



## C-vitamins beskyttende effekt mot oksidativt stress i bakterier

*Forfattere: Henrik Eidsaae Corneliussen og Christopher Eidsaae Corneliussen, Ullern videregående skole*

*Oksidativt stress er samspillet mellom reaktive oksygenforbindelser og antioksidanter. For høyt nivå av oksidativt stress kan føre til oksidativ skade på cellene i kroppen vår. C-vitaminer er antioksidanter som er med på å bryte ned hydrogenperoksid, som er en reaktiv oksygenforbindelse. I vårt forsøk utforsker vi C-vitamins beskyttende effekt mot hydrogenperoksid. Vi gjør dette ved å tilsette hydrogenperoksid og ulike konsentrasjoner av C-vitaminer til E.coli bakterier. Resultatene ble funnet ved å telle antall overlevende bakteriekolonier på agar plater. Bakterier som var inkubert med C-vitamin har en statistisk signifikant høyere overlevelse enn bakteriene uten. Høyere konsentrasjon av C-vitamin førte til høyere overlevelse opp til et visst punkt. Våre funn bekrefter at C-vitamin har en beskyttende effekt mot oksidativ skade i bakterier. Videre forskning kan være å se på effekten i eukaryote celler slik at resultatene kan bli mer anvendt til menneskekroppen.*

### Introduksjon

Ved normal celleånding produseres frie radikaler og andre reaktive oksygenforbindelser. Reaktive oksygenforbindelser er kjemiske forbindelser med oksygen som kan gi oksidative skader på nukleinsyrer (DNA og RNA), proteiner og fett. Oksygen er et av de mest elektronegative stoffene som finnes på jorda, og er dermed svært reaktivt i visse former (Aarnes, 2021). Hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) er en form for reaktive oksygenforbindelser (Pedersen, 2019). De reaktive forbindelsene benyttes i kroppen som blant annet et hjelpemiddel til å bekjempe angrep fra sykdomsfremkallende organismer. Antioksidanter er kroppens naturlige forsvar mot reaktive forbindelser (Ditlefsen, 2020). De hemmer oksidasjon ved å nøytralisere de reaktive forbindelsene. Videre brytes de reaktive forbindelsene kontrollert ned ved hjelp av ulike enzymer (Frivoll, 2019). Kroppen kan oppleve oksidativt stress når det er for høy konsentrasjon av reaktive oksygenforbindelser i kroppen. Denne balansen mellom reaktive oksygenforbindelser og deres tilintetgjørelse ved hjelp av antioksidanter er viktig for at kroppens celler skal fungere optimalt.

C-vitaminer er vannløselig antioksidanter (Bjørneboe, 2020). Gjennom C-vitaminer og katalase bryter kroppen ned hydrogenperoksid til vann og oksygen;  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$  (Universitetet i Oslo, 2011). I ulike tilfeller kan kroppen øke produksjonen av reaktive oksygenforbindelser, noe som kan føre til at kroppens antioksidantforsvar ikke rekker til (VitaeLab, u.d.). Ved slike tilfeller må vi få i oss antioksidanter fra utsiden. C-vitaminer er en slik antioksidant fordi de ikke produseres naturlig inne i kroppen, men heller er noe vi får i oss gjennom kosthold som grønnsaker, frukt og bær.

I dette forsøket skal vi undersøke C-vitamins beskyttende effekt mot hydrogenperoksid. Gjennom å tilføre hydrogenperoksid og ulike konsentrasjoner av C-vitaminer til *E.coli* bakterier skal vi se på samspillet mellom de to når stoffene blir tilført utenifra. Ut fra resultatet kan vi vurdere om et høyere inntak av C-vitamin vil beskytte mot oksidative skade fra hydrogenperoksid. På denne måten kan vi for eksempel vurdere om man burde øke inntaket av naturlige kilder til C-vitaminer for å beskytte kroppens bakterieceller mot oksidativt stress. Hensikten med dette forsøket er altså å undersøke C-vitamins beskyttende effekt mot hydrogenperoksid. Hypotesen vår er at en økt mengde C-vitamin vil gi større overlevelse blant bakterier tilført hydrogenperoksid.

## Metode

For å undersøke C-vitamins beskyttende effekt mot hydrogenperoksid ble det tilført hydrogenperoksid og C-vitaminer til bakterier. *E.coli* bakterier ble brukt som modellorganisme i dette forsøket ettersom de er lette å dyrke og kan enkelt manipuleres (Sirevåg, 2019). I tillegg produseres katalase naturlig inni i bakteriene, noe som da gjør hele forsøket mer representativt. En modellorganisme er en organisme som blir undersøkt for å forstå biologiske fenomener, med en forventning om at det skal gi innsikt til andre organismers arbeid. Vi må bruke en modellorganisme ettersom vi ikke har ressurser til å utføre et forsøk på alle kroppens ulike celler. For å finne en hydrogenperoksidkonsentrasjon som drepte rundt halvparten av bakteriene, satt vi opp et pilotforsøk. Vi ønsker denne konsentrasjonen ettersom det da er mulig å se effekten av hydrogenperoksid tydeligere.

Pilotforsøket er delt opp i 8 deler. Resultatet skal brukes i hovedforsøket.

Steg 1: Det ble strøket *E.coli* bakterier (Bio-Rad 10 stk) ut på en agarskål laget etter standard oppskrift (Bio-Rad).

Steg 2: Det ble overført en bakteriekoloni til 100 mL LB-medium (VWR-Chemicals) i en 500 mL erlenmeyerkolbe. Toppen av kolben ble dekket av parafilm for å minske forurensing. Bakteriene ble inkubert over natten i 37grader Celsius. Det ble også utført en test for å se sjekke at bakteriekulturen var i log fase ved hjelp av programmet «Pasco Spectrometer». Dette er viktig ettersom det er i log fase bakteriene deler seg raskest og mest effektivt. På denne tiden er det også lettest å manipulere bakterien.

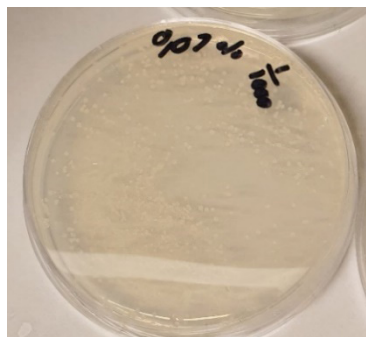
Steg 3: 1 mL fra bakteriekulturen ble pipettert over i 9 15 mL rør.

Steg 4: Det ble tilsatt 8,5 mL lb medium oppi hver av rørene.

Steg 5: De ulike konsentrasjonene av hydrogenperoksid pluss kontrollene ble lagd i separate rør. Til konsentrasjonene ble det brukt hydrogenperoksid på originalt 35 % (Fredriksen Scientific, A/S). 0,5 mL av konsentrasjonene blandes sammen med LB-bakterie blandingen. Vi brukte konsentrasjonene: 16 %, 8 %, 4 %, 2 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 % og 0 %.

Steg 6: Videre ble bakterieblandingen fortynnet i en fortynningsrekke til 1/1000 Dette er viktig ettersom for høy konsentrasjon av bakteriene vil føre til resultater som ikke er tolkbare.

Steg 7: 20 mikro liter fra hver av rørene ble strøket utover en egen agar plate.



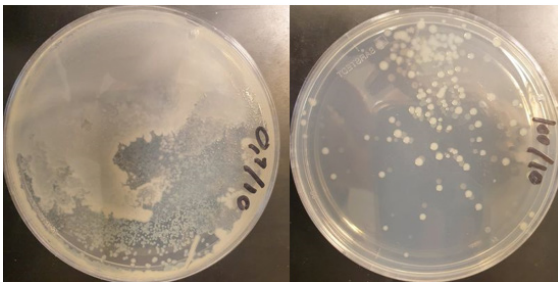
Vi besluttet å gå videre med 0,01 % hydrogenperoksid ettersom det var her ca. 50 % av bakterien overlevde, se figur 1. Hydrogenperoksid konsentrasjonen er viktig på grunn av at for mye vil drepe bakteriene og for lite vil ikke vise til en representativ giftig effekt.

Figur 1: agarplaten med utvalgt konsentrasjon av hydrogenperoksid

Hydrogenperoksidet skal virke som en konstant variabel, mens C-vitamin konsentrasjonene skal være den varierende faktoren. Selve forsøket starter med å overføre to bakteriekolonier til 100 mL LB-medium i to forskjellige 500 mL erlenmeyerkolber. Det ble laget to bakteriekulturer ettersom dette fører til at forsøket kjøres i to paralleller, noe som gir et tryggere resultat. Toppen av kolben ble dekket av parafilm. Bakteriene ble inkubert over natten i 37grader Celsius. I dette forsøket ble kulturene tatt ut av inkubasjon ca. 30 minutter tidligere enn i pilotforsøket, for å få de rett før log fase. Dette blir gjort fordi de skal senere tilbake i varmeskapet etter at C-vitamin har blitt tilsatt. På denne tiden viste kultur 1 et nivå på 0,855 og kultur 2 et nivå på 0,762 hvor 1 er logfase.

Videre ble bakteriekulturene splittet i seks 15 mL rør med 10 mL av kulturen i hver. Her ble det tilsatt C-vit (Nycloplus) i følgende konsentrasjoner, (mg/1 mL): 0 (kontroll), 0,000001, 0,00001, 0,0001, 0,001, 0,01. Konsentrasjonene av C-vitamin er basert på et tidligere forsøk vi utførte. De originale konsentrasjonene ble bygget på bakgrunn av anbefalt dose C-vitamin hver dag som er 75mg (Anderssen & Meltzer, 2012). Med hensyn på antall bakterier i menneske kroppen, våre kulturer og ved å gjøre et overslag, kom vi fram til disse ulike konsentrasjonene for å få mest representativt forsøk; (mg/1 mL): 0 (kontroll) 0,01, 0,1, 1, 10, 100. Det er viktig med mange ulike konsentrasjoner slik at man får et overblikk av effekten C-vitamin har på bakteriene. I det første hovedforsøket ble bakterien fortynt 1/1000. De høye konsentrasjonene av C-vitamin og bakterier førte til utydelige resultater grunnet for mye bakterier, se figur 2. Ut ifra dette ble det besluttet å kjøre forsøket på nytt med lavere konsentrasjoner og fortynne bakteriene ned til 1/100000 før de strykes ut på agarplater. Fra denne endringen fikk vi tydelige resultater som kan benyttes.

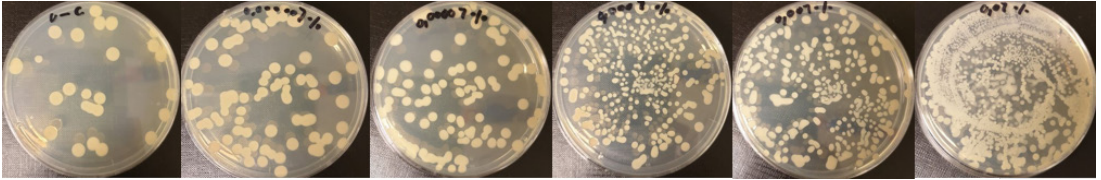
De oppsplittede bakteriekulturene ble videre satt i varmeskap i 30 minutter. Dette er for å få bakteriene til log fase og for å gi dem tid til å ta opp C-vitamin. Deretter ble det tilsatt 8,5 mL lb medium i nye 15 mL rør. Videre ble konsentrasjonen på 0,01 % hydrogenperoksid lagd og det ble tilsatt 0,5 mL av denne i hver av rørene. Det ble videre overført 1 mL fra hver av de ulike c-vit/bakterie blandingene i de nye rørene. Deretter ble bakterien fortynt til 1/100000 ved bruk av fortynningsrekke. Til slutt ble 20 mikrolitter fra hver av blandingene strøket utover en egen agarplate.



Figur 2: Bildet viser resultat fra forkastet forsøk med høye konsentrasjoner av C-vitamin og 1/1000 fortynt bakterier

Vi strøk ut bakterien og så telte vi antall kolonier i hver skål. I tillegg ble det utført T-tester av gjennomsnittet for konsentrasjonsgruppene med lik varians i Excel. Ved T-test blir det testet om verdiene vi har fått med hensyn på C-vitamin konsentrasjonene er statistisk signifikante. For å utføre T-testen var nullhypotesen at C-vitamin ikke hadde noen effekt på overlevelsen til bakteriene, mens hypotesen var at C-vitamin hadde en effekt. Det ble antatt at de to gruppene hadde lik varians ettersom de var basert på hver sin koloni fra samme *E.coli* plate. Fordi vi ikke vet om C-vitamin har en negativ konsekvens på bakteriene, ble det en tosidig fordeling.

## Resultat



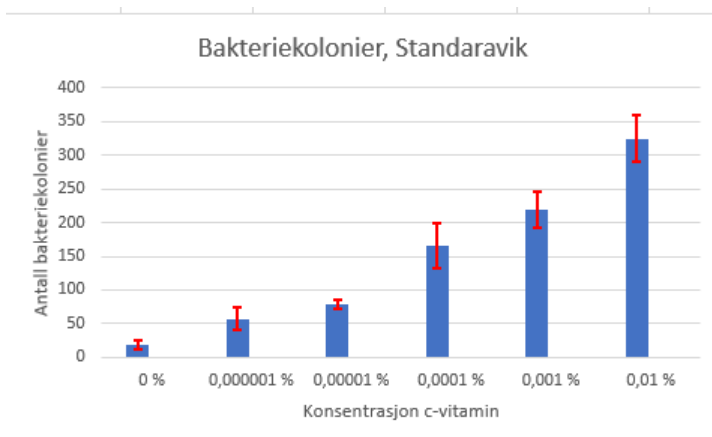
Figur 3: Resultater fra forsøk parallell 1. Viser serie av bakterieplater lagt etter stigende konsentrasjonsgradient fra venstre til høyre.

For å sjekke om det var en statistisk signifikant forskjell mellom bakteriene, ble det først sett på forskjellene mellom gjennomsnitt av alle bakteriene inkubert med C-vitamin og de uten. Det var en statistisk signifikant forskjell med en p-verdi på 0,015 mellom overlevelse hos bakteriene dyrket med C-vitamin og de som ikke ble eksponert. Det var gjennomsnittlig 916 % flere overlevende bakteriekolonier i de som var inkubert med C-vitamin enn i de som ikke var det. Resultatene viser også at det er sammenheng mellom overlevelse av bakterier inkubert med C-vitamin og konsentrasjonsgradienten av C-vitamin, se figur 3.

Tabell 3: Bakterie parallell 1 og 2 - antall overlevende bakterier kolonier per konsentrasjon.

C-vitamin-konsentrasjon	Kontroll (0)	0,000001 %	0,00001 %	0,0001 %	0,001 %	0,01 %
1	24	70	84	190	238	350
2	13	45	75	142	201	300
Gjennomsnitt	18,5	57,5	79,5	166	219,5	325
Standardavvik	7,7	17,6	6,3	33,9	26,1	35,3

Vi ser en tydelig forskjell mellom parallellene i forsøket. De generelt høye standardavvikene bekrefter at det er stor usikkerhet i gjennomsnittene, se tabell 3. Til tross for den store variasjonen ser vi en tydelig trend i mengden overlevende bakteriekolonier, ettersom standardavvikene er generelt mindre enn forskjellene mellom parallellene, se figur 4.



I tillegg viser resultatene at antall overlevende bakteriekolonier er økende med konsentrasjon av C-vitamin.

Figur 4: Søylediagram, gjennomsnitt bakteriekolonier ulike konsentrasjoner C-vitamin.

## Diskusjon og Konklusjon

I dette forsøket undersøkte vi C-vitaminer sin beskyttende effekt mot hydrogenperoksid. Det var en statistisk signifikant høyere overlevelse hos bakteriene inkubert med C-vitaminer enn bakteriene uten C-vitaminer. På bakgrunn av resultatene kan vi forkaste nullhypotesen om at det ikke er en forskjell mellom dem, noe som igjen styrker hypotesen vår. Dette er basert på relativt lite data, med bare 2 paralleller per gruppe. Til tross for kun to paralleller er det en statistisk signifikant forskjell. Dette betyr at forskjellene var så store at selv med lite data kan vi si at forskjellene i overlevelse ikke skyldes tilfeldigheter. Vi kan heller si at overlevelsen har en reell kobling opp mot C-vitamins antioksidanteffekt.

Ut fra tidligere forskning rundt antioksidanter og oksidanter var dette et forventet resultat (Guarnieri, Riso, & Porrini, 2007) (Green, et al., 1994). For eksempel i et forsøk utført av Melek Sakarya ble det vist at C-vitaminer hadde en beskyttende effekt mot frie oksygenradikaler. Dette ble gjort ved tilsette C-vitamin til rotter, og videre utsette dem for høye oksygenkonsentrasjoner (Sakarya, 2011). I resultatene av vårt forsøk ser vi at det er et klart større antall bakterier som overlevde der det var mer C-vitamin. Dette skyldes at C-vitamin er en antioksidant, og den har motvirket effekten fra hydrogenperoksidet på bakteriene ved å bryte stoffet ned. Under målingene ble det også tatt hensyn til ulike forhold mellom parallellene. For eksempel kunne noen feilkilder være størrelsen på *E.coli* bakteriekolonien. Dette kan videre føre til ulik vekst, noe som fører til at kulturene befinner seg i log fase på ulike tider. Dette så vi ved at kultur 1 var på 0,855, mens kultur 2 var på 0,762 da vi tok de ut av varmeskap. Dermed kan veksten med C-vitamin i senere tid vært svakere hos gruppe 2, noe som igjen ble bekreftet i resultatet. Her ser vi at ved hver konsentrasjon ved gruppe 1 er det flere bakteriekolonier enn i gruppe 2. Andre feilkilder kan være forurensing på bakteriene grunnet vanskeligheter med å holde det sterilt.

I vårt forsøk opplevde vi stor usikkerhet i gjennomsnittet ved noen av konsentrasjonene, noe som bekrefte av de relativt store standardavvikene her. Vi ser for eksempel at standardavviket er på 26,1 ved 0,01 % C-vitamin og 35,3 ved 0,001 % C-vitamin. Vi ser også at det var en økning i 32 % flere overlevende bakteriekolonier mellom konsentrasjonene. Problemet med usikkerhet rundt gjennomsnittet er at den tydelige forskjellen i overlevelsen blir usikker. For sikrere resultater kunne vi tatt med flere paralleller. Vi kunne også tatt med flere konsentrasjoner for å få et større overblikk av C-vitamins sin beskyttende effekt.

Selv om vi forkastet forsøket hvor vi bare fortynnet bakteriene ned til 1/1000, så er noen av resultatene spennende. Der hvor C-vitamin konsentrasjonen var størst var det færrest bakterier. Det resultatet antyder til at C-vitamin kan drepe bakterier hvis det blir for mye av det.

I denne studien har vi vist at C-vitamin har en beskyttende effekt mot hydrogenperoksid i bakterier. Vi så også at for mye C-vitamin kan ha en negativ effekt på bakterier. Overførbarheten av resultatene fra våre *in vitro* resultater til mennesker er ikke så stor ettersom forsøket bare er utført på bakterier. Vi kan konkludere med at C-vitaminer beskytter mot oksidativ skade i bakterier opp til et visst punkt. Noen videre spørsmål vi kan stille oss kan for eksempel være; hvorfor virker C-vitamin negativ ved for høy konsentrasjon? Videre forskning kan være å se på C-vitaminer og hydrogenperoksid i eukaryote celler eller se om det er andre stoffer som kan virke som antioksidanter mot hydrogenperoksid.

## Referanser

- Aarnes, H. (2021, Januar 18). *Oksygen (reaktive oksygenforbindelser)*. Hentet fra Store Norske Leksikon: [https://snl.no/oksygen\\_-\\_reaktive\\_oksygenforbindelser](https://snl.no/oksygen_-_reaktive_oksygenforbindelser)
- Anderssen, S., & Meltzer, H. (2012). *Anbefalinger om kosthold ernæring og fysisk aktivitet*. Andvord Grafisk AS. Hentet fra Apotek1.
- Bjørneboe, G.-E. (2020, Juli 10). *C-vitamin*. Hentet fra Store Medisinske Leksikon: <https://sml.snl.no/C-vitamin>

- Ditlefsen, A. (2020, September 23). *Antioksidanter*. Hentet fra Store Norske Leksikon: <https://snl.no/antioksidanter>
- Frivoll, Å. (2019, Juni 12). *Oksidativt Stress*. Hentet fra Store Norske Leksikon: [https://snl.no/oksidativt\\_stress](https://snl.no/oksidativt_stress)
- Green, M., Lowe, J., Waugh, A., Aldridge, K., Cole, J., & Arlett, C. (1994, august). *Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells*. Hentet fra ScienceDirect: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921873494900116?via%3Dihub>
- Guarnieri, S., Riso, P., & Porrini, M. (2007, mars 09). *Orange juice vs vitamin C: effect on hydrogen peroxide-induced DNA damage in mononuclear blood cells*. Hentet fra Cambridge university press: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/orange-juice-vs-vitamin-c-effect-on-hydrogen-peroxide-induced-dna-damage-in-mononuclear-blood-cells/6A3E1A3D7A5E5935D5528F0EF19DBEA8>
- Pedersen, B. (2019, Mai 8). *Hydrogenperoksid*. Hentet fra Store Norske Leksikon: [https://snl.no/hydrogenperoksid#:~:text=Ogs%C3%A5%20de%20cellene%20i%20kroppen,og%20oxygen%20\(O2\)](https://snl.no/hydrogenperoksid#:~:text=Ogs%C3%A5%20de%20cellene%20i%20kroppen,og%20oxygen%20(O2))
- Sakarya, M. (2011, Desember 4). *The antioxidant effects of vitamin C and vitamin E on oxidative stress*. Hentet fra Taylor Francis Online: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/tcic.10.6.245.250>
- Sirevåg, R. (2019, August 9). *E. coli*. Hentet fra Store Norske Leksikon: [https://snl.no/E.\\_coli](https://snl.no/E._coli)
- Universitetet i Oslo. (2011, Februar 4). *Oksygen*. Hentet fra Uio: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/o/oksygen.html>
- VitaeLab. (u.d.). *Oksidativt stress*. Hentet fra VitaeLab: <https://www.vitaelab.no/faktasider/oksidativt-stress/>