

Vissza a természethez! Hatékony lehet a méz és az illóolaj a biofilmképző baktériumokkal szemben?

ÁNGYÁN VIRÁG DIÁNA

Ángyán Virág¹⁺, Farkas Ágnes^{1*}, Kocsis Béla², Nagy-Radványi Lilla^{1*}

¹Pécsi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Farmakognózi Intézet

²Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézet

+előadó

*témavezetők

Bevezetés

Az antibiotikumok tartós helytelen használata vagy túlhasználata miatt megjelenő rezisztens baktériumtörzsek egyre komolyabb problémát jelentenek világszerte. Az akut középfülgyulladás a leggyakrabban előforduló gyermekkori betegség és a leggyakoribb ok, amiért ebben a korcsoportban antibiotikumot írnak fel¹. Hároméves korig a gyermekek 50-85%-ánál legalább egy alkalommal előforduló betegség². A fertőzés hátterében gyakran biofilmképző baktériumok állnak, melyek megnehezíthetik a kezelést. A biofilmek sűrű polimer mátrixa az antibiotikummal szemben védelmet nyújt a baktérium számára, ezáltal az emberi szervezet különböző mikrobiális fertőzéseinek kialakításában nagy szerepet játszanak³. A terápia során sok esetben csak a választott antibiotikum szubklinikai koncentrációja diffundál a biofilmbe, amely a baktériumsejt elpusztításához nem elég, azonban fokozhatja az antibiotikum-rezisztencia kialakulását⁴.

A méz az egyik legrégebbi természetes eredetű gyógyhatású anyag, amelyet gyulladáscsökkentő, antibakteriális és antioxidáns tulajdonságai révén mikrobiális fertőzések kezelésére alkalmaznak⁵. A méz összetétele nagyon változatos, amely függ a botanikai és földrajzi eredettől, a terület éghajlati viszonyaitól és a méhészeti technológiától⁶. Legnagyobb meny-

1 SCOTT- CLARK- JULIEN- ISLAM- ROOS- GRIMWOOD- LITTLE- DEL-MAR 2019, CD012941

2 GADDEY-WRIGHT-NELSON 2019, 350-356.

3 ZHANG-BERA-WANG-WANG-GUO-SHI-CUN-MOSER-HØIBY-YANG 2022, 121507.

4 RODIS-TSAPADIKOU-POTSIOS-XAPLANTERI 2020, 30.

5 BALÁZS-NAGY-RADVÁNYI-FILEP-KEREKES-KOCSIS-KOCSIS-FARKAS 2021, 1632.

6 ESCUREDO-SEIJO 2019, 577.

nyiségben szénhidrátokat tartalmaz, főként glükózt és fruktózt. A növények hatóanyagai és a méhek hormonjai mellett glükóz-oxidáz enzim is található benne, amelynek feladata a glükóz glükonsav- δ -laktonná alakítása. A folyamat melléktermékeként keletkező hidrogén-peroxid nagyban hozzájárul a baktericid és bakteriosztatikus hatáshoz^{7 8}. A mézek biológiai aktivitásáért leginkább magas polifenol tartalmuk felelős, amely összefüggésbe hozható mind antibakteriális, mind antioxidánskapacitásukkal⁹. Az enyhén savas pH szintén hozzájárul a méz antibakteriális aktivitásához, emellett elősegíti a szövetek regenerálódását.

A világos vagy középbarna színű, jellegzetes, enyhén kesernyész íű hársmez lassan kristályosodik, akár több évig megőrzi folyékony állagát. Kiemelkedő antibakteriális hatását több kutatócsoport is igazolta, így alternatív megoldást nyújthat rezisztens fertőzések kezelésében^{10 11}.

Az illóolaj növényi részekből előállított sokkomponensű, jellegzetes illatú és íű, szobahőmérsékleten maradék nélkül elpárolgó folyadék. Már az ősidők óta használják betegségek kezelésére a biológiai aktivitásuk széles skálája miatt¹². Napjainkban az élelmiszer-, kozmetikai- és gyógyszeriparban a legelterjedtebb a használata. A kivont illóolajok összetétele és mennyisége egy adott növényfajon belül is változatos, hiszen a földrajzi eredet, az illóolaj kinyerésének módja és az alkalmazott analízis körülményei is a befolyásoló tényezők közé tartoznak. Az illóolajok összetételét főként különböző molekulaszervezetű szénhidrogének és oxigénszármazékok alkotják, mint például a terpenoidok és fenilpropanoidok. Számos illóolaj áthatol a sejtmembránokon, és ennek köszönhetően képesek befolyásolni a molekuláris célpontok működését. Magas biológiai aktivitásukat széles körben kutadják, és bizonyították antioxidáns, antimikrobiális, gyulladáscsökkentő, gombaellenes és tumorelles hatásukat¹³.

A levendula illóolaj (*Lavandula aetheroleum*) aromaterápiában történő használata rendkívül elterjedt, de számos terápiás és farmakológiai tulajdonsággal rendelkezik. Tradicionális javallatai közé tartozik az álmatlanság, stressz tüneteinek enyhítése, görcsoldás, és emésztés elősegítése. Gyulladáscsökkentő, nyugtató és antiszeptikus hatásai miatt alkalmazható

7 SAK-BOSNAR-SAKAČ 2012, 827–831.

8 KUREK-GÓRECKA-GÓRECKI-RZEPECKA-STOJKO-BALWIERZ-STOJKO 2020, 556.

9 KUŠ-CONGIU-TEPER-SROKA-JERKOVIĆ-TUBEROSO 2014, 124–130.

10 SAKAČ-JOVANOV-MARIĆ-ČETOJEVIĆ-SIMIN-NOVAKOVIĆ-PLAVŠIĆ-ŠKROBOT-KOVAČ 2022, 1120.

11 BALÁZS-NAGY-RADVÁNYI-BENCSIK-KEREKES-KOLOH-SZABÓ-KOCSIS-KOCSIS-FARKAS 2023, 509.

12 LIZARRAGA-VALDERRAMA 2021, 657–679.

13 SHARIFI-RAD-SUREDA-TENORE-DAGLIA-SHARIFI-RAD-VALUSSI-TUNDIS-SHARIFI-RAD-LOIZZO-ADEMILUYI-SHARIFI-RAD-AYATOLLAHI-IRITI 2017, 70.

a dermatológiában pikkelysömör és ekcéma kezelésére. Fő alkotóelemei közé sorolható a linalool, linalil-acetát, 1,8-cineol, terpinen-4-ol, β -ocimén és kámfor¹⁴.

Céljaink között szerepelt a vizsgálatba bevont hazai hársméz botanikai eredetének meghatározása organoleptikus, fizikokémiai és mikroszkópos pollenanalízis vizsgálatokkal, illetve a levendula illóolaj és hársméz antimikrobás hatásának tesztelése széles körben elfogadott, *in vitro* mikrobiológiai módszerekkel. Kutatásunk során arra szerettünk volna választ kapni, hogy az említett két, antibakteriális aktivitással rendelkező anyag együttesen mennyire hatásos a vizsgálatokba bevont, középfülgyulladás okozó baktériumok (*Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae* és *Moraxella catarrhalis*) biofilmképzésének, illetve szaporodásának gátlásában.

Legjobb tudásunk szerint kevés adat áll rendelkezésre az ehhez hasonló kombinációk antibakteriális aktivitásának teszteléséről.

Anyag és módszer

Vizsgálatba vont illóolaj és méz

Előzetes kísérleteink során a Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar Farmakognóziái Intézetében működő kutatócsoportok bizonyították a hársméz és levendula illóolaj erős antibakteriális aktivitását¹⁵¹⁶. Az állatkísérletes vizsgálatok rámutattak a levendula illóolaj gyulladáscsökkentő hatására, hiszen ekcémás területen alkalmazva jelentős javulás következett be. A pozitív kimenetelű vizsgálatosorozatok miatt esett a választásunk a hársméz és a levendula illóolaj kombinációjának tanulmányozására.

Vizsgálatba vont baktériumtörzsek

A *M. catarrhalis* (LMM4024) az egyik leggyakrabban előforduló biofilmképző baktérium az akut-középfülgyulladásos megbetegedés esetén. Tenyésztése esetén Brain Heart Infusion (BHI) folyékony táptalajt alkalmaztunk. A *Haemophilus* nemzetség két tagja, a *H. influenzae* (DSM 4690) és *H. parainfluenzae* (DSM 8978) szintén gyakori kolonizálói a középfülnek, lokális és szisztémás fertőzéseket kiváltva komoly veszélyt jelentenek az egész emberi szervezetre nézve. A két törzs tenyésztése során speciális NAD tartalmú oldatot is használtunk a BHI táptalaj mellett.

14 KOULIVAND–GHADIRI–GORJI 2013, 681304.

15 BALÁZS–NAGY–RADVÁNYI–FILEP–KEREKES–KOC SIS–KOC SIS–FARKAS 2021, 1632.

16 BALÁZS–NAGY–RADVÁNYI–BENC SIK–KEREKES–KOLOH–SZABÓ–KOC SIS–KOC SIS–FARKAS 2023, 509.

A vizsgált fajtaméz botanikai eredete

A fajtamézek valódi típusának meghatározásához kulcsfontosságú a pontos botanikai eredetük tisztázása. A mézmintánk hársvirág eredetének igazolásához organoleptikus, fizikokémiai (pH, elektromos vezetőképesség és színintenzitás) és mikroszkópos pollenanalízis vizsgálatokat alkalmaztunk¹⁷. Mézmintánként legalább 500 pollent számoltunk le, jelezve, hogy hány pollenszem tartozik az adott növényfajhoz. A pollentípus relatív gyakoriságát az összes pollenszem százalékos arányában adtuk meg.

Az illóolaj minta összetételének analízise

A levendulaolaj kémiai összetételét gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) mérésekkel elemeztük. Az analízist a Messinai Egyetem (Olaszország) munkatársai végezték el számunkra a megadott paraméterek alapján. (1.táblázat)

A minimális gátló koncentráció meghatározása

A minimális gátló koncentrációk (MIC) meghatározásához mikrodilúciós módszert alkalmaztunk a mikrobiológiai laborokban elfogadott CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) irányelveknek megfelelően^{18, 19}. Az eljárást 96 cellás mikrotiter lemezekon végeztük és az illóolaj emulzifikálására Tween 40 tartalmú tápoldatot használtunk. Negatív kontrollként méz/illóolaj mintát tartalmazó tápoldatot, míg pozitív kontrollként kezeletlen baktériumsuszpenziót (10^5 CFU/ml) alkalmaztunk. A legpontosabb eredmények érdekében vizsgálatainkat 6 ismétléssel végeztük és mindhárom baktérium esetén azt a legkisebb koncentrációt tekintettük MIC értéknek, amely még megakadályozza az adott mikroorganizmus szaporodását.

A biofilmképződés gátlásának vizsgálata

Mikrobiológiai vizsgálataink során a MIC meghatározása után biofilmképződést gátló vizsgálatokat kivitelezünk hársmézzel, levendula illóolajjal és kombinációjukkal. Az eljárás során MIC/4 koncentrációkat alkalmaztunk. Az antibiofilm hatás feltárásához a biofilmeket 96 cellás mikrotiter lemezekon alakítottuk ki és az illóolaj emulzifikálására ebben az esetben is Tween 40 tartalmú tápoldatot használtunk. Negatív kontrollként mintát tartalmazó tápoldatot, pozitív kontrollként baktériumsuszpenziót (10^8 CFU/ml)

17 VON-DER-OHE-PERSANO-ODDO-PIANA-MORLOT-MARTIN 2004, S18-S25.

18 KEREKES-DEÁK-TAKÓ-TSERENNADMID-PETKOVITS-VÁGVÖLGYI-KRISCH 2013, 933-942.

19 CLSI 2012, METHODS FOR DILUTION ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTS FOR BACTERIA THAT GROW AEROBICALLY

alkalmaztunk. Az eljárás során használt kristályibolya festék kapcsolódik a biofilmek extracelluláris mátrixának negatív töltésű molekuláihoz, ezáltal lehetővé teszi a biofilmek teljes biomassájának mennyiségi meghatározását. Mikrotiterlap-olvasó segítségével 595 nm-en mértük az abszorbanciát²⁰.

Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat

A szerkezeti változások szemléltetésére az arany membránnal bevont biofilmekről pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételeket készítettünk²¹. A biofilmek kialakítása zsírtalanított és sterilizált fedőlemezeken történt, kontrollként pedig kezeletlen fedőlemezeket alkalmaztunk. A minták víztelenítéséhez alkoholsorozatot használtunk.

Eredmények

A vizsgált fajtaméz botanikai eredete

A hársméz pollenje sok esetben extrém módon alulreprezentált, azaz viszonylag kevés hárspollen jelenléte szükséges ahhoz, hogy a pollentartalom alapján hárs fajtamézként minősítsünk egy mézet. Több száz európai mézminta pollenelemzése alapján a hárs mézben átlagosan 23%-ot tesz ki a különböző hárs fajok (*Tilia* spp., *1b. kép*) virágpóra²². A Magyar Élelmi-szerkönyv a hársméz esetén legalább 30%-os hárs pollen értéket határoz meg²³. A vizsgált hárs mézben a hárs pollen volt a domináns pollentípus a méz fajtájának megfelelően. A hárs méz fizikokémiai paraméterei (színintenzitás, elektromos vezetőképesség, pH) és a mikroszkópos pollenanalízis eredményei alapján hárs fajtaméznek tekinthető (*2. és 3. táblázat*).

Az illóolaj minta összetételének analízise

A GC-MS vizsgálatok alapján a levendulaolaj főkomponensei a linalool és a linalil-acetát voltak, összhangban a szakirodalmi adatokkal. Az illóolaj komponenseinek gázkromatográffal mért százalékos arányait kördiagram foglalja össze, amelyben a 3% feletti összetevőket tüntettük fel (*2.kép*).

20 PEETERS-NELIS-COENYE 2008, 157–165.

21 KEREKES-DEÁK-TAKÓ-TSERENNADMID-PETKOVITS-VÁGVÖLGYI-KRISCH 2013, 933–942.

22 ODDO-PIRO-FLAMINI-LHERITIER-RUSSMANN-VON DER OHE-GOTSIUO-KARABOURNIOTI-KEFALAS-PASSALOGLOU-KATRALI-THRASYVOULOU-MARCAZZAN-PIANA-PIAZZA-BENTABOL-BOGDANOW 2004, S38-S81

23 CODEX ALIMENTARIUS. REVISED CODEX STANDARD FOR HONEY. 12–1981.

A minimális gátló koncentráció meghatározása

A minimális gátló koncentráció értékeit külön a mézre és külön az illóolajra is meghatároztuk (4. és 5. táblázat). A további mikrobiológiai vizsgálatok során MIC/4 koncentrációkkal dolgoztunk. A három baktériumtörzs közül mind a méz, mind az illóolaj esetén a *M. catarrhalis* reagált érzékenyebben a kezelésre, míg a *Haemophilus* törzsek ellenállóbbnak bizonyultak.

A biofilmképződés gátlásának vizsgálata

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a hársmézet és a levendula illóolajat külön-külön MIC/4 koncentrációban alkalmazva az illóolaj nagyobb mértékben csökkentette a biofilm képződését (32-71%), mint a méz (29-46%). A MIC/4 koncentrációban alkalmazott méz-illóolaj kombináció biofilmgátló hatása jelentős volt 80-84% gátlási aránnyal az egyes baktériumtörzsekkel szemben (3.kép). Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a vizsgálatba vont két természetes eredetű anyag kombinálásával magasabb hatékonyság érhető el, mint a mézet és illóolajat külön-külön alkalmazva.

Pasztázó elektronmikroszkópos vizsgálat

A SEM felvételekkel sikerült szemléltetni az illóolaj és méz kombinációnak a biofilmre kifejtett hatását. A kezeltlen mintákról (4. kép) készült felvételen jól látható a *H. influenzae* által képezett érett, összefüggő biofilm, míg a kezelt minták (5. kép) esetén a baktériumsejtek elszórtan, különálló sejtekként vannak jelen.

Következtetések

Középfülgyulladásban átesett betegek esetén nagy a kockázata a fertőzés újbóli fellángolásának, így nagyon fontos a hallójárat tisztán tartása, izolálása, illetve a dobhártya regenerálódásának elősegítése. Az antibiotikum-kurák kiegészítő terápiájaként jelentős szerepe lehet az antibakteriális aktivitással rendelkező növényi alapú hatóanyagoknak, hiszen megakadályozhatják a gyulladás újbóli kialakulását és a felülfertőződést. A különböző aktív komponenseket tartalmazó gyógyhatású anyagok kombinálásának és terápiás alkalmazásának létjogosultságát a komplex hatóanyagösszetételük adja²⁴. Az egyes mézek és illóolajok az antibakteriális hatásukat több támadásponton érik el, ezáltal csökkentve az antibiotikum-rezisztencia kialakulásának kockázatát. Az eredményeink elősegíthetik új, természetes eredetű antibakteriális hatású kombinációs készítmények fejlesztését. A jövőben

24 ASSAGGAF-NACEIRI-MRABTI-RAJAB-ATTAR-HAMED-SHEIKH-OMARI-MENYIY-BELMEHDI-MAHMUD-ALSHAHRIANI-PARK-KIM-ZENGIN-BOUYAHYA 2022, 5121.

további baktériumtörzsek, illetve korábban már tesztelt mézek és illóolajok bevonását is tervezzük a kísérletsorozatba.

A kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NKFI K 132044 pályázata támogatta.

Táblázatok

Paraméterek	
Készülék	GC-MS-QP2020
Injektor	split-splitless injektort (280 °C)
Mintavevő	automatikus AOC-20i
Tömegdetektor	quadropole típusú
Tömegtartomány	40-550 amu
Beolvasási sebesség	3333 amu/s
Ionforrás hőmérséklete	220°C
Felületi hőmérséklet	250°C
Injektor térfogata	0,5 µL
Split ratio	10:01
Oszlop	SLB-5ms /30m x 0,25 mm id x 0,25 µm/ alacsony polaritású kapilláris oszlopon
Hőmérsékleti paraméterek	50°C és 300°C között, 3°C / perc sebességgel
Vivőgáz	Hélium
Vivőgáz átlagos lineáris sebessége	30 cm/s

Adatok kiértékelése	GCMS solution software
---------------------	------------------------

1.táblázat: GC-MS készülék paraméterei

Fajtaméz, Növény	Hárs, <i>Tilia</i> spp.
ABS⁴⁵⁰⁻⁷²⁰ (mAU)	107 ± 1,4
Elektromos vezetőképesség (mS/cm)	0,528 ± 0,01
pH	4,1 ± 0,01

2.táblázat: Méz fizikokémiai paraméterei

Mézminta

Pollentípusa - relatív gyakoriság (%)

	hárs	akác	repce	napraforgó	gesztenye	egyéb
Reith hárs	36	25,7	20,4	6,2	5,8	5,9

3.táblázat: Pollentípusok relatív gyakorisága (%)

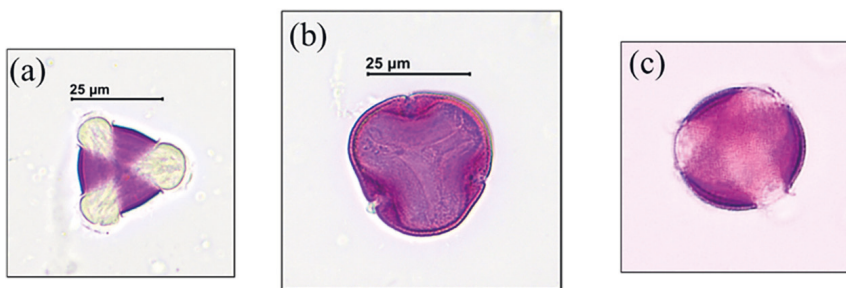
Hársméz	MIC	MIC/4
H. influenzae	111,11	27,78
H. parainfluenzae	111,11	27,78
M. catarrhalis	142,86	35,72

4.táblázat: Hársméz minimális gátló koncentráció értékek (mg/ml)

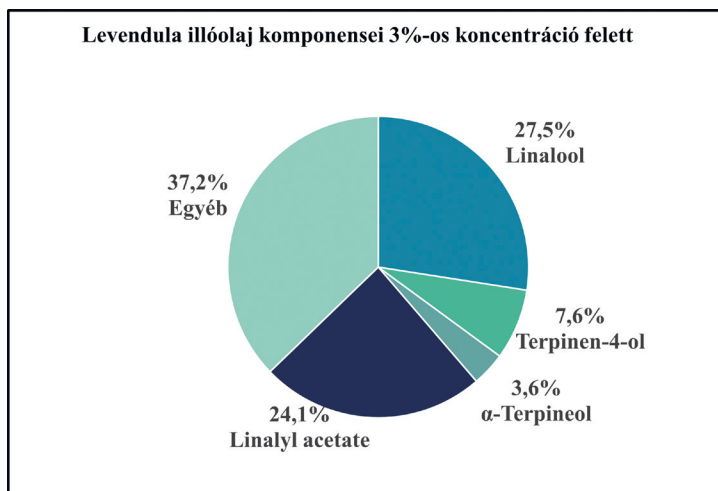
Levendula illóolaj	MIC	MIC/4
H. influenzae	0,625	0,165
H. parainfluenzae	0,625	0,165
M. catarrhalis	1,250	0,313

5.táblázat: *Levendula* illóolaj minimális gátló koncentráció értékek (mg/ml)

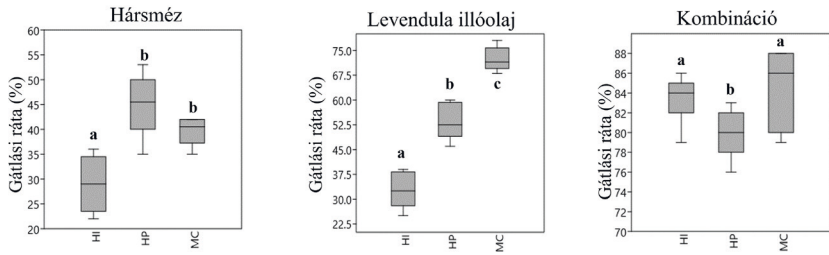
Képek



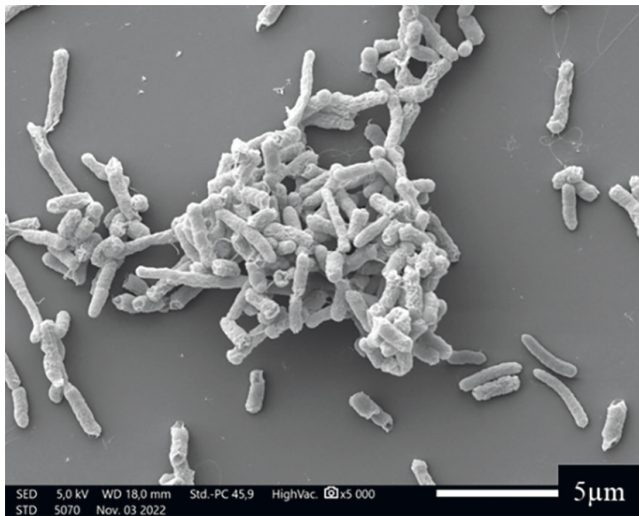
1.kép: (a) akác, (b) hárs, (c) repce pollen fénymikroszkópos képe, Arány-mérték: 25 µm (Fotó: Ángyán Virág Diána)



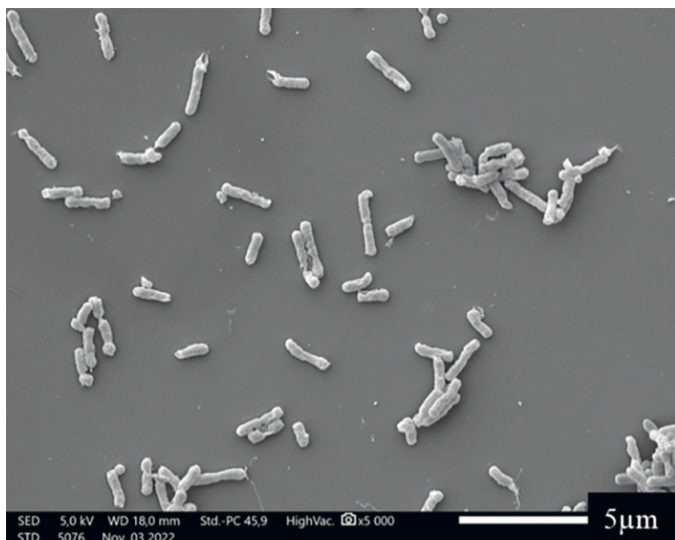
2.kép: *Levendula* illóolaj komponensei 3%-os koncentráció felett



3.kép: Hársméz, levendula illóolaj és kombinációjuk gátlási ráta értékei (%)



4.kép: Kezeletlen biofilm (*H. influenzae*)



5.kép: Kezelt biofilm (*H. influenzae*)

Irodalom

Assaggaf, Hamza M., Naceiri Mrabti, Hanae., Rajab, Bodour S., Attar, Ammar A., Hamed, Munerah, Sheikh, Ryan A., Omari, Nasreddine E., Menyiy, Naoual El., Belmehdi, Omar., Mahmud, Shafi, Alshahrani, Mohammed Merae., Park, Moon Nyeo., Kim, Bonglee., Zengin, Gokhan, Bouyahya, Abdelhakim.: Singular and Combined Effects of Essential Oil and Honey of Eucalyptus Globulus on Anti-Inflammatory, Antioxidant, Dermatoprotective, and Antimicrobial Properties: In Vitro and In Vivo Findings. *Molecules* (2022) 5121

Balázs, Viktória Lilla., Nagy-Radványi, Lilla., Bencsik-Kerekes, Erika., Koloh, Regina, Szabó, Dina., Kocsis, Béla., Kocsis, Marianna., Farkas, Ágnes.: Antibacterial and Antibiofilm Effect of Unifloral Honeys against Bacteria Isolated from Chronic Wound Infections. *Microorganisms* (2023) 509

Balázs, Viktória Lilla., Nagy-Radványi, Lilla., Filep, Rita., Kerekes, Erika., Kocsis, Béla., Kocsis, Marianna., Farkas, Ágnes.: In vitro antibacterial and antibiofilm activity of Hungarian honeys against respiratory tract bacteria. *Foods* (2021) 1632

CLSI. 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, (2012)

Codex Alimentarius. Revised Codex Standard for Honey. Rev. 1 (1987), Rev. 2. (2001) Codex STAN 12–1981

Escuredo, Olga., Seijo-Coello, M. Carmes.: Honey: chemical composition, Stability and Authenticity. *Foods* (2019) 577

Gaddey, Heidi L., Wright, Matthew Thomas., Nelson, Tracy N.: Otitis Media: Rapid Evidence Review. *American Family Physician* (2019) 350-356

Kerekes, Erika., Deák, Éva., Takó, Miklós., Tserennadmid, Rentsenkhand., Petkovits, Tamás., Vágvölgyi, Csaba., Krisch, Judit.: Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food related microorganisms. *Journal of Applied Microbiology* (2013) 933-942

Koulivand, Peir Hossein., Ghadiri, Maryam Khaleghi., Gorji, Ali.: Lavender and the nervous system. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2013) 681304

Kurek-Górecka, Anna., Górecki, Michal., Rzepecka-Stojko, Anna., Balwierz, Radoslaw., Stojko, Jerzy.: Bee Products in Dermatology and Skin Care. *Molecules* (2020) 556

Kuś, Piotr Marek., Congiu, Francesca., Teper, Dariusz., Sroka, Zbigniew., Jerković, Igor., Tuberoso, Carlo Ignazio Giovanni.: Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. *LWT - Food Science and Technology* (2014) 124-130

Lizarraga-Valderrama, Lorena R.: Effects of essential oils on central nervous system: Focus on mental health. *Phytotherapy Research* (2021) 657-679

Oddo, Livia Persano., Piro, Roberto., Flamini, Chritian., Lheritier, Joel., Russmann, Harald., Von Der Ohe, Werner., Gotsiou, Panagiota., Karabournioti, Sophia., Kefalas, Panagiotis., Passaloglou-Katrali, Maria., Thrasyvoulou, Andreas., Marcazzan, Gian Luigi., Piana, Maria Lucia., Piazza, Maria Gioia., Bentabol, Antonio., Bogdanow, Stefan.: Main European Unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* 35 (2004) S38-S81

Peeters, Elke., Nelis, Hans J., Coenye, Tom.: Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates.

Journal of Microbiological Methods (2008) 157-165

Rodis, Nikiforis., Tsapadikou, Vasiliki Kalouda., Potsios, Charalampos., Xaplanteri, Panagiota.: Resistance Mechanisms in Bacterial Biofilm Formations: A Review. *Journal of Emergency and Internal Medicine* (2020) 30

Sakač, Marijana., Jovanov, Pavle., Marić, Aleksandar., Četojević-Simin, Dragana., Novaković, Aleksandra., Plavšić, Dragana., Škrobot, Dubrovka., Kovač, Renata.: Antioxidative, Antibacterial and Antiproliferative Properties of Honey Types from the Western Balkans. *Antioxidants* (2022) 1120

Sak-Bosnar, Milan., Sakač, Nikola.: Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. *Food Chemistry* (2012) 827-831

Scott, Anna M., Clark, Justin., Julien, Blair., Islam, Farhana., Roos, Kristian., Grimwood, Keith., Little, Paul., Del Mar, Chris B.: Probiotics for preventing acute otitis media in children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* (2019) CD012941

Sharifi-Rad, Javad., Sureda, Antoni., Tenore, Gian Carlo., Daglia, Maria., Sharifi-Rad, Mehdi., Valussi, Marco., Tundis, Rosa., Sharifi-Rad, Marzieh., Loizzo, Monica R., Ademiluyi, Adedayo Oluwaseun., Sharifi-Rad, Razieh., Ayatollahi, Seyed Abdulmajid., Iriti, Marcello.: Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules* (2017) 70

Von Der Ohe, Werner., Persano Oddo, Livia., Piana, Maria Lucia., Morlot, Monique., Martin, Peter.: Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* (2004) S18-S25

Zhang, Li., Bera, Hriday., Wang, Hengzhuang., Wang, Junwei., Guo, Yi., Shi, Changzhi., Cun, Dongmei., Moser, Claus., Høiby, Niels., Yang, Ming-shi.: Combination and nanotechnology based pharmaceutical strategies for combating respiratory bacterial biofilm infections. *International Journal of Pharmaceutics* (2022) 121507

Back to nature! Can honey and essential oil be effective against biofilm forming bacteria?

VIRÁG DIÁNA ÁNGYÁN

Virág Ángyán¹⁺, Ágnes Farkas^{1*}, Béla Kocsis², Lilla Nagy-Radványi^{1*}

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

²University of Pécs, Clinical Centre, Department of Medical Microbiology and Immunology

⁺lecturer

^{*}Principal investigators

Many infections are caused by bacterial biofilms, which make pathogens much more resistant to treatments such as antibiotics. Honey is a naturally occurring medicinal substance with anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant properties, which is frequently used to treat microbial infections. Essential oils also have antibacterial properties and can be used to complement antibiotic therapies. In our study we aimed to test the combination of linden honey and lavender essential oil, which have been shown to exert antibacterial activity, against bacteria (*Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae* and *Moraxella catarrhalis*) that cause acute otitis media.

According to the microscopic pollen analysis and physicochemical parameters, our honey sample can be considered as linden honey. Gas chromatography was used to determine the chemical composition of lavender essential oil, which was in accordance with the literature.

The antimicrobial activity of honey, essential oil and their combination was tested by in vitro microbiological methods and supplemented by scanning electron microscopy. The combination used in the procedure was able to inhibit the biofilm formation of the bacterial strains used, with an average inhibition rate between 80 and 84% against all strains. Our results obtained by combining natural substances containing a variety of active components may facilitate the development of new antibacterial formulations of natural origin.