Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره پنجم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۵، ۱۸۶-۱۸۱

مطالعه اثر انواع مختلف عسل بر رشد سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا در شرایط برون‌تنی

دکتر محمود صفاری[۱]، دکتر محسن تقی‌زاده[۲]، محمد پوربابایی[۳]

دریافت مقاله: ۸٤/۱۰/۱۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۵/٤/۳ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۵/٦/۱۵ پذیرش مقاله: ۸۵/٦/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا *(Pseudomonas aeroginosa)* یک باسیل گرم منفی است که به صورت فلور طبیعی در دستگاه گوارش و پوست یافت می‌شود. این باکتری در ایجاد عفونت‌های فرصت‌طلب در سوختگی‌ها و زخم‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است و با توجه به مقاومت این باکتری به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، یافتن مواد جایگزین بدون عوارض مانند عسل توسط بعضی از متخصصین توصیه شده است. با توجه به خواص ضدمیکروبی عسل‌های مختلف بر آن شدیم تا در این مطالعه اثر این ماده را در منطقه کاشان روی باکتری فوق مورد بررسی و مطالعه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها: این مطالعه با روش آزمایشگاهی انجام شد. از ۱۵ نمونه عسل تهیه شده، ۸ نمونه عسل انتخاب و پس از انجام آزمایشات شیمیایی، مقدار قندهای احیاء کننده، آنزیم دیاستاز و مقدار قند ساکارز آن‌ها تعیین گردید. به این ترتیب ۶ نمونه عسل طبیعی و دو نمونه عسل غیرطبیعی و یک نمونه عسل ساختگی از شکر جهت کنترل انتخاب گردیدند. پس از تهیه رقت‌های ۱۰،۵، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰٪ از هریک از نمونه‌ها در محیط مولرهینتون (v/v)، سوش استاندارد (ATCC=۲۷۸۵۳) سودوموناس آئروژینوزا روی محیط‌های فوق کشت و نتایج ارزیابی گردید. دو نمونه عسل طبیعی نیز بعد از حرارت دادن با رقت‌های فوق، مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عسل طبیعی دارای سطح آنزیم استاندارد از رقت ۱۰٪ به بالا روی رشد باکتری مؤثر بوده و از رقت ۲۰٪ به بالا کاملاً مانع رشد باکتری شد در حالی که عسل‌های طبیعی فاقد آنزیم دیاستاز اثرات ضد میکروبی کمتری داشتند. عسل‌های غیرطبیعی هیچ‌گونه اثر ضدمیکروبی نداشتند. نتایج نشان داد که حرارت دادن باعث کاهش خاصیت ضدمیکروبی عسل می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که عسل‌های طبیعی دارای اثرات ضدمیکروبی روی سودوموناس آئروژینوزا هستند و با توجه به مقاومت این باکتری نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، به عنوان یک جایگزین با پایش کامل عفونت و انجام تحقیقات درون‌تنی بیشتر، می‌تواند مورد نظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: دیاستاز، زخم، سوختگی، سودوموناس آئروژینوزا، عسل

۱- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

تلفن: ۰۳۶۱-۵۵۷۰۳۳۰، فاکس: ۰۳۶۱-۴۴۴۶۹۸۹، پست الکترونیکی: saffarimahmood@yahoo.com

۲- استادیار گروه آموزشی بیوشیمی و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۳- کارشناس گروه آموزشی میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مطالعه روی عسل به عنوان یک ترکیب آنتی‌باکتریال از قرن هجدهم شروع شده است [۱]. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که این ماده می‌تواند اثرات ضدمیکروبی روی بسیاری از گونه‌های گرم مثبت و گرم منفی داشته باشد. تأثیر عسل بر رشد میکرو ارگانیسم‌ها می‌تواند به دلیل خاصیت مهارکنندگی عواملی مانند پراکسید، فلاوینوئیدها، اسیدهای فنولیک [۲] باشد هم‌چنین اثر اسموتیک عسل با تأثیر روی آب فعال، محیط رشد میکروارگانیسم‌ها را نامناسب می‌سازد [۵-۳] هم‌چنین وجود موادی نظیر Propolises موجود در آن باعث اثر ضدمیکروبی عسل می‌گردد [۶].

مطالعه بر روی ترکیبات عسل باروش HPLC، نشان داده است که عسل‌ها می‌توانند حاوی انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مخصوصاً تتراسیکلین [۷]، سولفونامیدها [۹-۸]، مواد غیر آلی[۱۰] و یا مواد آلی مثل اسیداسکوربیک [۱۱] و انواع تایلوزین‌ها باشند [۱۲]. نتایج بعضی از مطالعات نشان داده است که اثرات ضدمیکروبی عسل‌ها متفاوت است و این تفاوت تا حدود زیادی ناشی از نوع گل و منابع تغذیه متفاوت زنبورها است [۱۳].

با توجه به این خاصیت عسل و در دسترس بودن و بدون عارضه بودن آن، متخصصین سعی کرده‌اند به عنوان یک ماده درمانی در عفونت‌های خارجی مثل سوختگی‌ها، ورم ملتحمه و زخم‌های جراحی [۱۴] از آن استفاده نمایند. بعضی از محققین آزمایشات ارزنده‌ای بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام داده‌اند و تأثیر عسل را روی باکتری‌های مختلف مثل سودوموناس، کلبسیلا، اشرشیا، استافیلوکوک و سایر باکتری‌هایی که ممکن است در عفونت‌های پوستی نقش داشته باشند، بررسی کرده‌اند [۱۵]. بر همین اساس عسل‌های مختلف از منابع طبیعی مختلف ممکن است دارای اثرات آنتی‌باکتریال متفاوت باشند. در متون قدیم (Dioscorides C.50 AD) بیان شده که عسل زرد کمرنگ (Pale yellow honey) از ناحیه Attioca بهترین عسل است و ارسطو (Aristole) (۳۸۴-۳۲۲BC) وقتی که درباره عسل بحث می‌کند به عسل زرد رنگ به عنوان یک ماده مؤثر در درمان زخم‌های چشم و زخم‌های پوستی اشاره می‌کند. امروزه عسل Straw berry–tree honey از منطقه Sardinia یکی از بهترین عسل‌های شناخته شده است که دارای بهترین خصوصیات درمانی است. در India lotus honey گفته شده است که عسل یک اکسیر برای بیماری‌های چشم است. عسل Jirdin یمن که دربازارهای دبی به فروش می‌رسد دارای بهترین اثرات درمانی است [۱۶].

با توجه به اهمیت باکتری سودوموناس آئروژینوزا در سوختگی و جراحی و مقاومت وسیع این باکتری نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض ناشی از مصرف انها، استفاده از مواد جایگزین مانند عسل بیشتر مورد توجه قرار گرفته است.

با توجه به شیوع سوختگی‌های وسیع و عفونت‌های بعد از جراحی در جامعه و اهمیت این باکتری در این گونه عفونت‌ها و در دسترس بودن فراوان این ماده در مناطق مختلف کوهستانی و نیمه کوهستانی کشورمان، بر آن شدیم تا با مقایسه تأثیر عسل‌های مختلف، تأثیر این ماده روی این باکتری را تحت مطالعه و بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

انتخاب نمونه عسل: این مطالعه به روش آزمایشگاهی (Laboratory study) انجام شد. ابتدا به منظور تعیین کیفیت عسل‌ها، ۱۵ نمونه عسل از منابع مختلف به صورت تصادفی تهیه و میزان قند احیاء کننده و ساکارز آن‌ها مطابق روش لین‌آنیون [۱۶]، اندازه‌گیری گردید. از بین آن‌ها شش نمونه از نظر میزان ساکارز در حدود استاندارد و از نظر قند احیاءکننده در حد طبیعی بودند. دو نمونه به عنوان نمونه غیرطبیعی انتخاب گردید. نمونه‌های عسل از نظر فعالیت آنزیم دیاستاز [۱۷] نیز مورد ارزیابی قرار گرفت که دو نمونه عسل طبیعی دارای فعالیت دیاستاز مثبت و در بقیه منفی بود. بدین ترتیب، دو نمونه عسل طبیعی با فعالیت دیاستاز، چهار نمونه عسل طبیعی با فعالیت دیاستاز مثبت منفی و دو نمونه عسل

www.SID.ir

Archive of SID

غیرطبیعی دارای ساکاروز بیش از حد استاندارد و بدون فعالیت دیاستاز جهت ادامه کار انتخاب گردیدند. هم‌چنین جهت بررسی تأثیر حرارت روی خاصیت ضدمیکروبی عسل، مقداری از عسل طبیعی دارای فعالیت دیاستاز را حرارت دادیم (۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه) و در مطالعه به کار بردیم.

بررسی‌های میکروب‌شناسی: جهت مطالعات میکروب‌شناسی، سوش استاندارد باکتری سودوموناس آئروژینوزا از آزمایشگاه رفرانس با کد ATCC=۲۷۸۵۳ تهیه نمودیم پس از کشت مجدد روی محیط BHIA (Merck) با استفاده از تست TSI و سایر روش‌های بیوشیمیایی و هم‌چنین با کشت روی محیط ستریمید آگار هویت آن را مجدداً مورد تأیید قرار دادیم [۱۹]. باکشت آن روی BHI براث و انکوبه‌گذاری، غلظت مناسبی از سوسپانسیون باکتری تهیه و آماده استفاده گردید.

جهت مطالعه تأثیر عسل روی باکتری، از روش Agar dilution susceptibility test استفاده گردید. برای این منظور غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰٪ (v/v) هر یک از نمونه‌های عسل با احتساب رقت در ۶۰cc محیط مولر هینتون (Merck) استریل تهیه و با در نظر گرفتن حجم محیط جهت پرهیز از تغییر رقت و پس از همگن نمودن محیط آن را تقسیم نمودیم. جهت کنترل کیفی، یک‌سری از پلیت‌ها را ۲۴ ساعت در انکوباسیون قرار دادیم. هم‌چنین، غلظتی معادل قند هریک از نمونه‌های عسل، از شکر تهیه و در محیط جداگانه حل و جهت کنترل تأثیر فشار اسمزی در رشد باکتری، آن را مورد استفاده قرار دادیم. برای هر غلظت عسل و رقت آن، حداقل سه بار آزمایش تکرار گردید.

جهت کشت، پس از تهیه غلظت نیم مک فارلند از کشت استوک BHI براث (معادل$۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu/ml باکتری)، معادل ۰/۰۰۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون (معادل ۱۵۰/۰۰۰ باکتری) را به کمک نمونه برداراتوماتیک برداشت کرده و در سطح پلیت کشت و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار دادیم. پس از این مدت، میزان رشد در هر یک از پلیت‌ها به صورت منفی (فاقد رشد)، ۱+ (پلیت/کلنی ۱×۱۰^{۵} > و $۲،۱\times۱۰^{۵}$>پلیت/کلنی ۵×۱۰^{۴})، ۳+ (پلیت/کلنی ۱×۱۰^{۵} <) مشخص و در چک لیست‌های مربوطه ثبت گردید. اطلاعات به دست آمده از چک لیست‌ها استخراج و با روش آمار توصیفی مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

از ۱۵ نمونه عسل خریداری شده، ۸ نمونه جهت مطالعه انتخاب شدند. سایر نمونه‌ها به علت ناکافی بودن و داشتن مشخصات فیزیکی نامناسب کنار گذاشته شدند. نمونه‌های ۱ و ۲ بعنوان عسل‌های طبیعی، دارای قند احیاءکننده، درصد ساکاروز و فعالیت آنزیم دیاستاز در حد استاندارد بودند. نمونه‌های ۳، ۴، ۵ و ۶ از نظر درصد ساکاروز در حد استاندارد و نمونه‌های ۷ و ۸ از نظر درصد ساکاروز و فعالیت آنزیمی خارج از استاندارد بودند.

نتایج آزمایشات شیمیایی انجام شده بر روی نمونه‌های مختلف عسل نشان داد که عسل طبیعی شماره ۱ دارای قند قبل از احیاء ۵۹٪، قند بعد از هیدرولیز ۶۳٪ و میزان ساکاروز ۳/۸٪ و دارای فعالیت آنزیم دیاستاز مثبت بود و در عسل طبیعی شماره ۲ موارد به ترتیب ۶۰٪، ۶۴٪، ۳/۹٪ و دیاستاز مثبت؛ در عسل طبیعی شماره ۳ به ترتیب ۵۱٪، ۵۵ ٪، ۳/۸٪ و دیاستاز منفی؛ در عسل طبیعی شماره ۴، به ترتیب ۵۱/۵٪، ۵۴/۵٪، ۲/۸٪ و دیاستاز منفی؛ در عسل طبیعی شماره ۵ به ترتیب ۵۱٪، ۵۴٪، ۳٪ و دیاستاز منفی؛ در عسل طبیعی شماره ۶ به ترتیب ۵۵٪، ۶۰٪، ۴/۷٪ و دیاستاز منفی؛ در عسل طبیعی غیرطبیعی شماره ۷ به ترتیب ۵۰٪، ۶۰٪، ۹/۶٪ و دیاستاز منفی و درعسل غیرطبیعی شماره ۸ به ترتیب ۴۵/۵٪، ۵۸٪، ۱۱/۸٪ و دیاستاز منفی بودند.

نتایج اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف عسل بر رشد باکتری سود و موناس آگروژینوزا نشان داد که در غلظت ۵٪ رشد باکتری معادل ۳+ در کلیه نمونه‌های عسل دیده شد. در غلظت ۱۰٪، در کلیه نمونه‌های عسل به استثناء عسل طبیعی

www.SID.ir

Archive of SID

شماره ۱ رشد ۳+ دیده شد. در عسل طبیعی شماره ۱ در غلظت ۱۰٪ میزان رشد ۱+ بود. در غلظت ۱۵٪ در عسل طبیعی ۱ و ۲ میزان رشد معادل ۱+ و ۲+ به ترتیب مشاهده شد ولی در سایر نمونه‌های عسل میزان رشد ۳+ بود. در غلظت ۲۰٪ نمونه‌های عسل، در عسل شماره ۱ میزان رشد ۱+ و در عسل طبیعی شماره ۲ هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشد ولی درسایر نمونه‌ها میزان رشد ۳+ بود.

در غلظت ۲۵٪ نمونه عسل‌های مختلف، در عسل‌های شماره ۱ و ۲ هیچ رشدی مشاهده نشد و در عسل شماره ۳، ۴، ۵ و ۶ میزان رشد ۲+ و در عسل‌های غیرطبیعی ۷ و ۸ میزان رشد ۳+ بود. در غلظت ۳۰٪ نمونه عسل‌های مختلف در عسل‌های ۱، ۲ و ۳ هیچ رشدی مشاهده نشد و در عسل‌های ۶، ۴ و ۸ میزان رشد ۲+ و در عسل شماره ۵ میزان رشد ۱+ و در عسل شماره ۷ میزان رشد ۳+ بود (جدول ۱).

در کلیه غلظت‌های در نمونه شکر تهیه شده در محیط کشت (به عنوان شاهد)، میزان رشد ۳+ مشاهده شد و نشان داد که این غلظت‌های شکر در رشد باکتری تأثیری نداشته است.

جدول ۱- نتایج اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف عسل‌های طبیعی قبل و بعد از حرارت دادن بر رشد سودوموناس آئروژینوزا

درصد عسل / نوع عسل	٪۵	٪۱۰	٪۱۵	٪۲۰	٪۲۵	٪۳۰
طبیعی حرارت داده نشده (۱)	۳+	۱+	۱+	۱+	-	-
طبیعی حرارت داده شده (۱)	۳+	۳+	۲+	۱+	۱+	-
طبیعی حرارت داده نشده (۲)	۳+	۳+	۲+	-	-	-
طبیعی حرارت داده شده (۲)	۳+	۳+	۳+	۲+	۲+	۱+

۱+ : به معنی 5×10^{4} > colony /plate $\times10^{4}$ > در پلیت می‌باشد

۲+ : به معنی 1×10^{5} > و colony/plate 5×10^{4} < در پلیت می‌باشد

۳+ : به معنی colony/plate 1×10^{5} < در پلیت می‌باشد.

- : به معنی هیچ‌گونه رشد در پلیت می‌باشد.

بحث

نتایج مطالعات به دست آمده نشان داد که از ۱۵ نمونه عسل مورد بررسی، هیچ یک، درصد قند احیاءکننده در محدوده استاندارد ایران یعنی ۶۵٪ را نداشتند. البته تعدادی نمونه به دست آمده دارای قند کل بالاتر از ۶۵٪ بودند که این افزایش میزان قند مربوط به ساکاروز بالای عسل بود که دلیل بر تقلبی بودن آن است. نتایج به دست آمده از تأثیر میزان رشد عسل‌های مختلف روی سودوموناس آئروژینوزا نشان می‌دهد که در غلظت‌های پایین رشد کامل باکتری صورت پذیرفت ولی در غلظت‌های بالاتر ، میزان رشد باکتری متفاوت بود. به طوری که در این مورد میزان توقف رشد با غلظت عسل رابطه مستقیم داشت. در حالی که در عسل‌های طبیعی فاقد آنزیم دیاستاز توقف رشد فقط در غلظت‌های خیلی بالا مشاهده شد. در سایر نمونه های عسل حتی در غلظت‌های بسیار بالا تأثیر قابل توجهی مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد خاصیت آنتی‌باکتریال که به عسل ربط داده می‌شود تا حدود زیادی مربوط به طبیعی بودن عسل است.

مطالعه سایر محققین در این رابطه نیز نتایج مشابهی را نشان می‌دهد. مطالعه Cooper نشان داد که کمترین اثر ضدباکتریایی در عسل با غلظت ۱۰٪ مشاهده می‌شود [۱۹].

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات Al Gabri نشان داد که عسل در غلظت‌های پایین خاصیت آنتی‌باکتریال خود را از دست می‌دهد [۱۸]. مطالعات Cooper در این ارتباط نشان داده است که قدرت عسل در ممانعت از رشد میکرو ارگانیسم‌ها تنها به دلیل فشار اسمزی ناشی از قند بالا نمی‌باشد و عواملی غیر از فشار اسمزی در مهار رشد تأثیر می‌گذارند [۱۰-۸]. در این مطالعه جهت بررسی این نکته که آیا فشار اسمزی قند به تنهایی در عدم رشد باکتری مؤثر است محیط‌های کشتی را حاوی درصد بالای قند (۶۰٪)، تهیه نمودیم و به عنوان کنترل نیز با نتایج کشت عسل مقایسه نمودیم. نشان داده شد که علی‌رغم رشد باکتری در محیط کنترل قند، باکتری در روی محیط حاوی عسل رشدی نداشته است. این روش کنترل توسط Al-Waili و همکارانش با استفاده از باکتری پسودوموناس آئروژینوزا نیز به کار گرفته شده است [۱۵].

Allen نشان داد که انواع زیادی از عسل وجود دارندکه بعضی از آن‌ها دارای خاصیت آنتی‌باکتریال هستند و بدیهی است که انواع گل‌ها و منابع تغذیه زنبور در خصوصیات و نوع اثر آنتی‌بیوتیکی عسل اثر می‌گذارد [۱۳].

باتوجه به مباحث فوق به نظر می‌رسد عسل‌های مختلف می‌توانند خواص آنتی‌باکتریال متفاوت داشته باشند. هر چند محققان در گذشته به درستی مطمئن نبودند کدامیک از عناصر مؤثر و فعال عسل در این امر نقش دارد ولی امروزه با آزمایشات دقیق نشان دادند که انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، فنول‌ها و اسیدهای آلی و غیر آلی در عسل وجود دارد.

تحقیقات بیشتر با استفاده از تکنولوژی‌های پیشرفته وجود ۱۶ نوع سولفونامید را در عسل با روش کروماتوگرافی به اثبات رسانیده است [۹].

ترکیب کلرامفنیکل [۸] و Acaricides [۲۰] و سایر ترکیبات غیر آلی مثل اسیداگزالیک، فرمیک، سوکسینیک، پیرویک، لاکتیک، استیک، سیتریک و گلوکنیک [۱۰] و یا ترکیبات فنولی [۲] و تایلوزین‌های A و B و C و D [۱۲] از جمله ترکیباتی هستند که وجود آن‌ها در عسل اثبات شده است. بر همین اساس، کاربرد این ماده در زمینه‌های مختلف درمانی به عنوان ماده ضدباکتریایی و ضد قارچی [۲۱] و کمک کننده به ترمیم زخم‌ها [۲۴-۲۲] مورد توجه قرار گرفته است.

جهت مطالعه تأثیر حرارت بر عامل آنتی‌باکتریال عسل، دو نمونه طبیعی نیز بعد از حرارت دادن، مورد مطالعه قرار گرفتند و نتایج نشان داد که خواص ضدمیکروبی این عسل‌ها بعد از حرارت دادن بشدت کاهش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که عامل مؤثر خاصیت آنتی‌باکتریال به حرارت حساس بوده و در اثر حرارت دادن از بین می‌رود. در سایر مطالعات محققین به این نکته توجه چندانی نشده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به این نتایج و مروری بر مطالعات اخیر نشان می‌دهد که بسیاری از محققین از کاربرد عسل در درمان و پیشگیری از عفونت زخم‌ها به خصوص در مورد عفونت‌های ایجاد شده توسط انواع مقاوم به آنتی‌بیوتیک استافیلوکوک‌ها یا MRSA (Multiresistance Staphylococcus aureus) و سودوموناس با مقاومت بالا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، حمایت می‌کنند ولی در عین حال جهت کاربرد بالینی آن مطالعات بیشتری به خصوص در زمینه ویژگی‌های شیمیایی مؤثر در درمان عسل و تحقیق جهت بهینه کردن آن برای کاربرد درمانی و هم‌چنین مطالعات بیشتر تجربی در کلینیک برای اثبات این موضوعات مورد نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان در تصویب و مساعدت به طرح و از همکاران بخش بیوشیمی و میکروب‌شناسی دانشگاه جهت مساعدت‌های انجام شده در انجام امور اجرای طرح، ابراز می‌دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

[1] Al Somal N, Coley KE, Molan PC, Hancock BM. Susceptibility of Helicobacter pylori to the antibacterial activity of mannuka honey. *J R SO CMED*, 1994; 87(2): 9-12.

[2] Arraez – RD ,Gomez C AM, Gomez RM, Segura CA, Fernandez GA. Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid – phase extraction by capillary electrophoresis–electrospray ionization – mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; [Epub ahead of print].

[3] White J, W subers M. The identification of inibine the antibacterial factor in honeys as hydrogen peroxid and its origin in honeys glucose oxidase system. *Biophys Acta*, 1963; 73: 57–70.

[4] Molan PC. The antibacterial activity of honey. *J Bee world*, 1992; 73: 5–28.

[5] Subrahmanyam M. Tropical application of honey in treatment of burns. *Br J surg*, 1991; 78(4): 497–8.

[6] Miorin PL, Levy Junior NC, Custodio AR, Bretz WA, Marcucci MC. Antibacterial activity of honey and propolis from Apis mellifera and Tetragonisca angustula against Staphylococcus aureus. *J Appl Microbiol*, 2003; 95(5): 913–20.

[7] Oka H. Improvement of chemical analysis of antibiotics; simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey. *J chromatogar,* 1987; 400: 253-61.

[8] Ishii R, Horie M, Murayama M, Maitani T. Analysis of chloramphenicol in honey and royal jelly by LC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi,* 2006; 47(2): 58-65.

[9] Pang GF, Cao YZ, Zhang JJ, Jia GQ, Fan CL, Li XM, et al. Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J AOAC Int*, 2005; 88(5): 1304-11.

[10] Mato L, Huidobro JF, Simal – Lozano J, Sancho MT. Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. *J Agric Food Chem*, 2006; 54(5): 1541-50.

[11] Rahmanian M, Khouhestani A, Ghavifekr H, Ter-Sarkissian N, Donoso G, Olszyna Marzys AO. High ascorbic acid content in some Iranian honeys. Chemical and biological assays. *J Nutr Metab,* 1970;12: 131-5.

[12] Nozal Nalda MJ, Bernal Yague JL, Gomez MT, Jimenez Sevilla JJ, Bernal del Nozal J , Higes Pascual M. Trace analysis of antibactrialtylosin A, B, C , and D in honey by liquid chromatography – electrospray ionization- mass spectrometry. *J Sep Sci*, 2006; 29(3): 405-13.

[13] Allen KI. A survey of antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J Pharm pharmacol,* 1991; 43 : 817 – 22.

[14] Gethin G , Cowman S. Case series of use of Manuka honey in leg ulceration. *Int Wound J*, 2005; 2 (1) : 10-5.

[15] Al – Waili NS. 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(2): 210-22.

[16] Peter Charles Molan. Honey as a tropical antibacterial agent for treatment of infected wounds. *World Wide Wounds,* 2001; Revision: 1. 0, 1-13.

[17] Ronald SK, Ronald S, Pearson S. Composition and analysis of food, 9th, Singapore, Longman, 1997; 215-219.

[18] Al- Jabri AA, Nzeako B, AlMahrooqi Z, Al Naqdy A, Nsanze H. In vitro antibacterial activity of Omani and African honey. *Br J Biomed Sci*, 2003; 60(1): 1-4.

[19] Cooper RA, Halas E, Molan PC. The efficacy of honey in inhibiting strains of Pseudomonas aeruginosa from infected burns. *J Burn Care Rehabil*, 2002; 23(6): 366-70.

[20] Kamel A, Al-Ghamdi A. Determination of acaricide residues in saudi arabian honey and beewax using solid phase extraction and gas chromatography. *J Environ Sci Health B*, 2006; 41(2): 159-6.

[21] Irish J , Carter DA , Shokohi T , Blair SE. Honey has an antifungal effect aginst Candida species. *Med Mycol*, 2006; 44(3): 289-91.

[22] Mcntosh CD, Thompson CE. Honey dressing versus paraffin tulle grass following toenail surgery. *J Wound Care*, 2006; 15(3):133-6.

[23] Jones S. Honey use in wound management. *Nurs Stand*, 2006; 8-14, 20(26): 52.

[24] Manchester A. A passion for wound care. *Nurs N Z*, 2005; 11(14): 15.

www.SID.ir