógyászatban történő felhasználhatóságát. A mézben található alakos elemek közül a virágpornak van nagy jelentősége, mivel mennyisége meghatározza a méz jellegét. Ennek köszönhetően a melisszopalinológiai analízis az egyik legmegbízhatóbb és leghatékonyabb módszer annak igazolására, hogy mely növényekről származik az adott minta. Azonban a vizsgálat bonyolultsága kihívást jelent és rendkívül időigényes, így a kivitelezése nagy odafigyelést és szakértelmet kíván (Kúš *et al.*, 2018; Escrichre *et al.*, 2023). Korábban egy mézet akkor tekintettek fajtaméznek, ha legalább 45%-ban tartalmazta az adott növény pollenjét (Maurizio, 1975). Azonban egyes jól mézelő növényfajok pollenje alul- vagy felülreprezentált lehet, ezért mindenképpen figyelembe kell venni az abszolút pollentartalom mérésével kimutatott reprezentáltságot (Oddo *et al.*, 2004). Az egyes bevizsgáló laboratóriumok és tanulmányok ehhez mérten állítják fel a határértékeket.

A kutatásba bevont mézek melisszopalinológiai analízise alapján minden mézminta egyértelműen fajtaméznek tekinthető (1. táblázat) (Nagy-Radványi *et al.*, 2024). Az akácmezekben a *Robinia* pollen (5a. ábra) volt a domináns pollentípus a méz fajtájának megfelelően, hasonlóan a hárs-, napraforgó- és aranyvesszőmézekhez, amelyekben szintén nagy mennyiségben volt jelen a *Tilia* (5b. ábra), a *Helianthus* (5c. ábra) és a *Solidago* (5d. ábra) pollen. Az akácmez pollentartalma alulreprezentált, míg a hársmez pollenje sok esetben extrém módon alulreprezentált. Oddo és munkatársai (2004) átfogó tanulmányában az átlagos pollenarány az akác, illetve a hárs pollenszemekre – 28 és 23%. Kúš és munkatársai (2014) 11-16% és 22-26% közötti karakterisztikus pollent figyelt meg lengyel akác- és hársmezekben, míg a Magyar Élelmiszerkönyv (2009b) 15 és 30%-os értéket határoz meg. Bodó és munkatársai (2021) magyar akácmezmintáiban az átlagos *Robinia* pollentartalom 45,3% volt, míg a hársmezeken 45,9%-os értéket írtak le. Az általunk vizsgált akácmezekben a *Robinia* pollen 46,6%, 51,8% és 56,1%-os, a hársmezekben a *Tilia* pollen 45,5%, 47,2% és 53,6%-os arányban volt jelen, ezzel igazolva a mézminták monoflorális eredetét. A napraforgóméz *Helianthus* pollentartalma a legváltozóbb, 20 és 90%-os érték között mozoghat az egyes napraforgófajták pollentermelésétől függően (Oddo *et al.*, 2004). A Sari és munkatársai (2012) által

vizsgált, Törökországból származó 50 napraforgóméz minta 45-70%-ban tartalmazta a domináns pollenszemcséket. Bodó és munkatársai (2021) 47,4% átlagos *Helianthus* pollenarányt mutattak ki magyar napraforgómézekben. A kutatásba bevont napraforgómézek *Helianthus* pollenmennyisége 58,7%, 66,5% és 69,6%-os értékekkel szintén megfelelt az irodalmakban leírtaknak. Az aranyvesszőmész esetén nincs általánosan elfogadott pollengyakorisági határérték. Gyergyák és munkatársai (2015) a legalább 40% *Solidago* pollent tartalmazó mézmintákat tekintették valódi aranyvesszőmésznek, amennyiben ez volt a leggyakoribb pollentípus. Czigele és munkatársai (2022) magyar aranyvesszőmészekenél 40,1%, szlovák mintáknál 42,9%, lengyel minták esetén pedig 57% és afeletti karakterisztikus pollent detektáltak. Kocsis és munkatársai (2022) magyar mintáknál 45,3%-os értéket figyeltek meg. Az aranyvesszőmész mintáink pollenspektruma az elvárásainknak megfelelően 60,6%, 63,2% és 73,4%-os értékekkel a *Solidago* pollent mutatta a domináns pollentípusnak. A Magyar Élelmiszerkönyvben a napraforgó- és aranyvesszőmézek minimális karakterisztikus pollentartalmáról nem található adat.

1. táblázat: Pollentípusok relatív gyakorisága a vizsgálatba bevont mézmintákban

Mézminták		Pollen típusa – relatív gyakoriság (%)						
		<i>Robinia</i>	<i>Solidago</i>	<i>Helianthus</i>	<i>Tilia</i>	<i>Brassica</i>	Asteraceae	Egyéb
Akác	2020	56,1	2,4	3,8	16,2	13,1	3,6	4,8
	2021	51,8	-	8,8	14,5	8,3	9,1	7,5
	2022	46,6	3,7	6,5	10,3	20,6	1,9	10,4
Aranyvessző	2020	1,7	63,2	2,3	0,6	7,6	9,8	14,8
	2021	4,8	73,4	3,6	1,9	6,7	8,4	1,2
	2022	0,8	60,6	6,3	2,6	10,2	7,8	11,7
Hárs	2020	18,8	0,7	16,3	47,2	1,7	4,4	10,9
	2021	20,3	1,5	10,2	53,6	2,1	5,6	6,7
	2022	22,6	2,2	11,2	45,5	3,2	5,9	9,4
Napraforgó	2020	13,2	3,4	66,5	8,4	-	3,6	4,9
	2021	16,4	2,7	58,7	13,8	0,5	1,8	6,1
	2022	5,5	3,2	69,6	4,2	-	7,6	9,9



5. ábra: (a) akác – *Robinia pseudoacacia*, (b) hárs – *Tilia* spp., (c) napraforgó – *Helianthus annuus*, (d) aranyvessző – *Solidago gigantea* pollenszemcsék
fénymikroszkópos képe
(fotó: Nagy-Radványi Lilla)

4.2. A vizsgált fajtamézek fizikokémiai tulajdonságai

A pollentartalom tanulmányozása mellett a mézek érzékszervi vizsgálata, illetve további minőségi paramétereinek meghatározása is hozzájárul a monoflorális eredet igazolásához. A mézek színe, szaga és konzisztenciája, továbbá pH értéke és elektromos vezetőképessége is különbségeket mutathat az egyes fajtamézek esetén. Ezek a vizsgálatok a mézhamisítást is feltárhatják, mivel pl. cukorszirup hozzáadásával a mézek érzékszervi jellemzői és mérhető paraméterei is lényegesen megváltozhatnak (da Silva *et al.*, 2016; Pauliuc *et al.*, 2021; Kocsis *et al.*, 2022).

Az általunk tanulmányozott mézminták érzékszervi és fizikokémiai tulajdonságai megfeleltek az irodalmakban leírtaknak, illetve alátámasztották a mikroszkópos pollenanalízis során kapott eredményeinket (2. táblázat) (Nagy-Radványi *et al.*, 2024). A 2022-es mézminták jellemzőit a pörgetést követően még friss állapotában meghatároztuk, míg a 2021-es és 2020-as mintáknál, egy illetve két év elteltével. Méréseink alapján a pH és elektromos vezetőképesség értékek esetén nem, viszont a mézek színénél a tárolási idő döntő tényező. A kezdeti világosabb színhez képest a fajtamézek sötétedését tapasztaltuk az évek előrehaladásával. Kus és munkatársai (2014) a gyenge illatú, viszkózus állagú akácmézeket a legvilágosabb mézként jellemzik. A 26%-nál nagyobb arányban *Tilia* pollent tartalmazó hársmézeket világos borostyánsárgának, az akácnál szilárdabb konzisztenciájúnak és finomszemcsésen kristályosodónak írták le, az általunk vizsgált

2022-es mintákhoz hasonlóan. Cimpoiu és munkatársai (2013) az akácmézekre átlagosan magasabb színparaméter értéket (210 mAU) közöltek, míg Beretta és kutatócsoportja (2005) alacsonyabbat (25 mAU), amely érték közelített a mi megfigyelésünkhöz a 2022-es akácméz minta (44,4 mAU) esetén. Srećković és munkatársai (2019) a szerb akácmézeket szintén a legvilágosabb mézként definiálták. A kutatásba bevont 2022-es akácméz minta színe halvány és sárgászöld volt, míg a 2021-es és 2020-as mintáké közelített a 2022-es világos borostyán színű hársmez minta színéhez (44,4 → 103,1 mAU). Az összes vizsgált fajtaméznél egy év alatt következett be a színintenzitásváltozás jelentős része, azonban szagban és állagban nem detektáltunk lényeges különbséget az évek elteltével. Sari és munkatársai (2012) a napraforgóméz mintákat világossárga színnel és krémes, gyorsan kristályosodó textúrával jellemezték, hasonlóan a mi megfigyelésünkhöz. Brudzynski és Kim (2011) a tárolási idő növekedésével a sötétebb színű mézek (pl. napraforgó) esetén nagyobb mértékű színváltozást mért, mint a világosabb mézeknél (pl. borágó). Mi is jelentős sötétedést figyeltünk meg a napraforgóméznél (116,6 → 422,8 mAU), azonban a világosabb akácméznél is lényeges volt a különbség. A világosabb hársmezénél és a sötétebb aranyvesszőmezénél nem volt ilyen mértékű a változás, így feltételezhetően a méz fajtája a döntő és nem a méz kiindulási színe a színintenzitás változásának mértékében. Az aranyvesszőmez mintákat Kuš és munkatársai (2014), illetve Jasicka-Misiak és kutatócsoportja (2018) szintén borostyánsárga színnel és jellegzetes illattal jellemezte. A lengyel aranyvesszőmézek színintenzitása (205 mAU) megközelítette az általunk mért színparaméter értéket (236,9 mAU).

Korábbi kutatómunkánk során nyolc fajtamézet elemeztünk és megfigyeltük, hogy a világos színű mézek (akác, ámorakác, mézontófü, hárs) alacsonyabb antioxidáns kapacitással és ásványianyag-tartalommal rendelkeztek, mint a sötétebb színű mézminták (napraforgó, gesztenye, édeskömény, zsálya). Több kutatócsoport is bebizonyította, hogy a sötétebb fajtamézeknek jelentősebb az antimikrobás hatása (Oliveira *et al.*, 2018; Albaridi, 2019; Balázs *et al.*, 2023). A világos borostyánsárga hársmézek az ásványi anyagok tekintetében nagy mennyiségben tartalmaztak káliumot, illetve az oxigéngyök elnyelő kapacitásuk (ORAC) is magasabb volt, mint pl. a sötétebb színű napraforgómézeknek (Bodó *et al.*, 2021), emellett (világos színe ellenére) az antibakteriális aktivitása is kiemelkedő a magyar fajtamézek között (Balázs *et al.*, 2021; Farkas *et al.*, 2022; Balázs *et al.*, 2023).

Bár a vizsgálatainkba bevont fajtamézek színe idővel sötétedett, megfigyeléseink alapján a mézminták antibakteriális hatása csökkent (Nagy-Radványi *et al.*, 2024). Abban az esetben, ha a tárolási időnek köszönhető a mézek sötétebb színe, ez inkább a minőségromlás egyik fő paramétere, mintsem a jelentősebb antioxidáns és antimikrobás aktivitásé. A hosszabb tárolás vagy melegítés során a cukrok szabad aminosavakkal kondenzálódnak és ennek hatására barna pigmentek keletkeznek (Maillard-reakció) (Manzocco *et al.*, 2001; Singh & Singh, 2018). A Maillard-reakciótermékek is antioxidánsként működhetnek (Singh & Singh, 2018), így akár az évek óta tárolt mézek antibakteriális aktivitásához is hozzájárulhatnak, hiszen pl. a H₂O₂ tartalom idővel lebomlik, azonban ennek a folyamatnak a megértése mindenképpen további kutatómunkát igényel.

2. táblázat: Mézminták érzékszervi jellemzői és fizikokémiai paraméterei 2022-ben mérve

Mézminta, Növény	Év	Érzékszervi jellemzők (Szín, Szag és Konzisztencia)	ABS ₄₅₀₋₇₂₀ (mAU)	Elektromos vezetőképesség (mS/cm)	pH
Akác, <i>R. pseudoacacia</i>	2020	Világos borostyán, gyenge illat, folyékony, viszkózus	103,1 ± 3,0 ^a	0,132 ± 0,01	3,30 ± 0,02
	2021	Világos borostyán, gyenge illat, folyékony, viszkózus	99,3 ± 3,3 ^a	0,121 ± 0,01	3,22 ± 0,03
	2022	Halvány, sárgászöld, gyenge illat, folyékony, viszkózus	44,4 ± 1,7 ^b	0,126 ± 0,01	3,27 ± 0,06
Aranyvessző, <i>S. gigantea</i>	2020	Sötét borostyán, közepesen intenzív illat, félszilárd, finoman szemcsés	280,7 ± 1,5 ^a	0,624 ± 0,01	3,56 ± 0,03
	2021	Sötét borostyán, közepesen intenzív illat, félszilárd, finoman szemcsés	279,4 ± 1,9 ^a	0,609 ± 0,01	3,52 ± 0,04
	2022	Borostyánsárga, közepesen intenzív illat, félszilárd, finoman szemcsés	236,9 ± 3,2 ^b	0,615 ± 0,00	3,59 ± 0,03
Hárs, <i>Tilia spp.</i>	2020	Borostyánsárga, erős illat, félszilárd, finoman szemcsés	221,9 ± 1,7 ^a	0,567 ± 0,03	4,27 ± 0,04
	2021	Borostyánsárga, erős illat, félszilárd, finoman szemcsés	211,1 ± 3,4 ^a	0,607 ± 0,02	4,32 ± 0,03
	2022	Világos borostyán, erős illat, félszilárd, finoman szemcsés	166,3 ± 4,0 ^b	0,592 ± 0,02	4,19 ± 0,03
Napraforgó, <i>H. annuus</i>	2020	Sötét aranyárga, gyenge illat, félszilárd, durván szemcsés	422,8 ± 2,0 ^a	0,221 ± 0,01	3,68 ± 0,04
	2021	Sötét aranyárga, gyenge illat, félszilárd, durván szemcsés	413,5 ± 4,2 ^a	0,224 ± 0,01	3,61 ± 0,05
	2022	Aranyárga, gyenge illat, félszilárd, durván szemcsés	116,6 ± 1,5 ^b	0,223 ± 0,01	3,66 ± 0,04

ABS₄₅₀₋₇₂₀: a hígított mézminták színintenzitás értékei. Az adatok három független mérés átlagai ± szórása (n = 3). A különböző kisbetűk szignifikáns különbséget jeleznek az évek között adott fajtamézre vonatkozóan, a Student-féle *t*-próba szerint ($p \leq 0,05$).

A méz pH-ja főként a disszociált savaktól függ, ami hatással van a mikroorganizmusok szaporodására és az enzimaktivitásra egyaránt. A mézminták pH-értéke 3,22 és 4,32 között változott, a legmagasabb értékeket a hársmézekben ($4,26 \pm 0,07$), a legalacsonyabbakat az akácmézekben ($3,26 \pm 0,04$) mértük. A legalacsonyabb elektromos vezetőképessége szintén az akácmézeknek volt ($0,126 \pm 0,01$ mS/cm), ezt követték a napraforgó- ($0,222 \pm 0,002$ mS/cm), a hárs- ($0,589 \pm 0,02$ mS/cm) és az aranyvesszőmézek ($0,616 \pm 7,2$ mS/cm). A mintáink fizikokémiai paramétereinek vizsgálata alapján a pH, illetve a makro- és mikroelemtartalommal szorosan összefüggő elektromos vezetőképesség az idő függvényében nem változott (Nagy-Radványi *et al.*, 2024). A különböző évekből származó azonos fajtamézeknél közel egyforma értékeket kaptunk, továbbá több kutatócsoport is a mi eredményeinkhez hasonló számadatokat közölt (Juan-Borrás *et al.*, 2014; Majewska *et al.*, 2019; Bodor *et al.*, 2020; Pauliuc *et al.*, 2021; Džugan *et al.*, 2022).

4.3. A mézminták MIC és MBC értékei

Minimális gátló koncentrációként határoztuk meg a méz azon legkisebb koncentrációját, amely még hatásosan képes gátolni az adott baktériumtörzs növekedését. Minél kisebb a MIC érték, annál jelentősebb a fajtamézek antibakteriális aktivitása. Ezzel szemben a minimális baktericid koncentráció egy mézminta azon legkisebb koncentrációja, amely a baktériumok 99,9%-át elpusztítja. Amennyiben nincs lényeges különbség a vizsgált anyag/szer MIC és MBC értéke között, akkor a minta baktericidnek tekinthető, nagymértékű különbség esetén bakteriosztatikus hatásról beszélünk (Bouacha *et al.*, 2023). A tanulmányozott mézminták MIC és MBC értékei eltérést mutattak a tárolási idő, a méz fajtája, illetve a vizsgálatba bevont baktériumtörzsek tekintetében (3. és 4. táblázat). A legjelentősebb antibakteriális hatást a hárs- és a napraforgóméz fejtette ki, míg a legkevésbé az akácméz volt hatékony. Eredményeink alapján megfigyelhető, hogy a tárolási idő növekedésével egyre nagyobb koncentrációjú mézoldatokra volt szükség a megfelelő antibakteriális aktivitás eléréséhez. A 2020-as mézek esetén a MIC értékek 42,5 és 50% között mozogtak, míg a 2022-es mintáknál 10 és 17,5 % között. Az MBC értékeknél is hasonló nagyságrendű különbséget tapasztaltunk. A 2020-as fajtamézek MBC értékei 47,5-57,5%, a 2022-es mintáké 15-25% között változott. A 2021-es mézminták MIC eredményei 25 és 35% között mozogtak, az MBC vizsgálata során 30-40% közötti értékeket határoztunk meg. Magyar fajtamézek esetén elsőként

kiviteleztünk egy több évet érintő összehasonlító vizsgálatot, ezzel bizonyítva a tárolási idő fontosságát (Nagy-Radványi *et al.*, 2024).

3. táblázat: A mézminták MIC értékei (2022-ben mérve)

MIC értékek (%)		<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Akác	2020	50	50	50	50
	2021	30	30	35	32,5
	2022	12,5	12,5	17,5	12,5
Aranyvessző	2020	47,5	47,5	50	50
	2021	27,5	27,5	35	30
	2022	12,5	12,5	17,5	12,5
Hárs	2020	42,5	42,5	47,5	45
	2021	25	25	32,5	27,5
	2022	10	10	12,5	10
Napraforgó	2020	42,5	42,5	47,5	45
	2021	25	25	32,5	30
	2022	10	10	12,5	10

4. táblázat: A mézminták MBC értékei (2022-ben mérve)

MBC értékek (%)		<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Akác	2020	55	55	57,5	57,5
	2021	37,5	37,5	40	37,5
	2022	20	20	25	20
Aranyvessző	2020	55	55	57,5	55
	2021	35	35	40	35
	2022	20	20	25	20
Hárs	2020	47,5	47,5	52,5	50
	2021	30	30	35	32,5
	2022	15	15	20	15
Napraforgó	2020	50	50	55	50
	2021	32,5	30	37,5	35
	2022	15	15	20	15

Több kutatócsoport is megállapította, hogy a legtöbb fajtaméznél az antibakteriális hatás nagymértékben függ a hidrogén-peroxid tartalomtól (Bucekova *et al.*, 2019; Farkasovska *et al.*, 2019), de az alacsony pH, a magas cukortartalom (ozmolaritás), az antimikrobiális fehérjék/peptidek jelenléte is mind hozzájárulnak a méz antibakteriális aktivitásához (Mandal *et al.*, 2011, Nolan *et al.*, 2019). Általánosságban elmondható, hogy a mézek magas H₂O₂ és összpolicifénol-tartalma erőteljes bakteriosztatikus, illetve baktericid hatást eredményez (Bucekova *et al.*, 2019). A nem-peroxid antibakteriális hatás előnye, hogy hosszabb tárolási idő hatására is érintetlen marad (Libonatti *et al.*, 2014), míg a H₂O₂ idővel lebomlik a kataláz enzimnek köszönhetően (Bucekova *et al.*, 2018). Ebből arra következtethetünk, hogy az aktivitás megváltozásának folyamatában a H₂O₂ játszik kulcsszerepet, mivel a többi, antibakteriális aktivitásért felelős komponens aránya (nem-peroxid összetevők) nem változik ilyen mértékben az évek alatt (Libonatti *et al.*, 2014). Azonban a biológiailag aktív polifenolok lebomlása is bekövetkezhet magas hő és fénykitettség hatására (Barnes *et al.*, 2013).

Brudzynski és Kim (2011) hajdinamézek vizsgálata során megállapították, hogy a tárolás első 3-6 hónapjában a mézek MIC értéke 50%-al csökken, míg a további antibakteriális hatáscsökkenés fokozatosan ment végbe a *Bacillus subtilis* és *Escherichia coli* baktériumokkal szemben. Kísérletsorozatunkban egy év elteltével 50-60%-os aktivitáscsökkenést figyeltünk meg a MIC értékek tekintetében az egyes fajtaméznél minden vizsgált baktériumtörzs esetén. A legaktívabb hárs és napraforgóméz MIC értéke 12,5%-ról 32,5%-ra változott a legellenállóbb *P. aeruginosa* baktériummal szemben. Farkasovska és munkatársai (2019) szlovák akác-, hárs-, repce-, napraforgó- és vegyesvirágméz tanulmányozásakor megállapították, hogy a H₂O₂ tartalom erősen korrelált a mézek MIC-ben kifejezett antibakteriális aktivitásával. Eredményeinkhez hasonlóan a napraforgó- és a hársméz mutatta a legerősebb antibakteriális hatást. A napraforgóméz H₂O₂ mennyisége és MIC értéke között egyértelmű összefüggést írtak le, ezzel ellentétben a hársméz erőteljes antibakteriális aktivitása baktériumtörzstől függően gyenge korrelációt mutatott a H₂O₂ tartalommal, vagy egyáltalán nem állt fent az összefüggés. A hársméz kivételes antimikrobás hatását már több tanulmány is leírta és a H₂O₂ mennyiségen kívül egyéb tényezőket is felvetettek, amelyek potenciálisan szerepet játszhatnak ennek a fajtaméznek az eredményességében (Matzen *et al.*, 2018; Farkasovska *et al.*, 2019; Farkas *et al.*, 2022; Sakač *et al.*, 2022). Ilyen tényező lehet pl. a magas polifenoltartalom, azonban a korábbi tanulmányaink azt mutatták, hogy a hársméz erős antibakteriális hatása - a többi fajtamézzel ellentétben - nem függ össze a

polifenolok mennyiségével. Alacsony antioxidáns kapacitása (kivéve az ORAC mérések eredményei) ellenére jelentősebb antibakteriális aktivitással rendelkezett, mint azok a monoflorális mézek, amelyek fenolos vegyületekben gazdagabbak voltak (Bodó *et al.*, 2021; Farkas *et al.*, 2022). Az antioxidáns kapacitás az adott rendszerre vonatkozó összes antioxidáns vegyület együttes hatását jelenti (Cornetti, 2009). A metodikák specifikusak egy adott reakcióra vagy antioxidánsra, így mindenképpen szükséges több mérési eljárás alkalmazása a komplexebb összetételű mintáknál (Pellegrini *et al.*, 2003). Sakač és munkatársai (2022) 12 balkáni régióból származó mézminta vizsgálata során megállapították, hogy a hársmézek hatékonysága a *Staphylococcus* törzsek ellen megegyezett a mézontófűmézével (facéliaméz), habár a hársméz minták polifenolszintje szignifikánsan alacsonyabb volt. Markervegyületként a lindenint azonosították a hársmézekben, továbbá nagyobb mennyiségű metil-sziringátot mértek bennük (Qiao *et al.*, 2020). Ez utóbbi fenolos vegyületről ismert, hogy erős antioxidáns és antibakteriális hatású (Leyva-Jimenez *et al.*, 2019), így hozzájárulhat a hársméz kiemelkedő antimikrobás tulajdonságához. Egy másik tanulmányban 40 azonosított fajtaméz közül csupán 5 mézben találtak ferulinsavat, amelyek közül 3 minta hársméz volt, egy hajdinaméz és egy fűzfaméz. A fenolos természetű ferulinsavat szintén erős antioxidánsként tartják számon (Skadiņš *et al.*, 2023). A napraforgóméz nagymértékű antibakteriális aktivitásáról kevés adat áll rendelkezésre, ebben az esetben fontos befolyásoló tényező lehet a napraforgó fajtája és földrajzi származása. Đurović és munkatársai (2022) által tanulmányozott három szerb mézmintából a napraforgóméz rendelkezett a második legerősebb antibakteriális hatással, MIC értéke 12,5% volt a *S. aureus* vagy *Serratia marcescens* baktériumokkal szemben. Mi is hasonló számadatokat kaptunk, a *P. aeruginosa* esetén a 2022-es napraforgóméz minta MIC értéke 12,5% volt, míg a többi baktériumnál 10%. Kuś és munkatársai (2016) 14 lengyel fajtaméz antibakteriális aktivitásának elemzése során az akác-, hárs- és aranyvesszőmézek MIC értékét is meghatározták. A hársméznél hozzánk hasonlóan (2022-es minta) 12,5%-os, míg az akác- és aranyvesszőmézeknél 25%-os eredményt közöltek a *P. aeruginosa*-nál. Az alacsonyabb antibakteriális aktivitással rendelkező és még friss állapotában megmért akác- és aranyvesszőméz mintáink MIC értéke 17,5% volt az említett baktériummal szemben. Skadiņš és kutatócsoportja (2023) 40%-os MIC és MBC értéket állapított meg a hársmézeknél szintén a *P. aeruginosa*-nál egy mintát kivéve, ahol 10%-os adatokat közöltek. Valószínűsíthetően a minták alacsony hárspollen-tartalma, az eltérő földrajzi eredet, illetve a hűvösebb időjárási körülmények is hatással voltak a lett minták

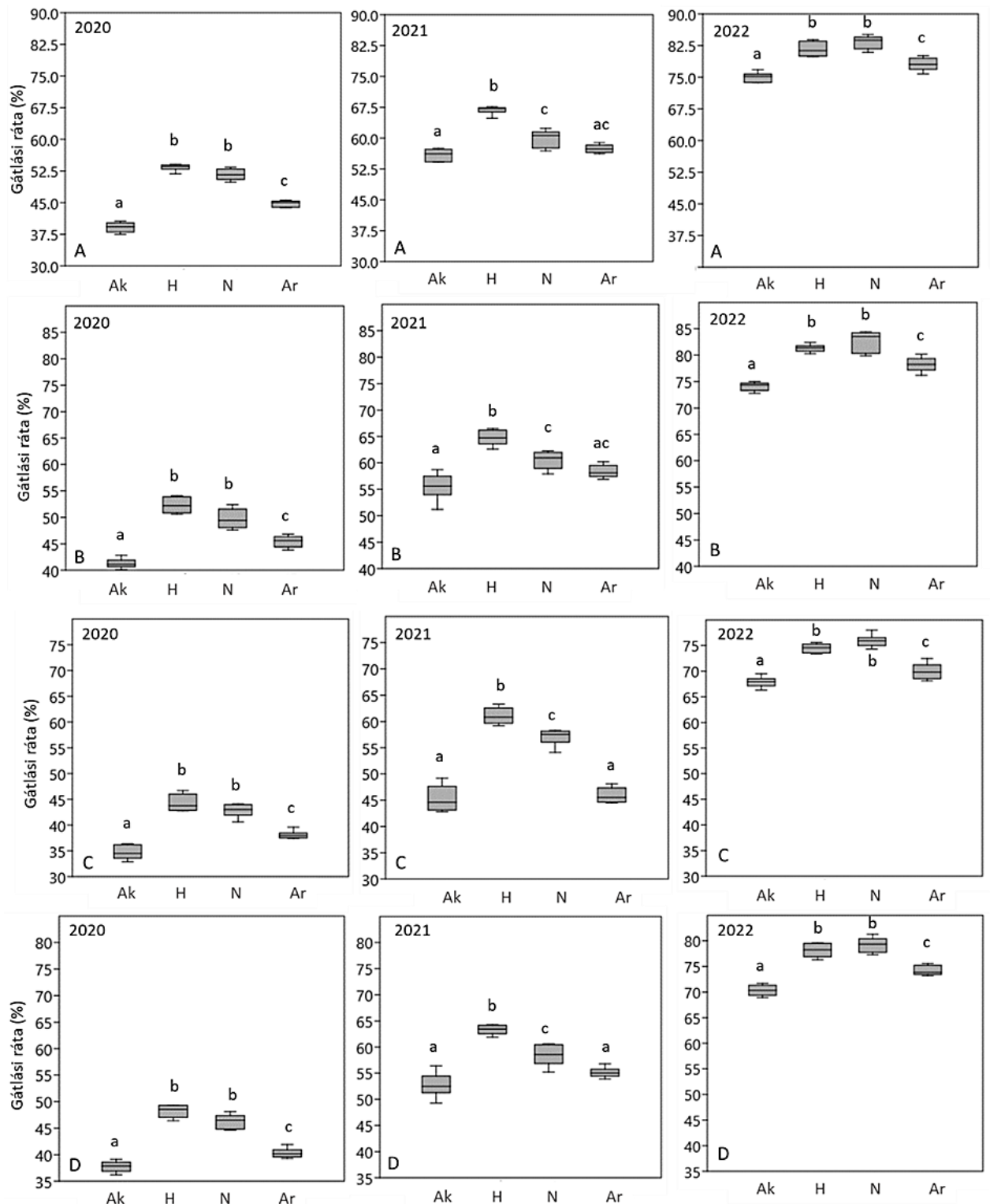
antibakteriális aktivitására, amely jóval gyengébb volt (egy minta kivételével), mint amelyet a magyar hársmézeknél tapasztaltunk. Vizsgálatsorozatunkban a legérzékenyebbnek a *Haemophilus* törzsek mutatkoztak, míg a leginkább ellenálló baktériumnak a *P. aeruginosa* bizonyult. Tkaczenko és munkatársai (2023) különböző lengyel hársmézminták antibakteriális hatását agarlyuk diffúziós módszerrel tesztelték Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal szemben. Míg a *S. aureus* és az *Escherichia coli* érzékenyek voltak a mézes kezelésre, addig a *P. aeruginosa* a mi megfigyeléseinkhez hasonlóan ellenállóbbnak mutatkozott. Egy 2023-as tanulmányunkban, ahol sebfertőzést okozó baktériumtörzsek ellen teszteltük magyar fajtamézek antibakteriális aktivitását, szintén a *P. aeruginosa* MIC értéke volt a legmagasabb a másik két baktériumhoz képest (methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* - MRSA, *Streptococcus epidermidis*) (Balázs *et al.*, 2023).

A *P. aeruginosa* fertőzések során lehetőség szerint a prevencióra és az antibakteriális kezelés azonnali megkezdésére kell összpontosítani, azonban sokszor elkerülhetetlen a fertőzés, főként a kórházi környezetben. Kombinált terápiával védekezhetünk a fertőzés továbbterjedése ellen, de ezt jelentősen megnehezítheti egyes *P. aeruginosa* törzsek multidrogrezisztenciája (Reynolds & Kollef, 2021). Bár a vizsgálatsorozatunkban a *P. aeruginosa* volt a legellenállóbb baktérium, a 2022-es mézminták antibakteriális aktivitása így is jelentős volt, hasonlóan mint a többi vizsgálatba bevont légúti patogénnel szemben, ebből kifolyólag az *in vivo* és klinikai kísérletek után érdemes fontolóra venni a méz klinikumban történő felhasználását.

4.4. A vizsgált fajtamézek biofilmképződést gátló hatása

Korábbi tanulmányainkban megjelent adatokkal (Balázs *et al.*, 2021, 2023) összhangban mindegyik általunk vizsgált magyar fajtaméz rendelkezett biofilm-ellenes aktivitással. A kísérletsorozatban a hígított mézmintákat MIC/2 koncentrációban alkalmaztuk, hiszen a célunk nem az adott baktériumtörzs elpusztítása volt, hanem a fajtamézek bakteriális biofilmtermelésre kifejtett hatásának monitorozása. A különböző monoflorális mézek eltérő mértékben hatottak a négy, vizsgálatba bevont baktériumtörzs biofilmképzésére, illetve a tárolási idő is lényegesen befolyásolta a mézminták ezen képességét. Megfigyeléseink alapján a hosszabb ideig tárolt mézek biofilm-ellenes hatása kisebb mértékű a frissen vizsgált mintákhoz képest. Eredményeinket a kontrolltól való eltérés formájában, a gátlási ráták százalékos arányának feltüntetésével szemléltettük (6.

ábra). A 2022-es fajtamézekhez képest a 2020-as minták biofilmképződést gátló hatása közel a felére csökkent. A 2020-as mézminták esetén az átlagos gátlási arány 34,7-53,4% között változott, míg a 2022-es mézeknél 67,9-83,2% közötti értékeket mértünk. A 2021-es minták 45,3-66,8%-ban gátolták a bakteriális biofilmképződést. A hárs- és a napraforgóméz biofilm-gátló hatása volt a legmagasabb, a 2022-es mintáknál a gátlási arány elérte a 80%-ot a *Haemophilus* törzsekkel szemben. Alacsonyabb aktivitást mutattak az akác- és aranyvesszőmézek, de a 2022-es friss minták ebben az esetben is átlagosan 70%-ban gátolták a biofilmképződést a választott baktériumtörzseknél. Minden évet figyelembe véve a mézminták a *Haemophilus* törzsekkel szemben tudták a legjelentősebb biofilm-ellenes hatást kifejteni, míg a *P. aeruginosa* és a *S. pneumoniae* törzsek esetén alacsonyabb volt az aktivitásuk (Nagy-Radványi *et al.*, 2024).



6. ábra: Mézminták gátló hatása *H. influenzae* (A), *H. parainfluenzae* (B), *P. aeruginosa* (C) és *S. pneumoniae* (D) biofilm képzésére. Ak-akácmez, H-hárméz, N-napraforgóméz, Ar-aranyvesszóméz. Az adatokat dobozdiagramok segítségével fejeztük ki: a minimum és maximum értékeket függőleges vonalak, míg a diagramon belüli mediánt vízszintes vonallal ábrázoltuk. A dobozok feletti különböző kisbetűk a gátlási arányok átlagai közötti szignifikáns különbségeket, a dobozok feletti azonos kisbetűk az egymástól szignifikánsan nem eltérő átlagértékeket jelölik a Student-féle *t*-próba szerint ($p \leq 0,01$).

A 2022-es hársmez minta 81,3 és 81,6%-os biofilmgátlási arányt mutatott a *H. parainfluenzae* és *H. influenzae* törzsekkel szemben. A *S. pneumoniae* baktériumnál 78,2%-os, a legellenállóbb *P. aeruginosa*-nál 74,5%-os biofilmgátlást eredményezett a hársmezes kezelés. Megfigyeléseinkhez hasonlóan a Közép- és Észak-Európából származó hársmezes is erős antibakteriális és biofilm-gátló aktivitással rendelkeztek (Matzen *et al.*, 2018; Farkasovska *et al.*, 2019; Balázs *et al.*, 2021; Farkas *et al.*, 2022; Balázs *et al.*, 2023). Matzen és munkatársai (2018) tizenegy dán mézminta és manukaméz elemzése során a hársmezet találták a legerősebb antibakteriális hatásúnak. Majkut és kutatócsoportja (2021) négy mézminta (hárs-, repce-, hajdina- és virágméz) antibakteriális aktivitásának elemzése során (*P. aeruginosa*-val szemben) szintén erre a következtetésre jutott. Ennek ellenére a legtöbb, mézet tartalmazó gyógyászati készítmény (pl. mézes kötszerek, torokspray-k) a szintén jelentős antimikrobás aktivitással rendelkező új-zélandi manukamézet tartalmazza. Emiatt nélkülözhetetlen az európai fajtamézek átfogó vizsgálata, hiszen a helyi termelők által előállított pl. hársmez helyettesíthetné a manukamézet az adott termékekben, így csökkentve a szállítási időt és a szállítás során bekövetkező esetleges minőségromlás kockázatát (hő- és fénykitettség). Nem elhanyagolható szempont a helyben hozzáférhető, Európában gyakorinak számító fajtamézek könnyebb elérhetősége és jóval alacsonyabb beszerzési ára a manukamézéhez viszonyítva. Skadiņš és munkatársai (2023) 40 lett monoflorális mézminta elemzésekor, kiválasztotta azt a 16 fajtamézet, amelyek az agarlyuk diffúziós eljárás és a MIC meghatározás (mikrodilúciós módszer) alapján alkalmasak lehetnek a tesztbaktériumok biofilmképzésének gátlására. A 10% MIC értékkel rendelkező hársmez is a kiválasztott fajtamézek között szerepelt és a *P. aeruginosa* baktériumnál 40%-ban, az MRSA esetén 60% felett gátolta a biofilmképződést. A mi esetünkben is a *P. aeruginosa* volt a kevésbé érzékeny patogén, bár saját vizsgálatunkban a nagyobb MIC érték ellenére (2022-es minta – 12,5%) mi jóval magasabb gátlási arányt (74,5%) figyeltünk meg. Skadiņš és kutatócsoportja (2023) jelentősebb gátlást közölt a Gram-negatív baktériumok (*E. coli*, *P. aeruginosa*) esetén, mint a Gram-pozitívaknál (*S. aureus*, MRSA). Az *E. coli* biofilm biomasszájának növekedését 53-65%-ban gátolták a vizsgált mézminták, a *S. aureus* baktériumnál 25-62%-ban. Eredményeink alapján a Gram-pozitív *S. pneumoniae* nagyobb mértékű ellenállást mutatott a mézes kezelésekre (mind a négy fajtaméz esetén), mint a Gram-negatív *Haemophilus* törzsek. Újabb vizsgálatokra lenne szükség további Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumtörzsek bevonásával, hogy nagy biztonsággal

megállapítható legyen, melyik csoportba tartozó baktériumok biofilmképzését tudják nagyobb eséllyel gátolni az egyes méztípusok.

Bár kísérleteinkben az akácméz a többi fajtamézhez képest alacsonyabb antibakteriális és biofilm-ellenes aktivitást mutatott a légúti kórokozókkal szemben, a sebfertőzéseknel jelentős lehet a hatása. Ranzato és munkatársai (2013) megfigyelték, hogy az akác- és hajdinamézek aktívabbak voltak a sebek záródásának elősegítésében, mint a manukamézek. Az antibakteriális hatás mellett az akácméz indukálta az interleukinek (IL-4, IL-6 és IL-8) mennyiségének növekedését, ezáltal elősegítve a sebgyógyulás folyamatát. Az általunk vizsgált 2022-es akácméz minta biofilmgátlási aránya 74,1% volt a *H. parainfluenzae* baktériummal szemben és a *H. influenzae* esetén is nagyon hasonló, 75%-os értéket kaptunk. A *S. pneumoniae* biofilmképzését 70,3%-kal csökkentette, a *P. aeruginosa* baktériumét 67,9%-kal.

Bolognese és munkatársai (2016) is a *P. aeruginosa*-t választották modell mikroorganizmusnak és arra keresték a választ, hogy melyek azok a genetikai tényezők, amelyek szerepet játszhatnak a baktérium mézstresszre adott válaszában. Korongdiffúziós módszerrel tesztelték a választott fajtamézek (akác, hárs, gesztenye, narancs, fenyő, manuka) antibakteriális aktivitását a PAO1 törzs ellen. Az akác-, narancs- és eukaliptuszméz csak 20%-os koncentráció esetén mutatott aktivitást, míg a hárs-, gesztenye- és manukaméz már 15%-os koncentrációnál is jelentős gátlást eredményezett. A legkiemelkedőbb a fenyőméz (mézharmatmézek egyik típusa) volt, így ezt a fajtamézet használták az érzékeny *P. aeruginosa* mutánsok kiválasztására. Mind a négy mutánsnak károsodott a hidrogén-peroxidot megkötő kataláz A (KatA) enzim működése. A továbbiakban a *katA* gén eliminálása a kutatócsoport várakozásainak megfelelően nemcsak a H₂O₂-dal szemben, hanem más bioaktív vegyületekkel szemben is érzékennyé tették az egyes mutánsokat, beleértve a manukaméz fő antibakteriális hatóanyagát, a metilglioxált. A genetikai komplementáció, valamint az extracelluláris kataláz tartalmazó PAO1 felülűszó hozzáadása helyreállította a mézzel szembeni nagyobb toleranciát minden mutánsban. Amennyiben természetes módon nem tartalmaz KatA enzimet a *P. aeruginosa* baktérium, a biofilmbe rendeződés következtében akár egy másik törzs baktériumsejtjétől is megkaphatja a *katA* gént horizontális géntranszfer segítségével. Ebből kifolyólag fontos a bakteriális biofilmek létrejöttének gátlása, hiszen megakadályozhatjuk a baktériumsejtek közötti géncserét, ezzel növelve a különböző terápiák sikerességének esélyét.

A 2022-es napraforgóméz minta 82,7%-kal csökkentette a biofilmképződést a *H. parainfluenzae*-nél és 83,2%-kal a *H. influenzae* baktériumnál. A *S. pneumoniae* esetén a gátlási arány közel 80% volt (79,2%), de a *P. aeruginosa*-nál is 75% feletti értéket mértünk. Korábbi tanulmányunkban, ahol akác-, hárs- és napraforgómézek biofilm-ellenes hatását teszteltük légúti patogének ellen, a legerősebb gátlást (80-83%) a hársméznél tapasztaltuk mindegyik baktériumtörzs (*H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*) esetében. A napraforgómézek gátlási aránya 75 és 80%-os érték között mozgott, a legkevésbé gátló akácméz minták biofilmképződést gátló hatása 69-75% között változott (Balázs *et al.*, 2021). Eredményeink alapján a 2022-es napraforgóméz a biofilm termelődését jelentősebben csökkentette, mint az azonos évből származó hársmész. A 2020-as és 2021-es mintáknál a hársméznek volt jelentősebb a biofilm-ellenes aktivitása és korábbi vizsgálatsorozatunk is ezeket az eredményeket támasztja alá. A napraforgómézeknél fontos szerepet játszhat a napraforgó fajtája a gátló hatás mértékében.

Az özönnövények komoly gondot jelentenek a hazai ökoszisztémák diverzitásának megőrzésében. Biomassájuk jelentős, ezért napjainkban egyre több kezdeményezés tűzi ki célul az özönnövények hasznosítását. Ennek fényében a hazánkban kiterjedt állományokat alkotó, jelentős természetvédelmi károkat okozó magas aranyvessző (*Solidago gigantea*) virágaiból nyerhető méz kiegészítő kezelésként történő használata számottevő lehet. A 2022-es aranyvesszőmész 78%-os gátlási arányt mutatott a *Heamophilus* törzsekkel szemben, míg ez az érték a *S. pneumoniae* baktériumnál 74,2%-ra, a *P. aeruginosa* esetén 70%-ra csökkent. Jelen kísérletsorozatunkat megelőzően már teszteltük az aranyvesszőmész biofilm-ellenes hatását sebfertőzést kiváltó baktériumok (*P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, MRSA) ellen. Ebben a vizsgálatban a hárs- és a gesztenyemész volt a legkiemelkedőbb, az aranyvesszőmész mintánál 50-60%-os gátlást figyeltünk meg (Balázs *et al.*, 2023).

Számos kutatócsoport beszámolt azokról a baktériumfajokról, amelyek nagy érzékenységet mutattak a mézre: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Micrococcus luteus* és *Bacillus subtilis* (Al-Waili *et al.*, 2011; Albaridi, 2019; Mama *et al.*, 2019; Yilmaz & Aygin, 2020). Ezek közül is az egyik legtöbbet vizsgált a *P. aeruginosa*, azonban a *H. influenzae* és a *H. parainfluenzae* baktériumok mézzel történő kezeléséről kevés adat áll rendelkezésre. Newby és munkatársai (2018) megfigyelései alapján a *H. influenzae* érzékenységet mutatott a SurgihoneyRO-ra

(engedéllyel rendelkező, CE-jelölésű steril méz, amelyet biológiailag úgy alakítottak ki, hogy lehetővé tegye a H₂O₂ szabályozott felszabadulását hosszabb időn keresztül). A mézminta jelentős mértékben gátolta a baktérium biofilmképzését. Kiemelendő, hogy a méz biológiai aktivitását *H. parainfluenzae* ellen korábbi tanulmányunkban elsőként írtuk le, illetve elsőként bizonyítottuk az akác-, hárs-, és napraforgómézek *Haemophilus* törzsekkel szembeni antibakteriális és biofilm-ellenes aktivitását (Balázs *et al.*, 2021). Mindemellett az aranyvesszőmézek ezen tulajdonságait ugyancsak elsőként tártuk fel a *H. influenzae* és *H. parainfluenzae* légúti patogének esetén (Nagy-Radványi *et al.*, 2024). Az egyes fajtamézek vizsgálata *S. pneumoniae* baktériummal szemben kevesebb figyelmet kapott a *P. aeruginosa*-hoz képest, azonban azt több kutatás is alátámasztotta, hogy a streptococcusok érzékenyek a mézes kezelésre (Moussa *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2013; Ramsay *et al.*, 2019). Öt különböző finn fajtaméz közül az erdei derécméz (*Epilobium angustifolium*) bizonyult a leghatékonyabbnak a *S. pneumoniae* ellen, összehasonlítva a hanga-, vörös áfonya-, hajdina- és törpemálnamézzel (Huttunen *et al.*, 2013). Huttunen kiemelte, hogy a *S. pneumoniae* volt a legérzékenyebb a *S. pyogenes* és a *S. aureus* baktériumokhoz képest. Korábbi publikációnkban elsőként közöltünk adatokat az akác-, hárs- és napraforgómézek biofilmképződést gátló hatásáról a *S. pneumoniae* esetén (Balázs *et al.*, 2021), illetve az aranyvesszőmész biofilm-ellenes hatását is elsőként írtuk le ennél a baktériumnál (Nagy-Radványi *et al.*, 2024).

Kutatócsoportunk elsőként térképezte fel négy különböző magyar fajtaméz tárolási idejével összefüggő biofilm-ellenes hatás csökkenését Gram-pozitív és Gram-negatív légúti baktériumokkal szemben.

4.5. Mézminták membrándegradáló tulajdonsága

A Gram-festés technikája lehetővé tette a baktériumok sejtfal tulajdonságaik alapján történő megkülönböztetését és ennek köszönhetően Gram-pozitív vagy Gram-negatív osztályba sorolását. A Gram-pozitív baktériumokat citoplazmamembrán és vastag sejtfal (több rétegű peptidoglikán, teikolsav, lipoteikolsav, némi fehérje és szénhidrát) jellemzi, a Gram-negatív baktériumoknál a citoplazmamembrán mellett egy külső membrán (lipopoliszacharidok – LPS, külső membránfehérjék, porinok) is megfigyelhető, amelyek között egy vékony peptidoglikán réteg helyezkedik el (Reichmann & Gründling, 2011; Sohlenkamp & Geiger, 2016). Természetes védelmüknek köszönhetően a Gram-negatív baktériumok ellen hatástalanok a Gram-pozitív baktériumokkal szemben alkalmazott

antibiotikumok. Ezek a szerek a Gram-negatív baktériumokra jellemző külső membránon nem képesek átjutni, így nem érik el célpontjukat (például a vancomycin esetében a peptidoglikán réteget a két membrán közötti periplazmában, ahol – Gram-pozitív baktériumok esetén – a vancomycin a peptidoglikánok közötti keresztkötések létrejöttét gátolja) (Tsuchido & Takano, 1988). Ahhoz, hogy egy antibiotikum ki tudja fejteni antimikrobiális hatását, el kell jutnia sejten belüli célpontjához, majd ott olyan koncentrációban kell felhalmozódnia, amelyben már képes aktivitást mutatni, például egy adott sejtfolyamatot gátolni (Walsh, 2000). Ezen tények ismeretében elengedhetetlen olyan alternatív megoldások keresése, amelyek elősegítik a bakteriális membrán roncsolását.

A méz egyik hatásmechanizmusának bemutatásához a korábbi vizsgálatokban magas aktivitást mutató hársmézet választottuk. Ennél a kísérletsorozatnál is több évből származó mintákkal dolgoztunk és különböző koncentrációjú (20, 40, 60 és 90%) mézoldatok membrándegradáló hatását Gram-pozitív (*S. pneumoniae*) és Gram-negatív (*P. aeruginosa*) baktérium esetén is tanulmányoztuk (5. táblázat). A 2020-as hársmézes kezelésnél a bakteriális membrán integritásának elvesztése 60%-os és afeletti koncentrációban volt megfigyelhető, míg a 2021-es minta alkalmazásakor a 40%-os koncentrációnál is történt membrándegradáció. A 2020-as mintánál, a 60 és 90%-os koncentrációk esetén tapasztaltuk a legnagyobb különbséget, mindkét vizsgálatba bevont patogénnél. A *P. aeruginosa* és *S. pneumoniae* baktériumoknál a 60%-os mézkoncentráció 7,6 és 9,7%-os bakteriális örökítőanyag kiömlést eredményezett, ezzel szemben a 90%-os 45,2 és 49,9%-ot. A legnagyobb DNS felszabadulást a 2022-es hársmész használatakor mértük, itt az alacsony 20%-os koncentrációnál is volt aktivitás. A *S. pneumoniae* baktériumnál a 2022-es, 60%-os mézes kezelést alkalmazva a felszabadult DNS mennyisége elérte a 43,7 %-ot. A DNS felszabadulás kinetikájának vizsgálata érdekében a minták 60%-os oldatát különböző időintervallumokban (20, 40, 60 és 90 perc) mértük. Ez a kísérlet kimutatta, hogy a bakteriális membrán lebomlása a hársmézes (2020, 2021, 2022) kezelés után hány perc elteltével kezdődött meg (6. táblázat). A 2022-es hársméznél már a 20. percnél, míg a 2020-as esetén a 60. percnél detektáltunk bakteriális DNS-t. Eredményeink alapján a Gram-negatív *P. aeruginosa* ebben az esetben is ellenállóbb baktériumnak bizonyult a Gram-pozitív *S. pneumoniae*-hoz képest (5. és 6. táblázat) (Nagy-Radványi *et al.*, 2024).

5. táblázat: Hársmezek hatása a DNS felszabadulására Gram-negatív (*P. aeruginosa*) és Gram-pozitív (*S. pneumoniae*) baktériumok esetén (2022-ben mérve)

Hársmez		DNS felszabadulás a baktériumsejtekből (%)	
Év	Koncentráció (%)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>
2020	0	0	0
	20	0	0
	40	0	0
	60	7,6 ± 0,9 ^a	9,7 ± 1,3 ^b
	90	45,2 ± 2,5 ^a	49,9 ± 3,0 ^b
2021	0	0	0
	20	0	0
	40	8,7 ± 1,3 ^a	11,3 ± 2,1 ^b
	60	18,8 ± 2,3 ^a	21,6 ± 2,6 ^a
	90	56,2 ± 2,5 ^a	60,1 ± 2,9 ^b
2022	0	0	0
	20	10,9 ± 2,1 ^a	15,2 ± 2,4 ^b
	40	28,7 ± 2,1 ^a	38,6 ± 1,2 ^b
	60	39,2 ± 1,7 ^a	43,7 ± 2,8 ^b
	90	100	100

Az adatok hat független mérés átlagai ± szórása (n = 6). Ugyanabban a sorban látható különböző kisbetűk mind a három év esetén szignifikáns különbséget jeleznek a két baktérium között a Student-féle *t*-teszt szerint ($p \leq 0,05$).

6. táblázat: 60%-os (w/w) hárszékkel kezelt Gram-negatív (*P. aeruginosa*) és Gram-pozitív (*S. pneumoniae*) baktériumokból felszabaduló, 260 nm-en abszorbeáló nukleinsav kinetikája (2022-ben mérve)

Hárszék		DNS felszabadulás a baktériumsejtekből (%)	
Év	Idő (perc)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>
2020	0	0	0
	20	0	0
	40	0	0
	60	7,6 ± 0,9 ^a	9,7 ± 1,3 ^b
	90	9,8 ± 1,3 ^a	10,5 ± 2,2 ^a
2021	0	0	0
	20	0	0
	40	12,4 ± 2,3 ^a	14,2 ± 2,3 ^b
	60	18,8 ± 2,3 ^a	21,6 ± 2,6 ^a
	90	23,2 ± 1,8 ^a	29,3 ± 3,1 ^b
2022	0	0	0
	20	22,5 ± 2,5 ^a	26,5 ± 1,8 ^b
	40	35,1 ± 2,5 ^a	40,5 ± 2,2 ^b
	60	39,2 ± 1,7 ^a	43,7 ± 2,8 ^b
	90	65,1 ± 3,0 ^a	69,8 ± 2,2 ^b

Az adatok hat független mérés átlagai ± szórása (n = 6). Ugyanabban a sorban látható különböző kisbetűk mind a három év esetén szignifikáns különbséget jeleznek a két baktérium között a Student-féle *t*-teszt szerint ($p \leq 0,05$).

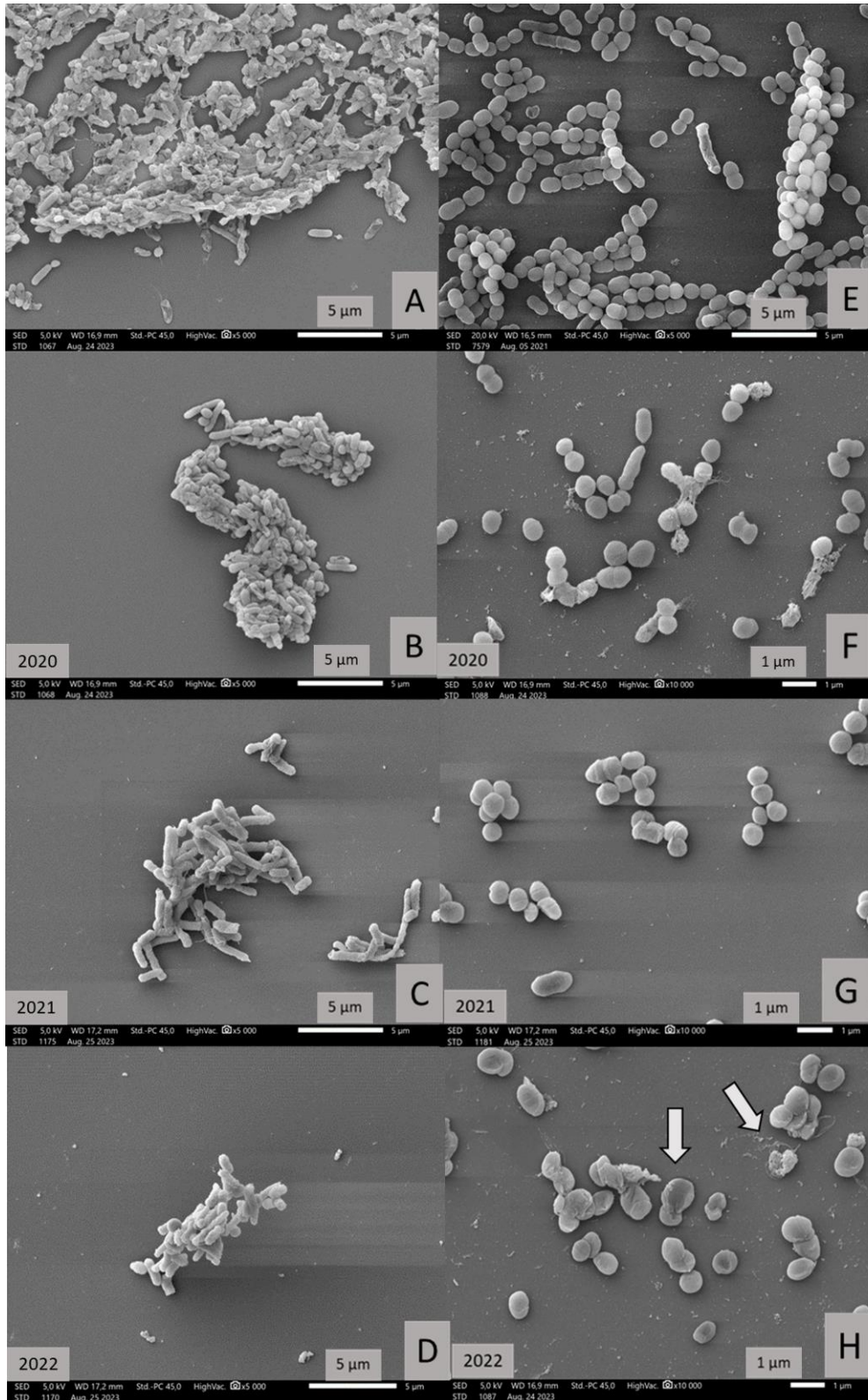
Egy másik membrándegradációs kísérlet sorozatunkban tapasztaltakhoz hasonlóan a hárszékes kezelést követően a Gram-pozitív *S. pneumoniae* baktériumnál jelentősebb volt a bakteriális örökítőanyag felszabadulás, mint a Gram-negatív *P. aeruginosa* esetén (Balázs *et al.*, 2021). Ebben a tanulmányban 40%-os mézkoncentráció alatt nem tapasztaltunk aktivitást egyik fajtaméznél sem, azonban az efeletti koncentrációknál a 2022-es hárszékes kezelés eredményei összecsengenek a korábban mértekkel. A *P. aeruginosa* és *S. pneumoniae* baktériumokból távozott DNS mennyisége 60%-os mézkoncentrációnál 40,2 és 42,5% volt, míg a jelenlegi vizsgálatoknál 39,2 és 43,7%. A bakteriális membrán lebomlásának időbeli tanulmányozása során is közel azonos

értékeket kaptunk mindkét baktériumtörzsnél. Egy 2023-as publikációnkban ugyancsak közelítő adatokat kaptunk, a hársméz 40 és 60%-os koncentrációjánál 35,8% és 44,5% kiömlött DNS-t detektáltunk a *P. aeruginosa* esetén (Balázs *et al.*, 2023). Otmani és munkatársai (2021) kutatása is alátámasztja azt a tényt, miszerint a Gram-pozitív baktériumok szerkezeti felépítésüknek köszönhetően kevésbé ellenállóak a mézes kezeléseknek. Esetükben a Gram-pozitív *S. aureus* membránját hatékonyabban degradálták az algériai mézek, mint a Gram-negatív *Salmonella typhi* baktériumét, azonban több olyan tanulmány is megjelent, amelyben a Gram-negatív baktériumok bizonyultak érzékenyebbeknek (Combarros-Fuertes *et al.*, 2019; Combarros-Fuertes *et al.*, 2020). Egyik korábbi kutatómunkánk (Balázs *et al.*, 2023) is ezt mutatja, ahol sebfertőzést okozó baktériumtörzseket vizsgáltunk. Combarros és munkatársai (2019, 2020) megfigyelték, hogy az avokádó-, gesztenye- és manukamézek nagyobb mértékben degradálták a Gram-negatív *E. coli* membránját, mint a Gram-pozitív *S. aureus* baktériumét, továbbá a krónikus sebeket okozó patogének elemzése során a *P. aeruginosa* DNS felszabadulása (pl. 60%-os mézkoncentráció → 44,5%) a hársméz hatására jelentősebb volt, mint a Gram-pozitív *S. epidermidis* (38,3%) vagy MRSA (39,4%) esetén (Balázs *et al.*, 2023). Bár ezeknek a baktériumoknak a külső membránja nagyobb védelmet nyújthat, azonban a lipopoliszacharid réteg elpusztításával megnő a külső membrán permeabilitása, amely nagymértékben hozzájárulhat a DNS felszabadulásához (Brudzynski & Sjaarda, 2014). Ezek az eltérő eredmények azt mutatják, hogy a baktériumok szerkezeti felépítése kisebb mértékben játszhat szerepet az ellenállás kialakításában, inkább az egyes törzsek sajátos védelmi mechanizmusai a döntők. Vizsgálatsorozatunkban a 2022-es hársméz mind a két tesztbaktérium membránját sikeresen degradálta, ezzel elérve a bakteriális örökítőanyag felszabadulását és biztosítva a baktériumsejt pusztulását. Habár a 2020-as és 2021-es minták aktivitása alacsonyabb volt, a mézkoncentráció növelésével így is jelentős roncsolás érhető el. A méz, mint kiegészítő kezelés hozzájárulhat az eredményes antibiotikum-terápiához és a rezisztencia visszaszorításához.

4.6. A SEM módszer eredményei

A könnyű kezelhetőség és a vizsgálandó minta viszonylag egyszerű előkészítése miatt a scanning elektronmikroszkópokat széles körben használják, többek között a mikrobiológiában is. Népszerűségének oka, hogy lehetővé teszi a vizsgált anyag különböző betekintési szögekből történő tanulmányozását, illetve manapság már nemcsak a minta felületének közeléből kapható információ, hanem szerkezeti, topografikus és összetételbeli adatokat is nyerhetünk (Li & Craig, 2023).

A magas aktivitású hársmez Gram-pozitív (*S. pneumoniae*) és Gram-negatív (*P. aeruginosa*) baktériumok biofilmképzésére kifejtett gátló hatását SEM felvételeken szemléltettük (7. ábra). A kezeletlen minták esetén kialakult a bakteriális biofilmek háromdimenziós szerkezete (7. A és E ábra), míg a kezelt mintáknál a mézek korának megfelelő mértékben gátlódott a biofilmképződés. A 2020-as és 2021-es hársmez kisebb mértékben csökkentette a biofilm képződését (7. B, C, F és G ábra), mint a 2022-es (7. D és H ábra), hasonlóan a korábbi eredményekhez. A 2020-as és 2021-es mézminták esetén a baktériumsejtek kitapadtak és a mikrokolóniák is kialakultak, de lényegesen kevesebb baktériumsejt alkotta a képződött biofilmet. Ezzel szemben a 2022-es hársmezzel kezelt, különálló *S. pneumoniae* baktériumsejtek degradálódtak és a sejtanyaguk kifolyt (7. H ábra). A *P. aeruginosa*-nál csökkent a biofilm biomasszájának mennyisége, de a baktériumsejtek épek maradtak (7. D ábra). A kezeletlen minták képein megfigyelhető, hogy a *P. aeruginosa* azonos idő alatt jelentősebb mennyiségű biofilmet termel, mint a *S. pneumoniae* (7. A és E ábra), ezzel is hozzájárulva az ellenállóképessége fokozásához (Nagy-Radványi *et al.*, 2024).



7. ábra: *P. aeruginosa* (A, B, C, D) és *S. pneumoniae* (E, F, G, H) scanning elektronmikroszkópos felvételei. Baktériumtörzsek kontrollmintái (A, E); különböző évekből származó, MIC/2 koncentrációjú hársmézzel kezelt *P. aeruginosa* (B, C, D) és *S. pneumoniae* (F, G, H). „H” képen a nyilak a degradálódott baktériumsejteket jelölik.

A *P. aeruginosa* által kiváltott krónikus légúti fertőzéseknél a patogén önállóan vagy más baktériumokkal kevert biofilmet alkotva eredményezi a megbetegedést (Høiby *et al.*, 2010). Egy frissen megjelent publikációban a gesztenyeméz hatékonyan gátolta a *P. aeruginosa* és az MRSA kevert biofilmjének termelődését. A SEM felvételek alapján a kezelés hatására a sejtek planktonikus formát vettek fel és nem voltak képesek a háromdimenziós szerkezet kialakítására (Kolah *et al.*, 2024). Egy 2023-as tanulmányunkban szintén a gesztenyeméz biofilm-ellenes aktivitását szemléltettük Gram-pozitív (*S. epidermidis*) és Gram-negatív (*P. aeruginosa*) baktériumokkal szemben. A gesztenyemézes kezelés ellenére a *P. aeruginosa*-nál összetapadt baktériumsejteket figyeltünk meg a scanning elektronmikroszkóppal készített képeken, habár a biofilmképződés jelentősen csökkent, míg a *S. epidermidis* esetén a sejtek planktonikus formában voltak jelen. Skadiņš és munkatársai (2023) a SEM analízis során megállapították, hogy a Gram-negatív *E. coli* baktériumnál 50%-kal csökkentette a biofilm biomasszáját a mézes kezelés. A Gram-pozitív *S. aureus*-nál kisebb mértékű volt a biofilm-ellenes hatás a legtöbb mézminta alkalmazásakor, azonban két fajtaméz (gesztenye- és hangaméz) esetén ugyancsak 50%-os csökkenést írtak le. Ez a vizsgálat is jól szemlélteti, hasonlóan a membrándegradációs kísérletekhez, hogy az egyes baktériumtörzsek egyedi tulajdonságai (pl. a *P. aeruginosa* alginátnyák termelése) azok, amelyek meghatározzák az ellenállóképességet és nem a Gram-negatív vagy Gram-pozitív csoportba sorolás. A fajtamézek egyedi sajátosságai is hozzájárulnak ahhoz, hogy a mézminták eltérő hatásfokkal képesek csökkenteni a biofilm képződését.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Az antibiotikum-rezisztencia visszaszorításához az alternatív megoldások keresése során fontos az új, akár természetes anyagok alaposabb megismerése, illetve az alkalmazásuk előnyeinek és hátrányainak feltérképezése. A méz erős antibakteriális hatással rendelkezik, azonban ahhoz, hogy egy antibiotikum-terápia kiegészítő kezelése lehessen, több szempontot is figyelembe kell venni. Tanulmányunk rávilágít a méz botanikai eredetének fontosságára, hiszen egyes fajtamézek jelentősebb baktériumgátló hatást képesek kifejteni, illetve az is lényeges, hogy az adott mézre legérzékenyebb baktériumtörzs ellen történjen a kezelés. Megállapítottuk, hogy a vizsgálatba bevont, légúti infekciót kiváltó patogének közül (Gram-negatív *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *P. aeruginosa* és Gram-pozitív *S. pneumoniae*) a *P. aeruginosa* volt a legellenállóbb baktérium a mézzel szemben az *in vitro* mikrobiológiai kísérletek alapján. Mézmintáink közül a hárs- és napraforgóméz rendelkezett a legjelentősebb antibakteriális aktivitással, főként a két *Haemophilus* törzssel szemben, hasonlóan a többi mézmintához, ahol szintén ezek a baktériumok bizonyultak a legérzékenyebbeknek. Az özönnövényként számontartott *S. gigantea*-ról származó aranyvesszőméz, illetve az akácméz gátló hatása sem elhanyagolható. Kutatásunk választ adott arra a kérdésre is, hogy a méz kora mennyiben befolyásolhatja az antibakteriális hatást, illetve milyen mértékben csökken az biofilm-ellenes aktivitás a tárolási idő függvényében. A frissen pörgetett fajtamézek mellett feltártuk az egy és két éve tárolt mézminták biofilm-ellenes hatását, illetve az emögött álló egyik hatásmechanizmust, a membrándegradációt és ennek kinetikáját. Ezen vizsgálatok során kapott eredményeinket SEM felvételekkel szemléltettük. Kutatómunkánk alapján a gyógyászati célra (preventív és kiegészítő terápiaként) alkalmas mézeket érdemes minél frissebben felhasználni a különböző kezelések során, hiszen ebben az esetben fejtik ki a legjelentősebb antibakteriális aktivitást. A virális eredetű akut légúti fertőzésekben az antibiotikum használat csökkentése elengedhetetlen, hiszen indokolatlan és káros. Az akut fázist követően különösen nagy a veszélye a bakteriális felülfertőzésnek, ebben az esetben a méz fogyasztása elsőrendű, kiváló eszköze lehet a felülfertőződés megelőzésének, ezáltal elősegítve a felesleges antibiotikum alkalmazást.

Új tudományos eredményeinket az alábbiakban foglaljuk össze:

1. Magyar fajtamézek esetén elsőként valósítottunk meg egy több évet érintő összehasonlító kísérletsorozatot, ezzel bizonyítva a tárolási idő fontosságát a mézek antibakteriális aktivitása szempontjából. A mézek gátló hatása közel a felére csökkent két év elteltével.
2. Megállapítottuk, hogy a tárolási idő függvényében nem változtak a mézek fizikokémiai paraméterei (pH és elektromos vezetőképesség), azonban a minták színének sötétedését tapasztaltuk. A színváltozás folyamata leginkább az első egy évben ment végbe.
3. Elsőként tártuk fel a komoly természetvédelmi károkat okozó magas aranyvessző mézének *H. influenzae* és *H. parainfluenzae* Gram-negatív légúti patogénekkal szembeni antibakteriális és biofilm-ellenes aktivitását (2022-es friss mintánál a gátlási ráta: 78,1 és 78,3%).
4. Sikeresen bizonyítottuk az aranyvesszőméz biofilmképződést gátló hatását (2022-es mintánál a gátlási ráta: 74,2%) a Gram-pozitív *S. pneumoniae* baktérium esetén.
5. Elsőként írtuk le, hogy a hársméz esetén a tárolási idő függvényében mekkora mézkoncentrációra (egy év elteltével min. 40%, két év után min. 60%) van szükség a bakteriális membrán degradálásához.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abuelgasim H., Albury C., Lee J. (2021): Effectiveness of honey for symptomatic relief in upper respiratory tract infections: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Evid. Based. Med.* 26:57-64.
2. Albaridi N.A. (2019): Antibacterial Potency of Honey. *Int. J. Microbiol.* 2019:2464507.
3. Albaridi N.A. (2019): Antibacterial Potency of Honey. *Int. J. Microbiol.* 2019:2464507.
4. Almasaudi S. (2021): The antibacterial activities of honey. *Saudi J. Biol. Sci.* 28:2188-2196.
5. Alqarni A.S., Owayss A.A., Mahmoud A.A., Hannan M.A. (2014): Mineral Content and Physical Properties of Local and Imported honeys in Saudi Arabia. *J. Saudi Chem. Soc.* 18:618-25.
6. Al-Waili N.S., Salom K., Butler G., Al Ghamdi A.A. (2011): Honey and Microbial Infections: A Review Supporting the Use of Honey for Microbial Control. *J. Med. Food.* 14:1079-1096.
7. Amariei S., Norocel L., Scripcă L.A. (2020): An innovative method for preventing honey crystallization. *IFSET.* 66: 102481.
8. An S.-Q., Murtagh J., Twomey K.B., Gupta M.K., O'Sullivan T.P., Ingram R., Valvano M.A., Tang J.L. (2019): Modulation of antibiotic sensitivity and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by interspecies signal analogues. *Nat. Commun.* 10:2334.
9. Antuori A., Giménez M., Linares G., Pere-Joan Cardona P.-J. (2023): Characterization of respiratory bacterial co-infection and assessment of empirical antibiotic treatment in patients with COVID-19 at hospital admission. *Sci. Rep.* 13:19302.
10. Asma S.T., Imre K., Morar A., Herman V., Acaroz U., Mukhtar H., Arslan-Acaroz D., Shah S.R.A., Gerlach R. (2022): An overview of biofilm formation-combating strategies and mechanisms of action of antibiofilm agents. *Life (Basel).* 12:1110.
11. Babin B.M., Atangcho L., van Eldijk M.B., Sweredoski M.J., Moradian A., Hess S., Tolker-Nielsen T., Newman D.K., Tirrell D.A. (2017): Selective proteomic analysis of antibiotic-tolerant cellular subpopulations in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *mBio.* 8:e01593-17.
12. Bagge N., Hentzer M., Andersen J.B., Ciofu O., Givskov M., Høiby N. (2004): Dynamics and spatial distribution of β -lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1168-1174.
13. Bajanca-Lavado M.P., Cavaco L., Fernandes M., Touret T., Candeias C., Simões A.S., Sá-Leão R. (2022): *Haemophilus influenzae* carriage among Healthy Children in Portugal, 2015-2019. *Microorganisms.* 10:1964.

14. Balázs V.L., Nagy-Radványi L., Bencsik-Kerekes E., Koloh R., Szabó D., Kocsis B., Kocsis M., Farkas Á. (2023): Antibacterial and Antibiofilm Effect of Unifloral Honeys against Bacteria Isolated from Chronic Wound Infections. *Microorganisms*. 11:509-516.
15. Balázs V.L., Nagy-Radványi L., Filep R., Kerekes E., Kocsis B., Kocsis M., Farkas Á. (2021): In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activity of Hungarian Honeys against Respiratory Tract Bacteria. *Foods*. 10:1632.
16. Barnes J.S., Foss F.W., Schug K.A. (2013): Thermally accelerated oxidative degradation of quercetin using continuous flow kinetic electrospray-ion trap-time of flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24:1513-1522.
17. Belfield K., Bayston R., Hajduk N., Levell G., Birchall J.P., Daniel M. (2017): Evaluation of combinations of putative anti-biofilm agents and antibiotics to eradicate biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrobial. Chemother.* 72:2531-2538.
18. Bennis S., Chami F., Chami N., Bouchikhi T., Remmal A. (2004): Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:454-8.
19. Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Facino R.M. (2005): Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta.* 533:185-191.
20. Bernal-Mercado A.T., Gutierrez-Pacheco M.M., Encinas-Basurto D., Mata-Haro V., Lopez-Zavala A.A., Islas-Osuna M.A., Gonzalez-Aguilar G.A., Ayala-Zavala J.F. (2020): Synergistic mode of action of catechin, vanillic and protocatechuic acids to inhibit the adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* on silicone surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 128:387-400.
21. Bhatt P., Bhatt K., Huang Y., Li J., Wu S., Chen S. (2023): Biofilm formation in xenobiotic-degrading microorganisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 43:1129-1149.
22. Bodó A., Radványi L., Kőszegi T., Csepregi R., Nagy D.U., Farkas Á., Kocsis M. (2021): Quality Evaluation of Light- and Dark-Colored Hungarian Honeys, Focusing on Botanical Origin, Antioxidant Capacity and Mineral Content. *Molecules*. 26:2825.
23. Bodor Z., Kovacs Z., Rashed M.S., Kókai Z., Dalmadi I., Benedek C. (2020): Sensory and Physicochemical Evaluation of Acacia and Linden Honey Adulterated with Sugar Syrup. *Sensors (Basel)*. 20:4845.
24. Bogdanov S., Lüllmann C., Martin P. (1997): Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*. 1-59.
25. Bogdanov S., Ruoff K., Oddo L.P. (2004): Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*. 35:4-17.
26. Bolognese F., Bistoletti M., Barbieri P., Orlandi V.T. (2016): Honey-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* mutants are impaired in catalase A. *Microbiology (Reading)*. 162:1554-1562.

27. Borges A., Ferreira C., Saavedra M.J., Simões M. (2013): Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb. Drug Resist.* 19:256-265.
28. Bouacha M., Besnaci S., Boudiar I. (2023): An Overview of The Most Used Methods to Determine The In Vitro Antibacterial Activity of Honey. *Acta Microbiol. Bulg.* 39:23-30.
29. Brooks L.R.K., Mias G.I. (2018): *Streptococcus pneumoniae's* Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front. Immunol.* 9:1366
30. Brudzynski K. (2020): A current perspective on hydrogen peroxide production in honey. A review. *Food Chem.* 332:127229.
31. Brudzynski K., Kim L. (2011): Storage-induced chemical changes in active components of honey de-regulate its antibacterial activity. *Food Chem.* 126:1155-1163.
32. Brudzynski K., Sjaarda C. (2014): Antibacterial Compounds of Canadian Honeys Target Bacterial Cell Wall Inducing Phenotype Changes, Growth Inhibition and Cell Lysis That Resemble Action of β -Lactam Antibiotics. *PLoS ONE.* 9:e106967.
33. Bucekova M., Buriova M., Pekarik L., Majtan V., Majtan J. (2018): Phytochemicalsmediated production of hydrogen peroxide is crucial for high antibacterial activity of honeydew honey. *Sci. Rep.* 8:1-9.
34. Bucekova M., Jardekova L., Juricova V., Bugarova V., Di Marco G., Gismondi A., Leonardi D., Farkasovska J., Godocikova J., Laho M., Klaudiny J., Majtan V., Canini A., Majtan J. (2019): Antibacterial Activity of Different Blossom Honeys: New Findings. *Molecules.* 24:1573.
35. Butler D.F., Myers A.L. (2018): Changing epidemiology of *Haemophilus influenzae* in children. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 32:119-128.
36. Cámara M., Green W., MacPhee C.E., Rakowska P.D., Raval R., Richardson M.C., Slater-Jefferies J., Steventon K., Webb J.S. (2022): Economic significance of biofilms: a multidisciplinary and crosssectoral challenge. *NPJ Biofilms. Microbiomes.* 8:42.
37. Chantawannakul P., Ramsey S. (2018): The Overview of Honey Bee Diversity and Health Status in Asia. *Asian Beekeeping in the 21st Century.* Springer, Berlin. pp 1-39.
38. Charani E., Holmes A. (2019): Antibiotic stewardship—Twenty years in the making. *Antibiotics.* 8:7.
39. Chegini Z., Khoshbayan A., Moghadam M.T., Farahani I., Jazireian P., Shariati A. (2020): Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Ann. Clin. Microbiol.* 19:1-17.
40. Chou J. W., Skornicki M., Cohen J.T. (2018): Unintended consequences of the potential phase-out of gamma irradiation. *F1000Res.* 7:348.

41. Ciofu O., Moser C., Jensen P.Ø., Høiby N. (2022): Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 20:621-635.
42. CLSI (2012): Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition. *CLSI Document*. M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
43. Cogen A.L., Nizet V., Gallo R.L. (2008): Skin microbiota: A source of disease or defence? *Br. J. Dermatol.* 158:442-455.
44. Colvin K.M., Irie Y., Tart C.S., Urbano R., Whitney J.C., Ryder C., Howell P.L., Wozniak D.J., Parsek M.R. (2012): The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ. Microbiol.* 14:1913-1928.
45. Combarros-Fuertes P., Estevinho L.M., Teixeira-Santos R., Rodrigues A.G., Pina-Vaz C., Fresno J.M., Tornadijo M.E. (2019): Evaluation of Physiological Effects Induced by Manuka Honey Upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Microorganisms.* 7:258.
46. Combarros-Fuertes P., Estevinho L.M., Teixeira-Santos R., Rodrigues A.G., Pina-Vaz C., Fresno J.M., Tornadijo M.E. (2020): Antibacterial Action Mechanisms of Honey: Physiological Effects of Avocado, Chestnut, and Polyfloral Honey upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Molecules.* 25:1252.
47. Cornetti U. (2009): Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin. Dermatol.* 27:175-94.
48. Czigle S., Filep R., Balažová E., Szentgyörgyi H., Balázs V.L., Kocsis M., Purger D., Papp N., Farkas Á. (2022): Antioxidant Capacity Determination of Hungarian-, Slovak-, and Polish-Origin Goldenrod Honeys. *Plants (Basel).* 11:792.
49. Czipa N. Andrási D., Kovács B. (2015): Determination of essential and toxic elements in Hungarian honeys. *Food Chem.* 175:536-542.
50. da Silva P.M., Gauche C., Gonzaga L.V., Costa A.C., Fett R. (2016): Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* 196:309-23.
51. Davies D.G., Geesey G.G. (1995): Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:860-867.
52. Di Pasquale G., Salignon M., Le Conte Y., Belzunces L.P., Decourtye A., Kretzschmar A., Suchail S., Brunet J.L., Alaux C. (2013): Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS One.* 8:e72016.
53. Ding L., Yang Y., Zheng C., Sun G., Han R., Guo Y., Yin D., Wu S., Zhu D., Hu F. (2022): Activities of eravacycline, tedizolid, norvancomycin, nemonoxacin, ceftaroline, and comparators against 1,871 *Staphylococcus* and 1,068 *Enterococcus* species isolates from china: updated report of the CHINET study 2019. *Microbiol Spectr.* 10:0171522.

54. Domenech M., García E., Moscoso M. (2012): Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Biotechnol.* 5:455-465.
55. Dubey G.P., Mohan G.B.M., Dubrovsky A., Amen T., Tsipshtein S., Rouvinski A., Rosenberg A., Kaganovich D., Sherman E., Medalia O., Ben-Yehuda S. (2016): Architecture and Characteristics of Bacterial Nanotubes. *Dev. Cell.* 36:453-461.
56. Đurović V., Mandić L., Mijatović M., Miletić N., a Radovanović M., Mladenović J., Pešaković M., Đukić D. (2022): Comparative analysis of antibacterial and antioxidant activity of three different types of honey. *Acta Agric. Serb.* 27:115-120.
57. Džugan M., Miłek M., Kielar P., Stępień K., Sidor E., Bocian A. (2022): SDS-PAGE Protein and HPTLC Polyphenols Profiling as a Promising Tool for Authentication of Goldenrod Honey. *Foods.* 11:2390.
58. Escrichre I., Juan-Borrás M., Visquert M., Valiente J.M. (2023): An overview of the challenges when analysing pollen for monofloral honey classification. *Food Cont.* 143: 109305.
59. Escuredo O., Dobre I., Fernández-González M., Seijo M.C. (2014): Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chem.* 149:84-90.
60. Farkas Á., Balázs V.L., Kőszegi T., Csepregi R., Kerekes E., Horváth G., Szabó P., Gaál K., Kocsis M. (2022): Antibacterial and Biofilm Degradation Effects of Hungarian Honeys Linked with Botanical Origin, Antioxidant Capacity and Mineral Content. *Front. Nutr.* 9:953470.
61. Farkasovska J., Bugarova V., Godocikova J., Majtan V., Majtan J. (2019): The Role of Hydrogen Peroxide in the Antibacterial Activity of Different Floral Honeys. *Eur. Food Res. Technol.* 245:2739-2744.
62. Flemming H.-C., Wingender J. (2010): The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:623-633.
63. Flemming H-C., Baveye P., Thomas N.R., Stoodley P., Szewzyk U., Wingender J., Wuertz S. (2021): Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. *NPJ Biofilms Microbiomes* 7:10.
64. Gellatly S.L., Hancock R.E. (2013): *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* 67:159-173.
65. Gessard C. (1984): Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. By Carle Gessard (1850–1925). *Rev. Infect. Dis.* 1984, 6:775-776.
66. Gorjanović S.Ž., Alvarez-Suarez J.M., Novaković M.M., Pastor F.T., Pezo L., Battino M., Sužnjević D.Ž. (2013): Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *J. Food Compos. Anal.* 30:13-18.

67. Grooters K.E., Ku J.C., Richter D.M., Krinock M.J., Minor A., Li P., Kim A., Sawyer R., Li Y. (2024): Strategies for combating antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 14:1352273.
68. Guler A., Bakan A., Nisbet C., Yavuz O. (2007): Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. *Food Chem.* 105:1119-1125.
69. Gupta K., Marques C.N.H., Petrova O.E., Sauer K. (2013): Antimicrobial tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is activated during an early developmental stage and requires the two- component hybrid SagS. *J. Bacteriol.* 195:4975-4987.
70. Gupta P., Sarkar S., Das B., Bhattacharjee S., Tribedi P. (2016): Biofilm, pathogenesis and prevention-a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology.* 198:1-15.
71. Gupta P., Sarkar S., Das B., Bhattacharjee S., Tribedi P. (2016): Biofilm, pathogenesis and prevention-a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol.* 198:1-15.
72. Gündoğdu E., Çakmakçı S., Şat G.I. (2019): An Overview of Honey: Its Composition, Nutritional and Functional Properties.
73. Gyergyák K., Boros B., Marton K., Felinger A., Papp N., Farkas Á. (2015): Bioactive constituents and antioxidant activity of some Carpathian Basin honeys. *Nat. Prod. Res.* 11 245-250.
74. Hakansson A.P., Orihuela C.J., Bogaert D. (2018): Bacterial-Host Interactions: Physiology and Pathophysiology of Respiratory Infection. *Physiological Reviews.* 98:781-811.
75. Hall-Stoodley L., Nistico L., Sambanthamoorthy K., Dice B., Nguyen D., Mershon W.J., Johnson C., Ze Hu F., Stoodley P., Ehrlich G.D., Post J.C. (2008): Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiol.* 8:173.
76. Hatjina F, Costa C, Büchler R, *et al.* Population dynamics of European honey bee genotypes under different environmental conditions. *Journal of Apicultural Research* 53 (2014): 233-247.
77. Hermanns R., Mateescu C., Thrasyvoulou A., Tananaki C., Wagener F.A.D.T.G., Cremers N.A.J. (2019): Defining the standards for medical grade honey. *J. Apic. Res.* 59:1-11.
78. Hermosin I., Chicón R.M., Dolores Cabezudo M. (2003): Free Amino Acid Composition and Botanical Origin of Honey. *Food Chem.* 83:263-268.
79. Hindler J.A., Jorgensen J.H. (2011): Susceptibility Test Methods: Fastidious Bacteria. *In Manual of Clinical Microbiology.* Washington, USA.
80. Høiby N. (1977): *Pseudomonas aeruginosa* Infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins

determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 262:1-96.

81. Høiby N., Ciofu O., Bjarnsholt T. (2010): *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Futur. Microbiol.* 5:1663-1674.
82. Holubová A., Chlupáčová L., Cetlová L., Cremers N.A.J., Pokorná A. (2021): Medical-Grade Honey as an Alternative Treatment for Antibiotics in Non-Healing Wounds-A Prospective Case Series. *Antibiotics (Basel).* 10:918.
83. Horak R.D., Leonard S.P., Moran N.A. (2020): Symbionts shape host innate immunity in honeybees. *Proc. Biol. Sci.* 287:20201184.
84. Ielapi N., Nicoletti E., Lorè C., Guasticchi G., Avenoso T., Barbetta A., de Franciscis S., Andreucci M., Sapienza P., Serra R. (2020): The role of biofilm in central venous catheter related bloodstream infections: evidence-based nursing and review of the literature. *Rev. Recent Clin. Trials.* 15:22-27.
85. Jasicka-Misiak I., Makowicz E., Stanek-Wandzel N. (2018): Chromatographic fingerprint, antioxidant activity, and colour characteristic of polish goldenrod (*Solidago virgaurea* L.) honey and flower. *Eur. Food Res. Technol.* 244:1169-1184.
86. Juan-Borrás M., Domenech E., Hellebrandova M., Escriche I. (2014): Effect of country origin on physicochemical, sugar and volatile composition of acacia, sunflower and tilia honeys. *Food Res. Int.* 60:86-94.
87. Kamal M.A., Klein P. (2011): Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi J. Biol. Sci.* 18:17-21.
88. Kaplan J.B., Ragunath C., Ramasubbu N., Fine D.H. (2003): Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Biofilm Cells by an Endogenous - Hexosaminidase Activity. *J. Bacteriol.* 185:4693-4698.
89. Kelly A.M., McLoughlin R.M. (2020): Target the Host, Kill the Bug; Targeting Host Respiratory Immunosuppressive Responses as a Novel Strategy to Improve Bacterial Clearance During Lung Infection. *Front. Immunol.* 11:767.
90. Kerekes E.-B., Deák É., Takó M., Tserennadmid R., Petkovits T., Vágvölgyi C., Krisch J. (2013): Anti-Biofilm Forming and Anti-Quorum Sensing Activity of Selected Essential Oils and Their Main Components on Food-Related Micro-Organisms. *J. Appl. Microbiol.* 115:933-942.
91. Khan F., Abadin Z.U., Rauf N. (2007): Honey: Nutritional and Medicinal Value. *Int. J. Clin. Pract.* 61:1705-7.
92. Khan S.U., Anjum S.I., Rahman K., Ansari M.J., Khan W.U., Kamal S., Khattak B., Muhammad A., Khan H.U. (2018). Honey: single food stuff comprises many drugs. *Saudi J. Biol. Sci.* 25:320-325.
93. Khatami S.H., Vakili O., Ahmadi N., Soltani Fard E., Mousavi P., Khalvati B., Maleksabet A., Savardashtaki A., Taheri-Anganeh M., Movahedpour A. (2021): Glucose oxidase: applications, sources, and recombinant production. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 69:939-950.

94. Khataybeh B., Jaradat Z., Ababneh Q. (2023): Anti-bacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities of honey: A review. *J. Ethnopharmacol.* 317:116830.
95. Kim L., McGee L., Tomczyk S., Beall B. (2016): Biological and Epidemiological Features of Antibiotic-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Pre- and Post-Conjugate Vaccine Eras: a United States Perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 29:525-52.
96. King P. (2012): *Haemophilus influenzae* and the lung (Haemophilus and the lung). *Clin. Transl. Med.* 1:10.
97. Kirketerp-Møller K., Stewart P.S., Bjarnsholt T. (2020): The zone model: A conceptual model for understanding the microenvironment of chronic wound infection. *Wound Repair. Regener.* 28:593-599.
98. Koch C. (2002): Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease. *Pediatr. Pulmonol.* 34:232-236
99. Kocsis M., Bodó A., Kőszegi T., Csepregi R., Filep R., Hoffmann G., Farkas Á. (2022): Quality Assessment of Goldenrod, Milkweed and Multifloral Honeys Based on Botanical Origin, Antioxidant Capacity and Mineral Content. *Int. J. Mol. Sci.* 23:769.
100. Koloh R., Balázs V.L., Nagy-Radványi L, Kocsis B., Kerekes E.B., Kocsis M., Farkas Á. (2024): Chestnut Honey Is Effective against Mixed Biofilms at Different Stages of Maturity. *Antibiotics (Basel).* 13:255.
101. Koo H., Xiao J., Klein M., Jeon J. (2010): Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases Modulate the Establishment of Microcolonies within Multispecies Biofilms. *J. Bacteriol.* 192:3024-3032.
102. Krishnakumar G.S., Mahendiran B., Gopalakrishnan S., Muthusamy S., Elangovan S.M. (2020): Honey based treatment strategies for infected wounds and burns: A systematic review of recent pre-clinical research. *Wound Med.* 30:100188.
103. Krishnan R., Mohammed T., Kumar G.S., SH A. (2021): Honey crystallization: Mechanism, evaluation and application. *J. Pharm. Innov.* 10:222-231.
104. Kuś P.M., Congiu F., Teper D., Sroka Z., Jerković I., Tuberoso C.I.G. (2014): Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. *LWT - Food Sci. Technol.* 55:124-130.
105. Kuś P.M., Jerković I., Marijanović Z., Kranjac M., Tuberoso C.I.G. (2018): Unlocking *Phacelia tanacetifolia* Benth. honey characterization through melissopalynological analysis, color determination and volatiles chemical profiling. *Food Res. Int.* 106:243-253.
106. Kuś P.M., Szweda P., Jerković I., Tuberoso C.I. (2016): Activity of Polish unifloral honeys against pathogenic bacteria and its correlation with colour, phenolic content, antioxidant capacity and other parameters. *Lett. Appl. Microbiol.* 62:269-76.

107. Lee V.T., Matewish J.M., Kessler J.L., Hyodo M., Hayakawa Y., Lory S. (2007): A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* 65:1474-1484.
108. Leyva-Jimenez F.J., Lozano-Sanchez J., Borrás-Linares I., de la Luz Cadiz-Gurrea M., Mahmoodi-Khaledi E. (2019): Potential Antimicrobial Activity of Honey Phenolic Compounds against Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *LWT*.101:236-245.
109. Li C., Craig J. (2023): Particle Orientation Adjustment Inside Scanning Electron Microscope: Side View Approach. *Microsc. Microanal.* 29:174-175.
110. Li Y., Min L., Zhang X. (2021): Usefulness of procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP), and white blood cell (WBC) levels in the differential diagnosis of acute bacterial, viral, and mycoplasmal respiratory tract infections in children. *BMC Pulm. Med.* 21:386.
111. Libonatti C., Varela S., Basualdo M. (2014): Antibacterial activity of honey: A review of honey around the world. *JMAA.* 6:51-56.
112. Liu S., Chen L., Wang L., Zhou B., Ye D., Zheng X., Lin Y., Zeng W., Zhou T., Ye J. (2022): Cluster differences in antibiotic resistance, biofilm formation, mobility, and virulence of clinical enterobacter cloacae complex. *Front. Microbiol.* 13:814831.
113. Liu W., Russel J., Røder H.L., Madsen J.S., Burmølle M., Sørensen S.J. (2017): Low-abundant species facilitates specific spatial organization that promotes multispecies biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 19:2893-2905.
114. Liu Y., Han L., Yang H., Liu S., Huang C. (2020) Effect of apigenin on surface-associated characteristics and adherence of *Streptococcus mutans*. *Dent. Mater. J.* 39:933-940.
115. Lv X., Wang L., Mei A., Xu Y., Ruan X., Wang W., Shao J., Yang D., Dong X. (2023): Recent Nanotechnologies to Overcome the Bacterial Biofilm Matrix Barriers. *Small.* 19:e2206220.
116. Ma Y., Zhang B., Li H., Li Y., Hu J., Li J., Wang H., Deng Z. (2017): Chemical and molecular dynamics analysis of crystallization properties of honey. *Int. J. Food Prop.* 20:725-733.
117. Machado De-Melo A.A., Almeida-Muradian L.B., Sancho M.T., Pascual-Maté A. (2018): Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *J. Apic. Res.* 57:5-37.
118. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. (2012): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:268-81.

119. Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus) (2009a): 1-3-2001/110 számú irányelv. A termékek megnevezései, meghatározásai és jellemzői – Méz. Magyar Élelmiszerkönyv Bizottság, Budapest.
120. Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus) (2009b): 2-100 számú irányelv. Megkülönböztető minőségi jelöléssel ellátott mézfélékről. Magyar Élelmiszerkönyv Bizottság, Budapest.
121. Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus) (2009c): 3-2-2009/1 számú irányelv. Méz mintavételi és vizsgálati módszerei. Magyar Élelmiszerkönyv Bizottság, Budapest.
122. Majewska E., Drużyńska B., Wołosiak R. (2019): Determination of the botanical origin of honeybee honeys based on the analysis of their selected physicochemical parameters coupled with chemometric assays. *Food Sci. Biotechnol.* 28:1307-1314.
123. Majkut M., Kwiecińska-Piróg J., Wszelaczyńska E., Pobereźny J., Gospodarek-Komkowska E., Wojtacki K., Barczak T. (2021): Antimicrobial activity of heat-treated Polish honeys. *Food Chem.* 343:128561.
124. Mama M., Teshome T., Detamo J. (2019): Antibacterial Activity of Honey against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Laboratory-Based Experimental Study. *Int. J. Microbiol.* 2019:7686130.
125. Man W.H., de Steenhuijsen Piters W.A.A., Bogaert D. (2017): The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat. Rev. Microbiol.* 15:259-270.
126. Manzocco L., Calligaris S., Mastrocola D., Nicoli M.C., Lericci C.R. (2001): Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci. Technol.* 11:340-346.
127. Marks L.R., Davidson B.A., Knight P.R., Hakansson A.P. (2013): Interkingdom signaling induces *Streptococcus pneumoniae* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to disease. *mBio.* 4:e00438-13.
128. Masomian M., Ahmad Z., Gew L.T., Poh C.L. (2020): Development of Next Generation *Streptococcus pneumoniae* Vaccines Conferring Broad Protection. *Vaccines (Basel).* 8:132.
129. Matsumoto-Nakano M. (2018): Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 54:22-29.
130. Matzen R.D., Leth-Espensen J.Z., Jansson T., Nielsen D.S., Lund M.N., Matzen S. (2018): The Antibacterial Effect in Vitro of Honey Derived from Various Danish Flora. *Dermatol. Res. Pract.* 2018:7021713.
131. Maurizio A. (1975): Microscopy of honey. In: Honey: A Comprehensive Survey (Ed. E. Crane). Heinemann, London, 240-257.
132. McTaggart L.R., Cronin K., Seo C.Y., Wilson S., Patel S.N., Kus J.V. (2021): Increased incidence of invasive *Haemophilus influenzae* disease driven by non-type B isolates in Ontario, Canada, 2014 to 2018. *Microbiol. Spectr.* 9:e0080321.

133. Messaoudi M., Milenkov M., Albrich W.C., van der Linden M.P., Bénét T., Chou M., Sylla M., Barreto Costa P., Richard N., Klugman K.P., Endtz H.P., Paranhos-Baccalà G., Telles J.N. (2016): The Relevance of a Novel Quantitative Assay to Detect up to 40 Major *Streptococcus pneumoniae* Serotypes Directly in Clinical Nasopharyngeal and Blood Specimens. *PLoS One*. 11:e0151428.
134. Mishra S., Pang S., Zhang W., Lin Z., Bhatt P., Chen S. (2021): Insights into the microbial degradation and biochemical mechanisms of carbamates. *Chemosphere*. 279:130500.
135. Moniruzzaman M., Sulaiman S.A., Khalil M.I., Gan S.H. (2013): Evaluation of Physicochemical and Antioxidant Properties of Sourwood and Other Malaysian Honeys: A Comparison with Manuka Honey. *Chem. Cent. J.* 7:138.
136. Münstedt K., Momm F., Hübner J. (2019): Honey in the management of side effects of radiotherapy- or radio/chemotherapy-induced oral mucositis. A systematic review. *Complement Ther Clin Pract.* 34:145-152.
137. Newby R.S., Dryden M., Allan R.N., Salib R.J. (2018): Antimicrobial activity of a novel bioengineered honey against non-typeable *Haemophilus influenzae* biofilms: An in vitro study. *J. Clin. Pathol.* 71:554-558.
138. Nishino K., Yamasaki S., Nakashima R., Zwama M., Hayashi-Nishino M. (2021): Function and inhibitory mechanisms of multidrug efflux pumps. *Front. Microbiol.* 12:737288.
139. Nolan V.C., Harrison J., Cox J.A. (2019): Dissecting the antimicrobial composition of honey. *Antibiotics*. 8:251.
140. Nwodo U.U., Green E., Okoh A.I. (2012): Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *Int. J. Mol. Sci.* 13:14002-14015.
141. Oddo L.P., Piro R., Bruneau É., Guyot-Declercq C., Ivanov T., Piskulová J., Flamini C., Lheritier J., Morlot M., Russmann H., Von der Ohe W., Von der Ohe K., Gotsiou P., Karabournioti S., Kefalas P., Passaloglou-Katrali M., Thrasyvoulou A., Tsigouri A., Luigi Marcazzan G., Lucia Piana M., Piazza M.G., Sabatini A.G., Kerkvliet J., Godinho J., Bentabol A., Ortiz Valbuena A., Bogdanov S., Ruoff K. (2004): Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*. 35:38-81.
142. Olas B. (2020): Honey and its phenolic compounds as an effective natural medicine for cardiovascular diseases in humans? *Nutrients*. 12:283.
143. Oli M.W., Otoo H.N., Crowley P.J., Heim K.P., Nascimento M.M., Ramsook C.B., Lipke P.N., Brady L.J. (2012): Functional amyloid formation by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 158:2903-2916.
144. Oliveira A., Sousa J.C., Silva A.C., Melo L.D., Sillankorva S. (2018): Chestnut Honey and Bacteriophage Application to Control *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilms: Evaluation in an *ex vivo* Wound Model. *Front. Microbiol.* 9:1725.
145. Oliveira J., Reygaert W.C. (2024): Gram-Negative Bacteria. StatPearls, Treasure Island (FL)

146. Osmon S., Ward S., Fraser V.J., Kollef M.H. (2004): Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. 125:607-616.
147. Pál T. (ed) (2013): Az orvosi mikrobiológia tankönyve. 2. kiadás, Medicina Könyvkiadó, Budapest.
148. Pang Z., Raudonis R., Glick B.R., Lin T.-J., Cheng Z. (2019): Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* 37:177-192.
149. Panlilio H., Rice C.V. (2021): The role of extracellular DNA in the formation, architecture, stability, and treatment of bacterial biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 118:2129-2141.
150. Paramasivan S., Bassiouni A., Shiffer A., Dillon M.R., Cope E.K., Cooksley C., Ramezani M., Moraitis S., Ali M.J., Bleier B., Callejas C., Cornet M.E., Douglas R.G., Dutra D., Georgalas C., Harvey R.J., Hwang P.H., Luong A.U., Schlosser R.J., Tantilipikorn P., Tewfik M.A., Vreugde S., Wormald P.J., Caporaso J.G., Psaltis A.J. (2020): The international sinonasal microbiome study: A multicentre, multinational characterization of sinonasal bacterial ecology. *Allergy.* 75:2037-2049.
151. Paul J. (2024): Respiratory Tract Infections. Disease Causing Microbes. Springer, Berlin. 99-148.
152. Pauliuc D., Oroian M., Ciursă P. (2021): Organic acids content, sugars content and physicochemical parameters of Romanian acacia honey. *Ukr. Food J.* 10:1.
153. Peeters E., Nelis H.J., Coenye T. (2008): Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods.* 72:157-65.
154. Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F. (2003): Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* 133:2812-2819.
155. Peña R.M., Barciela J., Herrero C., García-Martín S. (2004): Solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry determination of monoterpenes in honey. *J. Sep. Sci.* 27:1540-4.
156. Perry E.K., Tan M.-W. (2023): Bacterial biofilms in the human body: prevalence and impacts on health and disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13:1237164.
157. Persano Oddo L., Bogdanov S. (2004): Determination of honey botanical origin: Problems and issues. *Apidologie.* 35:2-3.
158. Petrova O.E., Sauer, K. (2009): A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS Pathog.* 5:e1000668.

159. Pinto R.M., Soares F.A., Reis S., Nunes C., Van Dijck P. (2020): Innovative strategies toward the disassembly of the EPS matrix in bacterial biofilms. *Front. Microbiol.* 11:952.
160. Pitt T. (1998): Pseudomonas, Burkholderia and related genera. *Microbiol. Microb. Infect.* 2:1109-1138.
161. Pontis J.A., Costa L.A.M.A., Silva S.J.R.D., Flach A. (2014): Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. *Food Sci. Technol.* 34:69-73.
162. Preda V.G., Săndulescu O. (2019): Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries. (Craiova).* 7:e100.
163. Proaño A., Coello D., Villacrés-Granda I., Ballesteros I., Debut A., Vizuete K., Brenciani A., Álvarez-Suarez J.M. (2021): The osmotic action of sugar combined with hydrogen peroxide and bee-derived antibacterial peptide Defensin-1 is crucial for the antibiofilm activity of eucalyptus honey. *LWT–Food Sci. Technol.* 136:110379.
164. Puścion-Jakubik A., Borawska M.H., Socha K. (2020): Modern Methods for Assessing the Quality of Bee Honey and Botanical Origin Identification. *Foods.* 9:1028.
165. Qiao J., Chen L., Kong L., Dong J., Zhou Z., Zhang H. (2020): Characteristic Components and Authenticity Evaluation of Rape, Acacia, and Linden Honey. *J. Agric. Food Chem.* 68:9776-9788.
166. Rampelotto P.H. (2013): Extremophiles and extreme environments. *Life.* 3:482-485.
167. Ramsay E.I., Rao S., Madathil L., Hegde S.K., Baliga-Rao M.P., George T., Baliga M.S. (2019): Honey in oral health and care: a mini review. *J. Oral. Biosci.* 61:32-36.
168. Ranzato E., Martinotti S., Burlando B. (2013): Honey Exposure Stimulates Wound Repair of Human Dermal Fibroblasts. *Burn. Trauma.* 1:2321-3868.
169. Rather M.A., Gupta K., Mandal M. (2021): Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz. J. Microbiol.* 52:1701-1718.
170. Reynolds D., Kollef M. (2021): The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs.* 81:2117-2131.
171. Rodis N., Tsapadikou V.K., Potsios C., Xaplanteri P. (2020): Resistance Mechanisms in Bacterial Biofilm Formations: A Review. *J. Emerg. Med.* 4:30.
172. Sager M. (2017): The honey as a bioindicator of the environment. *Ecol. Chem. Eng. S.* 24:583-594.
173. Sakač M., Jovanov P., Marić A., Četojević-Simin D., Novaković A., Plavšić D., Škrobot D., Kovač R. (2022): Antioxidative, Antibacterial and Antiproliferative

- Properties of Honey Types from the Western Balkans. *Antioxidants (Basel)*. 11:1120.
174. Sanchez C.J., Shivshankar P., Stol K., Trakhtenbroit S., Sullam P.M., Sauer K. Hermans P.W., Orihuela C.J. (2010): The Pneumococcal Serine-Rich Repeat Protein Is an Intra-Species Bacterial Adhesin That Promotes Bacterial Aggregation in Vivo and in Biofilms. *PLoS Pathog.* 6:e1001044.
 175. Sari E., Ayyildiz N. (2012): Biological activities and some physicochemical properties of sunflower honeys collected from the thrace region of Turkey. *Pak. J. Biol. Sci.* 15:1102-1110.
 176. Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G. (2002): *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184:1140-1154.
 177. Sauer K., Stoodley P., Goeres D.M., Hall-Stoodley L., Burmølle M., Stewart P.S., Bjarnsholt T. (2022): The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat. Rev. Microbiol.* 20:608-620.
 178. Schmalz G., Cieplik F. (2021): Biofilms on restorative materials. *Monogr. Oral Sci.* 29:155-194.
 179. Shapla U.M., Solayman M., Alam N., Khalil Md. I., Gan S.H. (2018): 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chem. Cent. J.* 12:1-18.
 180. Shrivastava S.R., Shrivastava P.S., Ramasamy J. (2018): World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *J. Med. Soc.* 32:76.
 181. Sierra Y., González-Díaz A., Tubau F., Imaz A., Cubero M., Càmara J., Ayats J., Martí S., Ardanuy C. (2020): Emergence of multidrug resistance among *Haemophilus parainfluenzae* from respiratory and urogenital samples in Barcelona, Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39:703-710.
 182. Sindi A., Chawn M.V.B., Hernandez M.E., Green K., Islam, M.K., Locher C., Hammer K. (2019): Anti-biofilm effects and characterisation of the hydrogen peroxide activity of a range of Western Australian honeys compared to Manuka and multifloral honeys. *Sci. Rep.* 9:1-17.
 183. Singer R., Abu Sin M., Tenenbaum T., Toepfner N., Berner R., Buda S., Schlaberg J., Schönfeld V., Reinacher U., van der Linden M., Claus H., Lâm T.T., Schneider M., Noll I., Haller S., von Laer A. (2024): The Increase in Invasive Bacterial Infections With Respiratory Transmission in Germany, 2022/2023. *Dtsch. Arztebl. Int.* 121:114-120.
 184. Singh I., Singh S. (2018): Honey moisture reduction and its quality. *J. Food Sci. Technol.* 55:3861-3871.
 185. Skadiņš I., Labsvārds K.D., Grava A., Amirian J., Tomsone L.E., Ruško J., Viksna A., Bandere D., Brangule A. (2023): Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Latvian Honey against Causative Agents of Wound Infections. *Antibiotics (Basel)*. 12:816.

186. Sohlenkamp C., Geiger O. (2016): Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* 40:133-59.
187. Solayman M., Islam M.A., Paul S., Ali Y., Khalil M.I., Alam N., Gan S.H. (2016): Physicochemical Properties, Minerals, Trace Elements, and Heavy Metals in Honey of Different Origins: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sc.i Food Saf.* 15:219-233.
188. Sonawane J.M., Rai A.K., Sharma M., Tripathi M., Prasad R. (2022): Microbial biofilms: recent advances and progress in environmental bioremediation. *Sci. Total Environ.* 824:153843.
189. Steindler L., Bertani I., De Sordi L., Schwager S., Eberl L., Venturi V. (2009): LasI/R and RhlI/R quorum sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants. *Appl Env. Microbiol.* 75:5131-5140.
190. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. (2002): Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:187-209.
191. Strateva T., Mitov I. (2011): Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann. Microbiol.* 61:717-732.
192. Tafere D.A. (2021): Chemical composition and uses of Honey: A Review. *J. Food Sci. Nutr.Res.* 4:194-201.
193. Tan H.T., Rahman R.A., Gan S.H., Halim A.S., Hassan S.A., Sulaiman S.A., Kirnpal-Kaur B. (2009): The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complement. Altern. Med.* 9:34.
194. Thi M.T.T., Wibowo D., Rehm B.H.A. (2020): *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* 21:8671.
195. Thomas C.M., Nielsen K.M. (2005): Mechanisms of and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:711-721.
196. Tikhomirova A., Kidd S.P. (2013): *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*: living together in a biofilm. *Pathog. Dis.* 69:114-26.
197. Tkaczenko H., Kurhaluk N., Lukash O., Yakovenko O., Opryshko M., Maryniuk M., Gyrenko O., Buyun L. (2023): In vitro antibacterial efficacy of different natural linden honey against some gram-positive and gram-negative strains. *Agrobiodivers. Improv. Nutr.* 7:173-180.
198. Tomasz A., Beiser S.M. (1965): Relationship between the competence antigen and the competence-activator substance in pneumococci. *J. Bacteriol.* 90:1226-1232.
199. Toyofuku M., Roschitzki B., Riedel K., Eberl L. (2012): Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *J Proteome Res.* 11:4906-4915.
200. Tsuchido T., Takano M. (1988): Sensitization by heat treatment of *Escherichia coli* K-12 cells to hydrophobic antibacterial compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1680-1683.

201. Van Hoecke H., De Paepe A.-S., Lambert E., Van Belleghem J.D., Cools P., Van Simaey L., Deschaght P., Vanechoutte M., Dhooge I. (2016): *Haemophilus influenzae* biofilm formation in chronic otitis media with effusion. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 273:3553-3560.
202. Vazquez-Rodriguez A., Vasto-Anzaldo X.G., Barboza Perez D., Vázquez-Garza E., Chapoy-Villanueva H., García-Rivas G., Garza-Cervantes J.A., Gómez-Lugo J.J., Gomez-Loredo A.E., Garza Gonzalez M.T., Zarate X., Morones-Ramirez J.R. (2018): Microbial Competition of *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L and *E. coli* increase biosynthesis of Non-Toxic Exopolysaccharide with Applications as a Wide-Spectrum Antimicrobial. *Sci. Rep.* 8:798.
203. Vermeë Q., Cohen R., Hays C., Varon E., Bonacorsi S., Bechet S., Thollot F., Corrad F., Poyart C., Levy C., Raymond J. (2019): Biofilm production by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* isolated from the nasopharynx of children with acute otitis media. *BMC Infect. Dis.* 19:44.
204. Vestby L.K., Grønseth T., Simm R., Nesse L.L. (2020): Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics.* 9:59.
205. Vetrivel A., Ramasamy M., Vetrivel P., Natchimuthu S., Arunachalam S., Kim G., Murugesan R. (2021): *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Its Control. *Biologics.* 1:312-336.
206. Von Der Ohe W., Oddo L.P., Piana M.L., Morlot M., Martin P. (2004): Harmonized Methods of Melissopalynology. *Apidologie.* 35:18-25.
207. Wahl B., O'Brien K.L., Greenbaum A., Majumder A., Liu L., Chu Y., Lukšić I., Nair H., McAllister D.A., Campbell H., Rudan I., Black R, Knoll M.D. (2018): Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000-15. *Lancet. Glob. Health.* 6:e744-e757.
208. Walsh C. (2000): Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* 406:775-781.
209. Wang Y., Liu B., Grenier D., Yi L. (2019): Regulatory mechanisms of the luxS/AI-2 system and bacterial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63: e01186-19.
210. Weeks J.R., Staples K.J., Spalluto C.M., Watson A., Wilkinson T.M.A. (2021): The Role of Non-Typeable *Haemophilus influenzae* Biofilms in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 11:720742.
211. Wei X-L., Zeng Q-L., Xie M., Bao Y. (2023): Pathogen Distribution, Drug Resistance Risk Factors, and Construction of Risk Prediction Model for Drug-Resistant Bacterial Infection in Hospitalized Patients at the Respiratory Department During the COVID-19 Pandemic. *Infect. Drug Resist.* 16:1107-1121.
212. Weiser J.N., D.M. Ferreira, J.C. Paton (2018): *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat. Rev. Microbiol.* 16:355-367.

213. Wen S., Feng D., Chen D., Yang L., Xu Z. (2020): Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Genet. Evol.* 80:1-6.
214. Wildman E., Mickiewicz B., Vogel H.J., Thompson G.C. (2023): Metabolomics in pediatric lower respiratory tract infections and sepsis: a literature review. *Pediatr. Res.* 93:492-502.
215. Willian de Alencar Pereira E., Fontes V.C., da Fonseca Amorim E.A., de Miranda R.C.M., Carvalho R.C., de Sousa E.M., Cutrim S.C.P.F., Alves Lima C.Z.G.P., de Souza Monteiro A., Neto L.G.L. (2023): Antimicrobial effect of quercetin against *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.* 180:106119.
216. Won S.-R., Lee D.-C., Ko S. H., Kim J.-W., Rhee H.-I. (2008): Honey Major Protein Characterization and Its Application to Adulteration Detection. *Food Res. Int.* 41:952-6.
217. Wood S.J., Goldufsky J.W., Seu M.Y., Dorafshar A.H., Shafikhani S.H. (2023b): *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxins: Mechanisms of Cytotoxicity and Impact on Inflammatory Responses. *Cells.* 12:195.
218. Wood S.J., Kuzel T.M., Shafikhani S.H. (2023a): *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. *Cells.* 12:199.
219. World Health Organization (2013): WHO Traditional Medicine Strategy: 2014-2023.
220. Xiao J., Su L., Huang S., Liu L., Ali K., Chen Z. (2023): Epidemic Trends and Biofilm Formation Mechanisms of *Haemophilus influenzae*: Insights into Clinical Implications and Prevention Strategies. *Infect. Drug Resist.* 16:5359-5373.
221. Xu L., Fang J., Ou D., Xu J., Deng X., Chi G., Feng H., Wang J. (2023): Therapeutic potential of kaempferol on *Streptococcus pneumoniae* infection. *Microbes. Infect.* 25:105058.
222. Yadav P., Verma S., Bauer R., Kumari M., Dua M., Johri A.K., Yadav V., Spellerberg B. (2020): Deciphering Streptococcal Biofilms. *Microorganisms.* 8:1835.
223. Yan J., Bassler B.L. (2019): Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. *Cell Host Microbe.* 26:15-21.
224. Yang Y., Yang Y., Scherpbier R.W., Zhu X., Chen Y., Zhou Y., Jiang Q. (2019): Coverage of *Haemophilus influenzae* Type b Conjugate Vaccine for Children in Mainland China: Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 38:248-252.
225. Yanwei S., Sijia C., Chen Z., Yali L., Li M., Xiangyu Z. (2018): Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of lemon essential oil on the acid tolerance and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* 87:235-241.
226. Yilmaz A.C., Aygin D. (2020): Honey Dressing in Wound Treatment: A Systematic Review. *Complement. Ther. Med.* 51:102388.

227. Yoon S.S., Hennigan R.F., Hilliard G.M., Ochsner U.A., Parvatiyar K., Kamani M.C., Allen H.L., DeKievit T.R., Gardner P.R., Schwab U., Rowe J.J., Iglewski B.H., McDermott T.R., Mason R.P., Wozniak D.J., Hancock R.E, Parsek M.R., Noah T.L., Boucher R.C., Hassett D.J. (2002): *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: Relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev. Cell.* 3:593-603.
228. Zamuz S., Munekata P.E., Dzuovor C.K., Zhang W., Sant'Ana A.S., Lorenzo J.M. (2021): The role of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* in food. A review. *Trends Food Sci. Technol.* 110:385-392.
229. Zhu X., Ge Y., Wu T., Zhao K., Chen Y., Wu B., Zhu F., Zhu B., Cui L. (2020): Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. *Virus Res.* 285:198005.
230. Zimmermann S., Klinger-Strobel M., Bohnert J.A., Wendler S., Rödel J., Pletz M.W., Löffler B., Tuchscher L. (2019): Clinically approved drugs inhibit the *Staphylococcus aureus* multidrug norA efflux pump and reduce biofilm formation. *Front. Microbiol.* 10: 2762.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik munkám feltételeit biztosították és együttműködésükkel hozzájárultak a kutatás céljainak megvalósításához.

Külön köszönöm témavezetőimnek Dr. Farkas Ágnesnek és Dr. Kocsis Mariannának, akik végig támogattak, bíztattak és rengeteg hasznos szakmai tanáccsal láttak el az évek alatt. Mindig türelemmel és megértéssel fordultak felém, bármilyen kérdés és probléma esetén mellettem álltak.

Köszönettel tartozom Dr. Balázs Viktória Lillának, aki mindvégig segítette a munkámat, a mikrobiológiai vizsgálatok megtervezésénél és kivitelezésénél is mindig számíthattam rá. Barátként biztató hozzáállásával mindig segített túljutnom a nehézségeken, hozzájárult a munkám sikerességéhez.

Köszönöm Dr. Kocsis Bélának a mikrobiológiai vizsgálatok előkészítésében nyújtott segítségét és szakmai iránymutatását.

Köszönettel tartozom Dr. Szabó Péternek, akire a SEM felvételek elkészítésében számíthattam.

Köszönöm továbbá a PTE GYTK Farmakognóziai Intézet összes munkatársának a messzemenő támogatást.

Hálás vagyok szüleimnek, akik végig segítettek a céljaim elérésében, illetve férjemnek és kislányomnak türelmükért és kitartásukért.

A munka a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NKFI K 132044 pályázata segítségével valósult meg.

8. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

8.1. Az értekezés alapját képező publikációk

Nagy-Radványi L., Balázs V.L., Kocsis B., Csikós E., Ángyán V.D., Szabó P., Biró V., Kocsis M., Farkas Á. (2024): Antibacterial activity of Hungarian varietal honeys against respiratory pathogens as a function of storage time. *Scientific Reports*. 14:10200. [IF: 4,996; Q1, D1]

Balázs V.L., Nagy-Radványi L., Bencsik-Kerekes E., Koloh R., Szabó D., Kocsis B., Kocsis M., Farkas Á. (2023): Antibacterial and Antibiofilm Effect of Unifloral Honeys against Bacteria Isolated from Chronic Wound Infections. *Microorganisms*. 11:509-516. [IF: 4,5; Q2]

Balázs V.L.*, Nagy-Radványi L.*, Filep R., Kerekes E., Kocsis B., Kocsis M., Farkas Á. (2021): *In vitro* antibacterial and antibiofilm activity of Hungarian honeys against respiratory tract bacteria. *Foods*. 10:16-32. [IF: 5,561; Q1]

*: osztott első szerzők

8.2. Egyéb publikációk

Koloh R., Balázs V.L., Nagy-Radványi L., Kocsis B., Kerekes E.B., Kocsis M., Farkas Á. (2024): Chestnut Honey Is Effective against Mixed Biofilms at Different Stages of Maturity. *Antibiotics*. 13:255. [IF: 4,8; Q2]

Bodó A., Radványi L., Kőszegi T., Csepregi R., Nagy D. U., Farkas Á., Kocsis M. (2021): Quality Evaluation of Light- and Dark-Colored Hungarian Honeys, Focusing on Botanical Origin, Antioxidant Capacity and Mineral Content. *Molecules*. 26:2825. [IF: 4,927; Q1]

Bodó A., **Radványi L.**, Kőszegi T., Csepregi R., Nagy D. U., Farkas Á., Kocsis M. (2020): Melissopalynology, antioxidant activity and multielement analysis of two types of early spring honeys from Hungary. *Food Bioscience*. 35:100587. [IF: 4,24; Q1]

Kocsis M., Ayaydin F., Kőrösi L., Teszlák P., **Radványi L.**, Jakab G., Hideg É. (2017): Contrasting acclimation mechanisms of berry color variant grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L. cv. Furmint) to natural sunlight conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*. 39:178. [IF: 1,438; Q2]

Egyéb, nem impakt faktoros publikáció

Radványi L., Farkas Á. (2020): Hazai akác-, hárs- és napraforgómézek antibakteriális hatásának vizsgálata. *Méhészet*. 60:18-19.

8.3. Konferencia szereplések

Nagy-Radványi L., Farkas Á., Kocsis M., Kocsis B., Ángyán V.D., Balázs V.L. (2024): Hazai fajtamézek membrándegradáló hatásának változása a tárolási idő függvényében. Magyar Biológiai Társaság XXXIII. Vándorgyűlés. 2024 június 6-7., Pécs, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 35.

Farkas Á., **Nagy-Radványi L.**, Balázs V.L., Bodó A., Koloh R., Ángyán V.D., Csetneki J.K., Kocsis M. (2024): Pollentípusok azonosítása magyar fajtamézekben. Magyar Biológiai Társaság XXXIII. Vándorgyűlés. 2024 június 6-7., Pécs, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 14.

Nagy-Radványi L., Balázs V.L., Kocsis B., Ángyán V.D., Kocsis M., Farkas Á. (2024): Changes of physicochemical properties and antibiofilm activity of Hungarian unifloral honeys as a function of storage time. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVII. and EUFEPS Annual Meeting 2024. 2024 május 23-25., Debrecen, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 351.

Ángyán V.D., Farkas Á., Kocsis B., **Nagy-Radványi L.** (2024): Hársméz, levendula illóolaj és kombinációjuk antibakteriális aktivitása. XII. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia. 2024 április 5-6., Pécs, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 85.

Ángyán V.D., Farkas Á., Kocsis B., **Nagy-Radványi L.** (2023): Honey and essential oil combination versus bacterial biofilm. The Grastyán Endre College Natural Science Workshop's International Scientific Forum. 2023 november 16., Pécs, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 3.

Ángyán V., Balázs V.L., Farkas Á., **Nagy-Radványi L.** (2023): Akác-, hárs- és napraforgómézek hatása baktériumok biofilmképzésére. Fialat Gyógynövénykutatók Fóruma. MGYT Gyógynövény Szakosztály. 2023 október 6., Budapest, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 15.

Farkas Á., **Nagy-Radványi L.**, Kocsis M., Koloh R., Balázs V.L. (2023): Antibacterial, biofilm-inhibiting and anti-quorum-sensing activity of Hungarian unifloral honeys, with special focus on chestnut honey. Chestnut honey for medical use – Symposium. 2023. március 24-26., Ljubljana, Szlovénia. In: Book of Abstracts p. 7.

Balázs V.L., **Nagy-Radványi L.**, Kocsis B., Farkas Á. (2021): Fajtamézek gátló hatása Pseudomonas bakteriális biofilm képzésére. XIX. Szentágothai János Multidiszciplináris Konferencia. 2021. március 26., Pécs, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 244.

Balázs V.L., Szabó P., Kocsis B., **Nagy-Radványi L.**, Farkas Á. (2021): Akác, hárs és napraforgó mézek biofilm képződést gátló hatásának szemléltetése scanning elektronmikroszkóp segítségével. XVI. Növényanatómiai Szimpózium. 2021. november 12., Pécs, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 21.

Nagy-Radványi L., Balázs V.L., Kocsis B., Kocsis M., Farkas Á. (2020): Antibacterial activity of domestic acacia, lime and sunflower honeys. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA 90: 2-3 pp. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, XVI. 2020. szeptember 10-12., Debrecen, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 133.

Nagy-Radványi L., Kocsis B., Farkas Á. (2020): Hazai fajtamézek antimikrobás hatásának vizsgálata agarlyuk diffúziós módszerrel. XVIII. Szentágotthai János Multidiszciplináris Konferencia. 2020. március 12-13., Pécs, Magyarország. In: Book of Abstracts pp. 89-90.

Kocsis M., Bodó A., **Radványi L.**, Teszlák P., Nagy D.U., Farkas Á. (2019): Environmental impacts on bioactivity of grape and honey. FARMACEUTICKY OBZOR 151/08. In: Book of Abstracts p. 180.

Kocsis M., **Radványi L.**, Teszlák P., Hideg É. O., Jakab G. (2016): Acclimative responses of grapevine leaves (*Vitis vinifera* var. Furmint) to varying sunlight conditions. Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress. 2016. június 26-30., Prága, Csehország. In: Book of Abstracts p. 758.

Kocsis M., Papp N., Abrankó L., Csepregi K., **Radványi L.**, Pour Nikfardjam M., Hideg É., Jakab G. (2014): Changes in grapevine leaf anatomy and polyphenolic composition during adaptive responses to different solar irradiation. 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology. 2014. augusztus 27-29., Szeged, Magyarország. In: Book of Abstracts p. 31.



OPEN

Antibacterial activity of Hungarian varietal honeys against respiratory pathogens as a function of storage time

Lilla Nagy-Radványi¹, Viktória L. Balázs¹, Béla Kocsis², Eszter Csikós¹, Virág D. Ángyán¹, Péter Szabó³, Viktória Biró¹, Marianna Kocsis⁴✉ & Ágnes Farkas¹

Today, antibiotic therapies that previously worked well against certain bacteria due to their natural sensitivity, are becoming less effective. Honey has been proven to inhibit the biofilm formation of some respiratory bacteria, however few data are available on how the storage time affects the antibacterial effect. The activity of black locust, goldenrod, linden and sunflower honeys from three consecutive years (2020, 2021, 2022) was analyzed in 2022 against Gram-negative (*Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*) and Gram-positive (*Streptococcus pneumoniae*) bacteria using in vitro microbiological methods. After determining the physicochemical parameters of honey, broth microdilution was applied to determine the minimum inhibitory concentration of each honey type against each bacterium, and crystal violet assay was used to test their antibiofilm effect. The possible mechanism of action was explored with membrane degradation test, while structural changes were illustrated with scanning electron microscopy. Honeys stored for one or two years were darker than fresh honeys, while older honeys had significantly lower antibacterial activity. The most remarkable inhibitory effect was exerted by linden and sunflower honeys, and *P. aeruginosa* proved to be the most resistant bacterium. Based on our results, honey intended for medicinal purposes should be used as fresh as possible during a treatment.

Respiratory infections are extremely common, being one of the main causes of illness and death worldwide, and one of the most significant problems in clinical medicine. In the beginning, the symptoms are caused by viruses, and this is often followed by bacterial superinfection, primary bacterial infection develops only in a smaller proportion¹. Regarding the resistance conditions of the most important upper respiratory tract pathogens, it can generally be said that macrolide and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance is significant, and the number of penicillin-resistant or moderately sensitive bacterial strains is increasing. Antibiotic resistance can also occur in natural populations to a small extent, however, the clinical use and overuse of certain antibiotics exerts a strong selection pressure on the emergence of resistance^{2–4}.

Bacterial communities colonize both the upper and lower respiratory tracts, but the highest bacterial density is found in the upper respiratory tract (URT). A characteristic of respiratory infections is that the causes of inflammation are actually members of the naturally present bacterial flora of the respiratory tract and primarily cause disease in an immunosuppressed state. Potentially infectious genera such as *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Pseudomonas* spp. or *Moraxella* spp. can also be found in the microbiome of a healthy person^{5,6}. These microbial communities often form biofilms, and mature biofilms show tolerance to environmental stressors, antibiotics and the body's immune responses. The bacterial biofilm provides optimal conditions and protection for the entire bacterial community^{7,8}. The high degree of resistance can be attributed to the metabolic changes of the cells connected in the biofilm and the structural characteristics affecting the permeability of the drugs⁹. Extracellular polysaccharides (EPS), which play an important role in the formation of biofilms, can prevent the antibiotic from reaching the bacterial DNA, thereby providing a high degree of resistance to bacterial colonies^{10,11}. Bacteria embedded in the polysaccharide matrix communicate with each other, the metabolism takes place through the channels of the matrix¹². With the help of horizontal gene transfer, bacterial cells are able to transfer antibiotic

¹Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary. ²Department of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary. ³Institute of Geography and Earth Sciences, Faculty of Sciences, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary. ⁴Department of Agricultural Biology, Institute of Biology, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary. ✉email: kocsis.marianna@pte.hu

resistance genes to each other, hence it is not necessary to develop resistance to a given agent from generation to generation¹³. In order to ensure the effectiveness of the treatment, it is definitely necessary to reduce the formation of biofilm or to destroy the biofilm, because 80% of bacterial infections are due to biofilm formation¹⁴.

Pseudomonas aeruginosa and *Streptococcus pneumoniae*, as well as *Haemophilus* species, are among the most frequently isolated respiratory bacteria capable of forming biofilms¹⁵. *P. aeruginosa* is a particularly dangerous Gram-negative opportunistic pathogenic bacterium, as most of its strains are antibiotic resistant¹⁶. The biofilm layer it creates reduces the surface area suitable for breathing in the lungs, thus creating optimal conditions for the reproduction of other microbes¹⁷. Two members of the Gram-negative *Haemophilus* genus, *H. influenzae* and *H. parainfluenzae*, are frequent colonizers of the respiratory system and can cause local and systemic infections and pose a serious threat to the human body. Due to the adhesion of biofilms, patients are exposed to increased risk, as antibiotic therapy is not successful in some cases^{18,19}. In contrast to the pathogens mentioned so far, *S. pneumoniae* is a Gram-positive bacterium, and the symptoms of the disease are rather due to the inflammatory reactions than to the invasiveness of the microbe. It is a capsulated bacterium, which makes it easy to stick to the surface of the respiratory tract²⁰. During pneumococcal infections, the bacterium adheres to the surface of the bronchi and creates a biofilm, thereby making the treatment of the infection more difficult. In many cases, biofilm structures can also be observed in certain areas of the lungs^{21,22}. In light of these facts, and as a result of the large increase in antibiotic resistance, the use of natural agents and a more thorough knowledge of the microorganisms that cause diseases affecting the respiratory system become even more relevant²³.

The antibiofilm effect of honey has been confirmed in several clinical studies, so its use as an additional therapy can be significant in the case of respiratory tract infections²⁴. The glucose oxidase enzyme present in honey is secreted by the pharyngeal gland of the bee and its task is to convert glucose into gluconic acid δ -lactone, producing hydrogen peroxide as a by-product. The fact that the H_2O_2 content of honey is essential for its antibacterial activity has been supported by several research groups, with the maximum H_2O_2 concentration observed at honey dilutions between 15 and 50% (w/v)²⁵, except for manuka honey, where H_2O_2 does not accumulate²⁶. The hydrogen peroxide responsible for the bactericidal effect breaks down into water and oxygen over time, so its level decreases thanks to the plant-derived catalase enzyme. Based on these, it can be assumed that honeys stored for years lose their antibacterial effect due to the decrease in the activity of the enzyme glucose oxidase^{27,28}. H_2O_2 can also be produced as a result of the prooxidant action of the biologically active polyphenols present in large quantities in honey. In this case, the pH value is an important parameter, it determines whether these compounds act as antioxidants or have an antibacterial effect^{29,30}. However, low pH and high sugar content are often sufficient to inhibit microbial growth³¹.

During the antibiofilm activity, the active ingredients of honey diffuse into the biofilm matrix and, in addition to destroying the biofilm, prevent further biofilm formation by inhibiting adhesion processes³². Proano et al. observed that osmotic activity, H_2O_2 content, high sugar concentration and the presence of defensin-1 peptide are responsible for the hypertension in honey, and this condition leads to the suppression of biofilm formation³³. H_2O_2 disrupts the attachment of bacterial cells and destabilizes the biofilm matrix, while bee-derived defensin-1 inhibits the formation of extracellular polymeric substances in addition to initial adhesion^{34,35}. Polyphenolic components also prevent bacterial cells from connecting to each other or attaching to a given surface (biotic, abiotic), thus disrupting one of the most sensitive steps of biofilm formation. In addition to all this, polyphenolic compounds can inhibit the synthesis of EPS³⁶. Sindi and his research team (2019) found that honey can reduce the number of viable bacterial cells within the mixed biofilm, and honey treatment also has a significant effect on metabolic activity³⁷.

For the therapeutic use of honey, it is essential to ensure its quality. Honey can be contaminated with various microorganisms, including endospores of *Clostridium botulinum* and *C. tetani*. This fact is often overlooked, and in order to avoid a possible infection, it is important to sterilize honey intended for medicinal purposes³⁸. In addition, nectar-producing plants are often sprayed with various herbicides and pesticides, compounds that also appear in honey. Environmental pollution, heavy metals from industrial areas, and antibiotic treatment of bees can also affect the quality of honey. Because of this, a clear definition of "medical grade honey" is definitely necessary to guarantee the safety and effectiveness of honeys during a treatment. Medical grade honey must fulfil the following criteria: "(1) organic, free of contaminants and toxic substances; (2) gamma-sterilized under standardized conditions, free of dangerous microorganisms; (3) can be safely implemented in medical therapies; (4) follows strict production and storage standards, legal and safety regulations; (5) complies to physicochemical criteria that are important for the use of honey as a wound care product"³⁹.

The amount of catalase enzyme, the composition of the active ingredients and, in this context, the complex effect of different types of honeys can show significant differences depending on which species or region the honey comes from. The basic question of our research is to what extent storage time, and the botanical and geographical origin of four Hungarian varieties of honey (black locust, goldenrod, linden, sunflower) influence their antibacterial effect, and against which biofilm-forming bacterial strains is the antibacterial effect of each honey sample most effective. To our knowledge, no similar comparative study covering several years has been carried out yet for Hungarian varietal honeys.

Methods

Honey samples

For our tests, we used black locust/acacia (*Robinia pseudo-acacia*), goldenrod (*Solidago gigantea*), linden (*Tilia* spp.) and sunflower (*Helianthus annuus*) honeys purchased from the same Hungarian apiaries in three consecutive years (2020, 2021, 2022). The examination of the physicochemical parameters of honey and the testing of its antibacterial effect took place in 2022, not only in 2022 samples, but also in the case of samples from 2020 and

2021. The honey samples came from the southern Transdanubian region and were stored at room temperature (20–21 °C) and in the dark until used.

Melissopalynological analysis

In order to establish the true type of honeys, it is crucial to clarify their exact botanical origin, so we performed a melissopalynological analysis following the method of Von der Ohe et al.⁴⁰. Ten grams of our honey samples were added to centrifuge tubes and mixed with 20 mL of distilled water using a Combi-spin FVL-2400N Vortex (Biocenter Kft., Szeged, Hungary). The subsequent centrifugation lasted for 10 min at a speed of 8753×g with a Neofuge 15R centrifuge (Lab-Ex Ltd., Budapest, Hungary), after which the supernatant was poured off. This step was followed by another centrifugation (5 min, 8753×g) and decantation, then 10 mL of distilled water was measured to the sediment left from the first centrifugation. In what follows, 250 µl of distilled water was added to the sediment remaining in the centrifuge tube, and after vortexing, 20 µl of the thus prepared pollen suspension was pipetted onto a microscope slide which was then placed on a heating plate set to 40 °C (OTS 40, Tiba Kft., Győr, Hungary). The water was evaporated, and then a small piece of Kaiser's glycerin jelly with fuchsine (Merck Life Science Ltd., Budapest, Hungary) was added to each pollen sample. When the jelly melted, the preparations were covered with a coverslip. Pollen preparations were analyzed with Nikon Eclipse E200 microscope equipped with a Michrome 20MP CMOS digital camera (Auro-Science Consulting Kft., Budapest, Hungary), and photomicrographs were taken at 400× magnification using 4.3.0.605 version of TCapture software⁴¹. At least 500 pollen grains were counted per honey sample, indicating how many pollen grains belong to a given plant species, genus or family. The relative frequency of pollen types was given as a percentage of all pollen grains.

Physicochemical parameters

The color intensity of the varietal honeys used in the tests was determined according to Beretta et al.⁴². The 50% (w/w) honey solutions prepared were placed in an ultrasonic water bath (water temperature: 45–50 °C) for 5 min and then filtered (0.45 µm pore size, Agilent Technologies, Milan, Italy). Color intensity results from the difference in absorbance values measured at 450 and 720 nm using a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Schweiz GmbH, Reinach, Switzerland) were expressed in milliabsorbance units (mAU).

A DSZ-708 Multiparameter analyzer (Simex Ltd., Budapest, Hungary) was used to examine pH values and electrical conductivity. The pH value of the honey samples was determined according to the Codex Alimentarius and the pH meter was calibrated each time with buffer solutions at values of 4 and 9⁴³. For the measurement, 10 g of honey was dissolved in 75 ml of freshly distilled carbon dioxide-free water, and in the case of electrical conductivity, a 20% honey solution was prepared with distilled water. The electrical conductivity of honey means the conductivity of the honey solution measured at 20 °C, the results were expressed in milli-Siemens per centimeter (mS/cm)⁴⁴.

Culture bacteria

The antibacterial effect of varietal honeys was investigated in case of both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Haemophilus influenzae* (DSM 4690) and *H. parainfluenzae* (DSM 8978) strains were grown in a supplemented Mueller Hinton broth special. 500 µl *Haemophilus* supplement B (Diagon Kft., Budapest, Hungary) and 750 µl (1 mg/ml) NAD were added to 3750 µl of Mueller–Hinton II Broth (MHB, Oxoid Ltd., London, UK). For *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Streptococcus pneumoniae* (DSM 20566), 100 ml of sterile MHB medium was used. The incubation time of bacterial suspensions was 12 h at 37 °C in a shaker incubator at 60 rpm (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)⁴⁵. Before the tests, the bacteria were diluted to the given concentration with the appropriate medium.

Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

A broth microdilution test was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC), which is commonly used in microbiological laboratories in accordance with CLSI guidelines (Clinical & Laboratory Standards Institute)⁴⁶. The procedure was performed on 96-cell microtiter plates. Three dilution series were used, as we expected—based on preliminary experiments—that the antibacterial activity would decrease with increasing storage time. The following dilution series were prepared (using Mueller–Hinton broth): 42.5, 45, 47.5, 50, 52.5, 55, 57.5% (w/w) (2020 honeys), 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 37.5, 40% (w/w) (2021 honeys) and 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25% (w/w) (2022 honeys). Then 100 µL of the honey solutions and bacterial suspensions (10⁵ CFU/mL) were measured into one cell of the microtiter plate, followed by incubation at 37 °C for 24 h. We performed our tests with six repetitions and considered the lowest honey concentration as the MIC, in which case there was no visible bacterial growth in the cells.

After the MIC determination, 10 µL of culture medium was taken from each cell of the microtiter plate, where no visible growth was observed, to test the minimum bactericidal concentration (MBC). In this case, the samples were cultured on BA plates and the incubation at 37 °C lasted for 24 h. Finally, we read the lowest concentration where no bacterial growth was observed on the plates⁴⁷.

Biofilm inhibition study

The biofilms were formed on 96-cell microtiter plates applying the crystal violet (CV) assay, thereby testing the anti-biofilm effect of the honey samples⁴⁸. The treatments were performed with honey samples with a concentration of MIC/2 and a bacterial suspension nutrient solution with a cell count of 10⁸ CFU/mL was used as a positive control, and a cell-free honey nutrient solution was used as a negative control. As a first step, 200 µL of bacterial suspension was measured into one cell of the microtiter plate and the subsequent incubation at 37 °C lasted for

four hours, thereby promoting the adhesion of the bacterial cells. The non-adherent cells were removed with physiological saline and only then were the honey solutions pipetted into the cells. In this case, the incubation was 24 h at 37 °C, and then the non-adherent cells were washed again with physiological saline. In order to fix the cells, 200 µL of methanol was added to each well for 15 min at room temperature (RT). In order to stain the bacterial biofilm, 200 µL of 0.1% crystal violet dye was applied after removing the methanol. After 20 min (RT), the excess dye was removed with water, and the crystal violet bound to the biofilm was dissolved with 200 µL of 33% acetic acid per cell. The absorbance values were determined at 590 nm using a plate reader (BMG Labtech SPECTROstar Nano, Budapest, Hungary). Among other things, the crystal violet dye binds to extracellular polysaccharides (EPS) which play an important role in the formation of biofilms, therefore enabling the estimation of the total biomass of the biofilm in the cell of the microtiter plate. The inhibition rate was determined based on the following formula: $(1 - S/C) \times 100\%$ (C and S were defined as the average absorbance of control and sample groups, respectively)⁴⁹.

Membrane degradation assay

During the study of cell material release, each bacterial suspension (10^8 CFU/mL) was prepared in PBS (phosphate buffer saline) and bacterial cells without honey treatment were used as a control. The bacterial cells were treated with honey samples of 20, 40 and 60% (w/w) concentration for one hour. In addition, the time dependence of membrane degradation was also investigated, in this test the bacterial cells were suspended in PBS containing 60% (w/w) honey. The treatments lasted: 0, 10, 20, 40, 60 and 90 min. After the treatments, the bacterial cells were centrifuged in both cases (Neofuge 15R, Lab-Ex Ltd., Budapest, Hungary) at 12,000×g for 2 min. The absorbance of the supernatant containing nucleic acid was measured at 260 nm with a Metertech SP-8001 (Abl&e-Jasco Ltd., Budapest, Hungary) spectrophotometer. The results were expressed as a percentage, compared to the control⁵⁰.

Scanning electron microscopy (SEM)

In order to visualize the inhibitory effect of honey on biofilm and to illustrate the structural changes, SEM images were taken. Both Gram-positive (*S. pneumoniae*) and Gram-negative (*P. aeruginosa*) bacteria were included in the study, and the samples were treated with linden honey which has an effective antibiofilm effect.

During the procedure, biofilms were formed on degreased and sterilized coverslips after the plates were incubated for 4 h at 37 °C in 5 mL of bacterial suspension (10^5 CFU/mL). After the adhesion, washing with physiological saline followed, and then linden honey from three different years was applied at a concentration of MIC/2 (5 mL). Untreated coverslips were used as controls. After 24 h of incubation (37 °C), non-adherent cells were washed again, and this was followed by 2 h (RT) incubation in 2.5% glutaraldehyde to fix the biofilm. The samples were dehydrated in absolute ethanol (50%, 70%, 80% and 90% solutions) for 2 × 15 min (RT). As a next step, the coverslips were placed in a 1:2, 1:1, 2:1 mixture of t-butyl alcohol and absolute ethanol. The samples were then transferred to absolute t-butyl alcohol for 1–1 h (RT) followed by overnight freeze-drying. The examination of biofilms coated with a gold membrane was performed with a JEOL JSM IT500-HR scanning electron microscope (Jeol Ltd., Tokyo, Japan)⁵¹.

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using Excel® (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) and the PAST software package version 3.11⁵² after normality checking with the Shapiro–Wilk test. Data were expressed as means ± standard deviations (SD) in case of honey type absorbance (Table 2) and membrane degradation results (Tables 5, 6). Results of antibiofilm activity (Fig. 1) were expressed as median (minimum to maximum) in box plots. The honey types had been compared with each other based on a given parameter using one-way ANOVA. If the null hypothesis of the ANOVA was rejected, we used Student t-test to establish a difference between the two group pairs (honey types). The p-values at 1% ($p \leq 0.01$) or 5% ($p \leq 0.05$) were considered significant.

Results

Melissopalynological analysis and Physicochemical parameters of honey samples

Based on the pollen analysis and examination of the physicochemical properties of the honeys included in the research, all honey samples can be considered unequivocally as varietal honey (Tables 1 and 2). In black locust honeys, *R. pseudoacacia* pollen was the dominant pollen type in accordance with the honey type declared by the beekeeper, similarly to goldenrod, linden and sunflower honeys which also contained high amounts of *Solidago*, *Tilia* and *Helianthus* pollen, respectively.

The color of honey is one of the most variable parameters, which can range from white, through pale yellow and red, to black. In this case, the determining factor is the plant origin and the storage time. The color of fresh black locust honey was pale, yellowish green, but the stored samples were darker (44.4 ± 1.7 vs. 103.1 ± 3.0 mAU), approaching the color of light amber colored linden honey. We observed a similar color change in the case of the other honey samples. The most obvious contrast between fresh and stored honey colors was experienced in sunflower honeys (116.6 ± 1.5 vs. 422.8 ± 2.0 mAU). The highest difference in color intensity was measured between honey samples stored for two vs. one year, afterwards we did not observe any significant difference in smell and texture in the next 2 years.

The pH of honey mainly depends on dissociated acids, which affects both the development of microorganisms and enzyme activity. The pH value of the varietal honeys varied between 3.22 and 4.32. Regarding the average of 3 years, the highest values were measured in linden honeys (4.26 ± 0.07), the lowest values in black locust honeys (3.26 ± 0.04). Also electrical conductivity was the lowest in black locust honey (0.126 ± 0.01 mS/cm), followed by sunflower (0.222 ± 0.002 mS/cm), linden (0.589 ± 0.02 mS/cm) and goldenrod honey (0.616 ± 7.2 mS/cm). The

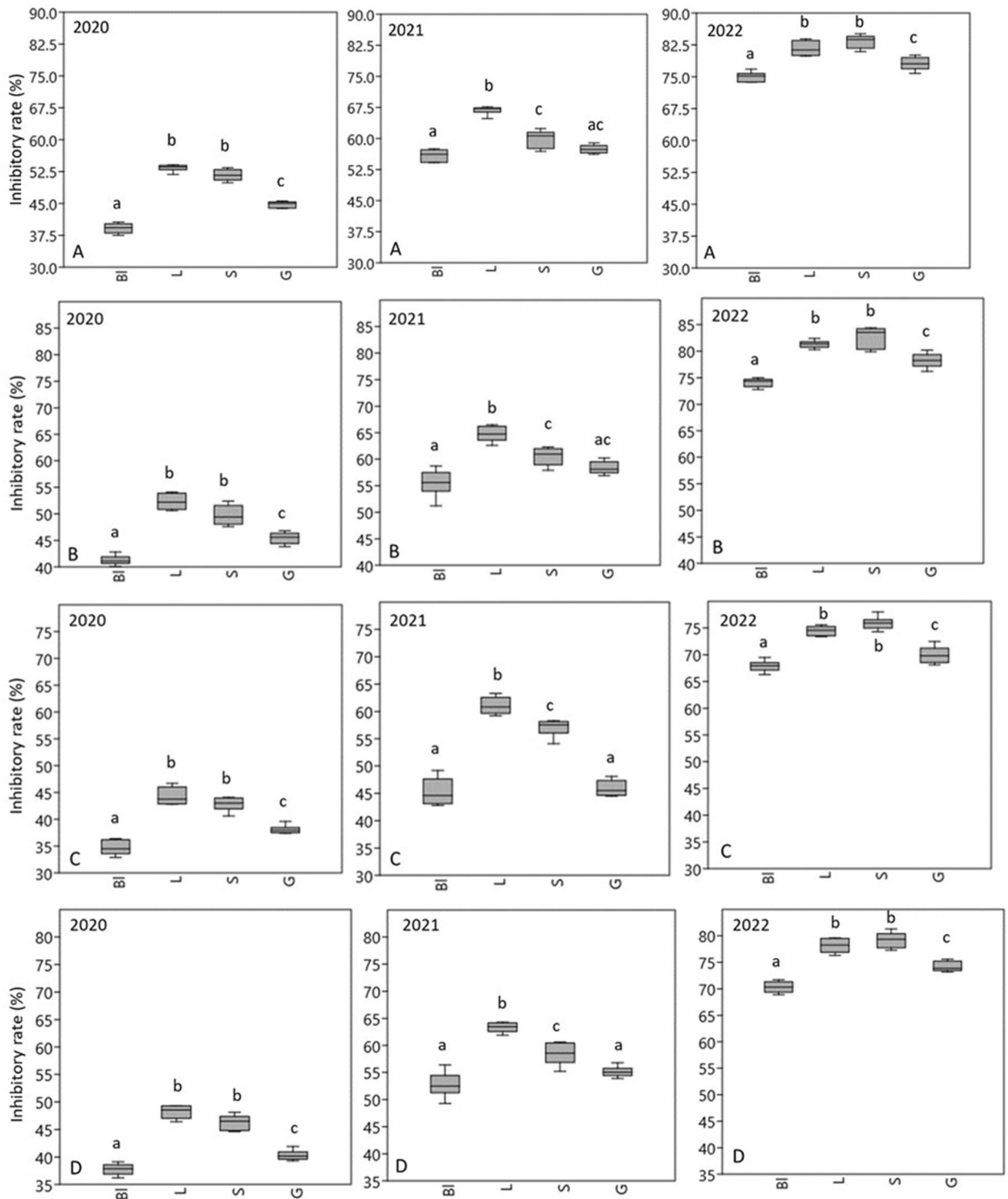


Figure 1. Biofilm inhibitory rates of honey samples against *H. influenzae* (A), *H. parainfluenzae* (B), *P. aeruginosa* (C) *S. pneumoniae* (D). Bl-black locust honey, L-linden honey, S-sunflower honey, G-goldenrod honey. Data are expressed using box plots, minimum to maximum values are presented by vertical lines, while median within the plot as horizontal line. Lowercase letters above the boxes indicate significant differences between the means of inhibitory rates, the same lowercase letters above the boxes indicate mean values that are not significantly different from each other; different lowercase letters indicate means, which are significantly different ($p \leq 0.01$).

Honey samples		Pollen type – relative frequency (%)						
		<i>Robinia</i>	<i>Solidago</i>	<i>Helianthus</i>	<i>Tilia</i>	<i>Brassica</i>	Asteraceae	Other
Black locust	2020	56.1	2.4	3.8	16.2	13.1	3.6	4.8
	2021	51.8	-	8.8	14.5	8.3	9.1	7.5
	2022	46.6	3.7	6.5	10.3	20.6	1.9	10.4
Goldenrod	2020	1.7	63.2	2.3	0.6	7.6	9.8	14.8
	2021	4.8	73.4	3.6	1.9	6.7	8.4	1.2
	2022	0.8	60.6	6.3	2.6	10.2	7.8	11.7
Linden	2020	18.8	0.7	16.3	47.2	1.7	4.4	10.9
	2021	20.3	1.5	10.2	53.6	2.1	5.6	6.7
	2022	22.6	2.2	11.2	45.5	3.2	5.9	9.4
Sunflower	2020	13.2	3.4	66.5	8.4	-	3.6	4.9
	2021	16.4	2.7	58.7	13.8	0.5	1.8	6.1
	2022	5.5	3.2	69.6	4.2	-	7.6	9.9

Table 1. Relative frequency of pollen types in the studied honeys. Dominant pollen > 45%, secondary pollen 16–45%, important minor pollen 3–15%, minor pollen < 3% of the pollen grains counted.

Honey type, plant name	Year	Sensory characteristics (color, odor and consistency)	ABS _{450–720} (mAU)	Electrical conductivity (mS/cm)	pH
Black locust, <i>Robinia pseudoacacia</i>	2020	Light amber, weak odor, liquid, viscous	103.1 ± 3.0 ^a	0.132 ± 0.01	3.30 ± 0.02
	2021	Light amber, weak odor, liquid, viscous	99.3 ± 3.3 ^a	0.121 ± 0.01	3.22 ± 0.03
	2022	Pale, yellowish green, weak odor, liquid, viscous	44.4 ± 1.7 ^b	0.126 ± 0.01	3.27 ± 0.06
Goldenrod, <i>Solidago gigantea</i>	2020	Dark amber, moderately intense odor, semisolid, fine granulated	280.7 ± 1.5 ^a	0.624 ± 0.01	3.56 ± 0.03
	2021	Dark amber, moderately intense odor, semisolid, fine granulated	279.4 ± 1.9 ^a	0.609 ± 0.01	3.52 ± 0.04
	2022	Amber, moderately intense odor, semisolid, fine granulated	236.9 ± 3.2 ^b	0.615 ± 0.00	3.59 ± 0.03
Linden, <i>Tilia</i> spp.	2020	Amber, strong odor, semisolid fine granulated	221.9 ± 1.7 ^a	0.567 ± 0.03	4.27 ± 0.04
	2021	Amber, strong odor, semisolid fine granulated	211.1 ± 3.4 ^b	0.607 ± 0.02	4.32 ± 0.03
	2022	Light amber, strong odor, semisolid, fine granulated	166.3 ± 4.0 ^c	0.592 ± 0.02	4.19 ± 0.03
Sunflower, <i>Helianthus annuus</i>	2020	Dark golden yellow, weak odor, semisolid, coarse granulated	422.8 ± 2.0 ^a	0.221 ± 0.01	3.68 ± 0.04
	2021	Dark golden yellow, weak odor, semisolid, coarse granulated	413.5 ± 4.2 ^a	0.224 ± 0.01	3.61 ± 0.05
	2022	Golden yellow, weak odor, semisolid, coarse granulated	116.6 ± 1.5 ^b	0.223 ± 0.01	3.66 ± 0.04

Table 2. Sensory characteristics and physicochemical parameters of honey samples. ABS_{450–720}: absorbance of diluted honey samples referring to their color. Data are means ± standard deviations of three independent determinations (n = 3). Different lowercase letters indicate a significant difference among years according to Student's *t*-test ($p \leq 0.05$).

pH and electrical conductivity did not change with storage time, so similar values were obtained for honeys of the same variety from different years.

MIC and MBC determination

The MIC and MBC values of the investigated honey samples showed variation in terms of the storage time, the type of honey, and the bacterial strains included in the study (Tables 3 and 4). Based on our results, it can be observed that as the storage time increased, higher concentrations of honey solutions were needed to achieve the appropriate inhibitory effect. In the case of the 2020 honeys, the MIC values ranged between 42.5 and 50%, while for the 2022 samples, between 10 and 17.5%. A difference of a similar magnitude was also experienced for the MBC values.

Linden and sunflower honey exerted the most significant inhibitory effect, while black locust honey was the least active. *Haemophilus* strains were the most sensitive, while *P. aeruginosa* proved to be the most resistant bacterium.

Antibiofilm activity

When examining the inhibitory effect of honey on biofilm formation, the individual honeys were used at a concentration of MIC/2. It is clearly visible also in this series of tests that the antibacterial activity of stored honeys is lower than that of fresh honeys (Fig. 1). When measured in 2022, the average inhibition rate of 2020 honeys (34.7–53.4%) was about half of that of 2022 honeys (67.9–83.2%). The 2021 samples inhibited biofilm formation by 45.3–66.8%. The antibiofilm effect of linden and sunflower honey was the most remarkable, the inhibition rate for the 2022 samples reached 80% against *Haemophilus* strains. Black locust and goldenrod

MIC values (%)		<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Black locust	2020	50	50	50	50
	2021	30	30	35	32.5
	2022	12.5	12.5	17.5	12.5
Goldenrod	2020	47.5	47.5	50	50
	2021	27.5	27.5	35	30
	2022	12.5	12.5	17.5	12.5
Linden	2020	42.5	42.5	47.5	45
	2021	25	25	32.5	27.5
	2022	10	10	12.5	10
Sunflower	2020	42.5	42.5	47.5	45
	2021	25	25	32.5	30
	2022	10	10	12.5	10

Table 3. MIC values of honey samples. Percentage values of the table correspond to dilution % of honey causing antimicrobial effects.

MBC values (%)		<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Black locust	2020	55	55	57.5	57.5
	2021	37.5	37.5	40	37.5
	2022	20	20	25	20
Goldenrod	2020	55	55	57.5	55
	2021	35	35	40	35
	2022	20	20	25	20
Linden	2020	47.5	47.5	52.5	50
	2021	30	30	35	32.5
	2022	15	15	20	15
Sunflower	2020	50	50	55	50
	2021	32.5	30	37.5	35
	2022	15	15	20	15

Table 4. MBC values of honey samples. Percentage values of the table correspond to dilution % of honey causing antimicrobial effects.

honey samples showed lower activity, but the fresh samples from 2022 also inhibited biofilm formation by an average of 70% in the selected bacterial strains. Considering each sampling year, the honey samples were able to exert the most significant antibiofilm effect against *Haemophilus* strains, while their activity was lower in the case of *P. aeruginosa* and *S. pneumoniae* strains.

Membrane degradation

To demonstrate one of the mechanisms of action of honey, we chose linden honey, which showed high activity in previous studies. In this series of experiments, we also worked with samples from three consecutive years and studied the membrane-degrading effect of honey solutions of different concentrations (20, 40, 60, 90%) in the case of Gram-negative (*P. aeruginosa*) and Gram-positive (*S. pneumoniae*) bacteria (Table 5). In the 2020 linden honey treatment, the loss of integrity of the bacterial membrane was observed at concentrations of 60% and above, while when the 2021 sample was used, membrane degradation occurred already at a concentration of 40%. The highest release of cell material was measured when 2022 linden honey was used, here some activity occurred even at the low concentration of 20%. Using the 2022, 60% honey treatment, the proportion of lysed cells for the *S. pneumoniae* bacterium reached 43.7%.

In order to investigate the kinetics of cell material release, the 60% solution of the samples was measured at different time intervals (20, 40, 60, 90 min). This experiment showed how many minutes it took for the bacterial membrane to start breaking down after the treatment with linden honey from different years (Table 6). The release of DNA from the bacterial cells started at 20 and 60 min in case of 2022 and 2020 linden honey, respectively. Based on our results, Gram-negative *P. aeruginosa* proved to be a more resistant bacterium in this case as well (Tables 5 and 6).

Scanning electron microscopy (SEM)

The inhibitory effect of highly active linden honey on the biofilm formation of Gram-negative (*P. aeruginosa*) and Gram-positive (*S. pneumoniae*) bacteria was illustrated in SEM images (Fig. 2). In the case of untreated samples, the three-dimensional structure of bacterial biofilms was formed (Fig. 2A,E), while in the case of

Linden honey		DNA release from bacterial cells (%)	
Year	Concentrations (%)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>
2020	0	0	0
	20	0	0
	40	0	0
	60	7.6 ± 0.9 ^a	9.7 ± 1.3 ^b
	90	45.2 ± 2.5 ^a	49.9 ± 3.0 ^b
2021	0	0	0
	20	0	0
	40	8.7 ± 1.3 ^a	11.3 ± 2.1 ^b
	60	18.8 ± 2.3 ^a	21.6 ± 2.6 ^a
	90	56.2 ± 2.5 ^a	60.1 ± 2.9 ^b
2022	0	0	0
	20	10.9 ± 2.1 ^a	15.2 ± 2.4 ^b
	40	28.7 ± 2.1 ^a	38.6 ± 1.2 ^b
	60	39.2 ± 1.7 ^a	43.7 ± 2.8 ^b
	90	100	100

Table 5. Effect of linden honeys on the release of DNA in Gram-negative (*P. aeruginosa*) and Gram-positive (*S. pneumoniae*) bacteria. Data are means ± standard deviations of six independent determinations (n = 6). Different lower case letters in the same row for each year indicate significant differences among the two bacteria according to Student's *t*-test ($p \leq 0.05$).

Linden honey		DNA release from bacterial cells (%)	
Year	Time (min)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>
2020	0	0	0
	20	0	0
	40	0	0
	60	7.6 ± 0.9 ^a	9.7 ± 1.3 ^b
	90	9.8 ± 1.3 ^a	10.5 ± 2.2 ^a
2021	0	0	0
	20	0	0
	40	12.4 ± 2.3 ^a	14.2 ± 2.3 ^a
	60	18.8 ± 2.3 ^a	21.6 ± 2.6 ^a
	90	23.2 ± 1.8 ^a	2.3 ± 3.1 ^b
2022	0	0	0
	20	22.5 ± 2.5 ^a	26.5 ± 1.8 ^b
	40	35.1 ± 2.5 ^a	40.5 ± 2.2 ^b
	60	39.2 ± 1.7 ^a	43.7 ± 2.8 ^b
	90	65.1 ± 3.0 ^a	69.8 ± 2.2 ^b

Table 6. Kinetics of 260 nm absorbing material released from Gram-negative (*P. aeruginosa*) and Gram-positive (*S. pneumoniae*) bacteria treated with 60% (w/w) linden honeys. Data are means ± standard deviations of six independent determinations (n = 6). Different lower case letters in the same row for each year indicate significant differences among the two bacteria according to Student's *t*-test ($p \leq 0.05$).

treated samples, biofilm formation was inhibited to an extent corresponding to the age of the honeys. The 2020 and 2021 linden honey reduced biofilm formation to a lesser extent (Fig. 2B,C,F,G) than the 2022 (Fig. 2D,H), similar to previous results. *S. pneumoniae* bacterial cells treated with 2022 linden honey were crushed and their cell material burst out (Fig. 2H). In addition, it can be observed in the images of the untreated samples that *P. aeruginosa* produces a larger amount of biofilm than *S. pneumoniae* during the same time, thus contributing to the increase of its resistance (Fig. 2A,E).

Discussion

Prior to our current research, we had already demonstrated the antibiofilm effect of several Hungarian varieties of honey against bacterial strains that cause respiratory and wound infections^{53,54}, however, no studies have yet been conducted to determine the extent to which honeys stored for several years lose from their antibacterial

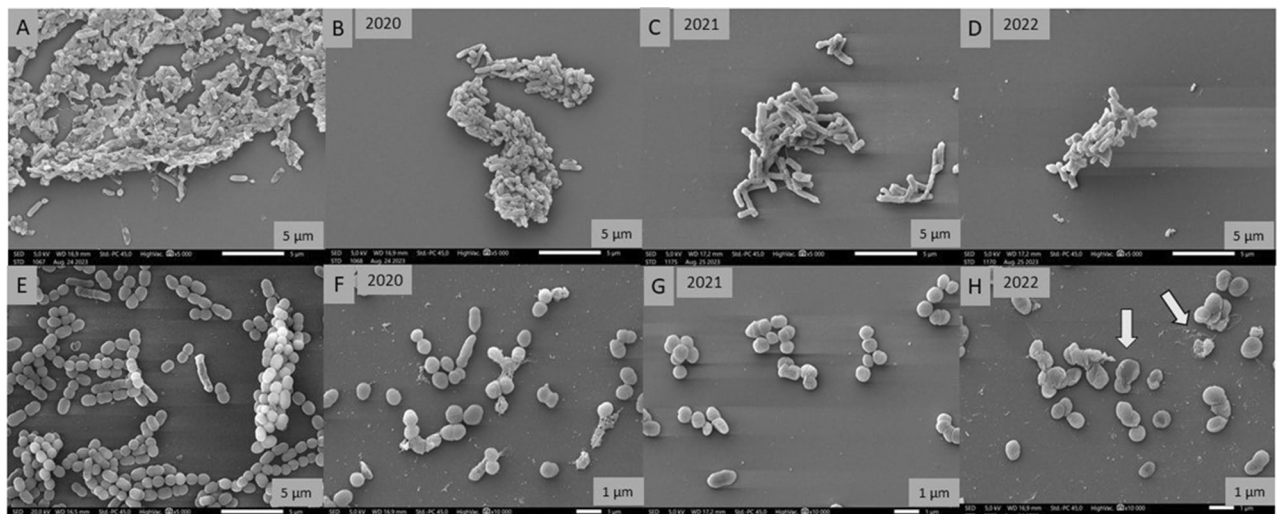


Figure 2. Scanning electron microscopic images of *P. aeruginosa* (A–D) and *S. pneumoniae* (E–H). Control samples of bacterial strains (A, E); treatment with linden honey from different years with MIC/2 concentration in the case of *P. aeruginosa* (B–D) and *S. pneumoniae* (F–H).

activity. We once again included respiratory biofilm-forming bacteria in our series of experiments, as there are still few data available on the reaction of these bacteria after treatment with honey, and respiratory diseases of bacterial origin are a serious problem worldwide. Our research work, which has been going on for several years, helps us to get to know these bacteria more thoroughly, as well as to develop alternative complementary therapies that could reduce the risk of developing antibiotic resistance. In the present study, we demonstrated for the first time how the antibiofilm effect of stored vs. fresh honey samples changes in case of four different types of Hungarian honeys against both Gram-positive and Gram-negative respiratory bacteria. In addition, we were able to gain insight into the kinetics and possible mechanism of the antibacterial effect with the help of membrane degradation tests. As a limitation of our study, it has to be noted that not the same honey samples were studied in three consecutive years, but the same honey type harvested in the same geographical region in three consecutive years, with highly similar pollen profile each year.

Based on the examination of the physicochemical parameters of the samples, the electrical conductivity, which is closely related to the pH and macro- and microelement content, proved to be constant over the years, and several research groups measured values similar to our results^{55–58}. However, the color intensity of stored honeys was higher, reflecting their darker color compared to fresh honeys. Brudzynski and Kim⁵⁹ measured a lower degree of color change for lighter honeys (e.g. borage) than for darker honeys (e.g. sunflower). We also observed a significant difference in the color of stored vs. fresh sunflower honey, but the difference was also relevant for the lighter black locust honey. The change was not so remarkable in the lighter linden honey and the darker goldenrod honey, so it is assumed that the type of honey and not the starting color of the honey is the decisive factor in the degree of change in color intensity.

Several research groups found that the antibacterial effect of most types of honey is largely dependent on the H_2O_2 content^{60,61}, but low pH, high sugar content (osmolarity), and the presence of antimicrobial proteins/peptides also all contribute to the antibacterial activity of the honey^{31,62}. In general, the higher the hydrogen peroxide and total polyphenol content of a given honey is, the more significant its bacteriostatic and bactericidal effects are⁶⁰. The advantage of the non-peroxide antibacterial effect is that it remains intact even after a longer storage time⁶³, while H_2O_2 degrades over time thanks to the catalase enzyme²⁸. From this, we can conclude that H_2O_2 plays a key role in the process of changing activity, since the ratio of the other components responsible for antibacterial activity (non-peroxides) does not change to such an extent over the years⁶³. However, high heat and light exposure can also contribute to the degradation of biologically active polyphenols⁶⁴.

Our research has proven that even honeys stored for one year display lower levels of antibacterial effect, and in the case of two-year-old samples, lower activity was even more pronounced. The antibiofilm activity of the 2021 honey samples was lower by an average of 20–25%, however, the inhibition ratio of the linden honeys was over 60% against all bacterial strains even after one year. Our results suggest that the strong antibacterial effect of linden honey is partially attributable to the non-peroxide factor(s), as reported by Farkasovska et al.⁶¹. Compared to the 2022 harvest, the antibiofilm effect of the 2020 honeys was almost halved. During the study of buckwheat honeys, Brudzynski and Kim⁵⁹ determined that the MIC value of honeys decreased by 50% in the first 3–6 months of storage, while the further decrease in antibacterial activity took place gradually against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* bacteria. In our series of experiments, after one year, a 50–60% decrease in activity was observed in terms of the MIC values for each type of honey for all tested bacterial strains. The MIC values of the most active linden and sunflower honeys were 12.5% vs. 32.5% against the most resistant *P. aeruginosa* bacterium in 2022 vs. 2021, respectively.

Farkasovska et al.⁶¹ studied acacia, linden, rapeseed, sunflower and multifloral honey from Slovakia and found that in most honey samples H_2O_2 content correlated with their antibacterial activity, expressed as MIC. Similarly to our findings, sunflower and linden honeys exhibited the strongest antibacterial effect. While the

H₂O₂ content of sunflower honeys showed correlation with their MIC values; linden honeys were exceptional in terms of antibacterial activity, which showed weak or no correlation with H₂O₂ content, depending on the bacterial strains. The outstanding inhibitory effect of linden honey has already been described in several studies, and factors other than H₂O₂ content were suggested as potential inhibitors of bacteria^{53,61,65–67}. Few data are available regarding the level of antibacterial activity of sunflower honey, in this case the variety and geographical origin of the floral source may be an important influencing factor. Of the three Serbian honey samples studied by Đurović et al.⁶⁸, sunflower honey had the second strongest antibacterial effect, which was higher than that of acacia honey, but lower than that of forest-meadow honey, with a MIC value of 12.5% against *Staphylococcus aureus* or *Serratia marcescens* bacteria. We also obtained similar results, the MIC value for *P. aeruginosa* was 12.5%, while for the other bacteria it was 10%. In accordance with the data published in our previous study, all Hungarian varieties of honey had an antibiofilm and bacteriostatic effect, but black locust honey and goldenrod honey showed less relevant inhibition^{53,54}.

Similar to what was observed in our previous series of membrane degradation experiments⁵³, the amount of DNA released from bacterial cells was more significant for Gram-positive *S. pneumoniae* than for Gram-negative *P. aeruginosa* bacteria after linden honey treatment. The studies of Otmani et al.⁶⁹ also support the fact that Gram-positive bacteria are less resistant to honey treatments due to their structure. However, several studies have been published in which Gram-negative bacteria proved to be more sensitive^{68,70}, including one of our previous studies⁵⁴, which supports this, where we used bacterial strains that cause wound infection. Although the outer membrane of these bacteria may provide greater protection, the destruction of the lipopolysaccharide layer increases the permeability of the outer membrane, which can greatly contribute to release of the genetic material of the bacterial cell⁷¹. These different results show that the structure of the bacteria may play a smaller role in the development of resistance, rather the specific defense mechanisms of each strain are decisive. In our series of tests, we were the first to explore which concentration of linden honey is required for the degradation of the bacterial membrane, depending on the storage time. To date no other study has examined the effect of varietal honeys on the bacterial membrane as a function of storage time.

Conclusions

Honey has a strong antibacterial effect, however, in order for it to be an additional therapy to an antibiotic course, several aspects must be taken into account. Our study highlights the importance of the botanical origin of honey, as some types of honey can exert a more significant inhibitory effect, and it is also relevant that the treatment should be applied against the bacterial strains that are the most sensitive to the given honey type. In addition, our research also answered the question of how much the age of honey can influence its antibacterial effect, and to what extent the antibiofilm activity decreases depending on the storage time. Our research group was the first to investigate the antibiofilm effect of honey samples stored for different time periods, as well as one of the mechanisms behind this, bacterial membrane degradation and its kinetics. Based on our results, honeys suitable for medicinal purposes should be used as fresh as possible during the various treatments, since in this case they exert the most significant antibacterial activity.

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 19 January 2024; Accepted: 29 April 2024

Published online: 03 May 2024

References

- Paul, J. *Respiratory Tract Infections. Disease Causing Microbes* 99–148 (Springer, 2024). https://doi.org/10.1007/978-3-031-28567-7_3.
- Palumbi, S. R. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*. **293**, 1786–1790. <https://doi.org/10.1126/science.293.5536.1786> (2001).
- Levy, S. B. & Marshall, B. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**, 122–129. <https://doi.org/10.1038/nm1145> (2004).
- Clatworthy, A. E., Pierson, E. & Hung, D. T. Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 541–548. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24> (2007).
- Man, W. H., de SteenhuijsenPeters, W. A. A. & Bogaert, D. The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 259–270. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.14> (2017).
- Paramasivan, S. et al. The international sinonasal microbiome study: A multicentre, multinational characterization of sinonasal bacterial ecology. *Allergy*. **75**, 2037–2049. <https://doi.org/10.1111/all.14276> (2020).
- Hall-Stoodley, L. et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 127–145. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x> (2012).
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R. & Nesse, L. L. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*. **9**, 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059> (2020).
- Jolivet-Gougeon, A. & Bonnaure-Mallet, M. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discov. Today Technol.* **11**, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.003> (2014).
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. **284**, 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318> (1999).
- Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M. & Nakonieczna, J. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *BioMed. Res. Int.* **13**, 150–653. <https://doi.org/10.1155/2013/150653> (2013).
- Wilking, J. N. et al. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 848–852. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216376110> (2013).
- Kasuya, M. Transfer of drug resistance between enteric bacteria induced in the mouse intestine. *J. Bacteriol.* **88**, 322–328. <https://doi.org/10.1128/jb.88.2.322-328.1964> (1964).

14. Wang, Y. *et al.* Effects of quorum sensing autoinducer degradation gene on virulence and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. China C. Life Sci.* **50**, 385–391. <https://doi.org/10.1007/s11427-007-0044-y> (2007).
15. Welp, A. L. & Bomberger, J. M. Bacterial community interactions during chronic respiratory disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 213. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00213> (2020).
16. Todar, K. *Online Textbook of Bacteriology*. <https://www.textbookofbacteriology.net/> (2008).
17. Steindler, L. *et al.* LasI/R and RhlI/R quorum sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5131–5140. <https://doi.org/10.1128/AEM.02914-08> (2009).
18. Mohd-Zain, Z., Kamsani, N. H., Ismail, I. S. & Ahmad, N. Antibiotic susceptibility profile of *Haemophilus influenzae* and transfer of co-trimoxazole resistance determinants. *Trop. Biomed.* **29**, 372–380 (2012).
19. Wen, S., Feng, D., Chen, D., Yang, L. & Xu, Z. Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Genet. Evol.* **80**, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104205> (2020).
20. Suaya, J. A. *et al.* Identification of *Streptococcus pneumoniae* in hospital-acquired pneumonia in adults: A systematic review. *J. Hosp. Infect.* **108**, 146–157. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.09.036> (2020).
21. Sanchez, C. J. *et al.* The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intra-species bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. *PLoS Pathog.* **6**, e1001044. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001044> (2010).
22. Domenech, M., Garcia, E. & Moscoso, M. Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Biotechnol.* **5**, 455–465. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00294.x> (2012).
23. Ruopp, M., Chiswell, K., Thaden, J. T., Merchant, K. & Tsalik, E. L. Respiratory tract infection clinical trials from 2007 to 2012: A systematic review of ClinicalTrials.gov. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **12**, 1852–1863. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201505-291OC> (2015).
24. Krishnakumar, G. S., Mahendiran, B., Gopalakrishnan, S., Muthusamy, S. & Elangovan, S. M. Honey based treatment strategies for infected wounds and burns: A systematic review of recent pre-clinical research. *Wound Med.* **30**, 100188. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100188> (2020).
25. Brudzynski, K. A current perspective on hydrogen peroxide production in honey: A review. *Food Chem.* **332**, 127229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127229> (2020).
26. Majtan, J., Bohova, J., Prochazka, E. & Klaudivny, J. Methylglyoxal may affect hydrogen peroxide accumulation in manuka honey through the inhibition of glucose oxidase. *J. Med. Food.* **17**, 290–293. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0201> (2014).
27. Dustmann, J. H. Antibacterial effect of honey. *Apiacta.* **14**, 7–11 (1979).
28. Bucekova, M. *et al.* Microwave processing of honey negatively affects honey antibacterial activity by inactivation of bee-derived glucose oxidase and defensin-1. *Food Chem.* **240**, 1131–1136. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.054> (2018).
29. de Graft-Johnson, J. & Nowak, D. Effect of selected plant phenolics on Fe²⁺-EDTA-H₂O₂ system mediated deoxyribose oxidation: Molecular structure-derived relationships of anti- and pro-oxidant actions. *Molecules.* **22**, 59. <https://doi.org/10.3390/molecules2010059> (2017).
30. Liu, X. *et al.* Green tea polyphenols function as prooxidants to inhibit *Pseudomonas aeruginosa* and induce the expression of oxidative stress-related genes. *Folia Microbiol.* **58**, 211–217. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0198-2> (2013).
31. Mandal, D. M. & Mandal, S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **1**, 154–160. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60016-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6) (2011).
32. Khataybeh, B., Jaradat, Z. & Ababneh, Q. Anti-bacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities of honey: A review. *J. Ethnopharmacol.* **317**, 116830. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116830> (2023).
33. Proano, A. *et al.* The osmotic action of sugar combined with hydrogen peroxide and bee-derived antibacterial peptide Defensin-1 is crucial for the antibiofilm activity of eucalyptus honey. *LWT-Food Sci. Technol.* **136**, 110379. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110379> (2021).
34. Santiago, A. J. *et al.* Inhibition and dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by combination treatment with escapin intermediate products and hydrogen peroxide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**(9), 5554–5562. <https://doi.org/10.1128/aac.02984-15> (2016).
35. Sojka, M., Valachova, I., Bucekova, M. & Majtan, J. Antibiofilm efficacy of honey and bee-derived defensin-1 on multispecies wound biofilm. *J. Med. Microbiol.* **65**(4), 337–344. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000227> (2016).
36. Zamuz, S. *et al.* The role of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* in food: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **110**, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.068> (2021).
37. Sindi, A. *et al.* Anti-biofilm effects and characterisation of the hydrogen peroxide activity of a range of Western Australian honeys compared to Manuka and multifloral honeys. *Sci. Rep.* **9**(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54217-8> (2019).
38. Chou, J. W., Skornicki, M. & Cohen, J. T. Unintended consequences of the potential phase-out of gamma irradiation. *F1000 Res.* **7**, 348. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14090.1> (2018).
39. Hermanns, R. *et al.* Defining the standards for medical grade honey. *J. Apicult. Res.* <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1693713> (2019).
40. Von Der Ohe, W., Oddo, L. P., Piana, M. L., Morlot, M. & Martin, P. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie.* **35**, S18–S25. <https://doi.org/10.1051/apido:2004050> (2004).
41. TCCapture V4.3.0.605 (2022). <https://www.tucsen.com/uploads/TCCapture4.3.0.605.zip>.
42. Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M. & Facino, R. M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta.* **533**, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010> (2005).
43. Codex Alimentarius. *Revised Codex Standard for Honey*. Codex STAN 12–1981, Rev. 1 (1987), Rev. 2. (2001).
44. Bogdanov, S. *et al.* Harmonised methods of the European honey commission. *Apidol. Extra Issue.* **1**, 1–59 (1997).
45. Hindler, J. A. & Jorgensen, J. H. Susceptibility test methods: Fastidious bacteria. In *Manual of Clinical Microbiology* (ed. Versalovic, J.) 1180–1187 (ASM, 2011).
46. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition, CLSI Document M07-A9*. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).
47. Tan, H. T. *et al.* The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complement. Altern. Med.* **9**, 34. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-34> (2009).
48. Peeters, E., Nelis, H. J. & Coenye, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods.* **72**, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010> (2008).
49. Yanwei, S. *et al.* Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of lemon essential oil on the acid tolerance and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral. Biol.* **87**, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.12.028> (2018).
50. Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T. & Remmal, A. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**, 454–458. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01511.x> (2004).
51. Kerekes, E.-B. *et al.* Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 933–942. <https://doi.org/10.1111/jam.12289> (2013).
52. Hammer, Ø., Harper, D. A. & Ryan, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* **4**, 9 (2001).
53. Balázs, V. L. *et al.* In vitro antibacterial and antibiofilm activity of Hungarian honeys against respiratory tract bacteria. *Foods.* **10**, 1632. <https://doi.org/10.3390/foods10071632> (2021).

54. Balázs, V. L. *et al.* Antibacterial and antibiofilm effect of Unifloral honeys against bacteria isolated from chronic wound infections. *Microorganisms*. **11**, 509. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020509> (2023).
55. Majewska, E., Drużyńska, B. & Wołosiak, R. Determination of the botanical origin of honeybee honeys based on the analysis of their selected physicochemical parameters coupled with chemometric assays. *Food Sci. Biotechnol.* **28**, 1307–1314. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00598-5> (2019).
56. Bodor, Z. *et al.* Sensory and physicochemical evaluation of acacia and linden honey adulterated with sugar syrup. *Sensors* **20**, 4845. <https://doi.org/10.3390/s20174845> (2020).
57. Pauliuc, D., Oroian, M. & Ciursă, P. Organic acids content, sugars content and physicochemical parameters of Romanian acacia honey. *Ukr. Food J.* **10**, 1. <https://doi.org/10.24263/2304-974X-2021-10-1-14> (2021).
58. Džugan, M. *et al.* SDS-PAGE protein and HPTLC polyphenols profiling as a promising tool for authentication of goldenrod honey. *Foods*. **11**, 2390. <https://doi.org/10.3390/foods11162390> (2022).
59. Brudzynski, K. & Kim, L. H. Storage-induced chemical changes in active components of honey de-regulate its antibacterial activity. *Food Chem.* **126**, 1155–1163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.151> (2011).
60. Bucekova, M. *et al.* Antibacterial activity of different blossom honeys: New findings. *Molecules*. **24**, 1573. <https://doi.org/10.3390/molecules24081573> (2019).
61. Farkasovska, J., Bugarova, V., Godocikova, J., Majtan, V. & Majtan, J. The role of hydrogen peroxide in the antibacterial activity of different floral honeys. *Eur. Food Res. Technol.* **245**, 2739–2744. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03393-y> (2019).
62. Nolan, V. C., Harrison, J. & Cox, J. A. Dissecting the antimicrobial composition of honey. *Antibiotics*. **8**, 251. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040251> (2019).
63. Libonatti, C., Varela, S. & Basualdo, M. Antibacterial activity of honey: A review of honey around the world. *J. Microbiol. Antimicrob.* **6**, 51–56. <https://doi.org/10.5897/JMA2014.0308> (2014).
64. Barnes, J. S., Foss, F. W. & Schug, K. A. Thermally accelerated oxidative degradation of quercetin using continuous flow kinetic electrospray-ion trap-time of flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **24**, 1513–1522. <https://doi.org/10.1007/s13361-013-0698-6> (2013).
65. Matzen, R. D. *et al.* The antibacterial effect in vitro of honey derived from various Danish flora. *Dermatol. Res. Pract.* **2018**, 7021713. <https://doi.org/10.1155/2018/7021713> (2018).
66. Farkas, Á. *et al.* Antibacterial and biofilm degradation effects of Hungarian honeys linked with botanical origin, antioxidant capacity and mineral content. *Front. Nutr.* **9**, 953470. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.953470> (2022).
67. Sakac, M. *et al.* Antioxidative, antibacterial and antiproliferative properties of honey types from the Western Balkans. *Antioxidants*. **11**, 1120. <https://doi.org/10.3390/antiox11061120> (2022).
68. Đurović, V. *et al.* Comparative analysis of antibacterial and antioxidant activity of three different types of honey. *Acta Agric. Serb.* **27**, 115–120. <https://doi.org/10.5937/AASer2254115D> (2022).
69. Otmani, A. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant and antibacterial activities of Algerian honeys. *Food Biosci.* **42**, 101070. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101070> (2021).
70. Combarros-Fuertes, P. *et al.* Antibacterial action mechanisms of honey: Physiological effects of avocado, chestnut, and polyfloral honey upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Molecules* **25**, 1252. <https://doi.org/10.3390/molecules25051252> (2020).
71. Brudzynski, K. & Sjaarda, C. Antibacterial compounds of Canadian honeys target bacterial cell wall inducing phenotype changes, growth inhibition and cell lysis that resemble action of β -lactam antibiotics. *PLoS ONE*. **9**, e106967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106967> (2014).

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Research, Development and Innovation Office; NKFIH K 132044, by János László Research Grant and by Ildikó Kriszbacher Talent Grant.

Author contributions

L.N.-R. conceived and designed the study and edited the manuscript. L.N.-R. and V.L.B. performed microbiological studies. L.N.-R., Á.F. and M.K. wrote the draft of the paper. L.N.-R. and M.K. performed statistical analysis and generated figures and tables. L.N.-R., V.L.B. and P.Sz. carried out SEM studies. B.K., V.D.Á., V.B. and E.Cs. helped with the microbiological experiments. All authors have read and revised the manuscript.

Funding

Open access funding provided by University of Pécs.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.K.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024



Article

Antibacterial and Antibiofilm Effect of Unifloral Honeys against Bacteria Isolated from Chronic Wound Infections

Viktória L. Balázs ¹, Lilla Nagy-Radványi ¹, Erika Bencsik-Kerekes ², Regina Koloh ¹, Dina Szabó ², Béla Kocsis ³, Marianna Kocsis ^{4,*} and Ágnes Farkas ¹

¹ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

² Department of Microbiology, Faculty of Science and Informatics, University of Szeged, 6726 Szeged, Hungary

³ Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

⁴ Department of Plant Biology, Institute of Biology, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

* Correspondence: kocsis.marianna@pte.hu

Abstract: Honey is known as an alternative remedy for the treatment of wounds. To evaluate the potential of five Hungarian honey types against wound-associated bacteria, in vitro microbiological assays were conducted on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined with the broth macrodilution method, and biofilm degradation capacity was tested with a crystal violet assay. To understand the underlying mechanisms, the effects of honey treatments were assessed on bacterial membrane integrity and quorum sensing (QS). The highest antibacterial activity, indicated by the lowest MIC values, as well as the highest biofilm inhibition rates and membrane disruption, was displayed by chestnut and linden honeys. The most sensitive bacterium was *S. epidermidis*. Bacterial membrane degradation took place 40 min after treatment with honey solutions of at least a 40% concentration. Each honey sample exhibited anti-QS activity, which was most pronounced in the case of chestnut honey. It was concluded that the antibacterial, biofilm-inhibiting and anti-QS activities of linden and chestnut honeys were superior to those of acacia, goldenrod and milkweed honeys. In addition to the floral source, the antibacterial effect of honey is influenced by the microbial species treated. The use of honey in wound treatment can be justified by its diverse antibacterial mechanisms.

Keywords: acacia honey; chestnut honey; goldenrod honey; linden honey; milkweed honey; antibacterial effect; antibiofilm activity; wound healing; quorum sensing



Citation: Balázs, V.L.;

Nagy-Radványi, L.; Bencsik-Kerekes, E.; Koloh, R.; Szabó, D.; Kocsis, B.; Kocsis, M.; Farkas, Á. Antibacterial and Antibiofilm Effect of Unifloral Honeys against Bacteria Isolated from Chronic Wound Infections.

Microorganisms **2023**, *11*, 509.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11020509>

Academic Editors: Claudia Vuotto and Mariagrazia Di Luca

Received: 19 December 2022

Revised: 10 February 2023

Accepted: 15 February 2023

Published: 17 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The most common types of chronic or non-healing wounds include pressure ulcers, venous ulcers and diabetic ulcers [1,2]. Bacterial colonization of the wound is an important step in the pathogenesis of chronic wounds, particularly if the bacteria involved are able to form biofilms. A microbial biofilm is a structured community of microbial cells surrounded by a self-produced polymer matrix. Biofilms can be created by bacteria, viruses or fungi, either as monomeric or polymeric cultures. Within biofilms, bacterial cells are located close to each other, which in itself promotes survival, as the process of horizontal gene transfer can take place quickly and easily. Bacterial cells are able to transfer resistance genes with the help of plasmids, thereby increasing antibiotic resistance, which complicates treatment [3,4]. Van der Waals forces and hydrogen bridges enable the strong adhesion of biofilms to biotic or abiotic surfaces with the help of glycocalyx. The glycocalyx, with enzymes and proteins produced, prevents antibacterial agents from entering the biofilm between the bacterial cells, thus enabling resistance to treatment with antibiotics and disinfectants [5–7].

In recent years, it has been proven that bacteria can communicate with each other, which leads to changes in gene expression. This is called the quorum sensing (QS) process, which controls the various physiological activities of bacterial cells. Quorum is the minimum cell density necessary for the formation of the stimulus-response system, and sensing refers to the detection of signal molecules that regulate the process [8]. Both Gram-negative and Gram-positive bacteria have QS mechanisms, but the signal molecules they transmit are different. Microbial cell-to-cell communication often occurs by releasing and receiving quorum-sensing molecules (QSMs). QSMs are abundant and widely distributed in natural or artificial microbial communities, of which N-acyl homoserine lactones (AHLs), as typical representatives of QSMs, could strongly affect the physiological metabolism of microorganisms. As a result of QS, it increases the expression of autoinducer synthase, so more AHL is produced, which amplifies the QS effect [9,10]. The bacteria influence, modify and control the functioning of the bacterial population arranged in the biofilm with the help of the released signal molecules. When the concentration of signal molecules reaches a threshold value that corresponds to the density of bacterial cells, specific gene expression is initiated. Quorum sensing systems only work if there is a sufficient number of bacterial cells in a given area, i.e., it is density dependent. Through the mechanism, it becomes possible to increase the pathogenicity of infections, the development of antibiotic resistance, the initiation of inflammatory processes in the body and the continuous increase of the biofilm [11,12]. As a result, the development of antibiotic resistance is accelerated [13,14].

Biofilm-related diseases develop slowly but are usually long lasting; the immune system is rarely able to suppress them. In addition, bacterial biofilms show little response to antibiotic treatments [15]. Biofilm-forming bacteria cause chronic infections with persistent tissue damage [11,16]. According to estimates, 65–70% of bacterial infections are associated with biofilm formation [11,17]. The biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are common on the surface of chronic wounds [18]. From a clinical point of view, one of the most dangerous multi-resistant nosocomial bacteria is *Pseudomonas aeruginosa* [19], which can be held responsible for at least 10% of hospital infections [20]. It is a Gram-negative opportunistic pathogen that occurs frequently both in our environment and in the human body as part of the normal bacterial flora (skin, upper respiratory tract, gastrointestinal tract) [20]. Its biofilm-forming properties play a significant role in the colonization of the wound surface and its biofilm is extremely resistant to antibiotics and disinfectants due to the production of alginate [21,22]. *S. epidermidis* is able to adapt to different microenvironments of the skin, so it can be found on the entire skin surface [23]. It is a Gram-positive, coagulase-negative (CoNS), opportunistic pathogen that can be easily isolated from areas of the body containing sebum and sweat glands or from the mucous membrane around body openings [20]. It is a common cause of nosocomial bacteremia and sepsis, and due to its mucus production, it adheres to skin and plastic surfaces with extreme affinity. The treatment of suture, implant and intravenous catheter infections is complicated by the bacteria's multidrug resistance and biofilm-forming ability [24,25]. MRSA occurs both in the epithelium of the human outer covering and in the upper respiratory tract and is one of the most common pathogens of nosocomial infections. MRSA has several virulence factors, as a result of which it causes very diverse pathologies (skin and soft tissue infections, lung and endocarditis, food poisoning). The main problem in the treatment of infections is the strain's resistance to most penicillin and cephalosporin derivatives. The use of glycopeptides (vancomycin, teicoplanin), linezolid, tigecycline and daptomycin, which are emerging as therapeutic alternatives, is greatly limited by the fact that strains with reduced sensitivity or resistance to these are increasingly common nowadays [26,27].

According to the above, it is absolutely important to investigate alternative remedies that offer an opportunity to reduce chronic wound infections. The wound healing activity of various uni- and multifloral honeys, associated with their antibacterial and anti-biofilm effects, was proven in several experiments. A great advantage of the therapeutic use of individual honeys is their diverse composition of active ingredients, which is largely determined by their botanical and geographical origins. The physicochemical properties of honey, such as pH, free acidity, electrical conductivity, moisture content, sugar spectrum, diastase and glucose oxidase activity, can be influenced even by the bee species that produce the honey [28]. Unlike other natural agents, the antibacterial effect of honey is not due to a specific compound or active ingredient but to their combination, so different strains of bacteria develop resistance to it to a lesser extent. The slightly acidic pH, hydrogen peroxide release and high polyphenol content also help tissue regeneration and contribute to antibacterial activity [29]. In general, the higher the hydrogen peroxide and total polyphenol content of honeys, the more they inhibit the growth of bacteria [30]. The high sugar content and high viscosity of honey greatly contribute to the inhibition of microbial growth and biofilm-forming ability [31], performing a barrier function in the infection process, thus preventing various pathogens from entering the wound. In addition, honey contributes to absorbing wound exudate, initiating the exfoliation of wounds, and keeping the wound area moist [32]. Furthermore, it has been documented that honey can inhibit the QS system of bacterial communities [33–35]. Recent experiments have indicated that honey could become an effective alternative, even in the elimination of antibiotic-resistant bacteria, including wound-infecting bacteria [36,37].

From the assortment of Central European honeys, there is evidence supporting the antimicrobial activity of acacia, chestnut, linden, rapeseed and sunflower honeys, but such data are scarce regarding goldenrod and milkweed honeys. Our aim was to test and compare the antibacterial and antibiofilm effects of five Hungarian honey varieties (black locust/acacia, chestnut, goldenrod, linden, milkweed) against the wound surface colonizing bacteria *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* and MRSA. To understand the underlying mechanisms, experiments were designed to assess the effect of honey treatments on bacterial membrane integrity and QS.

2. Materials and Methods

2.1. Origin of Honey Samples

The honey samples were purchased from three local apiaries in Hungary in the year 2021. Milkweed (*Asclepias syriaca*) honeys originated from the Southern Great Plain area, while black locust/acacia (*Robinia pseudo-acacia*), linden (*Tilia* spp.), goldenrod (*Solidago gigantea*) and chestnut (*Castanea sativa*) honeys were harvested in the Southwest Transdanubium area. They were stored at room temperature (20–21 °C) in the dark for a maximum of three weeks.

2.2. Melissopalynological Analysis and Color Determination

The botanical origin of the honey samples was confirmed by microscopic pollen analysis following the modified method of Von der Ohe [38]. Ten grams of honey were dissolved in 20 mL of distilled water, and the mixture was vortexed with Combispin FVL-2400N (Biocenter Kft., Szeged, Hungary). The samples were centrifuged using a Neofuge 15R centrifuge device (Lab-Ex Ltd., Budapest, Hungary) at a speed of $8753 \times g$ for 10 min. Afterwards, the supernatant was decanted, and 10 mL of distilled water was added to the sediment. Another centrifugation phase followed ($8753 \times g$ for 5 min). Distilled water (0.25 mL) was added to the precipitate and vortexed. Twenty milliliters of the resulting pollen suspension was pipetted onto the microscope slides. The slides were preheated to 40 °C using a heating plate (OTS 40, Tiba Kft., Győr, Hungary). The pollen preparations were placed in Kaiser's glycerin jelly with fuchsine (Merck Life Science Ltd., Budapest, Hungary), and then the pollen grains were examined with a Nikon Eclipse E200 light microscope equipped with a Michrome 20MP CMOS digital camera (Auro-

Science Consulting Kft., Budapest, Hungary). Micrographs were taken with the Capture 1.2 program at 400× magnification. We counted at least 500 pollen grains from each honey sample. The botanical source was identified at the level of plant species, genera or families. The relative frequency of pollen types was calculated as a percentage of the total number of pollen grains.

The color intensity of honey samples was determined according to the protocol of [39]. We prepared 50% *w/v* honey solutions (water temperature: 45–50 °C). After preparing the solutions, they were treated with ultrasound for 5 min and then filtered (0.45 µm pore size, Agilent Technologies, Milan, Italy). Absorbance was measured at 450 and 720 nm using a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Schweiz GmbH, Reinach, Switzerland). Color intensity was calculated as the difference between absorbance at 450 and 720 nm, and the results were expressed in milliabsorbance units (mAU).

2.3. Cultivation of Test Bacteria

The antibacterial effect of honey samples was determined on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 700698. Test bacteria were grown in 100 mL sterile BHI (Brain Heart Infusion, Sigma Aldrich Ltd., Budapest, Hungary), except for the MIC determination, in which case Mueller-Hinton Broth (MHB, Oxoid Ltd., London, UK) culture medium was used. Each bacterium was incubated in a shaker incubator (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) at 37 °C and at a speed of 60 rpm for 12 h [40]. The bacterial suspensions were diluted with clear BHI to the appropriate concentrations for each assay. For the anti-QS tests, the *Chromobacterium violaceum* 85WT (SZMC 6269) bacterial strain was used. The bacterium was cultivated on LB agar (Luria Bertani Broth, 10 g tryptone, 10 g NaCl, 6.6 g yeast extract, 15 g agar in 1000 mL distilled water, Sigma Aldrich Ltd., Budapest, Hungary) at 30 °C for 48 h.

2.4. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC)

To investigate the minimum inhibitory concentrations (MIC), a broth macrodilution test (BDT) was used, which is commonly used in microbiological laboratories according to CLSI guidelines (Clinical & Laboratory Standards Institute). From each honey sample, a serial twofold dilution (using Mueller-Hinton Broth) was prepared from 50 to 1.56% and 40 to 1.25%. As a control of bacterial growth, honey was not added to the tubes. For the dilution series of antibiotics, a detergent was not used. Ten microliters of an overnight bacterial culture (~10⁵ cells/mL) was added to each tube and incubated at 37 °C for 24 h. Then, the tubes were plated out on 5% sheep blood agar and incubated again for 48 h. The number of bacterial colonies was compared to the controls and then the values of the minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined. The MIC value was the concentration that could reduce the visible growth of bacteria in comparison with the controls. All tests were carried out in triplicate and under aerobic conditions.

2.5. Antibiofilm Capacity and Cell Viability Test

In order to prove the anti-biofilm effect of the honey sample, a crystal violet (CV) assay was used [41]. Bacterial biofilms were formed on 96-cell polystyrene microtiter plates. Two hundred microliters of 10⁸ CFU/mL cell suspensions were measured in the wells. The microtiter plate was incubated at 37 °C for 4 h, which time interval is sufficient for bacteria to adhere to the surface. After the incubation time, the non-adherent cells were washed with physiological saline solution. In the next step, the adherent cells were treated with MIC/2 concentrations of honey samples. After incubation (24 h, 37 °C) and washing with physiological saline, 200 µL of methanol was measured to the wells to fix the adherent cells. The incubation period was 15 min at room temperature (RT). After that 200 µL of 0.1% crystal violet solution was measured into the cells to dye the bacterial biofilms (20 min, RT). After 20 min, the dyed biofilm was dissolved with a 33% acetic acid solution and absorbance was measured at 595 nm with a plate reader (BMG Labtech

SPECTROstar Nano, Budapest, Hungary). Crystal violet binds to negatively charged surface molecules and polysaccharides within the extracellular matrix of biofilms, thus allowing measurement of the total biomass of the biofilm in the cells of the microtiter plate. The effect of inhibiting biofilm formation is expressed using the following relation: Inhibitory rate = $(1 - S/C) \times 100\%$ (C and S were defined as the average absorbance of control and sample groups, respectively) [42]. The measurements were carried out six times. In order to observe the viable bacterial cells in the biofilm unit, we performed cell viability tests. An MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay was used based on He et al. [43]. The biofilms were prepared in 96-well microtiter plates. After incubation (4 h, 37 °C) the non-adherent cells were washed with physiological saline solution and the honey samples were added to the biofilms. After 24 h (37 °C) the non-adherent cells were washed and MTT (5 mg/mL) was added to the biofilms. MTT can color only viable cells. After 3 h, the lysing solution (1 N NaOH) was added to dissolve the biofilm for 2 h at room temperature [44]. The absorbance was measured at 590 nm using a plate reader. The results are expressed as percentages compared to the untreated control.

2.6. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy was used to investigate the structural modifications of biofilms after treatment with chestnut honey, which was the most effective sample in previous assays. Both Gram-positive (*S. epidermidis*) and Gram-negative (*P. aeruginosa*) bacteria were included in this investigation.

For biofilm formation, 5 mL of bacterial culture (10^8 CFU/mL) was added to a sterilized bottle. During the preparation of the scanning electron microscopic examinations, biofilms were formed on degreased, sterilized coverslips. The coverslips were incubated in the bacterial suspensions for 4 h (37 °C). Adhesion occurred during the incubation time. After incubation time, the plates were washed with physiological salt solution, and then the chestnut honey sample was used as an inhibitor at a concentration of MIC/2 (5 mL). The control coverslips were the untreated ones. After 24 h (37 °C), the solutions were removed, and the non-adherent cells were removed with physiological saline. Then, the samples were prepared according to the SEM protocol: In order to fix the biofilm, the samples were incubated in 2.5% glutaraldehyde at RT for 2 h. In order to dehydrate the biofilms, absolute ethanol was used with 50%, 70%, 80%, 90% solutions and for 2×15 min (RT). The coverslips were then placed in a 1:2, 1:1, 2:1 mixture of t-butyl alcohol: absolute ethanol and then in absolute t-butyl alcohol for 1–1 h (RT). Finally, the samples were freeze-dried in t-butyl alcohol overnight. The sample was coated with a gold membrane and observed with a JEOL JSM IT500-HR scanning electron microscope (Jeol Ltd., Tokio, Japan) [45].

2.7. Membrane Degradation Study

The release of cellular material was examined in each bacterium. The bacterial suspension (10^8 CFU/mL) was made in PBS (phosphate buffer saline) and its absorbance was measured at 260 nm. The bacterial cells were treated with different concentrations of honey samples (20, 40, 60%) for 1 h. As a positive control, 90% solution of honey samples was used.

In order to examine the time dependence of membrane degradation, the bacterial cells were suspended in PBS, which contained 60% honey. The treatment was made for different periods of time: 0, 10, 20, 40, 60 and 90 min. The bacterial cells were centrifuged after each treatment (Neofuge 15R, Lab-Ex Ltd., Budapest, Hungary) at $12,000 \times g$ for 2 min, and the absorbance of the supernatant was determined at 260 nm with a Metertech SP-8001 (Abi&e-Jasco Ltd., Budapest, Hungary) spectrophotometer. During the test, the nucleic acid in the supernatant was measured. The results were expressed as percentage values, which were compared to the untreated cells [42].

2.8. Anti-Quorum Sensing Effect

The synthesis of violacein in *Chromobacterium violaceum* is under QS regulation, which makes this bacterium suitable for screening compounds with an anti-QS capacity. The anti-QS activity of the honey samples was assessed through the inhibition of violacein synthesis in this model organism [45]. In this assay, the violacein pigment produced in liquid culture was extracted and detected spectrophotometrically according to the modified method of Choo, Rukayadi and Hwang (2016) [46] and Zambrano et al. (2019) [47]. Erlenmeyer flasks containing 10 mL of LB medium and honey in different concentrations (75%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0.5%) were inoculated with 100 µL 24-h old bacterial culture with 10⁸ CFU/mL concentration. Flasks consisting of LB medium and bacterial suspension were used as positive controls, and flasks containing LB medium and honey were used as negative controls. After the preparation, samples were incubated at 30 °C for 24 h under continuous shaking at 150 rpm. Before pigment extraction, the cell number of all samples was determined by plating them on LB agar media. Bacterial colonies were counted, and the results were given in log CFU/mL. Two mL aliquots were placed in sterile Eppendorf tubes and subjected to centrifugation procedure (16,200 × g for 20 min) in order to precipitate the insoluble violacein pigment. After discarding the supernatant, the pellet was solubilized in 1 mL of dimethyl sulfoxide (vortex for 20 min). Cellular debris was removed by further centrifugation (16,200 × g, 20 min) and 200 µL of supernatant was added into a sterile 96-well microtiter plate. Absorbance was measured at 585 nm using a SPECTROstar Nano microplate reader (BMG Labtech, Germany). We compared the absorbance of the amount of pigment extracted from the liquid cultures of *C. violaceum* 85 WT with the measured cell numbers, so it could be confirmed that QS was inhibited instead of growth inhibition. The results are given as the mean ± SD of two parallel measurements.

2.9. Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out using ExcelR (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) and the PAST software package version 3.11 [48] at a 5% significance level ($p < 0.05$), after normality checking with the Shapiro–Wilk test. Data were expressed as means and standard deviations (SD). The comparisons of quantitative variables between the two groups (honey types) were conducted with one-way ANOVA and Mann–Whitney pairwise comparison. If the null hypothesis of the ANOVA was rejected, we used a Student’s t-test to establish a difference between the two groups.

3. Results

3.1. Pollen Analysis and Sensory Characteristics of Honey Samples

Identification of honey samples based on their sensory characteristics and melissopalynological analysis revealed that each sample was a unifloral honey (Tables 1 and 2). The pale color and liquid consistency of the black locust (acacia) honey sample, as well as the high percentage of *Robinia* pollen, confirmed that its botanical source was the flowers of *Robinia pseudoacacia*. Chestnut honey was characterized by dark amber color and liquid consistency and met the requirement of strongly over-represented *Castanea* pollen. In the amber-colored, semisolid goldenrod honey sample, *Solidago* pollen was determined as the dominant pollen type, while Asteraceae and Brassicaceae pollen were important minor pollen. The dominant pollen of the light amber, semisolid linden honey was *Tilia*, confirming its unifloral origin. Milkweed honey was treated as unifloral honey, even though it did not contain any *Asclepias* pollen, but *Brassica* pollen was identified as the dominant pollen type. This can be explained by the fact that the pollen grains of *Asclepias* are dispersed in large units called pollinia, which cannot be collected by honeybees and thus do not enter the honey. The sensory traits of our milkweed honey sample were in accordance with what was expected in the case of this honey type.

Table 1. Sensory characteristics and color of the analyzed honey samples.

Nr.	Honey Type, Plant Name	Sensory Characteristics (Color, Odor and Consistency)	ABS _{450–720} (mAU)
1	Black locust, <i>Robinia pseudoacacia</i>	Pale, yellowish green, weak odor, liquid, viscous	83.3 ± 14.2 ^a
2	Chestnut, <i>Castanea sativa</i>	Amber with reddish tone, strong odor, liquid, viscous	413.0 ± 21.2 ^b
3	Goldenrod, <i>Solidago gigantea</i>	Amber, moderately intense odor, semisolid, fine granulated	412.3 ± 13.0 ^b
4	Linden, <i>Tilia</i> spp.	Light amber, strong odor, fine granulated, semisolid	284.0 ± 9.2 ^c
5	Milkweed, <i>Asclepias syriaca</i>	Light yellowish amber, intense flower-like odor, viscous	119.0 ± 17.8 ^d

ABS_{450–720}: absorbance of diluted honey samples referring to their color. Each code number in the first column represents three biological replicates (n = 3) of the honey samples. Data in the last column with different superscripted letters mean significant differences among various honeys according to the Student's *t*-test ($p < 0.01$).

Table 2. Pollen spectrum of the studied honeys.

Honey Type	<i>Castanea</i>	<i>Robinia</i>	<i>Solidago</i>	<i>Tilia</i>	Asteraceae	<i>Brassica</i>	Other
black locust	-	64.2	11.2	0.4	1.9	6.8	15.5
chestnut	79.9	-	0.8	3.2	2.8	3.1	10.2
goldenrod	-	-	72.4	1.9	8.4	6.7	10.6
linden	-	1.9	19.5	72.4	2.7	3.2	0.3
milkweed	-	1.5	-	-	0.9	65.4	32.2

Dominant pollen >45%, secondary pollen 16–45%, important minor pollen 3–15%, minor pollen <3% of the pollen grains counted.

3.2. MIC Determination

The MIC values are summarized in Table 3. Our results showed that the darker chestnut and linden honey samples were more active than the light-colored honeys, such as black locust and milkweed. In the case of chestnut and linden samples, the MIC values were between 10 and 12.5%; however, the MIC was 20 to 25% when treating the bacterial strains with black locust, goldenrod and milkweed honey samples. The most resistant pathogen was *P. aeruginosa*, which required the highest concentrations of honey to inhibit growth (Table 3).

Table 3. The MIC value of black locust, chestnut, goldenrod, linden and milkweed honey.

Honey Samples		1	2	3
MIC values	black locust	25%	20%	20%
	chestnut	12.5%	10%	10%
	goldenrod	25%	20%	20%
	linden	12.5%	10%	10%
	milkweed	25%	20%	20%

1: *P. aeruginosa*, 2: *S. epidermidis*, 3: MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*. Percentage values of the table correspond to dilution % of honey causing antimicrobial effects.

3.3. Antibiofilm Capacity and Cell Viability

The antibiofilm activity of chestnut and linden honey was the most remarkable, inhibiting the most sensitive *S. epidermidis* by 71.1 and 68.7%, respectively. The biofilms of *P. aeruginosa* and MRSA were more resistant than that of *S. epidermidis*. The biofilm formation of *P. aeruginosa* was inhibited by 49.2 to 66.0 and 68.2% by the least active milkweed honey and the most effective linden and chestnut honeys, respectively. Similarly, in the case of MRSA, linden and chestnut honeys were the most effective, with inhibitory rates of 63.2 and 66.9%, respectively. Milkweed and black locust honey showed the lowest activity for each bacterium (Figure 1).

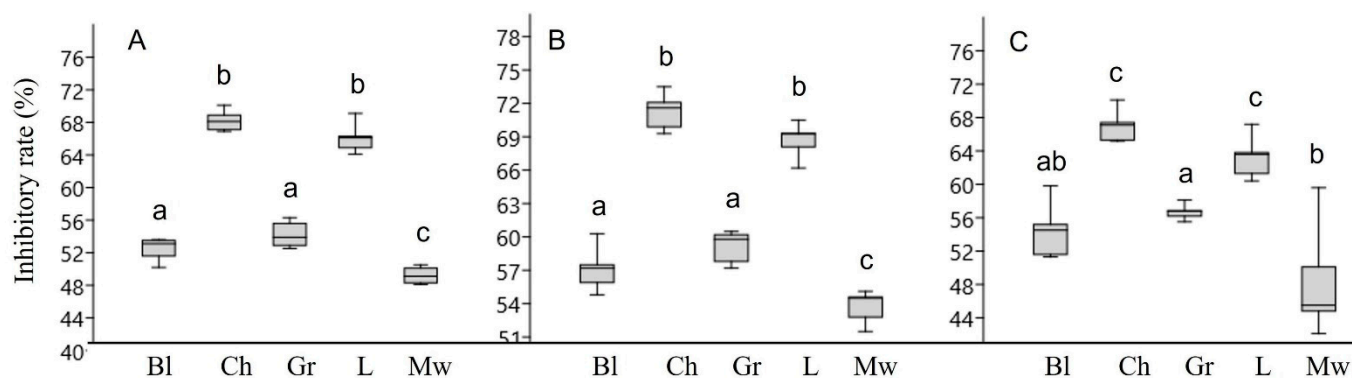


Figure 1. Biofilm inhibitory rates of honey samples against *P. aeruginosa* (A), *S. epidermidis* (B), MRSA: methicillin-resistant *S. aureus* (C). Bl-black locust honey, Ch-chestnut honey, Gr-goldenrod honey, L-linden honey, Mw-milkweed honey. Different lower case letters above the boxes indicate significant differences among various honeys according to Student's *t*-test ($p < 0.01$).

Our cell viability assay revealed that there were viable bacterium cells in the biofilm besides the dead cells. In the case of all three bacteria, the percentage of living cells was over 50%. The greatest reduction in the number of viable cells was observed in the case of chestnut honey (Table 4).

Table 4. Cell viability of *S. epidermidis*, MRSA and *P. aeruginosa* treated by honey samples.

Honey Samples	Percentage of Viable Cells (%)		
	1	2	3
black locust	57.4	62.7	52.7
chestnut	56.7	50.4	52.3
goldenrod	67.4	53.7	56.7
linden	61.1	61.2	62.8
milkweed	72.1	75.2	79.4

1: *P. aeruginosa*, 2: *S. epidermidis*, 3: MRSA.

3.4. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The SEM images illustrate the inhibitory effect of chestnut honey on biofilm formation. SEM tests were performed with this honey type because in our antibiofilm assays chestnut honey proved to be the most active. In the case of untreated samples, the formation of bacterial biofilms and the appearance of a three-dimensional structure can be observed (Figure 2A,C). In the case of samples treated with chestnut honey, no bacterial biofilm was formed (Figure 2B,D). It is worth mentioning that biofilm formation started in the case of *P. aeruginosa*; however, as can be seen in the picture, the process stopped due to the treatment (Figure 2C,D).

3.5. Membrane Degradation

From the tested concentrations of honey solutions (20, 40, 60, 90%), loss of integrity of the bacterial membrane was observed at concentrations of 40% and above, but no membrane degradation was found at 20% (Table 5). Chestnut and linden honey samples resulted in high membrane degradation; at a 60% concentration of these honeys, the lysis of bacterial cells reached up to 39.2% and 44.5%, respectively. The performance of black locust, goldenrod and milkweed honeys was weaker; the lowest activity was detected for milkweed honey (Tables 5 and 6). To investigate the kinetics of the effect of honey samples, their 60% solutions were measured at different time intervals (20, 40, 60 min). This experiment revealed that bacterial membrane degradation started after 40 min (Table 6). Furthermore, our results showed that Gram-positive bacteria were more resistant than Gram-negative *P. aeruginosa* (Tables 5 and 6).

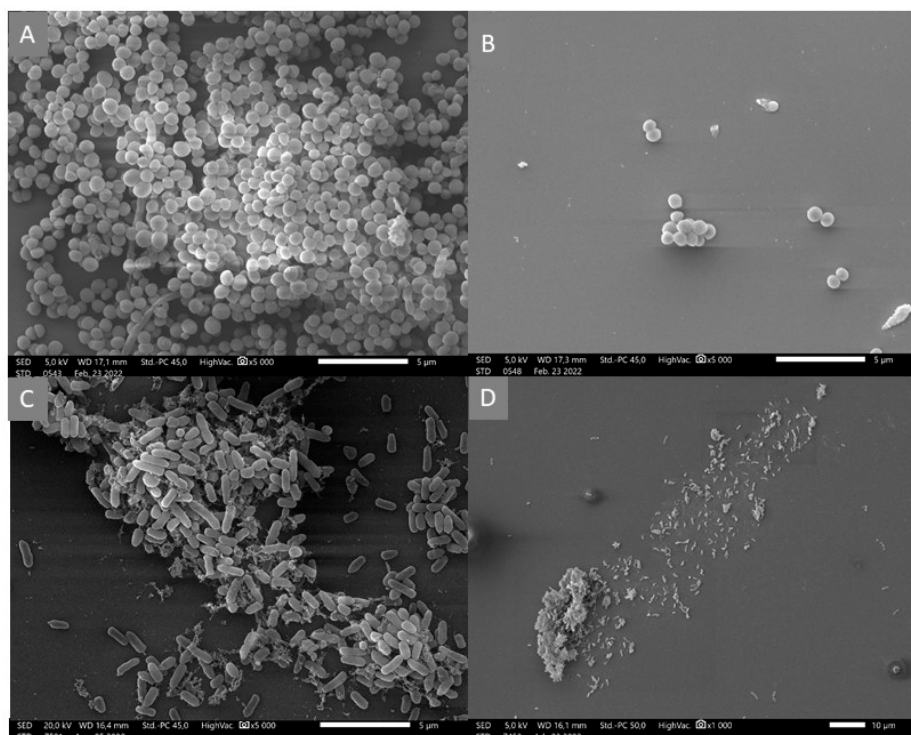


Figure 2. Scanning electron microscopic images of *S. epidermidis* (A,B) and *P. aeruginosa* (C,D) Control samples of bacterial strains (A,C); treatment with MIC/2 concentrations of chestnut honey in the case of *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* (B,D).

Table 5. Effect of honey solutions at different concentrations on the release of cellular material from Gram+ (*S. epidermidis*, MRSA) and Gram– (*P. aeruginosa*) bacteria.

Conc (%)	Lysis of <i>S. epidermidis</i> cells				
	Black Locust	Chestnut	Goldenrod	Linden	Milkweed
0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
40	17.45 ± 3.1 ^a	22.35 ± 2.0 ^{bc}	20.87 ± 2.2 ^{ac}	30.72 ± 1.6 ^d	16.88 ± 2.0 ^a
60	25.92 ± 2.9 ^a	30.68 ± 1.9 ^b	32.05 ± 2.2 ^b	38.30 ± 4.2 ^d	24.08 ± 2.9 ^a
90	100	100	100	100	100
Lysis of MRSA cells					
0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
40	21.38 ± 1.6 ^a	23.37 ± 2.5 ^a	22.18 ± 4.3 ^a	30.42 ± 1.8 ^b	16.35 ± 1.5 ^c
60	30.22 ± 1.5 ^a	35.45 ± 2.9 ^b	33.82 ± 2.6 ^b	39.38 ± 2.1 ^c	25.13 ± 3.3 ^d
90	100	100	100	100	100
Lysis of <i>P. aeruginosa</i> cells					
0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
40	21.55 ± 2.2 ^a	26.80 ± 4.5 ^b	22.23 ± 4.1 ^{ac}	35.77 ± 3.8 ^d	17.60 ± 3.3 ^c
60	32.72 ± 4.1 ^a	39.15 ± 1.3 ^b	36.30 ± 4.2 ^{ab}	44.53 ± 3.9 ^c	25.48 ± 3.1 ^d
90	100	100	100	100	100

Different lower case letters in the same row for each bacterium indicate significant differences among various honeys according to Student's *t*-test ($p < 0.05$).

Table 6. Kinetics of 260 nm absorbing material released from Gram+ (*S. epidermidis*, MRSA) and Gram− (*P. aeruginosa*) bacteria treated with 60% (*w/v*) honey solutions.

Time (Min)	Lysis of <i>S. epidermidis</i> cells				
	Black Locust	Chestnut	Goldenrod	Linden	Milkweed
0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
40	21.37 ± 1.4 ^a	24.60 ± 3.2 ^b	22.43 ± 2.8 ^{ab}	27.07 ± 6.4 ^{ab}	15.15 ± 3.3 ^c
60	25.92 ± 2.9 ^a	30.68 ± 1.9 ^b	32.05 ± 2.2 ^b	38.30 ± 4.2 ^c	24.08 ± 2.9 ^a
90	62.63 ± 3.0 ^a	64.85 ± 4.0 ^{ac}	54.85 ± 4.2 ^b	69.08 ± 4.4 ^c	35.28 ± 6.2 ^d
Lysis of MRSA cells					
0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
40	27.82 ± 1.9 ^a	29.95 ± 1.9 ^a	22.25 ± 3.6 ^b	32.28 ± 6.8 ^a	16.50 ± 3.3 ^c
60	30.22 ± 1.5 ^a	35.45 ± 2.9 ^b	33.82 ± 2.6 ^b	39.38 ± 2.1 ^c	25.13 ± 3.3 ^d
90	61.43 ± 4.8 ^a	65.70 ± 7.7 ^{ac}	52.48 ± 4.0 ^b	71.28 ± 1.1 ^c	33.87 ± 5.6 ^d
Lysis of <i>P. aeruginosa</i> cells					
0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
40	16.58 ± 3.2 ^a	26.08 ± 4.0 ^b	18.18 ± 2.3 ^a	26.40 ± 2.8 ^b	11.45 ± 1.3 ^c
60	32.72 ± 4.1 ^a	39.15 ± 1.3 ^b	36.30 ± 4.2 ^{ab}	44.53 ± 3.9 ^c	25.48 ± 3.1 ^d
90	63.22 ± 3.7 ^a	70.38 ± 5.6 ^b	57.67 ± 3.4 ^c	74.15 ± 3.9 ^b	43.38 ± 7.0 ^d

Different lower case letters in the same row indicate significant differences among various honeys according to Student's *t*-test ($p < 0.05$).

3.6. Anti-Quorum Sensing Effect

Based on the liquid culture assays performed, all honey samples exhibited anti-QS activity (Figure 3). Chestnut had a very strong growth inhibitory effect; no cell numbers could be detected between 75% (*v/v*) and 5% (*v/v*) concentrations. Between 2–0.5% (*v/v*) cell numbers increased to log 6–log 8 CFU/mL, but no pigment production could be detected, indicating the anti-QS effect of this type of honey. Black locust, goldenrod, linden and milkweed honey totally reduced cell growth between 75–25% (*v/v*) concentrations. QS inhibition was observed from a 10% honey concentration, where cell numbers reached log 5–log 7 CFU/mL, respectively, but pigment production was still inhibited compared to the control samples. At the lowest concentration tested (0.5% (*v/v*)) neither of the samples reached the CFU/mL or OD value of the control, indicating that both growth inhibition and anti-QS effects took place.

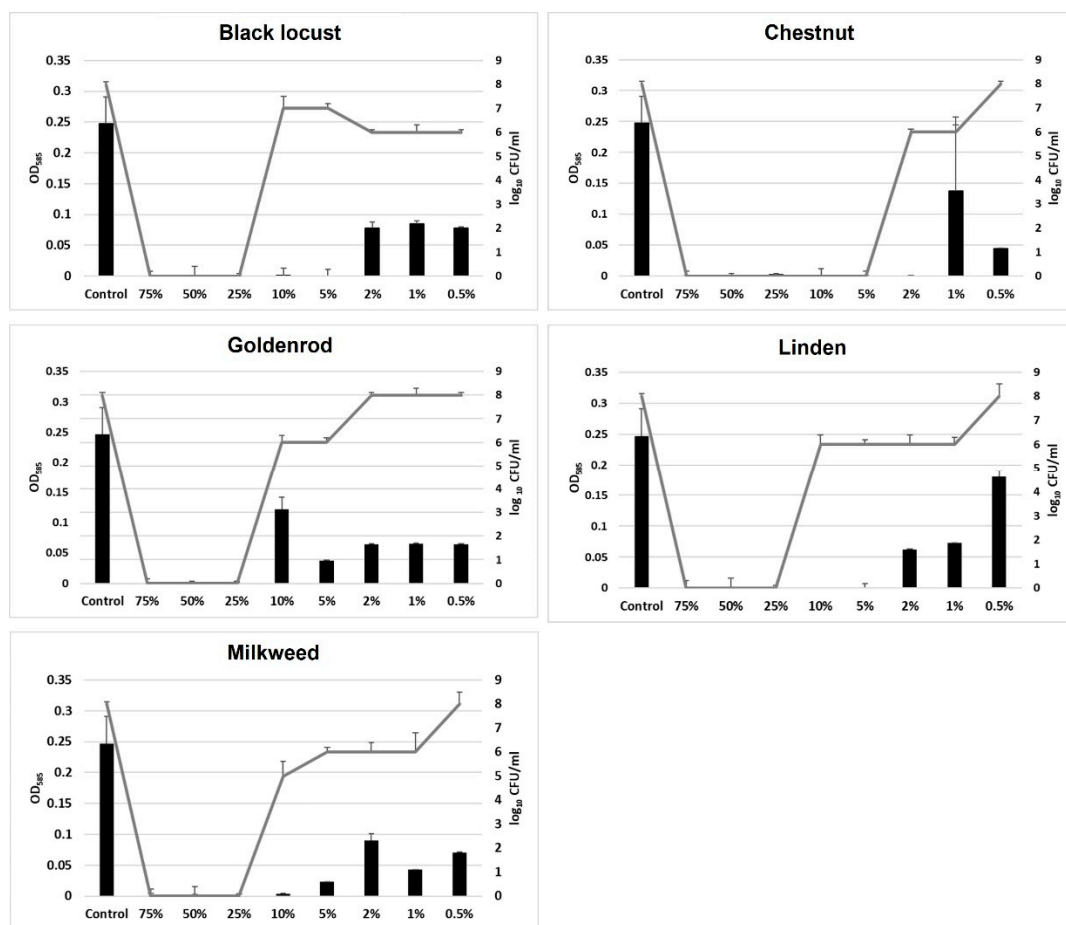


Figure 3. Anti-quorum sensing activity of unifloral honey samples. Bars represent OD values at 585 nm and lines represent cell numbers defined in log₁₀ CFU/mL. Data are given as mean ± SD.

4. Discussion

Our previous research demonstrated the antibacterial and antibiofilm effects of Central European unifloral honeys against food-borne pathogens and respiratory tract bacteria [49,50]. The present study confirmed that black locust (acacia), chestnut, goldenrod, linden and milkweed honeys effectively hinder the growth, biofilm formation and QS mechanisms of wound-associated bacteria, and thus can serve as valuable alternatives to antibiotics in topical therapies. The novelty of our research is that it reports on the effects of both common and less well-known honey types against bacteria in chronic wounds. This is the first study to investigate the antibacterial and antibiofilm-inhibiting effects of some specialty honeys, such as goldenrod and milkweed honeys. In addition, our work sheds some light on the mechanisms of action behind honey's antibiofilm activity, including the demonstration of the anti-quorum sensing effect of varietal honeys. All honey types were good anti-QS agents even at low concentrations (0.5% *v/v*), chestnut being the strongest inhibitor. Based on these results, without a growth inhibitory effect, an anti-QS effect was detectable, which indicates that the honey samples tested intervened in the biosynthesis of AHL signal molecules.

Our results revealed that the most significant antibacterial activity was shown by the darker-colored chestnut and linden honeys, in accordance with Albaridi (2019) [51]. This is also in agreement with the work of Truchado et al. [52], who tested 29 honey samples and found that each honey type was capable of interfering with QS, but chestnut and linden honeys had the highest anti-QS activity [52]. In accordance with our findings, Oliveira and coworkers [53] proved the antibiofilm effect of 50% chestnut honey against *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* in connection with wound healing. In our study, a much

lower concentration (6.25%) of chestnut honey inhibited the biofilm of *P. aeruginosa*, with a 68% inhibitory rate. In a recent study by Sevin and Yarsan [54], the efficiency of chestnut honey cream was proven in a rat wound model where inflammation, as well as levels of granulation tissue, were significantly reduced by the honey treatment compared to the control.

Similarly, linden honeys from Central and Northern Europe were found to exhibit strong antibacterial and antibiofilm activity [49,50,55,56]. In a study analyzing the effect of eleven Danish honeys and manuka honey, linden honey exhibited an even stronger antibacterial effect than manuka honey [55]. The analysis of five Slovakian honey types by Farkasovska et al. [56] revealed that linden honey samples showed the strongest antibacterial activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, compared to acacia, rapeseed, sunflower and multifloral honey samples. The antibacterial activity of most honey types was found to be mainly H₂O₂-dependent [30,56]; however, the strong antibacterial effect of linden honey seems to be at least partially attributed to non-peroxide factor(s) [56]. Sakač and co-workers [57] also observed the outstanding antibacterial effect of chestnut and linden honeys from the Balkan region against *S. aureus* and *S. epidermidis*, with 3.12 to 12.5% and 6.25 to 12.5% MIC values, respectively, which were in a similar range to those of our linden and chestnut honeys, their MIC being 10% against *S. epidermidis*. Differences in MIC values measured for the same type of honey in different countries or even in different regions of the same country can be due to differences in the actual composition of honey types, which in turn can be influenced by the year of harvest and geographical origin.

Although in our experiments black locust/acacia honey displayed weaker activity against wound-associated bacteria, in the study of Ranzato et al. [58] acacia and buckwheat honeys were more active in promoting scratch wound closure compared to manuka honey samples. Cytokines are known to play a role in wound healing. Ranzato et al. [58] reported that acacia honey induced significant increases of primary interleukins present in the fibroblast culture and pointed out a correlation between interleukin modulation and wound healing activity.

Our study was the first to report on the antibacterial, antibiofilm and anti-QS activity of goldenrod and milkweed honeys against the bacteria *S. epidermidis* and MRSA. The antibacterial effect of goldenrod honey was investigated against *P. aeruginosa* and *S. aureus* [49], but no previous research has been dedicated to the wound-healing potential of this honey type. The present study revealed that goldenrod honey had a medium level of antibacterial and antibiofilm activity against wound-associated pathogens, which was lower than that of chestnut and linden honeys but higher than that of acacia and milkweed honeys. As for milkweed honey, only our previous study [49] reported its ability to hinder the growth and biofilm formation of *P. aeruginosa* and *S. aureus*, but this honey type showed the lowest antimicrobial activity in each assay from a set of four Hungarian honeys. Similarly, in the present study, we found that milkweed honey had the lowest or second lowest (after acacia honey) antibacterial potential in most assays against wound-associated bacteria.

The outcomes of the current study, performed on wound-infecting bacteria, confirmed the high antibacterial and antibiofilm potential of linden and chestnut honeys, which were demonstrated previously against the respiratory tract and food-borne pathogens [49,50]. Regardless of the year when our honey samples were harvested, honey types of the same botanical origin inhibited the growth and biofilm formation of various bacteria in a similar manner. Similarly, Truchado et al. [52] concluded that the floral origin of honeys was the most decisive factor regarding QS inhibitory activity, independent of geographic location. In addition, they found that unifloral honey samples showed “non-peroxide” anti-QS activity, which was not linearly correlated with total and individual phenolic compounds. Our previous results also indicated that linden honey, exhibiting high levels of antibacterial activity in each assay, had a lower total phenolic content/total reducing capacity [49,59] compared to other unifloral honeys with weaker antibacterial properties. Similarly, a study of 12 honey types from the Balkan region reported that linden honey was one of the strongest antibacterial agents against *Staphylococcus* strains, but its polyphenol levels

were significantly lower than those of similarly effective phacelia honey [57]. Besides the marker compound lindenin, high levels of methyl syringate were measured in linden honey [60]. The latter phenolic compound is known to act as a potent antioxidant and antibacterial agent [61], and may thus contribute to the exceptional antibacterial properties of linden honey. In chestnut honey, kynurenic acid was identified as a specific compound with antioxidant and antibacterial potential; however, it did not reach a concentration that could justify its high level of antibacterial activity [62]. Further investigation is needed to determine which other unique compounds are associated with the high antibacterial and antibiofilm potential of chestnut and linden honeys.

Not all bacterial strains tested reacted in the same manner to the honey treatments. In our study, the most sensitive pathogen was *S. epidermidis*, which required the lowest concentration of honey to inhibit growth. Additionally, the biofilms of MRSA and *P. aeruginosa* were more resistant than that of *S. epidermidis*, being inhibited by 66.9%, 68.2% and 71.1% by the most effective chestnut honey, respectively. In contrast, when treated with sidr and manuka honeys, *P. aeruginosa* biofilms were more sensitive compared to both methicillin-susceptible and -resistant *S. aureus* strains [63]. At the same time, in our membrane degradation experiments, Gram-positive *Staphylococcus* strains were more resistant than Gram-negative *P. aeruginosa*. Similar observations were reported for avocado, chestnut and manuka honeys, which were more effective against Gram-negative *E. coli* than Gram-positive *S. aureus* [64,65]. A possible explanation for this difference is that honey increases the permeability of the outer membrane of Gram-negative bacteria by destroying the lipopolysaccharide layer [66].

5. Conclusions

Honey has great potential as a topical agent in the treatment of wounds due to its antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant properties. It has to be highlighted that different honey types display different levels of health benefits. From a set of five unifloral Hungarian honeys tested against wound-associated bacteria, the antibacterial, biofilm-inhibiting and anti-QS activities of linden and chestnut honeys were superior to those of acacia, goldenrod and milkweed honeys. In addition to the floral origin, the antibacterial effect of honey is also affected by the microbial species treated. Honey can play a significant role as a supplement to antibiotic therapy because it achieves its antibacterial effect at several points of attack.

Author Contributions: Conceptualization, M.K. and Á.F.; methodology, V.L.B. and B.K.; software, M.K.; validation, M.K. and Á.F.; formal analysis, Á.F.; investigation, R.K., V.L.B., E.B.-K., L.N.-R. and D.S.; resources, Á.F.; data curation, V.L.B., E.B.-K. and M.K.; writing—original draft preparation, V.L.B. and L.N.-R.; writing—review and editing, M.K. and Á.F.; visualization, M.K. and E.B.-K.; supervision, Á.F.; project administration, Á.F.; funding acquisition, Á.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the grants from the National Research, Development and Innovation Office NKFIH K 132044 and NKFIH PD 142122.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank Péter Szabó (Institute of Geography and Earth Sciences, University of Pécs) for the SEM study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lazarus, G.S.; Cooper, D.M.; Knighton, D.R.; Margolis, D.J.; Percoraro, R.E.; Rodeheaver, G.; Robson, M.C. Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing. *Wound Repair Regen.* **1994**, *2*, 165–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mustoe, T.A.; O’shaughnessy, K.; Kloeters, O. Chronic Wound Pathogenesis and Current Treatment Strategies: A Unifying Hypothesis. *Plast. Reconstr. Surg.* **2006**, *117*, 35S–41S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lewis, K.I.M. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 999–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Hall, C.W.; Mah, T.-F. Molecular Mechanisms of Biofilm-Based Antibiotic Resistance and Tolerance in Pathogenic Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 276–301. [[CrossRef](#)]
5. Sutherland, I.W. Biofilm Exopolysaccharides: A Strong and Sticky Framework. *Microbiology* **2001**, *147*, 3–9. [[CrossRef](#)]
6. Leid, J.G. Bacterial Biofilms Resist Key Host Defenses. *Microbe* **2009**, *4*, 66–70.
7. Flemming, H.-C.; Wingender, J. The Biofilm Matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 623–633. [[CrossRef](#)]
8. Fuqua, W.C.; Winans, S.C.; Greenberg, E.P. Quorum Sensing in Bacteria: The LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 269–275. [[CrossRef](#)]
9. Fetzner, S. Quorum Quenching Enzymes. *J. Biotechnol.* **2015**, *201*, 2–14. [[CrossRef](#)]
10. Liu, L.; Zeng, X.; Zheng, J.; Zou, Y.; Qiu, S.; Dai, Y. AHL-Mediated Quorum Sensing to Regulate Bacterial Substance and Energy Metabolism: A Review. *Microbiol. Res.* **2022**, *262*, 127102. [[CrossRef](#)]
11. Rodis, N.; Tspadikou, V.K.; Potsios, C.; Xaplanteri, P. Resistance Mechanisms in Bacterial Biofilm Formations: A Review. *J. Emerg. Intern. Med.* **2020**, *4*, 30.
12. Parsek, M.R.; Singh, P.K. Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *57*, 677. [[CrossRef](#)]
13. Chioro, A.; Coll-Seck, A.M.; Høie, B.; Moeloek, N.; Motsoledi, A.; Rajatanavin, R.; Touraine, M. Antimicrobial Resistance: A Priority for Global Health Action. *Bull. World Health Organ.* **2015**, *93*, 439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Abdula, N.; Macharia, J.; Motsoledi, A.; Swaminathan, S.; VijayRaghavan, K. National Action for Global Gains in Antimicrobial Resistance. *Lancet* **2016**, *387*, e3–e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Vestby, L.K.; Grønseth, T.; Simm, R.; Nesse, L.L. Bacterial Biofilm and Its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics* **2020**, *9*, 59. [[CrossRef](#)]
16. Høiby, N. A Personal History of Research on Microbial Biofilms and Biofilm Infections. *Pathog. Dis.* **2014**, *70*, 205–211. [[CrossRef](#)]
17. Dibartola, A.C.; Swearingen, M.C.; Granger, J.F.; Stoodley, P.; Dusane, D.H. Biofilms in Orthopedic Infections: A Review of Laboratory Methods. *Appl. Microbiol.* **2017**, *125*, 418–428. [[CrossRef](#)]
18. Percival, S.L.; Hill, K.E.; Williams, D.W.; Hooper, S.J.; Thomas, D.W.; Costerton, J.W. A Review of the Scientific Evidence for Biofilms in Wounds. *Wound Repair Regen.* **2012**, *20*, 647–657. [[CrossRef](#)]
19. Shariati, A.; Azimi, T.; Ardebili, A.; Chirani, A.S.; Bahramian, A.; Pormohammad, A.; Sadredinamin, M.; Erfanimanesh, S.; Bostanghadiri, N.; Shams, S. Insertional Inactivation of OprD in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Strains Isolated from Burn Patients in Tehran, Iran. *New Microbes New Infect.* **2018**, *21*, 75–80. [[CrossRef](#)]
20. Pál, T. Az Orvosi Mikrobiológia Tankönyve. *Med. Könyvkiadó Bp. Zrt* **2012**, *3.3*, 257–324.
21. Stewart, P.S.; Costerton, J.W. Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms. *Lancet* **2001**, *358*, 135–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Chegini, Z.; Khoshbayan, A.; Moghadam, M.T.; Farahani, I.; Jazireian, P.; Shariati, A. Bacteriophage Therapy against *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms: A Review. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2020**, *19*, 45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Byrd, A.L.; Belkaid, Y.; Segre, J.A. The Human Skin Microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 143–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Saffari, F.; Widerström, M.; Gurram, B.K.; Edebro, H.; Hojabri, Z.; Monsen, T. Molecular and Phenotypic Characterization of Multidrug-Resistant Clones of *Staphylococcus Epidermidis* in Iranian Hospitals: Clonal Relatedness to Healthcare-Associated Methicillin-Resistant Isolates in Northern Europe. *Microb. Drug Resist.* **2016**, *22*, 570–577. [[CrossRef](#)]
25. Knafl, D.; Tobudic, S.; Cheng, S.C.; Bellamy, D.R.; Thalhammer, F. Dalbavancin Reduces Biofilms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) and Methicillin-Resistant *Staphylococcus Epidermidis* (MRSE). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *36*, 677–680. [[CrossRef](#)]
26. Hiramatsu, K. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: A New Model of Antibiotic Resistance. *Lancet Infect. Dis.* **2001**, *1*, 147–155. [[CrossRef](#)]
27. Que, Y.-A. *Staphylococcus Aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). *Princ. Pract. Infect. Dis.* **2010**, 2543–2578. Available online: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1570009751465587968> (accessed on 10 February 2023).
28. Taha, E.-K.A.; Al-Kahtani, S.; Taha, R. Comparison of the Physicochemical Characteristics of Sidr (*Ziziphus Spp.*) Honey Produced by *Apis Florea*, F. and *Apis mellifera*, L. *J. Apic. Res.* **2021**, *60*, 470–477. [[CrossRef](#)]
29. Lusby, P.E.; Coombes, A.L.; Wilkinson, J.M. Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bacteria. *Arch. Med. Res.* **2005**, *36*, 464–467. [[CrossRef](#)]
30. Bucekova, M.; Jardekova, L.; Juricova, V.; Bugarova, V.; Di Marco, G.; Gismondi, A.; Leonardi, D.; Farkasovska, J.; Godocikova, J.; Laho, M. Antibacterial Activity of Different Blossom Honeys: New Findings. *Molecules* **2019**, *24*, 1573. [[CrossRef](#)]
31. Mandal, M.D.; Mandal, S. Honey: Its Medicinal Property and Antibacterial Activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2011**, *1*, 154–160. [[CrossRef](#)]
32. Scepankova, H.; Combarros-Fuertes, P.; Fresno, J.M.; Tornadijo, M.E.; Dias, M.S.; Pinto, C.A.; Saraiva, J.A.; Estevinho, L.M. Role of Honey in Advanced Wound Care. *Molecules* **2021**, *26*, 4784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bazaid, A.S.; Aldarhami, A.; Patel, M.; Adnan, M.; Hamdi, A.; Snoussi, M.; Qanash, H.; Imam, M.; Monjed, M.K.; Khateb, A.M. The Antimicrobial Effects of Saudi Sumra Honey against Drug Resistant Pathogens: Phytochemical Analysis, Antibiofilm, Anti-Quorum Sensing, and Antioxidant Activities. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gemiarto, A.T.; Ninyio, N.N.; Lee, S.W.; Logis, J.; Fatima, A.; Chan, E.W.C.; Lim, C.S.Y. Isoprenyl Caffeate, a Major Compound in Manuka Propolis, Is a Quorum-Sensing Inhibitor in *Chromobacterium Violaceum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2015**, *108*, 491–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Liaqat, I.; Gulab, B.; Hanif, U.; Sultan, A.; Sadiqa, A.; Zafar, U.; Afzaal, M.; Naseem, S.; Akram, S.; Saleem, G. Honey Potential as Antibiofilm, Antiquorum Sensing and Dispersal Agent against Multispecies Bacterial Biofilm. *J. Oleo Sci.* **2021**, *71*, 425–434. [[CrossRef](#)]
36. Combarros-Fuertes, P.; Fresno, J.M.; Estevinho, M.M.; Sousa-Pimenta, M.; Tornadijo, M.E.; Estevinho, L.M. Honey: Another Alternative in the Fight against Antibiotic-Resistant Bacteria? *Antibiotics* **2020**, *9*, 774. [[CrossRef](#)]
37. Hewett, S.R.; Crabtree, S.D.; Dodson, E.E.; Rieth, C.A.; Tarkka, R.M.; Naylor, K. Both Manuka and Non-Manuka Honey Types Inhibit Antibiotic Resistant Wound-Infecting Bacteria. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1132. [[CrossRef](#)]
38. Von Der Ohe, W.; Oddo, L.P.; Piana, M.L.; Morlot, M.; Martin, P. Harmonized Methods of Melissopalynology. *Apidologie* **2004**, *35*, S18–S25. [[CrossRef](#)]
39. Beretta, G.; Granata, P.; Ferrero, M.; Orioli, M.; Facino, R.M. Standardization of Antioxidant Properties of Honey by a Combination of Spectrophotometric/Fluorimetric Assays and Chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *533*, 185–191. [[CrossRef](#)]
40. Hindler, J.A.; Jorgensen, J.H. Susceptibility Test Methods: Fastidious Bacteria. In *Manual of Clinical Microbiology*; Versalovic, J., Ed.; ASM: Washington, DC, USA, 2011; Volume 1.
41. Peeters, E.; Nelis, H.J.; Coenye, T. Comparison of Multiple Methods for Quantification of Microbial Biofilms Grown in Microtiter Plates. *J. Microbiol. Methods* **2008**, *72*, 157–165. [[CrossRef](#)]
42. Bennis, S.; Chami, F.; Chami, N.; Bouchikhi, T.; Remmal, A. Surface Alteration of *Saccharomyces Cerevisiae* Induced by Thymol and Eugenol. *Lett. Appl. Microbiol.* **2004**, *38*, 454–458. [[CrossRef](#)]
43. He, Z.; Huang, Z.; Jiang, W.; Zhou, W. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde on *Streptococcus Mutans* Biofilms. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Oh, Y.J.; Hong, J. Application of the MTT-Based Colorimetric Method for Evaluating Bacterial Growth Using Different Solvent Systems. *LWT* **2022**, *153*, 112565. [[CrossRef](#)]
45. Kerekes, E.-B.; Deák, É.; Takó, M.; Tserennadmid, R.; Petkovits, T.; Vágvölgyi, C.; Krisch, J. Anti-Biofilm Forming and Anti-Quorum Sensing Activity of Selected Essential Oils and Their Main Components on Food-Related Micro-Organisms. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *115*, 933–942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Choo, J.C.; Koh, R.Y.; Ling, A.P.K. Medicinal Properties of Pitaya: A Review. *Spatula DD* **2016**, *6*, 69–76. [[CrossRef](#)]
47. Zambrano, C.; Kerekes, E.B.; Kotogán, A.; Papp, T.; Vágvölgyi, C.; Krisch, J.; Takó, M. Antimicrobial Activity of Grape, Apple and Pitahaya Residue Extracts after Carbohydrase Treatment against Food-Related Bacteria. *LWT* **2019**, *100*, 416–425. [[CrossRef](#)]
48. Hammer, Ø.; Harper, D.A.; Ryan, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* **2001**, *4*, 9.
49. Farkas, Á.; Balázs, V.L.; Kőszegi, T.; Csepregi, R.; Kerekes, E.; Horváth, G.; Szabó, P.; Gaál, K.; Kocsis, M. Antibacterial and Biofilm Degradation Effects of Hungarian honeys linked with botanical origin, antioxidant capacity and mineral content. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 953470. [[CrossRef](#)]
50. Balázs, V.L.; Nagy-Radványi, L.; Filep, R.; Kerekes, E.; Kocsis, B.; Kocsis, M.; Farkas, Á. In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activity of Hungarian honeys against respiratory tract bacteria. *Foods* **2021**, *10*, 1632. [[CrossRef](#)]
51. Albaridi, N.A. Antibacterial Potency of Honey. *Int. J. Microbiol.* **2019**, *2019*, 2464507. [[CrossRef](#)]
52. Truchado, P.; Gil-Izquierdo, A.; Tomas-Barberan, F.; Allende, A. Inhibition by Chestnut Honey of N-Acyl-L-Homoserine Lactones and Biofilm Formation in *Erwinia Carotovora*, *Yersinia Enterocolitica*, and *Aeromonas Hydrophila*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11186–11193. [[CrossRef](#)]
53. Oliveira, A.; Sousa, J.C.; Silva, A.C.; Melo, L.D.; Sillankorva, S. Chestnut Honey and Bacteriophage Application to Control *Pseudomonas Aeruginosa* and *Escherichia Coli* Biofilms: Evaluation in an Ex Vivo Wound Model. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sevin, S.; Yarsan, E. Investigation of the effects of pine and chestnut honey on wound healing. *Ank. Univ. Vet. Fak. Derg.* **2022**, *69*, 319–328. [[CrossRef](#)]
55. Matzen, R.D.; Leth-Espensen, J.Z.; Jansson, T.; Nielsen, D.S.; Lund, M.N.; Matzen, S. The antibacterial effect in vitro of honey derived from various Danish flora. *Dermatol. Res. Pract.* **2018**, *2018*, 7021713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Farkasovska, J.; Bugarova, V.; Godocikova, J.; Majtan, V.; Majtan, J. The role of hydrogen peroxide in the antibacterial activity of different floral honeys. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245*, 2739–2744. [[CrossRef](#)]
57. Sakač, M.; Jovanov, P.; Marić, A.; Četojević-Simin, D.; Novaković, A.; Plavšić, D.; Škrobot, D.; Kovač, R. Antioxidative, antibacterial and antiproliferative properties of honey types from the Western Balkans. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Ranzato, E.; Martinotti, S.; Burlando, B. Honey exposure stimulates wound repair of human dermal fibroblasts. *Burn. Trauma* **2013**, *1*, 2321–3868. [[CrossRef](#)]
59. Bodó, A.; Radványi, L.; Kőszegi, T.; Csepregi, R.; Nagy, D.U.; Farkas, Á.; Kocsis, M. Quality evaluation of light- and dark-colored Hungarian honeys, focusing on botanical origin, antioxidant capacity and mineral content. *Molecules* **2021**, *26*, 2825. [[CrossRef](#)]
60. Qiao, J.; Chen, L.; Kong, L.; Dong, J.; Zhou, Z.; Zhang, H. Characteristic components and authenticity evaluation of rape, acacia, and linden honey. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 9776–9788. [[CrossRef](#)]
61. Leyva-Jimenez, F.J.; Lozano-Sanchez, J.; Borrás-Linares, I.; de la Luz Cadiz-Gurrea, M.; Mahmoodi-Khaledi, E. Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria. *LWT* **2019**, *101*, 236–245. [[CrossRef](#)]

62. Ronsisvalle, S.; Lissandrello, E.; Fuochi, V.; Petronio, G.P.; Straquadanio, C.; Crascì, L.; Panico, A.; Milito, M.; Cova, A.M.; Tempera, G. Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Casteanea Sativa* Miller Chestnut Honey Produced on Mount Etna (Sicily). *Nat. Prod. Res.* **2019**, *33*, 843–850. [[CrossRef](#)]
63. Alandejani, T.; Marsan, J.; Ferris, W.; Slinger, R.; Chan, F. Effectiveness of Honey on *Staphylococcus Aureus* and *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2009**, *141*, 114–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Combarros-Fuertes, P.; Estevinho, L.M.; Teixeira-Santos, R.; Rodrigues, A.G.; Pina-Vaz, C.; Fresno, J.M.; Tornadijo, M.E. Evaluation of Physiological Effects Induced by Manuka Honey Upon *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*. *Microorganisms* **2019**, *7*, 258. [[CrossRef](#)]
65. Combarros-Fuertes, P.; Estevinho, L.M.; Teixeira-Santos, R.; Rodrigues, A.G.; Pina-Vaz, C.; Fresno, J.M.; Tornadijo, M.E. Antibacterial Action Mechanisms of Honey: Physiological Effects of Avocado, Chestnut, and Polyfloral Honey upon *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*. *Molecules* **2020**, *25*, 1252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Brudzynski, K.; Sjaarda, C. Antibacterial Compounds of Canadian Honeys Target Bacterial Cell Wall Inducing Phenotype Changes, Growth Inhibition and Cell Lysis That Resemble Action of β -Lactam Antibiotics. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e106967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activity of Hungarian honeys against Respiratory Tract Bacteria

Viktória Lilla Balázs ^{1,†}, Lilla Nagy-Radványi ^{1,†}, Rita Filep ¹, Erika Kerekes ², Béla Kocsis ³, Marianna Kocsis ⁴  and Ágnes Farkas ^{1,*} 

- ¹ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; balazsviktorialilla@gmail.com (V.L.B.); radvanyililla25@gmail.com (L.N.-R.); rita.filep@gmail.com (R.F.)
- ² Department of Microbiology, Faculty of Science and Informatics, University of Szeged, 6720 Szeged, Hungary; kerekserika88@gmail.com
- ³ Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; kocsis.bela@pte.hu
- ⁴ Institute of Biology, Faculty of Sciences, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; mkocsis@gamma.ttk.pte.hu
- * Correspondence: agnes.farkas@aok.pte.hu; Tel.: +36-72-503-625 (ext. 28822)
- † First authors with equal contribution.

Abstract: Honey is a rich source of carbohydrates, while minor compounds such as amino acids and polyphenols contribute to its health-promoting effects. Honey is one of the oldest traditional remedies applied for microbial infections, due to its antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant properties. The aim of this study was to investigate the antibacterial and antibiofilm effects of Hungarian black locust, linden, and sunflower honeys against the most common biofilm-forming respiratory tract pathogens *Haemophilus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Streptococcus pneumoniae*. The unifloral character of all three honey types was confirmed by melissopalynological analysis. The antibacterial activity of each honey sample against each bacterium strain was proven with agar well diffusion assay and thin layer chromatography—direct bioautography. Kinetics and mechanisms of antibacterial action were clarified with time-kill assay and membrane degradation study. The anti-biofilm activity was evidenced using crystal violet assay. In each assay, linden honey was the most effective, followed by sunflower and black locust honey. In addition, each honey sample had greater potential to suppress respiratory tract bacteria, compared to major sugar components. In conclusion, honey in general and linden honey in particular, can have a role in the treatment of respiratory tract infections caused by biofilm-forming bacteria.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; *Haemophilus* spp.; *Streptococcus pneumoniae*; antibiofilm activity; antibacterial effect; honey; respiratory tract



Citation: Balázs, V.L.; Nagy-Radványi, L.; Filep, R.; Kerekes, E.; Kocsis, B.; Kocsis, M.; Farkas, Á. In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activity of Hungarian Honeys against Respiratory Tract Bacteria. *Foods* **2021**, *10*, 1632. <https://doi.org/10.3390/foods10071632>

Academic Editor: Maria da Graça Costa G. Miguel

Received: 9 June 2021

Accepted: 12 July 2021

Published: 14 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Honey is a natural substance produced by *Apis mellifera* bees from the nectar of plants or from secretions of living parts of plants or excretions of plant-sucking insects on the living parts of plants, which the bees collect and transform by combining with specific substances of their own [1]. Honey of all origins is composed mainly of the sugars glucose, fructose, and sucrose, which constitute ~80% of its weight, with water composing the remaining 20%. In addition, vitamins, flavonoids, amino acids, enzymes, minerals, and phenolic acids are also present in honey [2]. Honey is one of the oldest traditional medicines, often applied as a remedy for microbial infections [3]. Honey can prevent and relieve the symptoms of respiratory tract infections, as well as gastrointestinal and cardiovascular diseases, due to the antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, and antibacterial effects [4–12]. Both Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria are susceptible to honey, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [13], *Shigella sonnei* [14], *Helicobacter pylori* [15], and yeasts like *Candida albicans* [16].

Recently, antibacterial resistance poses a major problem, which is in correlation with the biofilm forming ability of bacteria. Many of the resistant bacterial cells take advantage of being embedded in a biofilm, which is a complex matrix of polysaccharides and other components, providing optimal conditions and protection for the bacterial community [17–20]. Infections associated with biofilm growth are usually challenging to eradicate, since mature biofilms display tolerance towards environmental stress factors, as well as antibiotics and the immune response. Biofilms are compact structures of bacteria, which can resist the worst environmental circumstances and even survive the antibiotic treatment. Furthermore, during the antibiotics treatment the subclinical concentration can diffuse into the biofilm, which is not enough to kill the bacterial cells, but it can enhance the appearance of antibiotics resistance genes [21,22]. Moreover, biofilms can cause chronic diseases, as well [23,24]. The respiratory tract is the barrier between the environment and the human body, which may facilitate pathogens entering this area. The most common respiratory tract bacteria are *Haemophilus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Streptococcus pneumoniae* [25,26]. *Haemophilus* species with *Aggregatibacter* species, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, and *Kingella* species (HACEK group) are a small, heterogeneous group of fastidious, Gram-negative bacteria that frequently colonize the oropharynx, and can cause endocarditis due to their biofilm-forming ability. In the respiratory tract, they are often responsible for chronic otitis media, pharyngitis, and laryngitis [27–29]. *P. aeruginosa* is a well-known pathogen, which can develop biofilms on respiratory tract mucosa, being the causing agent of otitis media, sinusitis, and pharyngitis. This is the most significant Gram-negative bacterium in nosocomial diseases [30–32]. *P. aeruginosa*'s biofilm is highly resistant to antibiotics and disinfectants, due to its ability to produce alginate mucus [17,33]. Besides causing pneumonia, *S. pneumoniae* is common in otitis media and sinusitis, sepsis, and meningitis as well [34–36]. This Gram-positive bacterium can stick to the surface of bronchi easily, where it can create biofilms, making treatment more difficult [37,38]. The significance of the above-mentioned pathogens lies in the high risk they pose in health care. Due to the increased frequency of antibiotic resistance and the biofilm forming ability of several bacteria, it is essential to research new and natural antibacterial and antibiofilm agents, including honeys of various botanical origin.

There are data on the physicochemical properties, as well as sugar and volatile composition of black locust, linden, and sunflower honeys produced in various countries [39–42], including Hungary [43–45], but data are lacking about the antibacterial activity of Hungarian honeys. Our recent study, regarding the antioxidant activity of eight different unifloral honeys from Hungary (acacia/black locust, amorphia, phacelia, linden, sunflower, chestnut, fennel and meadow sage), revealed that linden honey had exceptionally high antioxidant activity despite its light colour [46]. Our hypothesis was that linden honey will be effective also as an antibacterial agent. From the eight Hungarian honey types mentioned above, for the purposes of the present study, we chose the ones that are readily available for customers and have different levels of antioxidant capacity: black locust with pale colour and low antioxidant activity, linden honey with light colour and high antioxidant activity, and sunflower honey with darker colour and high antioxidant activity. The aim of this study was to evaluate the antibacterial and antibiofilm properties of Hungarian black locust, linden, and sunflower honey samples against both Gram-negative and Gram-positive respiratory tract bacteria in three in vitro test systems. In addition, we intended to gain insight into the kinetics and possible mechanisms of action of the antibacterial activity, therefore time-kill assays and membrane degradation studies were performed as well.

2. Materials and Methods

2.1. Melissopalynological Analysis

The honey samples were purchased in 2020 from two Hungarian apiaries, directly from beekeepers, who identified the samples as black locust, linden, and sunflower honeys. The botanical origin of each honey sample was checked with melissopalynological analysis [47]. Honey samples, when fluid, were stirred thoroughly. In case they contained large crystals,

they were heated on a 40 °C water bath, until fluid, then stirred. 10 g of honey was measured into 50-mL centrifuge tubes, 20 mL of distilled water was added, then vortexed with Combi-spin FVL-2400N (Biocenter Ltd., Szeged, Hungary). The solution was centrifuged at 3000 rpm for 10 min with a Neofuge 15R centrifuge (Lab-Ex Ltd., Budapest, Hungary). The supernatant was decanted, then 10 mL of distilled water was added to the sediment, and this mixture was centrifuged again at 3000 rpm for 10 min, and decanted. Any remaining fluid was removed by setting the centrifuge tubes on filter paper. A frame of the size of the cover glass was drawn on each microscope slide with a paint marker (Edding 750), then the microscope slides were placed on a heating plate (OTS 40, Tiba Ltd., Győr, Hungary) set to 40 °C. Then, 0.25 mL of distilled water was added to the sediment in the centrifuge tube, then vortexed. A volume of 20 µL of the pollen suspension was pipetted on the microscope slide within the frame. Water was allowed to evaporate from the slide on the heating plate. The pollen preparation was mounted in fuchsine glycerol jelly (fuchsine added to Kaiser's glycerol jelly). Pollen preparations were studied with a Nikon Eclipse E200 microscope equipped with a Michrome 20MP CMOS digital camera (Auro-Science Consulting Ltd., Budapest, Hungary), and microphotos were taken with the software Capture 1.2 at 400× magnification. At least 500 pollen grains per honey sample were counted, and the source plants were identified at species level, or at least at family level. The relative frequency for each type of pollen was calculated as the percentage of the total number of pollen grains.

2.2. Thin Layer Chromatography–Direct Bioautography (TLC–DB)

The antibacterial effect of honey samples was screened against *Haemophilus influenzae* (DSM 4690), *H. parainfluenzae* (DSM 8978), *Pseudomonas aeruginosa* (PAO I), and *Streptococcus pneumoniae* (DSM 20566). For growing bacteria, Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Sigma Aldrich Ltd., Darmstadt, Germany) was used, and in the case of *Haemophilus* species, 1 mL of supplement B (Diagon Kft., Budapest, Hungary) and 15 µg/mL NAD solution (1 mg/mL) was added to BHI. After that, the solution was shaken at 37 °C in a shaker incubator (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) at a speed of 60 rpm for 24 h. The honey samples were dissolved in sterilized distilled water. The concentration of the stock solution was 1 g/mL in each honey sample. From these solutions 1.0 µL was applied to the silica gel 60 F254 aluminum sheet 5 × 10 cm TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany) with Thermo Fisher Scientific Finnpiette (Merck, Darmstadt, Germany), so the substance content on the plate was 1 mg. The negative control was the distilled water, the positive control was gentamicin (Sandoz, 40 mg/mL) against *P. aeruginosa*, ceftriaxone (Hospira, 250 mg powder, stock solution: 40 mg/mL) against *Haemophilus* spp., and *S. pneumoniae*. From the antibiotic samples we applied 1.0 µL. The plates were dipped into 100 mL of bacterial suspensions (4×10^7 CFU/mL). After that the plates were put in low-wall horizontal chambers, with dimensions of 20 × 14.5 × 5 cm. The incubation time was 1.5 h and the temperature of the box was 37 °C. In order to visualize the inhibition zones, MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Aldrich Ltd.) solution (0.05 g MTT powder dissolved in 90 mL of water) was used. The MTT solution is a bacterial selective dye, the color of which will change to blue or violet in the presence of viable bacteria. After using MTT solution, the incubation time was 12 h (37 °C). The antibacterial activity of the samples, following 13.5 h of total incubation time, was shown by the white inhibitory zones on the plates. The diameter of inhibition zones (expressed in mm) was measured with Motic Images Plus 2.0 program (Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Germany). All tests were carried out in eight replicates.

Since our preliminary statistical analysis revealed no significant differences between honey samples from different apiaries, but with the same botanical origin, in the subsequent microbiological assays we worked with pooled black locust, linden, and sunflower honey samples.

2.3. Agar Well Diffusion Assay

In this assay, the antibacterial activity of honey samples and sugar solutions (glucose:fructose, 1:1) was examined. We used chocolate agar for *Haemophilus* species and *Streptococcus pneumoniae*, and Müller-Hinton agar for *Pseudomonas aeruginosa*. In order to compare the antibacterial effects of honeys and sugar solutions, honey samples and also glucose and fructose (Sigma Aldrich Ltd.) were diluted in sterilized distilled water to 50% (*w/w*) and 25% (*w/w*). As a positive control, we used gentamicin against *P. aeruginosa*, ceftriaxone against *Haemophilus* spp., and *S. pneumoniae*. The stock solutions from antibiotics were 5 µg/mL. We added 150 µL from honey and sugar solutions, and 75 µL from antibiotic solutions to the wells. The plates were incubated at 37 °C for 12 h, after which period the diameter of the inhibition zones (expressed in cm) was measured. All tests were carried out six times.

2.4. Time-Kill Assay

Time-kill studies were conducted with escalating concentrations of honey samples and glucose:fructose (1:1) solution against *Pseudomonas aeruginosa* (Gram−) and *Streptococcus pneumoniae* (Gram+). The bacterial suspensions were diluted with BHI (37 °C, 12 h); 100 µL of the suspension was transferred to 96-well microtiter plates, each containing 100 µL of a honey or sugar solution at 20%, 40%, and 60% (*w/w*) concentrations. The final concentrations of the bacterial suspension in each well at baseline were approximately 10⁵ CFU/mL. As a control, we used the bacterial suspensions without treatment. We measured the absorbance (600 nm) seven times (0, 2, 4, 6, 8, 12, and 24 h) with plate reader (BMG Labtech, SPECTROstar Nano).

2.5. Membrane Degradation Study

The release of cellular material was examined in *P. aeruginosa* (Gram−) and *S. pneumoniae* (Gram+). The absorbance of 1 mL bacterial suspension containing 2×10^7 CFU/mL in PBS (phosphate buffer saline) was measured at 260 nm. The bacterial cells treated with honey were suspended for 1 h in PBS containing 20%, 40%, and 60% (*w/w*) concentrations of honey samples. Control cells were suspended in PBS without honey treatment. As positive control 90% solution of honey samples was used. In order to examine the antibacterial effect of sugar components, glucose:fructose (1:1) solutions were tested, as well. Moreover, the bacterial cells suspended in PBS containing honey and sugar samples (60%) were treated for different periods of time: 0, 10, 20, 40, 60, and 90 min. After treatment, cells were centrifuged (Neofuge 15R, Lab-Ex Ltd., Budapest, Hungary) at 11,107 rpm (12,000× *g*) for 2 min, and the absorbance of the supernatant at 260 nm was determined in Metertech SP-8001 (Abl&E-Jasco Ltd., Budapest, Hungary) spectrophotometer [48,49]. The results were expressed in percentage values, which were compared to the untreated cells.

2.6. Microdilution Assay

During biofilm inhibition experiments, honey samples with half the minimum inhibitory concentration (MIC/2) were used. The MICs were determined with broth microdilution test. We used 96-well microtiter plates to perform this assay. From each bacterium solution (10⁵ CFU/mL) 100 µL was measured to the wells. From our honey samples 12.5%, 25%, 40%, 50%, and 70% (*w/w*) stock solutions were prepared. Our preliminary experiments revealed that the MIC value will be between 40–55%, thus a dilution series of 40%, 40.5%, 41%, 41.5% to 55.5% was made. From stock solutions, 100 µL was added to each well. After incubation (24 h, 37 °C) we measured the absorbance (600 nm) with plate reader (BMG Labtech, SPECTROstar Nano). Distilled water was used as negative control, and the untreated bacterial suspension as positive control. All tests were carried out in six replicates, from which the average value was calculated, and then the mean of the negative control was subtracted from the value obtained. The concentration at which the absorbance was lower than 10% of the positive control samples, i.e. bacterial growth was inhibited by 90% or more, was considered as the MIC value.

2.7. Antibiofilm Activity

The biofilms were prepared in 96-well microtiter plates. 200 μL of bacterial culture (4×10^7 cells/mL) was added into each well, then the microtiter plate was incubated at 37 °C for 4 h in order to help the adhesion of the cells. After the incubation time the non-adherent cells were washed with physiological saline solution. Distilled water was used as a negative control, and the untreated bacterial suspension as a positive control. The biofilms were treated with 20% solution of honey samples. After the treatments the microtiter plate was incubated at 37 °C for 24 h. Then the adherent cells were fixed with methanol for 20 min. The biofilms were dyed with 0.1% crystal violet solution for 25 min. 33 $w/w\%$ of acetic acid was added to each well, then the absorbance intensity was measured at $\lambda = 595$ nm with microtiter plate reader (BMG Labtech SPECTROstar Nano). All tests were carried out six times [50].

2.8. Statistical Analysis

The data were compared with One-way ANOVA with Tukey's pairwise comparisons. If the normality assumption was violated, we applied Kruskal–Wallis test with Mann–Whitney pairwise comparisons. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$. All statistical data were calculated using Past statistic software (Version 2.17b; [51]).

3. Results

3.1. Melissopalynological Analysis

The botanical origin of the honey samples, identified as black locust (*Robinia pseudoacacia*), linden (*Tilia* sp.), and sunflower (*Helianthus annuus*) honeys by the producers, was confirmed by means of microscopic pollen analysis. The relative frequencies of pollen types in each honey sample are summarized in Table 1. In black locust honey samples, the dominant pollen was *R. pseudoacacia* (Figure 1a), accompanied by pollen grains of *Brassica napus*, *Solidago* sp., and *Tilia* sp. (Figure 1b). In linden honeys, the majority of pollen grains belonged to *Tilia* sp., but *H. annuus* and *R. pseudoacacia* pollen was also identified in lower percentage. Sunflower honeys contained *H. annuus* pollen (Figure 1c) as their dominant pollen type.

Table 1. Relative frequency of pollen types in Hungarian black locust, linden, and sunflower honeys.

Honey Type	Pollen Type—Relative Frequency (%)						
	<i>Robinia</i>	<i>Tilia</i>	<i>Helianthus</i>	<i>Solidago</i>	<i>Brassica</i>	Apiaceae	Other
black locust <i>R. pseudoacacia</i>	67.0	0.5	-	13.8	5.4	0.5	12.8
linden <i>Tilia</i> sp.	27.6	41.0	16.1	-	-	-	15.3
sunflower <i>H. annuus</i>	16.3	7.4	48.1	3.8	-	2.3	22.1

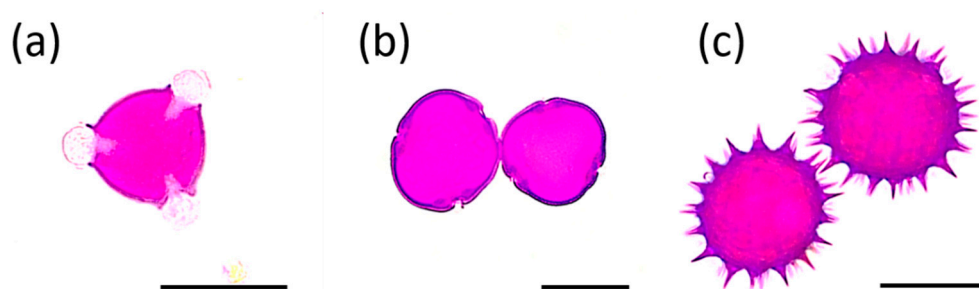


Figure 1. Analysis of botanical origin of honey samples with light microscopy. Pollen grains of: (a) black locust, (b) linden, and (c) sunflower. Scale bar = 25 μm .

3.2. Antibacterial Activity of Honeys

3.2.1. Thin Layer Chromatography–Direct Bioautography (TLC–DB) Assay

Thin layer chromatography–direct bioautography (TLC–DB) is a well-known method to detect the antibacterial activity of dissolved samples, but it is less frequently used with honey samples [52]. Thus, as the first step, we optimized the TLC–DB assay successfully, which allowed us to detect the inhibition zones of honey samples against respiratory tract pathogens as shown for *P. aeruginosa* in Figure 2.

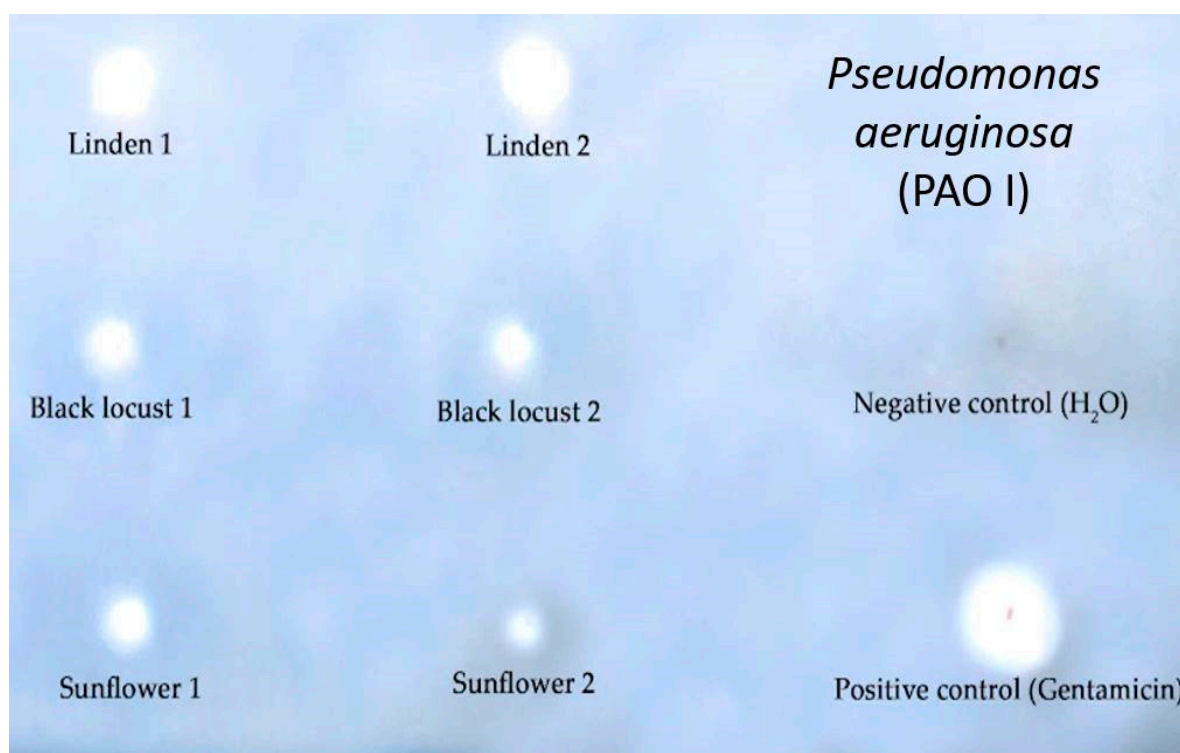


Figure 2. TLC–DB plate in the case of *P. aeruginosa*. Negative control: distilled water, Positive control: gentamicin (40 mg/mL) from which 1.0 μ L was applied to the plate. The numbers after each honey type refer to Apiary 1 and Apiary 2. The stock solutions from honey samples were 1.0 g/mL, 1.0 μ L was applied to the plate. The blue background shows the viable bacteria. The white spots (as inhibition zones) indicated the lack of dehydrogenase activity due to the antibacterial activity of honey samples.

Distilled water as a negative control did not inhibit the growth of any of the bacteria, while the 1- μ L solution of the antibiotics (gentamicin against *P. aeruginosa*, ceftriaxone against *Haemophilus* spp. and *S. pneumoniae*) was effective against each bacterial strain. Our results showed that all honey samples were active against each bacterium. Linden honey was significantly more active against *Haemophilus* and *Pseudomonas* strains, compared to black locust honey samples, while the activity of sunflower honey did not differ statistically from that of either black locust or linden honey. In the case of *S. pneumoniae*, both black locust and linden honeys were significantly more active compared to sunflower honey, but the antibacterial effect of black locust and linden honeys did not differ statistically from each other (Table S1).

Comparing the two *Haemophilus* species, *H. parainfluenzae* was more sensitive to each honey sample than *H. influenzae*, indicated by larger zones of inhibition, with average values of 4.0 and 3.8 mm for linden honey, and 3.5 and 3.2 mm for black locust honey, respectively. Treatment with linden honey resulted in larger inhibition zones, compared to black locust honey, both against *P. aeruginosa* (4.1 and 3.5 mm, respectively), and *S. pneumoniae* (3.9 and 3.6 mm, respectively). Sunflower honey inhibited each bacterium strain to a similar degree (Figure 3).

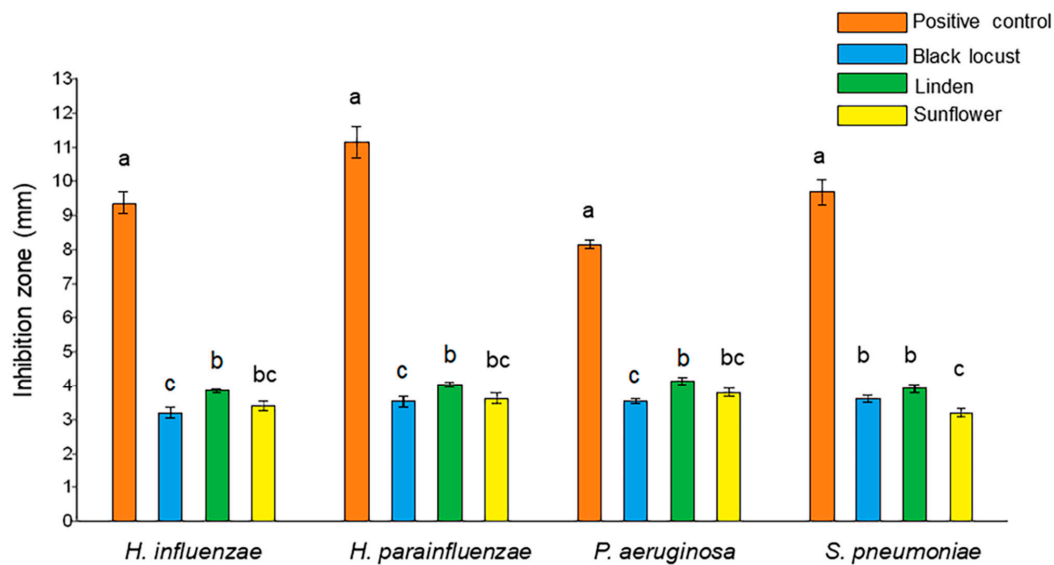


Figure 3. Antibacterial activity of black locust, linden, and sunflower honey samples against respiratory tract bacteria. The diameter of the inhibition zones was expressed in mm. Positive controls: gentamicin against *P. aeruginosa*, ceftriaxone against *Haemophilus* spp., and *S. pneumoniae*. Different letters above bars representing the same bacterial strain indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

3.2.2. Agar Well Diffusion Assay

As Tables 2 and 3 show, each honey sample proved to be more effective compared to sugar solutions, although the latter substances displayed some antibacterial activity, too. However, in the agar well diffusion assay, no significant differences could be detected in the antibacterial activity of various honey types. Regarding the sensitivity of bacterial strains, the lowest antibacterial effect was detected in case of *P. aeruginosa*, whose growth was inhibited to lesser degree by honey treatments, compared to other bacteria (Table S2).

3.3. Kinetics and Mechanisms of Action of Antibacterial Activity

3.3.1. Time-Kill Assay

The time-kill assay kinetics additionally confirmed the bactericidal potential of 40% (*w/w*) and 60% (*w/w*) black locust, linden, and sunflower honey samples against *S. pneumoniae* (Gram+) and *P. aeruginosa* (Gram−) bacteria. As a control, we used sugar solutions (glucose:fructose; 1:1) in order to exclude the sole antibacterial activity of the sugar content in honey. Our results showed that each honey sample exhibited antibacterial activity from the second hour, compared to the control. Between 6 and 8 h after treatment with honeys and sugar controls, the growth of *P. aeruginosa* and *S. pneumoniae* was retained steadily. We can conclude that some antibacterial activity can be attributed to the sugar samples, however, they showed lower activity than honey samples against both bacterial strains. Linden honey was the most effective sample against both bacterial strains compared to black locust and sunflower samples, as shown by Figure 4 in the case of *P. aeruginosa*.

Table 2. Results of the agar well diffusion assay with 25% honey and sugar solutions, compared to antibiotics as positive control. Inhibition of bacterial growth was indicated by the appearance of a zone of inhibition around the well.

Test Solution	Diameter of Inhibition Zones (cm) ¹			
	<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>
black locust 25%	1.7 ± 0.2 ^a	1.6 ± 0.3 ^a	1.2 ± 0.1 ^{ab}	1.6 ± 0.2 ^{ab}
linden 25%	1.8 ± 0.2 ^a	1.8 ± 0.2 ^a	1.4 ± 0.2 ^a	1.7 ± 0.2 ^a
sunflower 25%	1.5 ± 0.1 ^{ab}	1.6 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.2 ^b	1.3 ± 0.2 ^b
sugar solution 25%	1.2 ± 0.2 ^b	1.1 ± 0.1 ^b	0.9 ± 0.2 ^b	0.9 ± 0.3 ^c
antibiotic control	3.5 ± 0.3 ^c	3.5 ± 0.3 ^c	3.4 ± 0.2 ^c	3.6 ± 0.3 ^d

¹ Data are presented as means ± standard deviations, based on 6 parallel measurements. Different superscript letters within the same column indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

Table 3. Results of the agar well diffusion assay with 50% honey and sugar solutions, compared to antibiotics as positive control. Inhibition of bacterial growth was indicated by the appearance of a zone of inhibition around the well.

Test Solution	Diameter of Inhibition Zones (cm) ¹			
	<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>
black locust 50%	1.9 ± 0.3 ^a	1.9 ± 0.2 ^a	1.7 ± 0.3 ^a	1.9 ± 0.2 ^a
linden 50%	2.1 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.3 ^a	2.0 ± 0.1 ^a
sunflower 50%	1.8 ± 0.2 ^a	1.8 ± 0.2 ^a	1.7 ± 0.2 ^a	1.9 ± 0.2 ^a
sugar solution 50%	1.4 ± 0.2 ^b	1.3 ± 0.3 ^b	1.2 ± 0.1 ^b	1.3 ± 0.1 ^b
antibiotic control	3.5 ± 0.3 ^c	3.5 ± 0.3 ^c	3.4 ± 0.2 ^c	3.6 ± 0.3 ^c

¹ Data are presented as means ± standard deviations, based on 6 parallel measurements. Different superscript letters within the same column indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

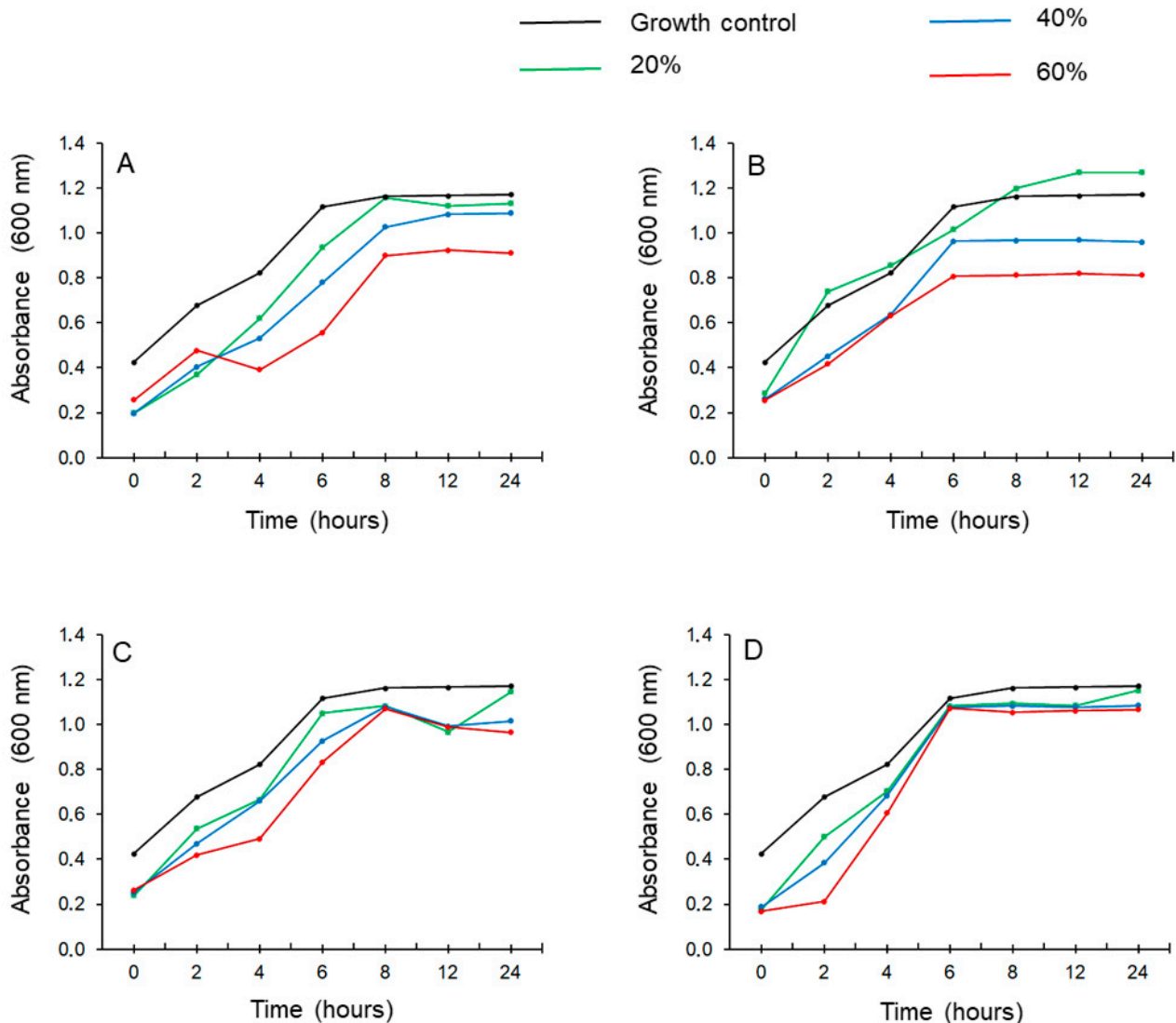


Figure 4. Time-kill assay in case of *P. aeruginosa*: (A) black locust honey samples, (B) linden honey samples, (C) sunflower honey samples, and (D) sugar (glucose:fructose, 1:1) solutions.

3.3.2. Membrane Degradation Study

In order to investigate potential mechanisms of action of honey, we studied the process of bacterial membrane degradation, by measuring the degree of bacteriolysis in *P. aeruginosa* and *S. pneumoniae* cells, treated with a range of concentrations of sugar and honeys. The 20% solutions of sugar and honey did not cause any lysis; however, the 40% and 60% solutions were active. *S. pneumoniae* responded more sensitively to treatment than *P. aeruginosa*. Each

honey sample performed better than the sugar solutions, and from the honey samples, linden honey showed the best activity against both bacteria (Table 4).

Table 4. The effect of sugar and honey solutions at different concentrations on the release of cellular material, absorbing at 260 nm, from *P. aeruginosa* and *S. pneumoniae*. The degree of bacteriolysis was expressed in percentage compared to the control.

Concentrations (%)	Lysis of <i>P. aeruginosa</i> Cells				Lysis of <i>S. pneumoniae</i> Cells			
	Sugar	Black Locust	Linden	Sunflower	Sugar	Black Locust	Linden	Sunflower
	A ₂₆₀ (%)				A ₂₆₀ (%)			
0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
40	22.1	25.8	32.9	27.0	26.4	31.6	39.5	30.9
60	30.2	36.8	40.2	35.9	33.7	38.9	42.5	40.1
90	100	100	100	100	100	100	100	100

In order to investigate the kinetics of the release of cellular material, we performed time course lysis with 60% (*w/w*) honey and sugar solutions, assessing the degree of cell lysis after various time intervals, up to 90 min (Table 5). Contact for 20 min with these antibacterial agents was shown to be enough to induce consistent release of 260-nm absorbing material. Our results showed that sugar solutions had lower activity compared to honey samples. From honey samples, linden honey was the most effective in case of both bacteria. The highest degree of membrane degradation was detected at 90 min, following treatment with linden honey.

Table 5. Kinetics of 260-nm absorbing material release from *P. aeruginosa* and *S. pneumoniae* treated with 60% (*w/w*) sugar and honey solutions.

Time (min)	Lysis of <i>P. aeruginosa</i> Cells				Lysis of <i>S. pneumoniae</i> Cells			
	Sugar	Black Locust	Linden	Sunflower	Sugar	Black Locust	Linden	Sunflower
	A ₂₆₀ (%)				A ₂₆₀ (%)			
0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
20	15.8	22.4	26.1	21.9	17.1	25.6	30.1	24.8
40	23.5	32.5	36.2	33.1	24.1	34.5	38.6	34.7
60	30.2	36.8	40.2	35.9	33.7	38.9	42.5	40.1
90	35.8	45.2	51.6	46.1	37.1	47.2	54.9	50.6

Based on the above experiments we can conclude that black locust, linden, and sunflower honey solutions can induce bacteriolysis, by disrupting the membrane of bacterial cells, not only in case of Gram−, but also in Gram+ bacterial strains. It was also proven that the sugar components of honey can be responsible for some of this activity, nevertheless, honey samples had higher membrane degradation activity compared to sugars alone in each experimental setup.

3.4. Antibiofilm Activity

3.4.1. Broth Microdilution Test

The MIC value of honey samples was determined by microdilution assay. Our samples showed similar activity, their MIC value ranging between 40.5 and 52.5% (Table 6). The most sensitive strains were the *Haemophilus* spp., their growth being inhibited by 40.5% concentration of linden honey. The most resistant pathogen was *P. aeruginosa*, inhibited only by the 50.5% solution of linden honey, and the 52.5% solution of black locust and sunflower honeys. Afterwards, a two-fold dilution of the MIC value (MIC/2 value) was used in the antibiofilm assay.

Table 6. The MIC and MIC/2 value of linden, black locust, and sunflower honey.

Honey Samples		1	2	3	4
MIC value	black locust	42.0%	42.0%	52.5%	44.0%
	linden	40.5%	40.5%	50.5%	42.5%
	sunflower	42.0%	42.0%	52.5%	45.0%
MIC/2 value	black locust	21.0%	21.0%	26.3%	22.0%
	linden	20.3%	20.3%	25.3%	21.3%
	sunflower	21.0%	21.0%	26.3%	22.5%

1: *H. influenzae*, 2: *H. parainfluenzae*, 3: *P. aeruginosa*, 4: *S. pneumoniae*. Percentage values of the table correspond to dilution % of honey causing antimicrobial effect.

3.4.2. Antibiofilm Activity

The potential of each honey sample to inhibit the biofilm forming ability of various bacterial strains was examined with MIC/2 concentration. The anti-biofilm formation activity of the honey samples was calculated and demonstrated in terms of inhibitory rate [53] (Figure 5). Our experiments revealed that each honey sample in this study was able to inhibit the formation of biofilm by each bacterium strain tested. Similar to the results of the TLC–DB assays, linden honey showed the best performance also regarding the inhibition of biofilm formation, with mean inhibitory rates above 80% against each strain (80 to 82%). In contrast, black locust samples exerted the lowest inhibition against respiratory tract biofilms, with inhibitory rates ranging between 69 and 75% (Table S3). It should be highlighted that *S. pneumoniae* was the most sensitive bacterium from the respiratory tract pathogens (Figure 5).

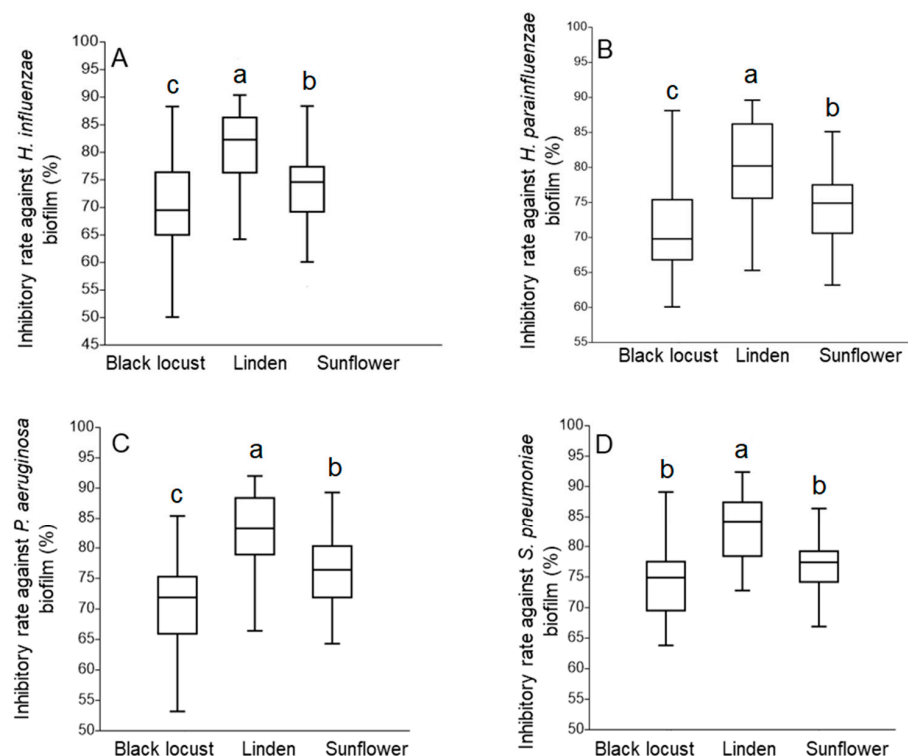


Figure 5. Biofilm inhibition activity of different honey samples against respiratory tract bacteria: (A) *Haemophilus influenzae*, (B) *H. parainfluenzae*, (C) *Pseudomonas aeruginosa*, and (D) *Streptococcus pneumoniae*. The anti-biofilm formation activity was calculated and demonstrated in terms of inhibitory rate according to the equation: Inhibitory rate = $(1 - S/C) \times 100\%$ (C and S were defined as the average absorbance of control and sample groups, respectively). Different lower case letters (a, b, c) above boxes in figures (A–D) indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

4. Discussion

The antibacterial activity of honey is highly complex and still remains not fully recognized. To date, it has been established that the mechanism of antibacterial effect varies, attributed to the fact that honey can have multiple attack points. The high concentration of sugars (80%) can inhibit the growth of bacteria, due to the high osmotic pressure. Moreover, the Gram-positive bacteria (like *S. pneumoniae*) are sensitive to defensin-1, which is a peptide secreted by the honeybee hypopharyngeal glands. One of the most important enzymes involved in honey ripening processes is glucose-oxidase, which can transform glucose to gluconic acid. The side product of this reaction, hydrogen peroxide is a strong antibacterial agent [12,54–58]. Besides, gluconic acid itself causes low pH-values (3.4–6.1) in honey, which prevents the development of most microorganisms. However, the antimicrobial efficiency of each honey type is not only dependent on its glucose oxidase activity, but also on its profile and concentration of honey constituents, particularly phenolic compounds [59–61].

Many bacteria were reported to display a high sensitivity to honey, particularly *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, and *Bacillus subtilis* [12,58,62–64], but there were no previous studies that focused exclusively on the reaction of respiratory tract bacteria following treatment with honey. For this reason, we chose to test the antibacterial potential and anti-biofilm activity of black locust, linden, and sunflower honeys, three well-known honeys that are readily available in Hungary, against the most common respiratory tract bacteria, including *H. influenzae* (DSM 4690), *H. parainfluenzae* (DSM 8978), *P. aeruginosa* (PAO I.), and *S. pneumoniae* (ATCC 20566), using agar well diffusion, time-kill and biofilm inhibitory assays, as well as TLC–DB. Since the latter technique was used only in a few instances with honey, e.g. [52], our research group had to optimize the process for use with honey samples. Optimizing TLC–DB for two *Haemophilus* species involved altering conditions such as incubation time, and the composition of agar for growing the bacterium, the necessity of which was also confirmed in our previous study [65].

Brown and co-workers proved the anti-*Haemophilus* activity of various honey samples (produced by *Apis mellifera*, *Frieseomelitta nigra*, and *Melipona favosa* bees), using agar diffusion assay [66]. Al-Waili's research group examined the antibacterial activity of multifloral honey against *Staphylococcus aureus*, *S. hemolyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *H. influenzae*, and *Proteus* sp., because these are the most common bacteria in wounds. The results of this research group showed that the growth of *S. aureus*, *H. influenzae*, and *P. aeruginosa* was inhibited by the 30–50% multifloral honey samples, which values were comparable to the MIC values obtained in our study, being 40.5–42% and 50.5–52.5% for *H. influenzae* and *P. aeruginosa*, respectively [67]. Newby et al. described that *H. influenzae* biofilm was sensitive to SurgihoneyRO (a licensed, CE-marked sterile honey that has been bioengineered to enable the controlled release of H₂O₂ over a prolonged period), because this honey was able to cause significant reduction in biofilm growth [68]. It has to be highlighted that the bioactivity of honey against *H. parainfluenzae* has not been described yet. Our study was the first to prove that black locust, linden, and sunflower honeys were active against both *H. influenzae* and *H. parainfluenzae*, the highest activity shown by linden honey both in TLC–DB and antibiofilm assays.

Salonen et al. compared the antibacterial effect of sweet clover (*Melilotus officinalis*), buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), multifloral, raspberry (*Rubus idaeus*), and heather (*Calluna vulgaris*) honeys, as well as honeydew against *P. aeruginosa* by microdilution assay. Their experiments revealed that from the five honey samples, buckwheat and raspberry honey inhibited the growth of *P. aeruginosa*, similarly to the honeydew sample [69]. Our findings are in accordance with Awan and co-workers' results regarding the anti-*Pseudomonas* activity of sunflower honey, which was, however, inferior compared to the effect of eucalyptus honey [70]. Manuka (*Leptospermum scoparium*) honey proved to be effective against *P. aeruginosa* both in antibacterial and antibiofilm assays [71–73]. In

addition, clover (*Trifolium* sp.), buckwheat and sidr (*Ziziphus spina-christi*) honey samples were found to be effective against *P. aeruginosa* biofilm [74]. A recent study supported the antibacterial activity of lime (linden), rapeseed (*Brassica napus*), buckwheat, and multifloral honey samples against *P. aeruginosa* [75]. In the latter study, linden honey was one of the most effective honey samples against this bacterium, similarly to our findings. Another recent study revealed that multiple mechanisms of actions are responsible for the antibacterial activity of pine honey against *P. aeruginosa*, exerting an inhibitory effect on quorum sensing, bacterial chemotaxis and biofilm formation [76].

The reaction of *S. pneumoniae* to honey treatment has received very limited attention so far. Some research supported that *Streptococcus* spp. in general were sensitive to treatment with honey [77–79]. From five different types of Finnish honeys, willow herb (*Epilobium angustifolium*) honey was found to be the most effective against *S. pneumoniae*, compared to heather, lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*), buckwheat, and cloudberry (*Rubus chamaemorus*) honey samples. Huttunen highlighted that *S. pneumoniae* was the most sensitive bacterium to the treatment (microbroth dilution assay), in comparison with *S. pyogenes* and *Staphylococcus aureus* [80]. Our study was the first to present data regarding the effect of black locust, linden, and sunflower honeys on the growth and biofilm formation ability of *S. pneumoniae*. Similarly to the Finnish honeys, we found that honey concentrations slightly above 40% were necessary to inhibit the growth of this bacterium, when treated with the three Hungarian honeys involved in our study (MIC values in the range 42.5–45%).

As for the kinetics of the antibacterial activity, time-kill studies revealed that our honey samples started inhibiting bacterial growth between 6 and 8 h of incubation both for *P. aeruginosa* and *S. pneumoniae*, similarly to a recent study performed with Iranian honeys and *P. aeruginosa* [73].

An important component of honey's antimicrobial activity is the disruption of bacterial membrane. Due to membrane damage, honey can induce bacteriolysis, both in the case of Gram-negative and Gram-positive bacteria [49]. In our study, *S. pneumoniae* (Gram+) was more sensitive compared to *P. aeruginosa* (Gram−) both in the time-kill assay and membrane degradation studies, which is likely due to structural differences. Similarly, Otmani et al. [81] found that a Gram+ strain (*Staphylococcus aureus* FRI S6) was inhibited to larger extent by honey samples, compared to a Gram- strain (*Salmonella typhi* ATCC 14028).

5. Conclusions

This study highlighted the effectiveness of commonly available Hungarian honey types against the essential respiratory tract bacteria. To the best of our knowledge, our research group was the first to demonstrate the bioactivity of honey against *H. parainfluenzae*, as well as the inhibitory effect of black locust, linden, and sunflower honeys on *S. pneumoniae*; thus, the novelty of our study is indisputable. Our findings support the view that honeys of various botanical origin can provide an alternative means to treat respiratory tract infections, due to their potential to decrease the growth and biofilm production and disrupt the membrane of respiratory tract bacteria. At the same time, our study revealed that even in the case of honeys from the same geographical region, the botanical source of the honey can have a high impact on its biological activity. From the investigated Hungarian honey types, linden honey particularly deserves more attention as a powerful natural antibacterial agent.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods10071632/s1>, Table S1: Statistical data of thin layer chromatography-direct bioautography (TLC-DB) assays. Table S2: Statistical data of agar well diffusion assays. Table S3: Statistical data of antibiofilm assays.

Author Contributions: Conceptualization, Á.F., B.K., and M.K.; methodology, V.L.B., E.K., and L.N.-R.; software, R.F.; formal analysis, V.L.B., R.F., and Á.F.; investigation, V.L.B., L.N.-R., E.K., and R.F.; resources, Á.F., M.K., and B.K.; data curation, L.N.-R., V.L.B., and R.F.; writing—original draft preparation, V.L.B. and L.N.-R.; writing—review and editing, Á.F., B.K., and M.K.; visualization, R.F.;

supervision, Á.F. and M.K.; project administration, Á.F.; funding acquisition, Á.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from the National Research, Development and Innovation Office; NKFIH, K 132044; by Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences BO/00701/19/4; and by the ÚNKP-20-5 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development, and Innovation Fund.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and Supplementary Tables S1–S3.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. EUR-Lex 32001L0110 EN EUR-Lex. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32001L0110> (accessed on 6 July 2021).
2. Da Silva, P.M.; Gauche, C.; Gonzaga, L.V.; Costa, A.C.O.; Fett, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* **2016**, *196*, 309–323. [[CrossRef](#)]
3. Brudzynski, K. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Can. J. Microbiol.* **2006**, *52*, 1228–1237. [[CrossRef](#)]
4. Jaganathan, S.K.; Mandal, S.M.; Jana, S.K.; Das, S.; Mandal, M. Studies on the Phenolic Profiling, Anti-Oxidant and Cytotoxic Activity of Indian Honey: In Vitro Evaluation. *Nat. Prod. Res.* **2010**, *24*, 1295–1306. [[CrossRef](#)]
5. Bodó, A.; Radványi, L.; Hoszegi, T.K.; Csepregi, R.; Nagy, D.U.; Farkas, Á.; Kocsis, M. Melissopalynology, Antioxidant Activity and Multielement Analysis of Two Types of Early Spring Honeys from Hungary. *Food Biosci.* **2020**, *35*, 100587. [[CrossRef](#)]
6. Tonks, A.; Cooper, R.; Jones, K.; Blair, S.; Parton, J. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine* **2003**, *21*, 242–247. [[CrossRef](#)]
7. Cianciosi, D.; Forbes-Hernández, T.Y.; Afrin, S.; Gasparrini, M.; Reboledo-Rodríguez, P.; Manna, P.P.; Zhang, J.; Lamas, L.B.; Flórez, S.M.; Toyos, P.A.; et al. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules* **2018**, *23*, 2322. [[CrossRef](#)]
8. Abbas, A.S.; Ghozy, S.; Minh, L.H.N.; Hashan, M.R.; Soliman, A.L.; Van, N.T.; Hirayama, K.; Huy, N.T. Honey in Bronchial Asthma: From Folk Tales to Scientific Facts. *J. Med. Food* **2019**, *22*, 543–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ali, A.; Yangchan, J.; Ahmad, A.; Kumar, A.; Mishra, R.K.; Vyawahare, A.; Akhter, R.; Ashraf, G.M.; Shakil, S.; Khan, R. A Mechanistic Perspective on Chemopreventive and Therapeutic Potential of Phytochemicals in Honey. In *Therapeutic Applications of Honey and Its Phytochemicals*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020; pp. 113–140.
10. Al-Hatamleh, M.A.I.; Hatmal, M.M.; Sattar, K.; Ahmad, S.; Mustafa, M.Z.; Bittencourt, M.D.C.; Mohamud, R. Antiviral and Immunomodulatory Effects of Phytochemicals from Honey against COVID-19: Potential Mechanisms of Action and Future Directions. *Molecules* **2020**, *25*, 5017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Al-Hatamleh, M.A.; Boer, J.C.; Wilson, K.L.; Plebanski, M.; Mohamud, R.; Mustafa, M.Z. Antioxidant-Based Medicinal Properties of Stingless Bee Products: Recent Progress and Future Directions. *Biomolecules* **2020**, *10*, 923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Szweda, P. Antimicrobial Activity of Honey. *Honey Anal.* **2017**. [[CrossRef](#)]
13. Jenkins, R.; Burton, N.; Cooper, R. Proteomic and genomic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) exposed to manuka honey in vitro demonstrated down-regulation of virulence markers. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 603–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lusby, P.E.; Coombes, A.L.; Wilkinson, J.M. Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bacteria. *Arch. Med. Res.* **2005**, *36*, 464–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Manyi-Loh, C.E.; Clarke, A.M.; Munzhelele, T.; Green, E.; Mkwetshana, N.F.; Ndip, R.N. Selected South African Honeys and Their Extracts Possess In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity. *Arch. Med. Res.* **2010**, *41*, 324–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Irish, J.; Carter, D.A.; Shokohi, T.; Blair, S.E. Honey Has an Antifungal Effect against *Candida* Species. *Med. Mycol.* **2006**, *44*, 289–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Stewart, P.S.; Costerton, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **2001**, *358*, 135–138. [[CrossRef](#)]
18. Hall-Stoodley, L.; Stoodley, P.; Kathju, S.; Høiby, N.; Moser, C.; William Costerton, J.; Moter, A.; Bjarnsholt, T. Towards Diagnostic Guidelines for Biofilm-Associated Infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, *65*, 127–145.
19. Høiby, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS* **2017**, *125*, 272–275. [[CrossRef](#)]
20. Vestby, L.K.; Grønseth, T.; Simm, R.; Nesse, L.L. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics* **2020**, *9*, 59. [[CrossRef](#)]
21. Smith, K.; Gemmell, C.G.; Hunter, I.S. The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *61*, 78–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rodis, N.; Tspadikou, V.K.; Potsios, C.; Xaplanteri, P. Resistance Mechanisms in Bacterial Biofilm Formations: A Review. *J. Emerg. Intern. Med.* **2020**, *4*, 30.

23. Otoole, A.G.; Kaplan, H.B.; Kolter, R. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, *54*, 49–79. [[CrossRef](#)]
24. Bjarneholt, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS* **2013**, *121*, 1–58. [[CrossRef](#)]
25. Dickson, R.P.; Erb-Downward, J.R.; Martinez, F.J.; Huffnagle, G.B. The microbiome and the respiratory Tract. *Annu. Rev. Physiol.* **2016**, *78*, 481–504. [[CrossRef](#)]
26. Rytter, D.; Rask, C.U.; Vestergaard, C.H.; Andersen, A.-M.N.; Bech, B.H. Non-specific Health complaints and self-rated health in pre-adolescents; impact on primary health care use. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–9. [[CrossRef](#)]
27. Chambers, S.T.; Murdoch, D.; Morris, A.; Holland, D.; Pappas, P.; Almela, M.; Fernández-Hidalgo, N.; Almirante, B.; Bouza, E.; Forno, D.; et al. HACEK Infective Endocarditis: Characteristics and Outcomes from a Large, Multi-National Cohort. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63181. [[CrossRef](#)]
28. Feder, H.M., Jr.; Roberts, J.C.; Salazar, J.C.; Leopold, H.B.; Toro-Salazar, O. HACEK Endocarditis in Infants and Children: Two Cases and a Literature Review. *Pediatric Infect. Dis. J.* **2003**, *22*, 557–562. [[CrossRef](#)]
29. Mohd-Zain, Z.; Kamsani, N.H.; Ismail, I.S.; Ahmad, N.; Mohd-Zain, Z.; Kamsani, N.H.; Ismail, I.S.; Ahmad, N. Antibiotic susceptibility profile of Haemophilus influenzae and transfer of co-trimoxazole resistance determinants. *Trop. Biomed.* **2012**, *29*, 372–380.
30. Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **1999**, *284*, 1318–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Mah, T.-F.; Pitts, B.; Pellock, B.; Walker, G.C.; Stewart, P.S.; O'Toole, G.A. A genetic basis for Pseudomonas aeruginosa biofilm antibiotic resistance. *Nature* **2003**, *426*, 306–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Vakulenko, S.B.; Mobashery, S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 430–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chegini, Z.; Khoshbayan, A.; Moghadam, M.T.; Farahani, I.; Jazireian, P.; Shariati, A. Bacteriophage Therapy against Pseudomonas Aeruginosa Biofilms: A Review. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2020**, *19*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kadioglu, A.; Weiser, J.N.; Paton, J.C.; Andrew, P.W. The Role of Streptococcus Pneumoniae Virulence Factors in Host Respiratory Colonization and Disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 288–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Greenwood, D.; Slack, R.C.; Barer, M.R.; Irving, W.L. *Medical Microbiology E-Book: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control. With STUDENT CONSULT Online Access*; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands, 2012.
36. Suaya, J.A.; Fletcher, M.A.; Georgalis, L.; Arguedas, A.; McLaughlin, J.M.; Ferreira, G.; Theilacker, C.; Gessner, B.D.; Verstraeten, T. Identification of Streptococcus Pneumoniae in Hospital-Acquired Pneumonia in Adults: A Systematic Review. *J. Hosp. Infect.* **2020**, *108*, 146–157. [[CrossRef](#)]
37. Sanchez, C.J.; Shivshankar, P.; Stol, K.; Trakhtenbroit, S.; Sullam, P.M.; Sauer, K.; Hermans, P.W.; Orihuela, C.J. The Pneumococcal Serine-Rich Repeat Protein Is an Intra-Species Bacterial Adhesin That Promotes Bacterial Aggregation in Vivo and in Biofilms. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1001044. [[CrossRef](#)]
38. Domenech, M.; García, E.; Moscoso, M. Biofilm formation in Streptococcus pneumoniae. *Microb. Biotechnol.* **2012**, *5*, 455–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Juan-Borrás, M.; Doménech, E.; Hellebrandova, M.; Escriche, I. Effect of country origin on physicochemical, sugar and volatile composition of acacia, sunflower and tilia honeys. *Food Res. Int.* **2014**, *60*, 86–94. [[CrossRef](#)]
40. Oroian, M.; Ropciuc, S. Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds. *Comput. Electron. Agric.* **2017**, *138*, 148–156. [[CrossRef](#)]
41. Oroian, M.; Ropciuc, S. Romanian Honey Authentication Using Voltammetric Electronic Tongue. Correlation of Voltam-metric Data with Physico-Chemical Parameters and Phenolic Compounds. *Comput. Electron. Agric.* **2019**, *157*, 371–379. [[CrossRef](#)]
42. Rusko, J.; Vainovska, P.; Vilne, B.; Bartkevics, V. Phenolic Profiles of Raw Mono-and Polyfloral Honeys from Latvia. *J. Food Compos. Anal.* **2021**, *98*, 103813. [[CrossRef](#)]
43. Farkas, Á.; Zájác, E. Nectar Production for the Hungarian Honey Industry. *Eur. J. Plant Sci. Biotechnol.* **2007**, *1*, 125–151.
44. Sajtos, Z.; Herman, P.; Harangi, S.; Baranyai, E. Elemental analysis of Hungarian honey samples and bee products by MP-AES method. *Microchem. J.* **2019**, *149*, 103968. [[CrossRef](#)]
45. Czipa, N.; Andrási, D.; Kovács, B. Determination of essential and toxic elements in Hungarian honeys. *Food Chem.* **2015**, *175*, 536–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bodó, A.; Radványi, L.; Kőszegi, T.; Csepregi, R.; Nagy, D.; Farkas, Á.; Kocsis, M. Quality Evaluation of Light- and Dark-Colored Hungarian Honeys, Focusing on Botanical Origin, Antioxidant Capacity and Mineral Content. *Molecules* **2021**, *26*, 2825. [[CrossRef](#)]
47. Von Der Ohe, W.; Oddo, L.P.; Piana, M.L.; Morlot, M.; Martin, P. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* **2004**, *35*, S18–S25. [[CrossRef](#)]
48. Carson, C.F.; Mee, B.J.; Riley, T.V. Mechanism of Action of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil on Staphylococcus aureus Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1914–1920. [[CrossRef](#)]
49. Bennis, S.; Chami, F.; Chami, N.; Bouchikhi, T.; Remmal, A. Surface alteration of Saccharomyces cerevisiae induced by thymol and eugenol. *Lett. Appl. Microbiol.* **2004**, *38*, 454–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

50. Peeters, E.; Nelis, H.J.; Coenye, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods* **2008**, *72*, 157–165. [[CrossRef](#)]
51. Hammer, Ø.; Harper, D.A.; Ryan, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* **2001**, *4*, 9.
52. Guzelmeric, E.; Ciftci, I.; Yuksel, P.I.; Yesilada, E. Importance of Chromatographic and Spectrophotometric Methods in Determining Authenticity, Classification and Bioactivity of Honey. *LWT* **2020**, *132*, 109921. [[CrossRef](#)]
53. Sun, Y.; Chen, S.; Zhang, C.; Liu, Y.; Ma, L.; Zhang, X. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of lemon essential oil on the acid tolerance and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **2018**, *87*, 235–241. [[CrossRef](#)]
54. Mandal, M.; Mandal, S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2011**, *1*, 154–160. [[CrossRef](#)]
55. Bizerra, F.C.; Da Silva, P.I.; Hayashi, M.A.F. Exploring the antibacterial properties of honey and its potential. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 398. [[CrossRef](#)]
56. Zainol, M.I.; Yusoff, K.M.; Yusof, M.Y.M. Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 1–10. [[CrossRef](#)]
57. Israili, Z.H. Antimicrobial Properties of Honey. *Am. J. Ther.* **2014**, *21*, 304–323. [[CrossRef](#)]
58. Al-Waili, N.S.; Salom, K.; Butler, G.; Al Ghamdi, A.A. Honey and Microbial Infections: A Review Supporting the Use of Honey for Microbial Control. *J. Med. Food* **2011**, *14*, 1079–1096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Anand, S.; Pang, E.; Livanos, G.; Mantri, N. Characterization of Physico-Chemical Properties and Antioxidant Capacities of Bioactive Honey Produced from Australian Grown *Agastache rugosa* and its Correlation with Colour and Poly-Phenol Content. *Molecules* **2018**, *23*, 108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Cebrero, G.; Sanhueza, O.; Pezoa, M.; Báez, M.E.; Martínez, J.; Báez, M.; Fuentes, E. Relationship among the minor constituents, antibacterial activity and geographical origin of honey: A multifactor perspective. *Food Chem.* **2020**, *315*, 126296. [[CrossRef](#)]
61. Silva, B.; Biluca, F.C.; Gonzaga, L.V.; Fett, R.; Dalmarco, E.M.; Caon, T.; Costa, A.C.O. In vitro anti-inflammatory properties of honey flavonoids: A review. *Food Res. Int.* **2021**, *141*, 110086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Albaridi, N.A. Antibacterial Potency of Honey. *Int. J. Microbiol.* **2019**, *2019*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Mama, M.; Teshome, T.; Detamo, J. Antibacterial Activity of Honey against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Laboratory-Based Experimental Study. *Int. J. Microbiol.* **2019**, *2019*, 1–9. [[CrossRef](#)]
64. Yilmaz, A.C.; Aygin, D. Honey Dressing in Wound Treatment: A Systematic Review. *Complement. Ther. Med.* **2020**, *51*, 102388. [[CrossRef](#)]
65. Balázs, V.L.; Horváth, B.; Kerekes, E.; Ács, K.; Kocsis, B.; Varga, A.; Böszörményi, A.; Nagy, D.U.; Krisch, J.; Széchenyi, A.; et al. Anti-Haemophilus Activity of Selected Essential Oils Detected by TLC-Direct Bioautography and Biofilm Inhibition. *Molecules* **2019**, *24*, 3301. [[CrossRef](#)]
66. Brown, E.; O'Brien, M.; Georges, K.; Suepaul, S. Physical characteristics and antimicrobial properties of *Apis mellifera*, *Frieseomelitta nigra* and *Melipona favosa* bee honeys from apiaries in Trinidad and Tobago. *BMC Complement. Med. Ther.* **2020**, *20*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Al-Waili, N.S. Investigating the Antimicrobial Activity of Natural Honey and Its Effects on the Pathogenic Bacterial Infections of Surgical Wounds and Conjunctiva. *J. Med. Food* **2004**, *7*, 210–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Newby, R.S.; Dryden, M.; Allan, R.N.; Salib, R.J. Antimicrobial activity of a novel bioengineered honey against non-typeable *Haemophilus influenzae* biofilms: An in vitro study. *J. Clin. Pathol.* **2018**, *71*, 554–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Salonen, A.; Virjamo, V.; Tammela, P.; Fauch, L.; Julkunen-Tiitto, R. Screening bioactivity and bioactive constituents of Nordic unifloral honeys. *Food Chem.* **2017**, *237*, 214–224. [[CrossRef](#)]
70. Awan, U.A.; Ali, S.; Andleeb, S. A Comparative Study of Antibacterial and Antioxidant Activities of Wild Honey (Sunflower and Eucalyptus) and Commercial Honey. *J. Pharm. Sci. Pharmacol.* **2014**, *1*, 211–218. [[CrossRef](#)]
71. Abeshu, M.; Geleta, B. Medicinal Uses of Honey. *Biol. Med.* **2016**, *8*, 279. [[CrossRef](#)]
72. Seraglio, S.K.T.; da Silva, B.; Bergamo, G.; Brugnerotto, P.; Gonzaga, L.V.; Fett, R.; Costa, A.C.O. An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Res. Int.* **2019**, *119*, 44–66. [[CrossRef](#)]
73. Moghadam, M.N.; Khaledi, E.M. Antibacterial activity and mechanism of action of some Iranian honeys compared to manuka honey against multidrug-resistant respiratory and urinary infections. *Food Biosci.* **2021**, *41*, 101003. [[CrossRef](#)]
74. Alandejani, T.; Marsan, J.; Ferris, W.; Slinger, R.; Chan, F. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryngol. Neck Surg.* **2009**, *141*, 114–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Majkut, M.; Kwiecińska-Piróg, J.; Wszelaczyńska, E.; Pobereźny, J.; Gospodarek-Komkowska, E.; Wojtacki, K.; Barczak, T. Antimicrobial activity of heat-treated Polish honeys. *Food Chem.* **2021**, *343*, 128561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Kafantaris, I.; Tsadila, C.; Nikolaidis, M.; Tsavea, E.; Dimitriou, T.G.; Iliopoulos, I.; Amoutzias, G.D.; Mossialos, D. Transcriptomic Analysis of *Pseudomonas Aeruginosa* Response to Pine Honey via RNA Sequencing Indicates Multiple Mechanisms of Antibacterial Activity. *Foods* **2021**, *10*, 936. [[CrossRef](#)]
77. Moussa, A.; Noureddine, D.; Mohamed, H.S.; Abdelmelek, M.; Saad, A. Antibacterial activity of various honey types of Algeria against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2012**, *5*, 773–776. [[CrossRef](#)]
78. Patel, H.R.; Krishnan, C.A.; Thanveer, K. Antimicrobial effect of honey on *Streptococcus mutans*—An in vitro study. *Int. J. Dent. Sci. Res.* **2013**, *1*, 46–49. [[CrossRef](#)]

79. Ramsay, E.I.; Rao, S.; Madathil, L.; Hegde, S.K.; Baliga-Rao, M.P.; George, T.; Baliga, M.S. Honey in oral health and care: A mini review. *J. Oral Biosci.* **2019**, *61*, 32–36. [[CrossRef](#)]
80. Huttunen, S.; Riihinen, K.; Kauhanen, J.; Tikkanen-Kaukanen, C. Antimicrobial activity of different Finnish monofloral honeys against human pathogenic bacteria. *APMIS* **2013**, *121*, 827–834. [[CrossRef](#)]
81. Otmani, A.; Amessis-Ouchemoukh, N.; Birinci, C.; Yahiaoui, S.; Kolayli, S.; Rodríguez-Flores, M.S.; Escuredo, O.; Seijo, M.C.; Ouchemoukh, S. Phenolic compounds and antioxidant and antibacterial activities of Algerian honeys. *Food Biosci.* **2021**, *42*, 101070. [[CrossRef](#)]