DOI: http://dx.doi.org/10.22104/jift.2014.46

بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره اتانولی پوسته و مغز هسته میوه پسته‌وحشی (*Pistacia khinjuk Stocks*)

سید حمید مرتضوی[1*]، صدیف آزادمرد دمیرچی[2]، محمود صوتی[3]، رزاق محمودی[4]، فیروزه صفائیان[5]، سجاد مرادی[6]

1.دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
2.دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
3.استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
4. استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز
5. کارشناس، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
6. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: 92/11/20، تاریخ پذیرش: 93/3/31)

چکیده

در این پژوهش اثرات ضدمیکروبی عصاره اتانولی پوسته و مغز هسته میوه پسته‌وحشی گونه خینجوک علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، عصاره اتانولی میوه پسته‌وحشی به روش غوطه-وری به‌دست آمد. با استفاده از روش رقیق‌سازی آگار و رقیق‌سازی در لوله، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها (MBC) تعیین گردید. هم‌چنین قطر هاله عدم رشد از آزمون انتشار در آگار با استفاده از دیسک تعیین شد. کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با استفاده از محلول 0/5 استاندارد مک فارلند برابر با حدود $1/5\times10^{8}$ CFU/ml تنظیم گردید. از محیط کشت‌های نوترینت آگار و نوترینت براث برای آزمایش‌های رقت‌سازی در لوله استفاده شد. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی پسته‌وحشی، اثرات ضدمیکروبی علیه هر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی دارد. میزان MIC و MBC برای هر دو باکتری در عصاره پوسته کم‌تر از عصاره مغز هسته بود. هم‌چنین در روش رقیق‌سازی در آگار عصاره پوسته تاثیرات ضدمیکروبی بهتری نسبت به مغز هسته ار خود نشان داد. قطر هاله عدم رشد برای باکتری اشرشیاکلای بیش‌تر از استافیلوکوکوس اورئوس بود. هم‌چنین قطر هاله عدم رشد عصاره پوسته بیش‌تر از عصاره مغز هسته برای هر دو باکتری به‌دست آمد. بیش‌ترین تاثیر در جلوگیری از رشد باکتری‌ها مربوط به عصاره پوسته علیه باکتری اشریشیاکلای است. اثرات ضدمیکروبی عصاره اتانولی میوه پسته‌وحشی علیه باکتری گرم منفی بیش‌تر از باکتری گرم مثبت مشاهده شد که می‌تواند به‌دلیل مقاومت لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت باشد.

واژه‌های کلیدی: khinjuk ، پسته‌وحشی، ضدمیکروبی، حداقل غلظت بازدارندگی، انتشار دیسک.

* مسئول مکاتبات: Hamidmort1@yahoo.com

1- مقدمه

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در اکثر کشورها برای درمان بیماری‌ها و جلوگیری از عفونت‌ها بسیار معمول می‌باشد و عواقب بعد از آن به خاطر سنتزی و شیمیایی بودن آن و مقاومت بدن نسبت به آنتی‌بیوتیک می‌تواند سلامت مردم جامعه را مورد تهدید قرار دهد از این رو، امروزه استفاده از ترکیبات گیاهی برای درمان بیماری-ها و عفونت‌ها به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه مورد توجه قرار گرفته است. هم‌چنین علاوه‌بر ویژگی‌های ضدمیکروبی گیاهان و ترکیبات طبیعی موجود در آن، بعضی از این گیاهان دارای خواص تغذیه‌ای و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که باید در رژیم غذایی افراد جامعه مورد توجه قرار بگیرد. اکثر گیاهان وحشی (کوهی) دارای چنین ویژگی‌هایی بوده و ایران به‌عنوان یکی از مناطق اصلی رویشگاه‌های این گیاهان به‌خصوص در دامنه‌های رشته‌کوه زاگرس محسوب می‌شود [1].

پسته‌وحشی گونه خینجوک در مکان‌هایی با عرض جغرافیایی 2000 – 700 متر بالای سطح دریا پراکنده شده است. این گیاه در زبان فارسی به نام خنجوک[1] یا کلخنگ[2] شناخته شده است. علاوه‌بر این، میوه این گیاه به‌عنوان یک میوه خوراکی کوهی (وحشی) مورد استفاده است. قاسمی پیربلوطی و همکاران (2011) در آنالیز اسانس میوه پسته‌وحشی گونه خینجوک گزارش دادند که ترکیباتی از جمله α-pinene، phellandrene، terpinolene و... در ترکیب این میوه وجود دارد که این ترکیبات تاثیرات ضدمیکروبی علیه گونه‌های مختلف باکتری‌ها دارند [2]. دو ترکیب α-pinene و terpinolene جزء ترکیبات اصلی با ویژگی‌های ضدمیکروبی بالا هستند [3و4].

در این پژوهش سعی بر آن است تا با گزارش اطلاعات کاملی از ویژگی‌های ضدمیکروبی پوسته و هسته میوه پسته‌وحشی گونه خینجوک، این گونه مورد توجه محققین برای پژوهش‌های توسعه‌ای و کاربردی بعدی قرار گیرد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- شناسایی گونه گیاهی پسته‌وحشی

برای شناسایی گونه گیاهی پسته مورد مطالعه در این پژوهش، میوه و برگ درخت پسته در شهرستان باشت استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری شد. میوه درخت در سایه خشک گردید و برگ درخت در بین دو ورقه کاغذی قرار گرفت و هر روز با انجام عمل هوادهی در بین دو ورقه، خشک شد. سپس نمونه‌ها به هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (Tbz-Fph) منتقل شد. گونه مورد مطالعه با نام علمی *Pistacia khinjuk Stocks* شناسایی و با شماره 733 در هرباریوم نگه‌داری می‌شود.

2-2- آماده سازی نمونه‌ها

در این پروژه آزمون‌ها به صورت جداگانه بر روی پوسته و مغز هسته میوه پسته‌وحشی انجام شد. در ابتدا پوسته میوه از هسته جدا شد سپس هسته‌ها را خرد کرده و مغز داخل آن جداسازی گردید. پوسته و مغز هسته در دمای 18°C- تا زمان انجام آزمون‌ها نگه‌داری شد.

2-2-1- آماده سازی پودر چربی گرفته پوسته و هسته پسته‌وحشی

جهت استخراج عصاره اتانولی از پوسته و مغز هسته پسته‌وحشی به دلیل اینکه دارای مقادیر بالایی از روغن می‌باشد ابتدا باید با هگزان به روش سرد روغن از نمونه استخراج شود سپس عصاره گیری انجام شود. بدین منظور نمونه‌ها با هگزان با نسبت 1:5 (وزنی-حجمی) مخلوط شده و به مدت 2 ساعت روی هم‌زن با دور 400 rpm در دمای اتاق قرار گرفتند. در ادامه مخلوط حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره 1 با استفاده از پمپ خلأ صاف شده و نمونه‌های روی کاغذ صافی در آون 40°C خشک شدند [5].

2-3- عصاره‌گیری از پودر چربی گرفته پسته‌وحشی

جهت عصاره‌گیری از حلال اتانول 80 استفاده شد. پودرهای پوسته و مغز هسته در حلال اتانول (نسبت پودر و حلال 6:1 وزنی حجمی) مخلوط گردید و در شیکر با دور 400 rpm به مدت 2 ساعت در دمای اتاق قرار گرفت، پس از آن توسط کاغذ صافی واتمن شماره 1صاف گردید، مواد باقیمانده در کاغذ صافی با مقداری اتانول شستشو داده‌شد تا عصاره‌گیری

1. Khenjuk
2. Kelkhong

به‌طور کامل انجام شود. سپس مخلوط فیلتر شده جهت تبخیر حلال در پلیت شیشه‌ای ریخته شد و در آون 40°C تا زمان خشک شدن کامل عصاره قرار گرفت. پودر عصاره‌های به‌دست آمده از نمونه، با کاردک از پلیت جدا شد و پودرها تا زمان انجام آزمایش در دمای 18- °C قرار گرفتند [6].

2-3- آزمون‌های میکروبی

جهت ارزیابی ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره اتانولی پوسته و مغز هسته پسته‌وحشی، MIC [1] و MBC [2]عصاره‌ها با روش رقیق‌سازی در لوله[3] [9و10] و هم‌چنین روش رقت‌سازی آگار[4] [13] تعیین شد. برای تعیین خواص ضدمیکروبی از دو باکتری شاخص استافیلوکوکوس اورئوس به‌عنوان گرم مثبت و دیگری اشریشیاکلای به‌عنوان گرم منفی استفاده شد. هم‌چنین میزان هاله‌ی عدم رشد باکتری‌ها با روش انتشار در آگار با استفاده از دیسک[5] [11و12] مورد ارزیابی قرار گرفت.

2-4- باکتری‌های مورد مطالعه

باکتری‌های مورد مطالعه اشریشیاکلای O157:H7 با شماره ATCC10536 و استافیلوکوکوس اورئوس با شماره ATCC25923 بود که به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید.

2-5- تهیه سوسپانسیون باکتریایی

آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری *(استافیلوکوکوس اورئوس*[6] و *اشریشیاکلای*[7]*)* ابتدا در شرایط سترون باز و به محیط کشت مایع NB (Nutrient broth) انتقال و به مدت 24 ساعت در 37°C انکوبه شد. سپس جهت اطمینان از خالص بودن باکتری از محیط نوترینت براث یک شبه به‌صورت خطی بر روی محیط کشت انتخابی- افتراقی کشت داده‌شد و به مدت 48 ساعت در 37°C انکوبه گردید. سپس از کلنی باکتری یک لوپ برداشت کرده و 24 ساعت قبل از هر آزمون آن را به نوترینت براث تلقیح نموده و به همین صورت برای هر آزمون جهت بررسی اثرات ضدمیکروبی کشت تازه 24 ساعته تهیه گردید. با استفاده از سمپلر یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی 24 ساعته به لوله‌ی حاوی نوترینت براث سترون انتقال داده و سپس کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده، با استفاده از استاندارد مک فارلند تنظیم شده با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج 625 نانومتر با میزان جذب 0/13–0/08 (برابر با $1/5\times10^{8}$ CFU/ml)، به صورت چشمی مقایسه گردید. از محیط کشت نوترینت براث برای آزمایش رقیق‌سازی در لوله و از محیط کشت مولر هینتون آگار برای روش‌های انتشار در آگار با استفاده از دیسک و رقت‌سازی در آگار استفاده شد. کلیه محیط‌های کشت بر اساس دستور کارخانه سازنده مرک تهیه و با استفاده از دستگاه اتوکلاو سترون گردید [7].

2-6- تهیه غلظت‌های عصاره

از اتانول 70 درصد برای حل کردن پودر عصاره استفاده گردید. در ابتدا از پودرهای به‌دست آمده از عصاره‌گیری غلظت 50 میلی‌گرم/میلی‌لیتر تهیه شد. سپس محلول عصاره اتانولی به‌دست آمده با غلظت مشخص از فیلترهای 0/45 میکرومتر عبور داده‌شد تا از عدم آلودگی میکروبی عصاره‌ها اطمینان حاصل شود. سترون کردن عصاره برای پوسته و مغز هسته پسته‌وحشی به‌طور جداگانه انجام شد. عصاره‌های فیلتر شده در دمای 18°C- در لوله‌های آزمایش سترون تا زمان انجام آزمایش نگه‌داری شدند [8].

2-7- بررسی اثرات ضدمیکروبی

2-7-1- روش رقت‌سازی در لوله

با استفاده از روش رقت‌سازی در لوله حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی ماده ضدمیکروبی (MBC) تعیین گردید. برای تعیین MIC، برای هر عصاره (پوسته و مغز هسته) از یک سری 12 تایی از لوله‌های آزمایش استفاده شد. 9 لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله به‌عنوان کنترل مثبت (حاوی عصاره رقیق شده به علاوه محیط کشت) و یک لوله به‌عنوان کنترل منفی (حاوی

1.Minimal Inhibitory Concentration
2. Minimal Bactericidal Concentration
3. Broth Macro dilution susceptibility assay
4. Agar dilution
5. Disk diffusion
6. *Staphylococcus aureus*
7. *Escherichia coli*

سوسپانسیون میکروبی به علاوه محیط کشت) و هم‌چنین یک لوله حاوی اتانول، سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت جهت اطمینان از رشد باکتری‌ها در محیط حاوی اتانول بکار رفته برای عصاره‌گیری استفاده شد. هر عصاره (غلظت اولیه عصاره 50 میلی‌گرم/میلی‌لیتر است که با وارد کردن 1 میلی‌لیتر از عصاره به لوله اول که حاوی1 میلی‌لیتر محیط کشت است غلظت 25 میلی‌گرم/میلی‌لیتر به‌دست می‌آید) با رقت‌های مختلف از لوله شماره یک با غلظت 25 میلی‌گرم/میلی‌لیتر تا لوله شماره 9 با غلظت 0/097 میلی‌گرم/میلی‌لیتر به‌دست آمد به این صورت که برای لوله اول 1 میلی‌لیتر از عصاره با غلظت 50 میلی‌گرم/میلی‌لیتر با 1 میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث رقیق‌سازی شد و به همین ترتیب 1 میلی‌لیتر از لوله اول برداشته و به لوله دوم که حاوی 1 میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث بود انتقال داده و این کار تا لوله شماره 10 انجام گرفت و از لوله آخر 1 میلی‌لیتر برداشته و بیرون ریخته شد که در نهایت هر لوله نصف رقت لوله قبلی شد. سپس به لوله‌ها به جز لوله شماره 10 (کنترل مثبت) به میزان 50 میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی که دارای CFU/ml $1/5\times10^8$ باکتری بود انتقال داده‌شد. رقت‌سازی عصاره‌ها برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلای به صورت جداگانه انجام شد. همه لوله‌های آزمایش برای مدت 24 ساعت در°C 37 قرار داده‌شد. پس از طی زمان انکوباسیون لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی گردیدند. از همه لوله‌هایی که در آن‌ها عدم رشد باکتری مشاهده شده بود، نمونـــه برداری و جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها، به روش سطحی کشت داده‌شد. بدین منظور 100 میکرولیتر از لوله‌هایی که عدم رشد باکتری را نشان می‌دادند بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته شد و با پخش کننده بر روی محیط کشت پخش شد. بعد از انکوبه کردن به مـــدت 24 ساعت، پلیت‌های کشت داده‌شده از نظر وجود رشد میکروبی کنترل شد. لوله‌ای که حاوی کم‌ترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوطه عدم رشد باکتری مشاهده گردید، به‌عنوان MBC آن عصاره در نظر گرفته شد [9و10].

2-7-2- روش انتشار در آگار با استفاده از دیسک

جهت تهیه دیسک‌های مورد آزمایش، هر دیسک با قطر 6/4 میلی‌متر از عصاره‌های پوسته و مغز هسته تهیه شده با غلظت mg/ml 50اشباع گردیدند. سپس دیسک‌ها به مدت 1 ساعت روی صفحه مشبک سترون قرار داده‌شد تا عصاره به‌طور کامل جذب دیسک شود (اگر دیسک‌ها بعد از آغشته سازی، مستقیماً درون پلیت گذاشته شوند مواد آغشته به دیسک در محیط کشت پخش می‌شوند و نتیجه مطلوبی به‌دست نمی‌آید). در هر سری آزمایش یک دیسک حاوی حلال اتانول 70 درصد به‌عنوان کنترل منفی بکار برده شد. جهت مقایسه‌ی هاله‌های عدم رشد از آنتی‌بیوتیک وانکومایسین (غلظت 30میلی‌گرم در دیسک) و آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین (غلظت 5 میلی‌گرم در دیسک) به‌ترتیب جهت جلوگیری از رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلای استفاده شد. در این آزمایش‌ها از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده گردید. بعد از ریختن محیط کشت درون پلیت و بسته شدن آن، 100 میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی دارای cfu/ml 10^8 روی محیط کشت ریخته و با پخش‌کننده در تمام نقاط محیط کشت پخش شد. سپس دیسک‌های تهیه شده از عصاره‌ها با غلظت‌های مختلف در فاصله مناسب از یکدیگر کاشته شدند و برای مدت 24 ساعت در گرم‌خانه 37 درجه سانتیگراد نگه‌داری شدند. سپس قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری و میانگین مربوطه گزارش گردید [11و12].

2-7-3- روش رقت‌سازی در آگار

ابتدا غلظت‌های عصاره پس از پخش کردن و بستن محیط‌ها (غلظت‌های نهایی بعد از مخلوط کردن محیط کشت با عصاره محاسبه گردید) در دمای آزمایشگاه و خشک شدن آن‌ها به‌طور کامل، از سوسپانسیون‌های میکروبی معادل 0/5 مک فارلند آماده شده، 10 میکرولیتر برداشته و بر روی محیط‌های کشت که حاوی رقت‌های مختلفی از عصاره هستند به صورت نقطه‌ای کشت داده‌شد. از ترکیب حلال DMSO و محیط کشت به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. پس از کشت باکتری بر روی این پلیت‌ها، آن‌ها در انکوباتور قرار گرفتند و پس از 24 ساعت نتیجه را با

بررسی کلنی‌های تشکیل شده در پلیت‌های مختلف حاوی رقت‌های سریالی بررسی کرده و پایین‌ترین رقتی که رشد میکروارگانیسم‌ها را در محیط جامد مهار کرده، به‌عنوان MIC در نظر گرفته می‌شود. در این تکنیک، مهار رشد با عدم تشکیل کلنی در روی محیط جامد مشخص می‌گردد [13].

3- نتایج و بحث

3-1- حداقل غلظت بازدارندگی

در آزمایشات رقت‌سازی در لوله حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌ها تعیین شد. روش رقت‌سازی در لوله برای تعیین خواص ضدمیکروبی روش دقیق و بسیار حساس می‌باشد و تاکنون برای تعیین ارزیابی خواص ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی استفاده شده است [14]. حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظتی از عصاره است که می‌تواند به میزان 90 درصد از رشد باکتری‌ها جلوگیری کند. نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های پوسته و هسته پسته‌وحشی در جدول 1 نشان داده‌شده است.

حداقل غلظتی از عصاره‌ها که موجب جلوگیری از رشد 90 درصد از باکتری‌ها شد مربوط به باکتری اشریشیاکلای و عصاره پوسته است و این غلظت برابر 1/56 میلی‌گرم در میلی‌لیتر است (جدول1). مقایسه نتایج MIC شبیه نتایج حاصل از قطر هاله‌های مهار رشد باکتری‌ها است به‌طوری‌که تاثیر عصاره پوسته نسبت به عصاره هسته بیش‌تر است و هم‌چنین حساسیت باکتری گرم منفی اشریشیاکلای نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس بیش‌تر است[8]. میزان MIC عصاره برگ درخت خینجوک برای باکتری‌ها حدود 0/5–0/02 میلی‌گرم/میلی‌لیتر و برای قارچ‌ها حدود 0/4–0/06 میلی‌گرم/میلی‌لیتر است [15]. صمغ ترشحی از درخت خینجوک تاثیر مثبتی در جلوگیری از رشد باکتری‌ها خصوصاً باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارد که حداقل غلظت بازدارندگی آن 125 میلی‌گرم/میلی‌لیتر است [16]. گونه خینجوک همانند سایر گونه‌های پسته‌وحشی دارای فعالیت‌های ضدمیکروبی قابل توجهی می‌باشد [15].

3-2- حداقل غلظت کشندگی باکتریایی

حداقل غلظت کشندگی باکتریایی، حداقل غلظتی از عصاره است که باعث جلوگیری از رشد 99/9 درصد از رشد باکتری‌ها می‌شود. نتایج حاصل از حداقل غلظت کشندگی باکتریایی عصاره‌های پوسته و مغز هسته پسته‌وحشی در جدول 2 نشان داده‌شده است.

میزان MBC برای باکتری اشریشیاکلای کم‌تر از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است که به‌دلیل دیواره پپتیدوگلیکان موجود در دیواره استافیلوکوکوس اورئوس است و مقاومت

جدول(1) حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره پوسته و هسته پسته‌وحشی گونه خینجوک

میکروارگانیسم	عصاره	
	پوسته	هسته
اشریشیاکلای	1/56*	6/25
استافیلوکوکوس اورئوس	3/12	12/5

* میلی گرم در میلی لیتر

جدول(2) حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) عصاره پوسته و هسته پسته‌وحشی گونه خینجوک

میکروارگانیسم	عصاره	
	پوسته	هسته
اشریشیاکلای	12/3*	12/5
استافیلوکوکوس اورئوس	6/25	25

* میلی گرم در میلی لیتر

بیش‌تری از خود نشان می‌دهد [8]. پوسته پسته‌وحشی تاثیر بیش‌تری روی کشندگی باکتریایی نسبت به هسته از خود نشان داد. بالاترین غلظت MBC مربوط به عصاره هسته پسته‌وحشی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است و برابر 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. پایین‌ترین غلظت MBC مربوط به عصاره پوسته پسته‌وحشی علیه باکتری اشریشیاکلای است و برابر 3/12 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (جدول 2).

خواص بازدارندگی از رشد میکروب‌ها مربوط به ترکیبات فنولی عصاره‌ها است که محلول در حلال‌های قطبی می‌باشد. پسته‌وحشی در گزارش پژوهش‌های اخیر در مورد ترکیبات موجود در عصاره و اسانس این گیاهان دارای ترکیبات فنلی و تری‌ترپنوئیدها است [17و18]. ترپن‌ها یا ترپنوئیدها ترکیبات فعالی در برابر باکتری‌ها هستند [19]. نتایج حاصل از تجزیه شیمیایی عصاره پسته‌وحشی گونه خینجوک توسط قاسمی پیربلوطی و همکاران (2011) نشان داد این ترکیبات شامل α-pinene 15/28 درصد، phellandrene 52/33 درصد و ... می‌باشد.این ترکیبات تاثیرات ضدمیکروبی علیه گونه‌های مختلف باکتری‌ها دارند [2]. دو ترکیب α-pinene و terpinolene جزء ترکیبات اصلی با ویژگی‌های ضدمیکروبی بالا هستند [3و4].

3-3- انتشار در آگار با استفاده از دیسک

نتایج مربوط به قطر هاله‌ی عدم رشد در جدول 3 نشان داده‌شده است.قطر دیسک‌های مورد استفاده 6/4 میلی‌متر بوده است.نتایج حاصل از آزمون انتشار در آگار با استفاده از دیسک نشان داد که پوسته پسته‌وحشی نسبت به مغز هسته آن اثرات ضد میکروبی بیش‌تری دارد به‌طوری‌که بیش‌ترین قطر هاله مهار رشد مربوط به عصاره پوسته برای باکتری اشریشیاکلای، 16 میلی‌متر است درحالی‌که این مقدار برای مغز هسته 12 میلی‌متر بود. هم‌چنین قطر هاله مهار رشد عصاره پوسته برای استافیلوکوکوس اورئوس 13 میلی‌متر و برای مغز هسته 9 میلی‌متر است (جدول 3). برای هر دو نوع میکروب عصاره پوسته تاثیر بیش‌تری نسبت به عصاره مغز هسته از خود نشان داده است و این اختلاف معنی‌دار ($p\leq 0/05$) می‌باشد. ترکیبات فنلی نقش مهمی در جلوگیری از رشد باکتری‌ها دارد که تفاوت در تاثیر این ترکیبات به نوع ترکیبات فنولی، غلظت ترکیبات فنلی، روش عصاره‌گیری، حلال عصاره‌گیری و ... بستگی دارد [8]. هم‌چنین تاثیر ترکیبات ضدمیکروبی عصاره‌ها نسبت به باکتری گرم منفی اشریشیاکلای بیش‌تر از باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس است که احتمال می‌رود به دلیل لایه‌ی پپتیدوگلیکان موجود در دیواره‌ی باکتری‌های گرم مثبت باشد. برای مقایسه تاثیرات ضدمیکروبی عصاره‌ها از آنتی‌بیوتیک Vancomycin علیه استافیلوکوکوس اورئوس و آنتی‌بیوتیک Rifampicin علیه اشریشیاکلای استفاده شد. قطر هاله‌های مهار رشد آنتی‌بیوتیک‌ها از عصاره‌ها بیش‌تر است (جدول 3). بهروز

جدول(3) میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی پوسته و هسته پسته‌وحشی

عصاره	میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد(میلی‌متر)	
	اشریشیاکلای	*استافیلوکوکوس اورئوس*
پوسته	16±0/15[c]	13±0/3[d]
هسته	12±0/2[d]	9±0/2[e]
اتانول 70 درصد	-	-
Vancomycin	-	18±0/2[b]
Rifampicin	20±0/4[a]	-

حروف لاتین غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری ($p\leq 0/05$) می‌باشد.
خط تیره به معنای عدم تشکیل هاله مهار رشد می‌باشد.
غلظت عصاره‌ها 50 mg/ml و غلظت وانکومایسین و ریفامپیسین به ترتیب 30 و 5 میلی‌گرم در دیسک است.

و همکاران (2003) ویژگی‌های ضدمیکروبی صمغ درخت خینجوک را ارزیابی کردند و میزان قطر هاله عدم رشد را برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس 8 میلی‌لیتر بیان کردند. هم‌چنین قطر هاله عدم رشد عصاره بنه (P. atlantica) برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس 16/5 میلی‌متر و برای اشرشیاکلای 9/5 میلی‌متر است [20]. عصاره پوسته بنه (P. atlantica) دارای قطر هاله 18 میلی‌متر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است [21].

4-3- رقیق‌سازی در آگار

غلظت‌های نهایی به‌دست آمده در پلیت در محدوده 20-0/62 میلی‌گرم در میلی‌لیتر به صورت دو برابر به‌دست آمد. جدول 4 نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی میکروب‌ها در محیط کشت جامد را نشان می‌دهد. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که عصاره پوسته خینجوک دارای اثرات ضدمیکروبی بهتری نسبت به مغز هسته می‌باشد. به‌طوری که در غلظت 2/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره پوسته هیچ کلنی بر روی محیط کشت‌ها برای باکتری اشریشیاکلای مشاهده نشد. چنین تاثیری برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت 5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد (جدول4).

عصاره مغز هسته تاثیرات ضدمیکروبی ضعیف‌تری نسبت به پوسته از خود نشان داد که می‌تواند به‌دلیل کم‌تر بودن ترکیبات فنلی هسته نسبت به پوسته باشد. هم‌چنین پوسته به‌دلیل نقش حفاظتی خود در مقابل حشرات و مواد خارجی دارای تاثیر بهتری نسبت به هسته می‌باشد. روش رقیق‌سازی در آگار روشی بسیار مناسب و سریع جهت بررسی تاثیرات ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهان می‌باشد و کارایی بهتری نسبت به سایر روش‌ها دارد.

4-نتیجه گیری

میوه پسته‌وحشی علاوه‌بر گزارش های مبنی بر ویژگی آنتی‌اکسیدانی قوی، از خود فعالیت های ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد. پوسته میوه به‌دلیل نقش حفاظتی دارای اثرات ضدمیکروبی بیش‌تری نسبت به مغز هسته میوه است. در این میان حساسیت باکتری اشریشیاکلای بیش‌تر از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود. پسته‌وحشی به‌عنوان میوه‌ای ارزان و مفید به لحاظ تغذیه‌ای و هم‌چنین دارای خواص ضدمیکروبی باید در رژیم غذایی مورد توجه قرار گرفته و مطمئنا پژوهش‌های آتی در این کاربرد موثر خواهد بود.

جدول(4) نتایج حداقل غلظت بازدارندگی در محیط جامد حاوی عصاره پوسته و هسته خینجوک

باکتری	عصاره	
	پوسته	هسته
اشریشیاکلای	2/5*	10
استافیلوکوکوس اورئوس	5	20

*میلی‌گرم در میلی‌لیتر

منابع

[1] Ghasemi Pirbalouti, A., Aghaee, K. (2011). Chemical composition of essential oil of *Pistacia khinjuk* Stocks grown in Bakhtiari Zagross mountains, Iran. *Electronic Journal of Biology*, 7, 67-69.

[2] Delazar, A., Reid, R.G., Sarker, S.D. (2004). GC-MS Analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* VAR. *mutica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(1), 24-27.

[3] Raman, A., Weir, U., Bloomfield, Pistacia atlantica VAR. mutica. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(1), 24-27.

[3] Raman, A., Weir, U., Bloomfield, S.F. (1995). Antimicrobial effects of tea tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

epidermidis and P*ropionibacterium acnes. Appl. Microbial*, 21, 242-245.

[4]Carson, C.F., Riley, T.V. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleca alternifoli*. *Journal Appl. Bacteriol*, 78, 264-269.

[5] آزادمرد دمیرچی، ص. (1389). شیمی و تجزیه روغن‌ها و چربی‌های خوراکی. انتشارات عمیدی، تبریز.

[6] حاجی مهدی‌پور، ه.؛ خانوی، م.؛ شکرچی، م.؛ عابدی، ز.؛ پیرعلی همدانی، م. (1388). بررسی بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی موجود در گیاه سرخارگل. فصلنامه گیاهان دارویی، سال هشتم، دوره4، جلد 32، 152-145.

[7] جلالی، م.؛ عابدی، د.؛ قاسمی دهکردی، ن.؛ چهارمحالی، ا. (1385). بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی تعدادی از گیاهان دارویی علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز. دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دوره 8، شماره 3، 33-25.

[8] Das, K., Tiwari, R. K. S., Shrivastava, D. K., (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 104-111.

[9] Vanden, D.A., Vlietinck, A.J., In Dey, P.M., Harborne, J.B. (1991). Methods in plant biochemistry: screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. London: Academic Press, 47-69.

[10] Sindambiwe, J.B., Calomme, M., Cos, P., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A. (1999). Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activites. *Journal Ethnopharmacol*. 65(1), 71-77.

[11] Baner, A.W., Kirby, W.M.M., Sherries, J.C., Truck, M. (1991). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol*, 45, 493-496.

[12] Mangena, T., Muyima, N.Y. (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of Artemisia afra, Pteronia incana and Rosmarinus officinalis on selected bacteria and yeast strains. *Lett Appl Microbiol*. 28(4), 291-296.

[13] Gradwohl, R.B.H., Sonnenwirth, A.C., Jarett, L. (1980). Clinical laboratory methods and diagnosis. Mosby Company: St Louis, 267p.

[14] Scorzoni, L., Benaducci, T., Almeida, A.M.F., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Mendes-Giannini, M.J.S. (2007). Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts Candida spp and Cryptococcus sp. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 25-34.

[15] Taran, M., Sharifi, M., Azizi, E., Khanahmadi, M. (2010). Antimicrobial activity of the leaves of *Pistacia khinjuk*. *Journal of Medicinal plants*, 9, 81-85.

[16] Bahrouz, M.A., Sirwan, H.Sh. (2003). The antibacterial activity of pistacia khinjuk resionous exudate. *Journal of Zankoy Sulaimani*, 6, 75-81.

[17]Yalpani, M., Tyman, J.U.P. (1983). The phenolic acids of Pistachia vera. *Phytochemistry*, 22, 2263-2266.

[18] Marner, F.J., Freyer, A., Lex, J. (1991). Triterpenoids from gum mastic: The resin of *Pistacia lentiscus. Phytochemistry*, 30, 3709-3721.

[19]Cowan, M.M. (1999). Plants Products as Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews*, 4, 564-582.

[20] Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Kadifkova Panovska, T. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and *Pistacia* atlantica extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2, 22-28.

[21] Malekzadeh, F. (1974). An antimicrobial compound in two *Pistacia* species. *Mycopathologia et Mycologia applicata*, 54, 73-77.