

ارزیابی پتانسیل ضد میکروبی عسل های تجاری تولید شده در شهرستان ارومیه

حسین تاجیک^{۱*}، فرنود شکوهی ثابت جلالی^۲، سپیده والهی^۳

۱- استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

۲- استادیار گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

۳- دانش آموز، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

چکیده

گزارشات زیادی در تائید قدرت ضدباکتریایی عسل وجود دارد. این گزارشات تاثیر عسل را در ممانعت از رشد انواع میکروارگانیسمها تائید می نمایند. قصد ما از ارائه این طرح ارزیابی خاصیت ضد میکروبی عسلهای تولید شده در مناطق مختلف شهرستان ارومیه بوده است. این تحقیق بر روی نمونه های جمع آوری شده از عسلهای تولید شده در پنج منطقه اصلی تولید کننده عسل در ارومیه (مارمیشو: ۱، نازلو: ۲، دره قاسملو: ۳، مرگه ور: ۴، ترگه ور: ۵) انجام شده است. از هر منطقه ۲۰ نمونه مجموعاً ۱۰۰ نمونه مورد ارزیابی قرار گرفته اند. نمونه ها بر روی محیطهای کشت باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *ایشرشیا کلی* و *پزودوموناس آئروژینوزا* بعنوان میکروارگانیسمهای کنترل و همچنین میکروارگانیسمهای جدا شده از مراجعات درمانگاهی قرار داده شدند. پس از گذراندن دوره انکوباسیون، مناطق مهاری (IZ) بر حسب میلی متر محاسبه گردیدند. و همچنین با تهیه غلظتهای ۷۵٪، ۵۰٪، ۴۰٪، ۲۰٪ و ۱۰٪ میزان حد اقل غلظت مهاری (MIC) برای نمونه های مختلف اندازه گیری شدند. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق نمونه عسل شماره ۵ (عسل ترگه ور) دارای بیشترین منطقه مهاری (MIC) بر روی محیط کشت میکروبیهای کنترل بوده است. ($p < 0.05$) کمترین غلظت مهاری (MIC) نمونه های عسل مورد آزمون بر روی میکروارگانیسمهای کنترل ۴۰٪ بوده است. نمونه های عسل مورد ارزیابی، تاثیر مهاری بر روی برخی از میکروارگانیسم های جدا شده از موارد بالینی داشته اند ولی این تاثیر بر روی میکروارگانیسمهای فارچی قابل مشاهده نبوده است. وجود اختلاف در پتانسیل ضد باکتریایی نمونه های مختلف عسل اساساً به مواد فیتوشیمیایی خاص حاصل از فلور گیاهی منطقه پرورش زنبور بستگی دارد. پیشنهاد میشود با انجام بررسی بر روی بافت گیاهی منطقه ((ترگه ور)) و انتخاب گیاهان مناسب و پرورش آنها در مزارع خاص اقدام به پرورش زنبور عسل در چنین مزارع کنترل شده ای نموده و از این طریق عسلهایی با قدرت ضد باکتریایی بالاتر جهت استفاده در مصارف دارویی و درمانی تولید نمود.

کلید واژگان: عسل تجاری، ضد میکروبی، عفونت، ارومیه

۱- مقدمه

در بسیاری از بخشهای سوختگی به دلیل بروز مقاومت دارویی، عوارض جانبی و یا هزینه بالا، استفاده از آنتی بیوتیکها جزء پروتکل معمول محسوب نمی شود [۱]. یافتن مواد زیستی دارای خواص ضد میکروبی و افزایش علاقه مندی به استفاده از داروهای طبیعی و گیاهان دارویی را می توان یکی از استراتژیهای نوین در عرصه تحقیقات پزشکی در مقابله با مقاومت های دارویی دانست. عسل هزاران سال است که با هدف درمان جراحات و بیماریها مورد استفاده بشر قرار گرفته است. شواهد

عفونت مهمترین عامل مرگ و میر ناشی از سوختگی ها و زخمهای حاصل از تصادفات و حوادث می باشد [۱]. زخمهای به منزله دروازه های بزرگی برای هجوم میکروارگانیسم های آسیب رسان بوده و به دلیل وجود بافت های نکروزه و تخریب شده محیط مغذی مناسبی را جهت تکثیر گسترده آنها فراهم می آورند [۲، ۳]. علی رغم پیشرفتهای فراوان در تولید نسلهای جدید داروهای آنتی باکتریایی، هنوز موارد زیادی از عدم موفقیت در کنترل و درمان زخمهای عفونی مشاهده می شود.

* مسئول مکاتبات: Tajik_h@yahoo.com

از هر نوع عسل تعداد ۲۰ نمونه (مجموعاً ۱۰۰ نمونه) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه ها بطور تصادفی توسط یک محقق جمع آوری و کد گذاری شده و اجراء آزمون توسط محققین دیگری بصورت جداگانه و کور انجام گردیده است. هر یک از نمونه ها پس از عبور از توری های استریل درون ظروف مخصوص استریل در درجه حرارت ۸-۲ درجه سانتی گراد و بدور از نور نگهداری می شدند. سپس نمونه ها بمنظور اطمینان از عدم آلودگی اولیه بر روی پلت آگار خون کشت داده شدند. از هر نمونه با استفاده از محلول نمکی نرمال استریل رقت های ۱۰٪، ۲۰٪، ۴۰٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ تهیه گردید. سه میکروارگانیسم کنترل شامل:

Staphylococcus aureus (ATCC25923),
Escherchia coli (ATCC25922), *Pseudomonas*
aeruginosa (ATCC27853) بودند. که از آزمایشگاه

کنترل کیفی گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردیدند. میکروارگانیسمها بر محیط کشت آگار مغز-قلب (Brain-Hart Agar (BHA کشت داده شدند.

درجه حرارت و طول مدت مورد نیاز دوره انکوباسیون برای میکروارگانیسمهای مورد آزمون بر مبنای توصیه های ATCC انجام گرفته است.

محیط های کشت بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده آماده سازی گردیدند. (Difco, Detroit, MI)

از کشت هر میکروب ($10^8 \times 1/5$ ارگانیسم در هر میلی لیتر، معادل کدورت محلول ۰/۵ مک فارلند) در محلول نمکی فیزیولوژیک تهیه شده و بر روی پلیت های مورد استفاده قرار گرفت.

۵۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه های مورد آزمون عسل و رقتهای تهیه شده از آنها بر روی پلیت ها قرار داده شدند. پلیت ها بمنظور نفوذ عسل درون آگار و طی دوره انکوباسیون بمدت یک شب در حرارت اتاق قرار داده شدند و پس از آن میزان نواحی مهارتی مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان مناطق مهارتی inhibition zone (IZ) بر اساس میلی متر (mm) ثبت شده و سپس میانگین آنها محاسبه گردیدند. نمونه هایی که مناطق مهارتی آنها بیش از ۱ میلی متر گسترش یافته بودند، دارای فعالیت ضد میکروبی بر ضد میکروارگانیسم مورد آزمون بوده و مثبت تلقی میشدند. آخرین نقطه فعالیت ضد باکتریایی

تاریخی موید آنست که مصریان، آشوریان، یونانیان و پارسیان از جمله اقوام کهنی هستند که از عسل همراه با گیاهان دارویی و یا به تنهایی برای بهبود امراض بهره جسته اند [۵،۶،۷]. توانایی عسل در ممانعت از رشد میکروبی حتی در مواردی که داروهای آنتی باکتریایی رایج موثر نبوده اند در گزارشات زیادی مورد تاکید قرار گرفته است [۸،۱۱،۹،۱۰]. ارزیابی های آزمایشگاهی نشاندهنده آنست که طیف وسیعی از میکروارگانیسمهای پاتوژن موثر در عفونت زخمها توسط عسل مهار می شوند [۱۳، ۱۲]، بویژه آنهایی را که پتانسیل گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی را دارا هستند نظیر:

Staphylococcus aureus [۱۵] *Pseudomonas*

aeruginosa [۱۴] فعالیت آنتی باکتریایی عسل را عمدتاً ناشی از خواص فیزیکی و مواد شیمیایی آن دانسته اند [۱۶، ۱۷]. عسل بدلیل ماهیت و میکانیزم فعالیت مانند سایر آنتی سبتیک ها دارای تاثیر تخریبی و پاتوژنیک بر روی بافتهای سالم نیست [۱۳]. مصرف عسل در رژیم غذایی و یا کاربرد آن در رژیم درمانی در طب سنتی در فرهنگ ما از جایگاه خاصی برخوردار است.

استان آذربایجان غربی بعنوان نخستین تولید کننده عسل در سطح کشور دارای انواع مختلف از عسلهای تجاری میباشد. از این رو بر آن شدیم که با طراحی مطالعه حاضر به ارزیابی پتانسیل ضد باکتریایی عسلهای تولید در این استان به پردازیم.

۲- مواد و روش کار

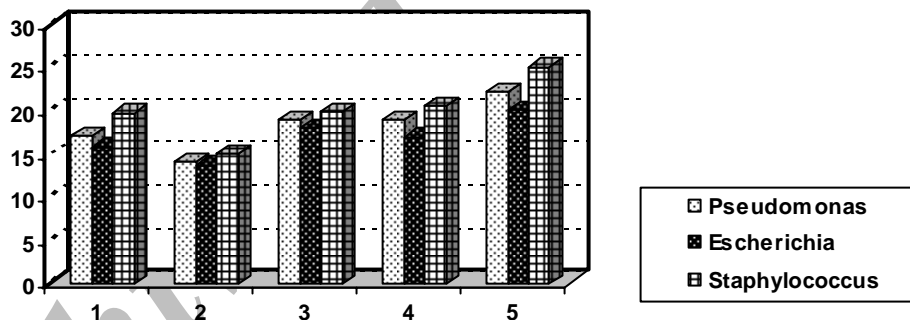
این پژوهش بر روی پنج نوع از عسلهای تجاری تولید شده در شهرستان ارومیه انجام گرفته است. این عسلها شامل: عسل مارمیشو، عسل نازلو، عسل دره قاسملو، عسل مرگه ور، عسل ترگه ور (جدول ۱).

جدول ۱ عسلهای مورد آزمون، منطقه تولید، تعداد و نوع آنها

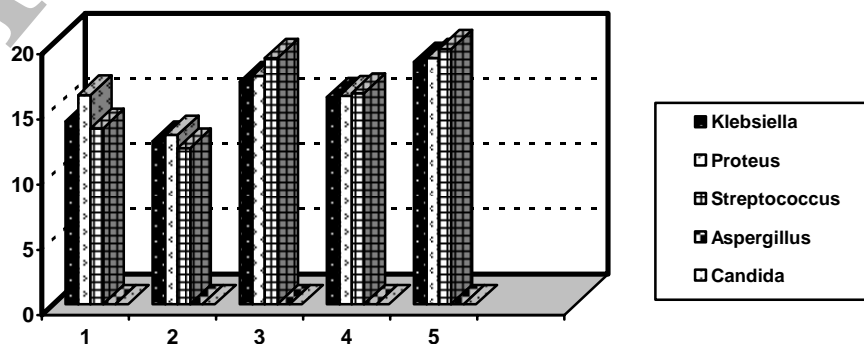
شماره	منطقه تولید	نمونه	نوع	منشاء
۱	مارمیشو	۲۰	عسل مرتعی	آذربایجان غربی
۲	نازلو	۲۰	عسل مرتعی	آذربایجان غربی
۳	دره قاسملو	۲۰	عسل مرتعی	آذربایجان غربی
۴	مرگه ور	۲۰	عسل مرتعی	آذربایجان غربی
۵	ترگه ور	۲۰	عسل مرتعی	آذربایجان غربی

جدول ۲ حداقل غلظت مهاری نمونه های مختلف عسل بر روی میکروارگانیسمهای کنترل

<i>Staphylococcus aureus</i> منطقه مهاری نمونه ها (mm)					<i>Escherichia coli</i> منطقه مهاری نمونه ها (mm)					<i>Pseudomonas aeruginosa</i> منطقه مهاری نمونه ها (mm)					رقت عسل
۵	۴	۳	۲	۱	۵	۴	۳	۲	۱	۵	۴	۳	۲	۱	نمونه ها
۱۲.۲۲	۰۰.۱۹	۸۸.۱۸	۰۰.۱۴	۰۱.۱۷	۰۶.۲۰	۰۰.۱۷	۹۶.۱۷	۷۶.۱۳	۷۹.۱۵	۰۷.۲۵	۵۸.۲۰	۸۸.۱۹	۰۳.۱۵	۷۶.۱۸	خالص
۵۷.۱۶	۰۶.۱۴	۵۵.۱۵	۰۵.۱۴	۰۰.۱۰	۸۷.۱۴	۰۶.۱۳	۵۴.۱۴	۸۸.۹	۰۱.۱۰	۸۸.۲۰	۰۱.۱۵	۷۵.۱۴	۰۸.۱۳	۹۸.۱۳	٪۷۵
۰۰.۱۳	۱۰.۸	۷۷.۱۱	۰۶.۸	۰۰.۱۰	۶۳.۱۲	۹۳.۸	۰۰.۹	۵۵.۷	۷۵.۹	۷۴.۱۵	۰۳.۹	۴۸.۱۱	۰۰.۹	۱۰.۱۲	٪۵۰
۰۱.۸	۰۰.۰	۰۰.۱۲	۵۰.۶	۱۵.۵	۱۴.۷	۰۰.۰	۰۰.۳	۰۰.۰	۱۰.۹	۰۰.۸	۰۰.۰	۹۵.۵	۰۰.۰	۰۰.۶	٪۴۰
۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	٪۲۰
۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	۰۰.۰	٪۱۰



نمودار ۱ نمودار مقایسه ای مناطق مهاری نمونه های مختلف عسل بر روی میکروارگانیسمهای کنترل (عسل مارمیشو: ۱، عسل نازلو: ۲، عسل دره قاسملو: ۳، عسل مرگه ور: ۴، عسل ترگه ور: ۵)



نمودار ۲ نمودار مقایسه ای مناطق مهاری نمونه های مختلف عسل بر روی میکروارگانیسمهای جدا شده از موارد بالینی. (عسل مارمیشو: ۱، عسل نازلو: ۲، عسل دره قاسملو: ۳، عسل مرگه ور: ۴، عسل ترگه ور: ۵)

حداقل غلظت مهاری (MIC) بر روی کشت میکروارگانیسمهای کنترل، نمونه های عسل شماره ۵، ۳ و ۱ دارای حداقل غلظت ۲۰٪ و نمونه های عسل شماره ۴ و ۲ نیز دارای غلظت ۵۰٪ بوده اند (جدول شماره ۲).

نتایج تاثیر نمونه های مورد آزمون عسل بر روی میکروارگانیسمهای جدا شده از موارد بالینی نشاندهنده آن است که عسل های ترگه ور، دره قاسملو، مرگه ور، مارمیشو و نازلو به ترتیب دارای بیشترین مناطق مهاری (IZ) بوده اند (نمودار شماره ۲). در هیچیک از موارد، اضافه نمودن آنزیم کاتالاز، تاثیر مهاری قابل مشاهده ای بر روی فعالیت ضد میکروبی نمونه های عسل نداشته است.

۴- بحث و نتیجه گیری

هدف از اجراء این تحقیق، بررسی پتانسیل ضد میکروبی عسلهای تجاری تولید شده در شهرستان ارومیه بصورت عام و ارزیابی مقایسه ای فعالیت ضد میکروبی این عسلها با یکدیگر بصورت خاص بوده است. این آزمون بر روی میکروارگانیسمهای کنترل و جدا شده از موارد بالینی در دو سطح تجربی و میدانی انجام گرفته است. برخی محققین را عقیده بر آنست که فعالیت ضد میکروبی عسل عمدتا در اثر خواص فیزیکی این مایع زیستی است. این خواص فیزیکی شامل: جاذب الرطوبت بودن، چسبندگی بالا، اسمولاریته بالا، اسیدیته بالا هستند [۱۱، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹]. در مقابل عده ای دیگر از پژوهشگران معتقدند که پتانسیل ضد میکروبی عسل وابسته به پراکسید هیدروژن موجود در آن است که توسط فعالیت آنزیمی ترشحات بزاقی زنبور به عسل اضافه می شود [۱۳، ۲۰، ۲۱]. یافته های مطالعه حاضر نشاندهنده آنست که مهار پراکسید هیدروژن توسط آنزیم کاتالاز نتوانسته است که مانع فعالیت ضد میکروبی نمونه های مورد آزمون عسل گردد. از این رو فعالیت ضد میکروبی نمونه های عسل مورد ارزیابی در این پژوهش وابستگی معنی داری به فعالیت پراکسید هیدروژن در آنها ندارند.

Jeddar و همکاران مدعی آن هستند که اصولا عسل در پائین تر از غلظت ۴۰٪ قادر به مهار رشد میکروبها نیست [۲۲]. یافته های ما این نظر را تأیید میکنند و در هیچیک از انواع عسلهای

هر نمونه عسل، بالاترین رقت یا حداقل غلظت مهاری -Minimal inhibition concentration (MIC) از آن نمونه محسوب میشد که میتوانست منطقه مهاری بر روی میکروارگانیسم های کنترل ایجاد کند. در اطراف گودچه های حاوی نمونه های عسل بمیزان ۵ میکرولیتر آنزیم کاتالاز Catalase (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) بصورت نقطه ای قرار داده میشد. این کار با این هدف انجام شد که مشخص شود که مهار پراکسید هیدروژن چه تاثیری بر روی فعالیت ضد میکروبی نمونه های عسل دارد. عدم وجود منطقه مهاری در کنار نقطه آنزیمی دلیل حساسیت فعالیت ضد میکروبی عسل به عملکرد این آنزیم و وابستگی آن به فعالیت پراکسید هیدروژن بوده است. آزمون ها در هر مورد حداقل سه بار تکرار شده است. پنج میکروارگانیسم جدا شده از موارد ارجاعی به بخش جراحی درمانگاه تخصصی دامپزشکی دانشگاه ارومیه، مورد ارزیابی حساسیت سنجی نسبت به نمونه های پیش گفته عسل قرار گرفتند. این میکروارگانیسم ها شامل: *Candida albicans*, *Streptococcus pyogenes*, *Aspergillus niger*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia* One مقایسه میانگین ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) way analysis of variance و با حداقل اختلاف معنی دار با $P < 0.05$ مورد پذیرش بوده است. این آزمون از طریق نرم افزار Minitab (Minitab version 10.51 xtra, State college, PA) انجام گرفت.

۳- نتایج

نتایج میانگین مناطق مهاری و حداقل غلظت مهاری نمونه های مورد ارزیابی از عسل بر روی کشت میکروارگانیسم های کنترل در جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج میانگین مناطق مهاری نمونه های مورد ارزیابی عسل بر روی میکروارگانیسمهای جدا شده از مراجعات درمانگاهی نیز در نمودار شماره ۲ آمده است.

براساس نتایج حاصل از این تحقیق به ترتیب عسل های شماره ۵ (عسل ترگه ور)، شماره ۴ (عسل مرگه ور)، شماره ۳ (عسل دره قاسملو)، شماره ۱ (عسل مارمیشو) و شماره ۲ (عسل نازلو) دارای بیشترین منطقه مهاری (IZ) بر روی کشت میکروارگانیسمهای کنترل بوده اند (نمودار شماره ۱). از نظر

نمونه داشته است و با عنایت به آنکه به اعتقاد بسیاری از محققین منشاء مواد شیمیائی موجود در عسل عمدتاً در شهد گیاهان فلور منطقه است که عسل در آنجا تولید شده است [۲۶،۲۷،۲۸]. میتوان تصور نمود که احتمالاً نوع گیاهان موجود در منطقه " ترگه ور " شهرستان ارومیه حاوی موادی با خاصیت ضد میکروبی بالاتری نسبت به سایر مناطق تولید کننده مورد بررسی میباشند. نیاز به آزمونهای تجزیه شیمیائی دقیقی است تا بتواند ماهیت این مواد را تشخیص داد.

با شناخت نوع این گیاهان و مواد شیمیائی اختصاصی موثر در خاصیت ضد باکتریایی میتوان با ایجاد مزارع ویژه به پرورش این گیاهان و تولید عسل طبی از آنها پرداخت و یا از طریق بیوتکنولوژی به سنتز صنعتی این مواد و اضافه کردن آنها به عسل و یا استفاده از آنها در تولید فراورده های مستقل داروی اقدام نمود. و بر این مبنا شاید بتوان این نوع عسلها خاص را بعنوان ماده اولیه جهت ساخت پمادها و یا صابون ها ی ضد عفونی کننده مورد استفاده قرار داد.

۵- سپاسگزاری

در اینجا از همکاران بخش بهداشت مواد غذایی و بخش جراحی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال سپاسگزاری و تشکر را داریم.

۶- منابع

- [1] Artz CP, Reiss ER. The treatment of burns. Philadelphia: WB Saunders Co, 1975; 128-9.
- [2] Hussain M.T, Karim Q.T, Tajuri S. Analysis of infection in burns wound. Burns. 1989; 15, 299-302.
- [3] Ivanowska N.D, Dimov V.B , Bankova V.S , Popov S.S : Immunomodulatory action of popolis. Influence of water derivative on compliment activity in vitro. J. Ethnopharmacol. 1995; 47, 145-147.
- [4] Edwards-Jones V, Dawson MM, Childs CA. Survey into TSS in UK Burns Units. Burns. 2000; 26:323-33.

مورد آزمون فعالیت ضد میکروبی در غلظتهای پائین تر از ۰.۴٪ مشاهده نگردیده است و حتی در برخی موارد (نمونه های شماره ۴ و ۲) حداقل غلظت مهار (MIC) برابر با ۰.۵٪ از خود نشان میدادند.

بر مبنای نتایج حاصل از این تحقیق، بالاترین و پائین ترین قدرت ضد میکروبی را به ترتیب عسل منطقه ترگه ور (نمونه شماره ۵) و عسل منطقه نازلو (نمونه شماره ۲) از خود نشان داده اند ($P < 0.05$). بنظر میاید که بسته به نوع میکروارگانیسم، نمونه های عسل واکنش ضد میکروبی متفاوتی را نشان میدهند. بگونه ای که نمونه شماره ۵ (عسل ترگه ور) در کشت استافیلوکوکوس قدرت ضد باکتریایی بیشتری نسبت به تاثیر آن در پزودوموناس و ایشریشا کلی داشته است. تاثیر مهاري نمونه های عسل بطور غیر معنی داری از نظر آماری، بر ضد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از سایر باکتریهای مورد آزمون بوده است. این موضوع با نتایج حاصل از گزارشات موجود در این زمینه مطابقت دارد [۱۲، ۱۳]. در بسیاری از ارزیابی های باکتریولوژیک روی عسل معمولاً از باکتری *Staphylococcus aureus* استفاده میشود زیرا این باکتریها به مواد ضد باکتریائی عسل حساس تر هستند [۱]. دلیل این امر به روشنی مشخص نیست. شاید علت این امر در حساسیت استافیلوکوکوس به محیط اسیدی باشد که بدلیل اسیدی بودن عسل ممکن است که مانع رشد آن شود. البته این مطلب علی رغم آنست که استافیلوکوکوس اورئوس به میزان آب فعال کمتری نسبت به سایر باکتریها برای رشد و بقاء نیاز دارد [۱۶]. فعالیت ضد میکروبی عسل بر روی میکروارگانیسم های جدا شده از موارد بالینی تنها محدود به *Klebsiella pneumoniae*، *Streptococcus pyogenes* و *Proteus mirabilis* ظاهر شده است. ظاهراً نمونه های

مورد ارزیابی عسل تاثیری بر روی میکروارگانیسم های قارچی جدا شده از موارد بالینی نداشته اند. این یافته در مغایرت با موارد گزارش شده از تاثیر مهاري عسل بر روی قارچها بویژه *Candida albicans* و *Aspergillus niger* میباشد [۱۶، ۲۳، ۲۴، ۲۵].

البته در این مطالعه به تجزیه شیمیائی مواد ضد میکروبی موجود در عسل پرداخته نشده است ولی با توجه به این واقعیت که عسل منطقه ترگه ور قدرت ضد میکروبی بالاتری نسبت به سایر

- [18] Efem.S.E.E. Clinical observation on the wound healing properties of honey. *Br. J. Surg.* 1991; 78 : 679-681.
- [19] Kaufman.T, Eichenlaub.E.H, Angel.M.F. Topical acidification promotes healing of experimental partial thickness skin burns : A randomized double-blind preliminary study. *Burns.* 1985; 12:84-90.
- [20] Hyslop.P.A, Hinshaw.D.E, Scraufstatter.I.U. Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic :Implications for host defense. *Free. Radic. Biol. Med.* 1995;19(11) : 31-37.
- [21] Morse.R.A. The antibiotic properties of honey. *Pan – Pacific Entomologist.* 1986, 62 , 337 – 370 .
- [22] Jeddar.A , Khasany A , Ramsaroop VG , Bhamjei A , Haffejee IE , et al. The antibacterial action of honey : an in vitro study. *S. Afr. Med. J.* 1985; 67 ; 257 – 8.
- [23] Ceyhan, N. and Ugur.A. Investigation of in vitro Antimicrobial Activity of Honey. *Riv. Biol. / B. Forum.* 2001; 94(2): 363-371.
- [24] Efem, S. E. E.; Udoh, K. T.; Iwara, C. I. The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. *Infection.* 1992; 20 (4): 227-229.
- [25] Molan, P. C.; Cooper, R. A. Honey and sugar as a dressing for wounds and ulcers. *Tropical. Doctor.* 2000; 30 : 249-250.
- [26] Allen K L, Hutchinson.G, Molan.P.C. The potential for using honey to treat wounds infected with MRSA and VRE. *First World Wound Healing Congress, Melbourne, Australia.* 2000, 24-25
- [27] Molan P C. The Antibacterial Activity of Honey. 2. Variation in the Potency of the Antibacterial Activity. *Bee World.* 1992; 73, 5-28 and 59-76.
- [28] Russel.K.M, Molan.P, Wilkins.A.L, Holland.P.T. Identification of some antibacterial constituents of NewZealand manuka honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1988, 38 , 10-13 .
- [5] Tovey.F . Editorial . Honey and suger as dressing for wounds and ulcers. *Tropical. Doctor.* 2000; 30 : 1.
- [6] Forrest.R.D. Development of wound theraoy from dark ages to the present. *J. Roy. Soc. Med.* 1982 ; 75:268-273.
- [7] Zumla, A., Lulat. A. Honey - a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine.* 1989; 82: 384-385.
- [8] Al Somal N, Coley K E, Molan P C, Hancock BM. Susceptibility of Helicobacter pylori to the Antibacterial Activity of Manuka Honey. *J. Royal Soc. Med.* 1994; 87, 9-12.
- [9] Efem, S. E. E. Recent advances in the management of Fournier's gangrene: Preliminary observations. *Surgery.* 1993; 113 (2): 200-204.
- [10] Molan, P. C. The Antibacterial Activity of Honey. 1. The Nature of the Antibacterial Activity. *Bee World.* 1992; 73, 5-28.
- [11] Subrahmanyam.M. Topical application of honey in treatment of burns. *Br. J. Surg.* 1991; 78:497-498.
- [12] Cooper .R.A . The inhibition of bacteria isolated from chronic venous leg ulcers by honey. *Journal of Medical Microbiology.* 1998, 47 , 1140-1146.
- [13] Molan, P. C. The role of honey in the management of wounds. *Journal of Wound Care* 1999; 8 (8): 423-426.
- [14] Cooper .R.A, Molan . P.C. The use of honey as an antiseptic in managjng Pseudomonas infection. *J. Wound. Care.* 1999, 8 : 161-4.
- [15] Cooper .R.A, Molan . P.C, Harding.K.G. Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds. *J. Roy. Soc. Med.* 1999; 92 : 283-285.
- [16] Mathews.K.A, Binning.A.G. wound management using honey. *Compend . Con. Edu.* 2002; 24 (1): 53-59.
- [17] Phillips, C. E. Honey for burns. *Gleanings in Bee Culture.* 1993, 61 : 284.