

Izabela Steinka

OCENA ZDOLNOŚCI HAMOWANIA WZROSTU *S. AUREUS* PRZEZ SOKI POZYSKANE Z ANANASÓW I MANDARYNEK

Katedra Towaroznawstwa i Zarządzania Jakością
Akademii Morskiej w Gdyni
Kierownik: prof. dr hab. P. Przybyłowski

*Soki pozyskiwane z ananasów i mandarynek z uwagi na istotną rolę w profilaktyce chorób nowotworowych powinny być ocenione także jako źródło substancji o charakterze antydrobnoustrojowym. Badania soków wykazały znaczącą różnicę we właściwościach biostatycznych w zależności od gatunku owoców. Sok z mandarynek nie wykazywał aktywności w hamowaniu wzrostu *S. aureus*. Sok pozyskiwany z ananasa powodował dziesięciokrotne zmniejszenie liczby komórek tych bakterii po 2 godz. oddziaływania.*

Słowa kluczowe: gronkowce, hamowanie wzrostu, sok, ananasy, mandarynki.
Key words: staphylococci, inhibition of growth, juice, pineapple, mandarin.

Wśród różnych surowców pochodzenia roślinnego bogatym źródłem substancji o charakterze antybiotycznym i antyoksydacyjnym są soki wielu owoców. Dotychczasowe badania potwierdziły znaczną skuteczność grejpfrutów w hamowaniu wzrostu komórek gronkowców, a także soku ananasa w hamowaniu wzrostu pałeczek jelitowych takich jak *E. coli* i *Salmonella* oraz bakterii z rodzaju *Streptococcus* (1–6). O ile istnieje dostateczna liczba danych na temat aktywności antynowotworowej i biostatycznej ananasów, o tyle niewiele jest danych na temat właściwości biostatycznych mandarynek (7). Mandarynki zawierają znaczne stężenia flawonów takich jak tengerytyna i nobilityna, którym przypisywane jest silne działanie w hamowaniu komórek nowotworowych, a także działanie antyoksydacyjne (8, 9). Potwierdzenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków zawartych w tych owocach stanowiłoby dodatkowy argument zastosowania mandarynek w profilaktycznych dietach antynowotworowych. Dotychczasowe badania nad właściwościami biostatycznymi mandarynek wykazały m.in. aktywność olejowych frakcji z pestek tych owoców w hamowaniu grzybów, co może sugerować ich zdolność do hamowania rozwoju również innych drobnoustrojów (10).

Wśród mikroorganizmów w stosunku do których poszukuje się skutecznych substancji hamujących ich wzrost na szczególną uwagę zasługują antybiotykooporne szczepy *S. aureus*, izolowane z coraz liczniejszej grupy środków spożywczych. Oporność szczepów należących do tego gatunku bakterii na wiele rodzajów antybiotyków determinuje konieczność poszukiwania alternatywnych możliwości hamowania ich rozwoju.

Wykorzystanie w dietach substancji biostatycznych lub biobójczych znajdujących się w tkankach różnych owoców może stanowić dodatkowy czynnik prowadzący do

hamowania rozwoju tych szczepów gronkowców, ograniczający rozprzestrzenianie opornych na antybiotyki bakterii w środowisku.

Celem pracy była ocena biostatycznych właściwości soków z ananasów i mandarynek w stosunku do wzorcowego szczepu gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* ATTC 23925.

MATERIAŁ I METODY

Do badań zastosowano ananasy (*Ananas comosus* var. *comosus*) oraz mandarynki (*Citrus reticulata*) dostępne w sieciach handlowych Trójmiasta. Z owoców w jałowych warunkach pozyskiwano sok a następnie 1 cm³ dodawano do 9 ml hodowli bulionowej *Staphylococcus aureus* ATTC 23925. Sok owoców uzyskiwano w wyniku homogenizowania owoców pozbawionych skóry. Badania mikrobiologiczne wykonywano zgodnie z PN-EN ISO 6888-1 (11). Kontrolę stanowiły hodowle bulionowe *Staphylococcus aureus*, których miano po rozcieńczeniu oceniano na podłożu Baird–Parker RPF firmy Merck. Posiewów dokonano metodą zalewową w dwóch powtórzeniach. Inokulum testowych szczepów *Staphylococcus aureus* ATTC 23925 stosowanych w mieszaninach z 10% sokiem owoców wahało się od 6,69 do 7,63 log₁₀ jtk/cm³. Badano zachowanie populacji gronkowców w interakcji z sokiem po 30 i 120 min inkubacji w temp. 20°C. Otrzymane wyniki podano analizie statystycznej za pomocą programu Statistica var. 10. Dane poddawano regresji wielorakiej w celu opisanie zmienności populacji gronkowca w czasie inkubacji. Wyznaczone współczynniki determinacji posłużyły do oceny wpływu czasu inkubacji i inokulum na zmienność liczby gronkowców pod wpływem działania soków.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Prowadzone badania wykazały zróżnicowane oddziaływanie soku ananasa i mandarynek na komórki *S. aureus*. W przypadku 10% soku ananasowego obserwowano redukcję liczby gronkowców zarówno po 30 min inkubacji jak i po 120 min. Liczebność populacji *S. aureus* ulegała średnio zmniejszeniu odpowiednio o 0,77 log₁₀ jtk/cm³ (jednostek tworzących kolonie w cm³), a po następnych 90 min o dalsze 0,2 log₁₀ jtk/g (tab. I).

Tabela I. Zmiany liczby *S. aureus* podczas interakcji z sokiem ananasa

Table I. Changes in *S. aureus* count during interaction with pineapple juice

Czas interakcji (min)	Średnia	Max	Min	Odchylenie standardowe
	Log ₁₀ jtk/cm ³ n=12			
0	6,69	7,63	5,61	0,6414
30	5,92	7,15	4,47	0,6771
120	5,72	7,30	4,84	0,7886

Analiza regresji wykazała, że w przypadku soku ananasowego zarówno początkowe inokulum, jak i czas oddziaływania były odpowiedzialne za zmienność liczby *S. aureus* (tab. I, II). Po 30 min interakcji z sokiem ananasowym 14,2% (R² 0,142)

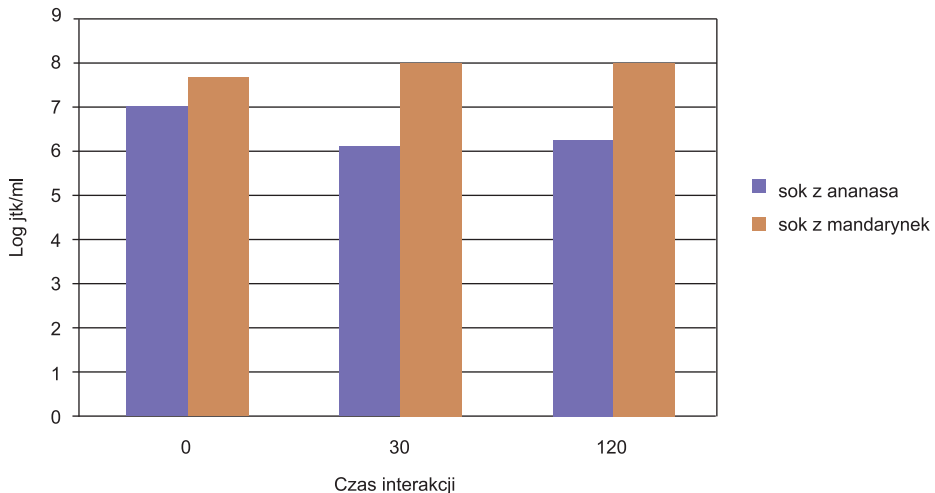
zmienności liczby gronkowców mieszaninie było zależne od początkowej wielkości dodawanej populacji. Po 2 godz. obserwowany wpływ czasu na liczbę *S. aureus* kształtował 11,1% zmienności liczby tych bakterii pod wpływem soku. Aktywność biostatyczną soku ananasowego określiła wielkość redukcji populacji gronkowca po 2 godzinach, stanowiącej 14,5% wielkości dodawanego inokulum *S. aureus*.

Tab e l a II. Parametry regresji wielorakiej zmiennych wyznaczonej dla interakcji bakterii *S. aureus* i soku z ananasa

Tab l e II. Multivariate regression parameters for the *S. aureus* bacteria and pineapple juice interaction

Parametry równania regresji	Zależność liczby <i>S. aureus</i> od wielkości inokulum	Zależność liczby gronkowców od czasu interakcji po 120 min	Zależność liczby gronkowców od czasu interakcji po 120 min i od inokulum
	czas (min)		
	0–30	30–120	0–120
Współczynnik korelacji <i>r</i>	0,377	0,549	0,334
Współczynnik determinacji <i>R</i> ²	0,142	0,302	0,111
Błąd standardowy estymacji	0,6609	0,7041	0,7944

Stwierdzono wyższą dynamikę hamowania gronkowców pozostających w interakcji z sokiem ananasowym w porównaniu do efektu obserwowanego dla tych bakterii podczas kontaktu z sokiem mandarynek (ryc. 1).



Ryc. 1. Wielkość populacji *S. aureus* po interakcji z sokiem z ananasów i mandarynek.

Fig. 1. Size of *S. aureus* population after interaction with pineapple and mandarin juice.

Podczas inkubacji gronkowców z sokiem z mandarynek stwierdzono nieistotne zmiany liczby komórek *S. aureus* zarówno po 30 min, jak i po 2 godz. oddziaływania. Średnia liczba gronkowców po 120 min wynosiła 7,20 log₁₀ jtk/cm³ (tab. III).

Uzyskane wyniki pozwoliły ustalić wartość aktywności biostatycznej soku z mandarynek wskazując, że liczba *S. aureus* obniżyła się jedynie o 1,36% w stosunku do wprowadzonego inokulum.

Table III. Zmiany liczby *S. aureus* podczas interakcji z sokiem z mandarynek

Table III. Changes in *S. aureus* count during interaction with mandarin juice

Czas interakcji (min)	Średnia	Max	Min	Odchylenie standardowe
	Log ₁₀ jtk/cm ³ n=12			
0	7,30	8,39	6,72	0,6563
30	7,39	8,04	6,52	0,4676
120	7,20	8,32	6,25	0,6387

Z dostępnych danych piśmiennictwa wynika, że sok ananasowy może być skuteczny w hamowaniu rozwoju wybranych patogenów jelitowych (2).

Natomiast z badań niektórych autorów oceniających biostatyczne właściwości ananasów wynikało, że obserwowano aktywność ananasa w hamowaniu zarówno *E. coli* i *Salmonella typhi* jak i *S. aureus* (4). Biostatyczny efekt działania soku ananasa autorzy przypisywali obecności w jego miąższu składników o charakterze antydrobnoustrojowym, wśród których wymieniane były m.in. flawonoidy, taniny. Wrażliwość gronkowców na obecność tanin była odnotowana w literaturze (12).

Payne i współpr. (13) potwierdzili istotny wpływ kwasu taninowego na zachowanie biofilmu formowanego przez *S. aureus*, co potwierdza istotną rolę tych związków w hamowaniu rozwoju tego gatunku gronkowca.

Badania prowadzone nad wrażliwością wybranych bakterii chorobotwórczych wykazały, że *S. aureus* wykazuje wysoką wrażliwość na działanie niektórych polifenoli w porównaniu z innymi drobnoustrojami. Wartość MIC (Minimal Inhibition Concentration) dla kwasu taninowego powinna być dla tego gatunku bakterii 161±43 µg/cm³, ale była znacznie wyższa niż dla efektu uzyskiwanego w wyniku interakcji z miąższem owocu granatu (14). Potwierdzona w niniejszym doświadczeniu słaba aktywność biostatyczna mandarynek może sugerować, że zawartość polifenoli w soku z tych owoców jest niska.

Z badań prowadzonych przez Abdulraman i współpr. (15) wynikało, że enzym zawarty w ananasie – bromelaina może być czynnikiem odpowiedzialnym za hamowanie wzrostu bakterii, co również było zgodne z obserwacjami innych autorów (5, 16). O ile cytowane powyżej badania potwierdziły wrażliwość *Vibrio cholerae*, *Enterococcus* spp. czy *E. coli* na działanie bromelainy o tyle brak jest danych na temat wrażliwości *S. aureus* na działanie tego enzymu.

Wśród składników ananasów można stwierdzić znaczne stężenie kwasu askorbinowego, szacowane na 16,9 do 56,4 mg/100 g w zależności od odmiany. Według niektórych źródeł piśmiennictwa kwas askorbinowy jest związkiem o istotnym znaczeniu w hamowaniu rozwoju bakterii (17). Z badań Sanchez-Najra i współpr. (17) wynikało, że w biofilm bakteryjny złożony z gronkowców jest wrażliwy na działanie kwasu askorbinowego o stężeniu między 10 a 20 mg/cm³. Już jednak hamowanie szczepów *S. aureus* przez kwas askorbinowy o stężeniu nie przekraczającym 5 mg/cm³ było znikome. Jednakże istotne znaczenie ma aktywność tego kwasu w stosunku do szczepów *S. aureus* opornych na jeden lub wiele antybiotyków.

Niska aktywność biostatyczna soku badanych mandarynek w stosunku do komórek gronkowca była prawdopodobnie związana ze stężeniem kwasów organicznych w tych owocach. Z danych wynika, że stężenie kwasu askorbinowego zawartego w sokach z mandarynek było niższe niż w stwierdzane w ananasach (18). Zawartość kwasu askorbinowego w mandarynkach wynosi średnio 26,7 mg, co stanowi jedynie połowę stężenia stwierdzanego w niektórych odmianach ananasów. Maksymalna zawartość tego kwasu w ananasach dochodzi do 56,4 mg. Jednakże należy brać pod uwagę również to, że w soku ananasów, w zależności od technologii wytwarzania i sposobu przechowywania ta zawartość może być niższa nawet o 42% od stwierdzanej w owocach bezpośrednio po zbiorach. Podobne zjawiska zachodzą w przypadku produkcji soku z mandarynek.

Do składników stanowiących komponenty obu owoców zaliczyć należy kwas cytrynowy. Efektywność działania kwasu cytrynowego w stosunku do gronkowców w zależności od gatunku owoców i stężenia była opisywana w literaturze (19, 20).

Zatem to różnice w stężeniach kwasów organicznych obu owoców mogą stanowić o stosunkowo niskich właściwościach hamujących mandarynek w porównaniu z prezentowaną wyżej aktywnością biostatyczną ananasów.

Wyniki naszych wcześniejszych badań potwierdzają również słabą aktywność wodnych roztworów uzyskiwanych w wyniku homogenizowania tkanek owoców, w hamowaniu rozwoju populacji *S. aureus*. Tym można tłumaczyć ograniczone działanie hamujące składników organicznych zawartych w fazie wodnej badanych mandarynek.

Mandarynki odznaczają się dodatkowo znaczną zawartością witamin z grupy B, wykazujących zdolność do podtrzymywania rozwoju bakterii. Znacznie mniejsze stężenie tych witamin stwierdzane jest w ananasach. Istnieje zatem prawdopodobieństwo, że mimo obecności flawonoidów i tanin, to stężenie witamin grupy B jest odpowiedzialne za nikłe właściwości biostatyczne soku z mandarynek.

WNIOSKI

1. W warunkach modelowych sok z mandarynek nie wykazuje właściwości hamujących w stosunku do komórek *S. aureus*.
2. Sok z ananasów po 2 godz. interakcji z gronkowcami o inokulum ponad $6 \log_{10}$ jtk/g powoduje redukcję ich liczby średnio o $0,97 \log_{10}$ /jtk/cm³.
3. Aktywność biostatyczna soku z mandarynek jest dziesięciokrotnie niższa w porównaniu z hamującym działaniem soku ananasowego.

I. Steinka

EVALUATION OF ABILITY OF MANDARIN JUICE AND PINEAPPLE JUICE TO INHIBIT *S. AUREUS* POPULATION GROWTH

Summary

The aim of this study was to evaluate the biostatic properties of the juice from the pineapple and mandarins in relation to staphylococci *Staphylococcus aureus* ATCC 23925.

Inoculum test strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 23925 used in mixtures with juices ranged from 6.69 to 7.63 \log_{10} jtk/ml.

There is a large dynamic braking staphylococci remaining in interaction with pineapple juice in comparison to the effect observed for the bacteria in contact with the juice mandarins.

In the experimental conditions of mandarin juice showed no inhibitory against *S. aureus* ATCC 23925 in comparison to pineapple juice after 2 hours of the interaction. Staphylococci inoculum $6 \log_{10}$ cfu/ml causes a reduction in the number of this bacteria average $0.97 \log_{10}$ CFU/ml with pineapple juice. Activity biostatic mandarin juice is ten times lower in comparison with the inhibitory effect of pineapple juice.

PIŚMIENNICTWO

1. Guthrie N., Carroll K.K.: Inhibition of mammary cancer by citrus flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998; 439: 227-236. – 2. Bansode D.S., Chavan M.D.: Evaluation of antimicrobial activity and photochemical analysis of papaya and pineapple fruit juices against selected enteric pathogens. *Int. J. Pharma. Bio. Sci.*, 2013; 4(2): 1176-1184. – 3. Fisher K., Philips C.A.: The effect of lemon, orange, bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacete rjejuni Escherichia coli O157*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food system. *J. Appl. Microbiol.*, 2006; 101: 1232-1240. – 4. Tochi B.N., Wang Z., Xu S-Y., Zhang W.: Therapeutic application of pineapple protease (Bromelain): A review. *Pakistan J. Nutr.*, 2010; 7(4): 513-520. – 5. Khosropanah H., Bazargani A., Ebrahimi H., Eftekhari K., Emami Z., Esmailzadeh S.: Assessing the effect of pineapple extract alone and combination with vancomycin on *Streptococcus sanguis*. *Jundishapur J Nutr PharmProducts*, 2012; 7(4): 140-143. – 6. Steinka I.: Porównanie biostatycznych właściwości mięszu owoców cytrusowych. – 7. Lopes T.P., Salas C.E., Hernandez M.: In vivo antitumoral activity of stem pineapple (*Ananascomosus*) bromelin. *Planta Medica*, 2007; 13: 1377-1383. – 8. Codoner-French P., Lopez-Jaen A.B., Sentandreu E., Belles V.V.: Mandarin in juice improves the andioxidant status of hypercholesterolemic children. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 2008; 47(3): 349-355. – 9. Morley K.L., Ferguson P.: Tangeretin and nobilitin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cell, 2006. – 10. Viuda Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J.: Antibacterial activity lemon (*Citrus lemon* L.) mandarin (*Citrus reticulate* L.), Grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *J. Food Safety.*, 2008; 28(4): 567-576.
11. PN-EN ISO 6888-1, Mikrobiologia żywności i pasz – horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków). – 12. Akiyama H., Fujii K., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K.: Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.*, 2001; 48(4): 487-491. – 13. Payne D.E., Martin R., Parzych K.R., Rickard A.H., Underwood A., Boles B.R.: Tannic acid inhibits *Staphylococcus aureus* surface colonization in an IsaA-dependent manner. *Inf. Immun.*, 2013; 81(2): 496-504. – 14. Taguri T., Tanka T., Kouno I.: Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol. Pharm. Bull.*, 2014; 27(12): 1965-1969. – 15. Abdulraman A., Milala M.A., Gulani I.A.: Antimicrobial effects of crude bromelain extracted from pineapple fruit (*Ananas comosus* Linn.). *Advances in Biochemistry*, 2015; 3: 1-4. – 16. Praveen N.C., Rajesh A., Madan M., Chaurasia V.R., Hiremath N.: In vitro evaluation of antibacterial Efficacy of Pineapple (Bramelein) on periodontal pathogens. *J Int. Oral Health.*, 2014; 6(5): 96-98. – 17. Sanchez-Najera R.I., Nakagoshi-Cepeda S., Martinez-Sanmiguel J.J., Hernandez-Delgado R., Cabral-Romero C.: Ascorbic acid on oral microbial growth and biofilm formation. www.thepharmajournal.com, 2013; 2(4): 103-109. – 18. Ywassaki L.A., Canniatti-Brazacc S.G.: Ascorbic acid and pectin in different sizes and parts of citric fruits. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 2011; 31(2): 319-326. – 19. Hammer K.A., Garson C.F., Rile T.V.: Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.*, 1999; 86: 985-990. – 20. Steinka I., Kukulowicz A.: Effect of select plants on the survival of *Staphylococcus aureus*, Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Ed. A. Mendez-Vilas, 2011; 1186-1194.