



SPISS

Naturfaglige artikler av
elever i videregående
opplæring

Effekten av miljøgiften Bisfenol A på veksten av bakterien *E. coli*

Forfattere: Andrea Marie Angell Malm og Alexander Rognås, Ullern videregående skole

Bisfenol A (BPA) er en mye brukt kjemikalie i plastprodukter og har vært gjenstand for bekymring grunnet potensielle helseeffekter. I denne studien ble effekten av BPA på veksten av Escherichia coli (E. coli) undersøkt ved å eksponere bakteriene for ulike konsentrasjoner av BPA. Resultatene viste at høyere BPA-konsentrasjoner førte til økt bakterievekst, noe som kan ha implikasjoner for tarmfloraens balanse og menneskers helse. Tarmfloraen spiller en avgjørende rolle for mennesker, og er helt essensiell når det kommer til fordøyelsen og immunforsvaret. Studien gir verdifull innsikt i hvordan BPA kan påvirke mikrobiotaen og understreker behovet for videre forskning på området.

Introduksjon

Miljøgifter kan ha flere ulike effekter på helsen. Disse effektene kan være endringer i arvestoff, forstyrrelser i fosterutvikling, forstyrrelser i hormonbalansen, fertilitetsskader og skader på lever og nyrer (Brox et al., 2020). Disse helseeffektene kan oppstå både etter langvarig eksponering og ved akutte tilfeller. Miljøgifter brytes ned svært sakte i naturen, akkumuleres i levende organismer, og utgjør en betydelig trussel for både miljø og helse grunnet sin giftighet og potensial for langsiktige skadevirkninger (NOU 2010:9, s.13). Miljøgifter inkluderer også hormonforstyrrende stoffer og tungmetaller med tilsvarende egenskaper (NOU 2010:9, s.13). Blant disse miljøgiftene finner vi bisfenoler. Bisfenoler er en gruppe menneskeskapt kjemiske stoffer som brukes i produksjonen av polykarbonatplast og epoksyharpiks (Husøy, 2023). *Bisfenol A (BPA)* er den vanligste typen, og brukes som tilsetningsstoff i produksjon av polykarbonatplast (Arbeidstilsynet, 2018). Polykarbonatplast er en type plast som er slitesterk, varmebestandig og kjemisk stabil, og egner seg godt til bruk i beholdere for mat, vann, kopper og tallerkener (Biosense Laboratories, 2023). Polykarbonatplast brukes også i en del leker, kosmetiske produkter og tåtesmukker. Mennesker får i all hovedsak i seg BPA gjennom mat og drikke som har vært oppbevart i plastbeholdere og kosmetiske produkter (Husøy, 2023). I dag eksponeres vi for økende mengder BPA. Barn i alderen 3-10 år har høyest eksponering (1,26 µg/kg og 1,45 µg/kg), hvor omtrent 80% av dette kommer fra kostholdet (Folkehelseinstituttet, 2023, s.15). Det er stor oppmerksomhet rundt de mulige helseeffektene som BPA kan gi, da dette er et stoff som kan forstyrre kroppens hormonbalanse, da spesielt kjønnshormonene. Dette kan bidra til hormonrelaterte sykdommer som polycystisk ovariesyndrom (PCOS), infertilitet eller forstyrret pubertetsutvikling (Folkehelseinstituttet, 2023, s.15). Tarmfloraen består av et komplekst samfunn av bakterier, virus, sopp og andre mikroorganismer som naturlig finnes i menneskets tarm (Otterholt, 2024). Dette økosystemet spiller en avgjørende rolle for mennesket på flere måter. Tarmfloraen er helt essensiell når det kommer til fordøyelsen, der den bryter ned komplekse karbohydrater, proteiner og fettstoffer, noe som frigjør energi og øker næringsopptaket (Oliphant & Allen-Vercoe, 2019). I tillegg bidrar tarmfloraen til

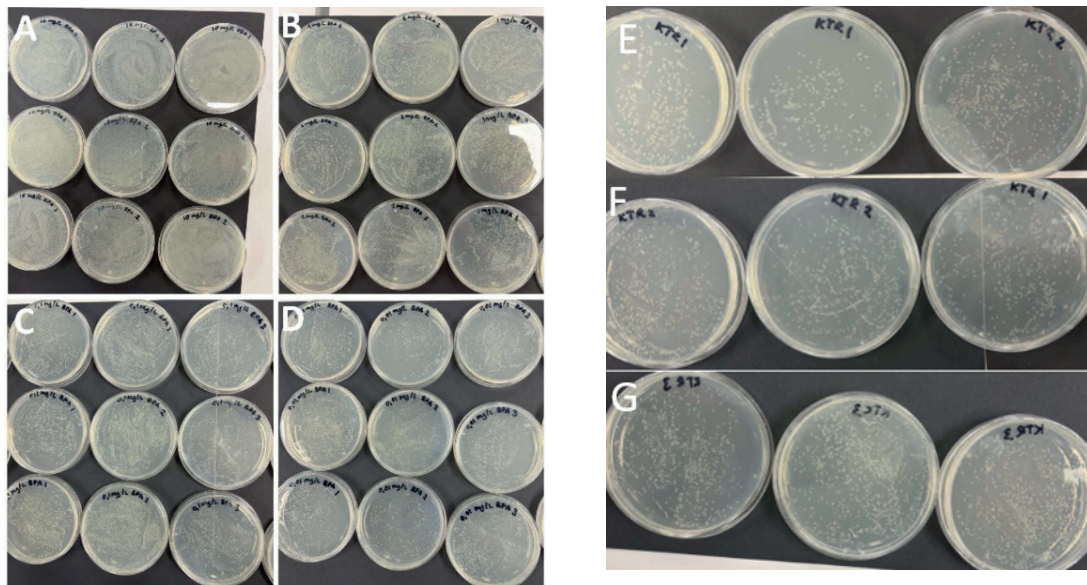
produksjon av viktige vitaminer, som B-vitaminer og vitamin K, som er spesielt viktig for blodkoagulering (Otterholt, 2024). En sunn tarmflora fungerer også som en barriere mot patogene mikroorganismer. De gunstige bakteriene utkonkurrerer patogene mikrober ved å oppta plass og forbruke tilgjengelige næringsstoffer, noe som hindrer de patogene mikroorganismene i å etablere seg (Gjølby, 2023). Videre er tarmfloraen viktig for funksjonen og utviklingen til immunforsvaret, da den bidrar til å modulere immunresponsen og opprettholde kroppens forsvarsmekanismer (Zheng et al., 2020). Dysbiose refererer til en ubalanse i tarmens mikrobiota, hvor sammensetningen av mikroorganismer er forstyrret (Otterholt, 2024). Denne tilstanden kan oppstå som følge av faktorer som endringer i kosthold, sykdom eller antibiotika. For eksempel kan en antibiotikabehandling drepe mange av de gunstige tarmbakteriene, og dermed svekke den beskyttende normalfloraen. Dette gir rom for at patogene mikroorganismer kan etablere seg (Ramirez et al., 2020). Konsekvensene av dysbiose er omfattende og har blitt tilknyttet en rekke helseproblemer. Forskning indikerer at en ubalansert tarmflora kan være assosiert med utvikling av allergier, inflammatoriske tarmsykdommer, hjerte- og karsykdommer, samt psykiske lidelser som angst, depresjon eller schizofreni (Otterholt, 2024). *E. coli* er en bakterie som naturlig finnes i tarmen hos både mennesker og dyr, og spiller en viktig rolle i å opprettholde balansen i tarmfloraen (Tenaillon et al., 2010). Enkelte stammer av *E. coli* er gunstige og bidrar til tarmens helse, mens andre kan være patogene (Wassenaar, 2016). Grunnet sin utbredelse og funksjon i tarmen brukes *E. coli* ofte som modellorganisme i forskning på tarmbakterier og effekter av ytre påvirkninger som miljøgifter (Chiu et al., 2020). Mennesker får i dag i seg en økende mengde med miljøgifter. BPA er kjent for å kunne forstyrre menneskers hormonbalanse og er assosiert med en rekke negative helseeffekter, men kunnskapen om disse helseeffektene er fortsatt begrenset (Husøy, 2023). Tarmfloraen spiller en avgjørende rolle i menneskers helse, og det å opprettholde riktig balanse i tarmflora er essensielt for menneskers velvære. Siden majoriteten av BPA-inntak kommer fra kosthold, og det da viser seg at BPA kan ha negative konsekvenser på tarmen vår, kan BPA ha større effekter på human helse enn man først hadde sett for seg. Ved å skaffe en dypere forståelse om hvordan miljøgifter påvirker tarmfloraen blir det mulig å bedre vurdere deres helserisiko, og utvikle ulike strategier for å minimere skadelig effekt. *Hypotesen vi undersøkte var at BPA vil forhindre vekst av E. coli.*

Metode

Hensikten med forsøket var å undersøke hvordan ulike konsentrasjoner av BPA (133027, Sigma-Aldrich) påvirket veksten av *E. coli* (DH5α). *E. coli* ble valgt som modellorganisme grunnet dens evne til å vokse raskt med minimal næring (Yokoyama, 2020). BPA ble valgt som teststoff ettersom det er en av de vanligste miljøgiftene mennesker får i seg i dag, og det var av interesse å undersøke hvordan dette kan påvirke bakterievekst i tarmen. For å utføre forsøket ble det først laget en startkultur med *E. coli* i LB-medium (L3022, VWR chemicals). En inokuleringsøse ble brukt til å skrape opp bakteriekultur som ble overført til 1 mL LB-medium og inkubert ved romtemperatur i to timer. Deretter ble 1 mL av kulturen overført til 200 mL LB-medium, og inkubert over natten for å sikre tilstrekkelig oppformering av bakteriekulturen slik at videre testing med BPA kunne gjennomføres på en homogen og aktivt voksende kultur. Dagen etter ble 15 kolber satt opp, hver med 10 mL av startkulturen og 90 mL LB-medium. Disse volumene ble valgt basert på et pilotforsøk som viste at det var passende mengde for å kunne stryke ut etter inkubering. For å tilsette BPA ble det brukt en løsning med 0,016 g/L BPA i aceton. Aceton ble tatt i bruk da BPA er et upolart stoff som ikke løser seg opp i vann. Vi benyttet fem forskjellige konsentrasjoner av BPA: 10 mg/L, 1 mg/L, 100 µg/L, og 10 µg/L. Hver av disse konsentrasjonene ble fortynnet 1:100 000 før de ble tilsatt i de 15 kolbene med bakteriekultur. Alle gruppene, inkludert kontrollene, ble tilsatt samme mengde aceton, slik at den totale mengden ekstra stoff som ble tilsatt til alle gruppene var lik. Deretter ble bakteriekulturen strøket ut på agarplater (23C104109, VWR-chemicals,) for å vurdere vekst. Vi benyttet prinsippet 3x3, der for hver fortynning av BPA ble det strøket ut tre kolber, og hver kolbe fikk tre utstryk. Dette ga totalt 36 agarplater. I tillegg ble det inkludert en positiv kontroll uten BPA for å bekrefte at bakteriene i kulturen var levedyktige og kunne vokse under de eksperimentelle forholdene, samt se hvor mye bakterier som vokser uten noe BPA. Alle agarplatene ble så satt i et varmeskap som holdt 36 grader over natten, før vi telte antall bakteriekolonier. Vi brukte et python-program (Python 3.11.9) for å telle antall bakteriekolonier i hver av skålene. Det ga oss antall bakteriekolonier i hver plate. For å gjøre en regresjon av dataene ble Excel benyttet.

Resultater

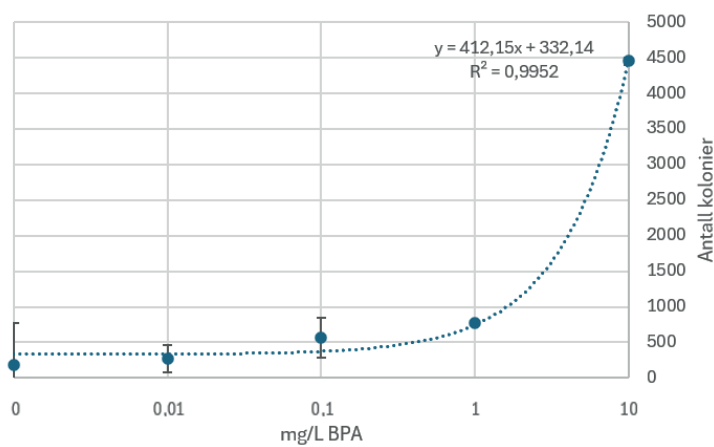
Resultatene viste at konsentrasjoner av BPA påvirket veksten av *E. coli* i kolbene. Høyeste vekst ble observert ved 10 mg/L BPA, hvor antall kolonier var 4449 ± 760 (gjennomsnitt $\pm$ standardavvik). Ved lavere BPA-konsentrasjoner viser resultatene en gradvis reduksjon i antall bakteriekolonier. Ved 1 mg/L BPA var antall kolonier 769 ± 253 , mens 0,1 mg/L BPA resulterte i 565 ± 357 kolonier. For 0,01 mg/L BPA ble det observert 269 ± 38 kolonier. Kontrollgruppen (KTR) hadde den laveste veksten med 188 ± 65 kolonier. Regresjonen gir et regresjonstall på 0,995.



Figur 1. Agarskåler med *E. coli* strøket ut etter inkubering over én natt i kolber med LB-medium. Konsentrasjonen av BPA avtar fra A til D, der A har høyest konsentrasjon (10 mg/L), etterfulgt av B (1 mg/L), C (0,1 mg/L) og D (0,01 mg/L). Bilde E, F og G er kontrollgruppene uten BPA.

Tabell 1. Antall *E. coli* kolonier som vokste opp i agar-skål med LB-medium etter inkubering over natt. Tallene er delt inn i ulike konsentrasjoner av BPA (mg BPA/L LB-medium) og en kontrollgruppe med 0 mg/L. Konfidensintervallet er satt til 95 %.

Kolbe	Mengde BPA (mg/L)				
	10	1	0,1	0,01	0
A	4675	987	418	277	137
A	3981	913	259	328	99
A	3670	555	280	258	86
B	3072	905	1109	257	188
B	4678	982	1143	334	249
B	4963	679	804	240	228
C	4456	441	403	254	238
C	5567	402	372	228	211
C	4982	1059	294	247	253
Gjennomsnitt	4449	769	565	269	188
Standardavvik	760	253	357	38	65
Konfidensintervall	[3865,5034]	[575,964]	[290,839]	[240,2989]	[138,237]



Figur 2. antall *E. coli* kolonier som vokste opp på LB-agar etter inkubering over natt i ulike konsentrasjoner BPA. Hvert punkt representerer ni skåler med konsentrasjoner fra 3 kolber, som hver ble strøket ut på 3 plater. X-aksen er en logaritmisk skala og figuren viser også konfidensintervall.

Diskusjon

Resultatene viser at BPA påvirket veksten av *E. coli*, og at økt BPA-konsentrasjon førte til flere bakteriekolonier. Det ble observert en klar doseavhengig sammenheng, hvor høyeste vekst forekom ved 10 mg/L BPA, og laveste vekst i kontrollgruppen uten BPA (se tabell 1 og figur 2). Standardavvikene var relativt lave

innen hver gruppe (se tabell 1), noe som tyder på konsistente resultater og høy reliabilitet. Dette styrkes ytterligere av regresjonsanalysen, som viser en tydelig sammenheng mellom BPA-konsentrasjon og vekst ($r^2 = 0,99$, se figur 3). Tidligere studier har også vist at bisfenoler kan påvirke tarmfloraen ved å endre sammensetningen og redusere diversiteten (Średnicka et al., 2024), noe som støtter våre funn.

Vår hypotese om at BPA ville hemme veksten av *E. coli* ble dermed ikke bekreftet – resultatene viste det motsatte. Det ble observert størst vekst ved høyeste BPA-konsentrasjon og gradvis lavere vekst ved reduserte konsentrasjoner. En potensiell feilkilde i forsøket er tellingen av bakteriekolonier. Ved de høyeste konsentrasjonene (10 mg/L og 1 mg/L) var det svært mange kolonier, og de lå tett. Dette kan ha ført til at noen kolonier vokste sammen og ble vanskelig å telle nøyaktig, noe som igjen kan ha gitt en underestimert av veksten (se tabell 1 og figur 2). Det er dermed mulig at BPA har hatt enda større effekt enn det resultatene viser.

Videre kan det ha vært unøyaktigheter i pipettering eller i hvor mye startkultur som ble tilsatt hver kolbe. Dette kan forklare enkelte avvik, som for eksempel at kolbe B med 0,1 mg/L BPA viste vesentlig høyere vekst enn de to andre kolbene med samme konsentrasjon (henholdsvis 1109, 1143 og 804 kolonier, se tabell 1 og figur 2). At vi brukte tre kolber for hver konsentrasjon bidro til å redusere effekten av slike tilfeldige feil og gir et mer robust datagrunnlag. Et aspekt som bør diskuteres nærmere er valg av BPA-konsentrasjoner. Konsentrasjonene 10 mg/L til 0,01 mg/L ble valgt for å dekke et bredt spekter og sikre at eventuelle effekter kunne avdekkes. Selv om det er utfordrende å vite hvilke nivåer tarmflora faktisk utsettes for, er det kjent at kosthold er hovedkilden for BPA hos mennesker (Folkehelseinstituttet, 2023). Det er derfor rimelig å anta at de laveste konsentrasjonene i forsøket ligger nærmere realistiske nivåer i tarmen, mens de høyere først og fremst viser potensialet BPA har for å påvirke bakterievekst.

Når det gjelder overførbarhet, er det viktig å understreke at modellen vi har brukt er forenklet. *E. coli* ble dyrket i monokultur under aerobe forhold, i motsetning til det komplekse, anaerobe miljøet i menneskets tarm. Dette betyr at interaksjoner med andre bakterier, samt påvirkningen fra vertens immunsystem og metabolisme, ikke fanges opp. Likevel kan resultatene indikere at BPA har potensial til å fremme vekst av enkelte bakterier, noe som igjen kan forstyrre balansen i tarmfloraen. En overvekst av *E. coli* kan føre til at gunstige bakterier utkonkurreres, noe som kan svekke tarmens funksjon og immunforsvar (Zheng et al., 2020).

Selv om vår modell ikke fullt ut gjenspeiler forholdene i tarmen, gir funnene verdifull innsikt i hvordan BPA kan påvirke bakterievekst. Dette understreker behovet for videre studier i mer komplekse og representative systemer, som in vitro-modeller med blandingskulturer eller dyremodeller.

Konklusjon

Som konklusjonen i denne studien viser at bisfenol A (BPA) har en betydelig innvirkning på veksten av *Escherichia coli* (*E. coli*). Hypotesen om at høyere konsentrasjon BPA ville forhindre vekst av *E. coli* ble ikke bekreftet. Økende konsentrasjoner av BPA førte til høyere antall bakteriekolonier, noe som tyder på at BPA kan stimulere veksten av *E. coli*. Denne effekten kan potensielt forstyrre balansen i tarmfloraen, spesielt da *E. coli* kan konkurrere med de gunstige bakteriene som er viktige for tarmhelsen. Selv om enkelte feilkilder, som unøyaktigheter ved blanding av konsentrasjoner eller stryking av bakteriene, kan ha påvirket resultatene, er den observerte sammenhengen mellom BPA-konsentrasjonene og bakterieveksten tydelig. Fremtidige studier vil være avgjørende for å få en dypere forståelse av hvordan BPA påvirker tarmfloraen og hvordan dette kan bidra til helseproblemer.

Referanser

- Arbeidstilsynet. (2018, April 15). Grunnlag for fastsettelse av grenseverdi Grunnlagsdokument for bisfenol A ($C_{15}H_{16}O_2$). *Arbeidstilsynet*. <https://www.arbeidstilsynet.no/globalassets/tema/kjemikalier/grunnlagsdokumenter-for-grenseverdier-for-kjemikalier/b/bisfenol-a-grunnlagsdokument-2018.pdf>
- Biosense enviroSAFE. (2023). *Miljø og vannkvalitet* | Biosense Laboratories. Biosense Laboratories. <https://biosense.com/no/enviroSAFE>
- Brox, J., Averina, M., & Huber, S. (2020). Kan miljøgifter true oss som art? *Tidsskrift for Den Norske Legeforening*, 140. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.20.0392>
- Gjøby, I. (2023). *NMBU Veterinaerhøgskolen Institutt for parakliniske fag Mattrygghet*. NMBU. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/bitstream/handle/11250/3105833/Gj%c3%b8by2023.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Husøy, T. (2023, December 18). *FHI.no*. Folkehelseinstituttet. <https://www.fhi.no/kl/miljogifter/fakta/bisfenol-a-og-helserisiko---faktaar>
- Miljøverndepartementet. (2010, November 9). *NOU 2010: 9*. Regjeringen.no. <https://www.regjeringen.no/no/no/dokumenter/nou-2010-9/id622877/>
- Oliphant, K., & Allen-Vercoe, E. (2019). Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, 7(91). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>
- Otterholt, E. (2022, February 15). *Tarmflora* Store medisinske leksikon. Store Medisinske Leksikon. <https://sml.snl.no/tarmflora>
- Paulsen, M., Thomsen, C., Brantsæter, A. L., Granum, B., & Haug, L. (2023, September). *Miljøgifter i norske barn. Resultater fra Miljøbiobanken*. Folkehelseinstituttet; Folkehelseinstituttet. <https://www.fhi.no/contentassets/970cede40331456fa88734a05d02de5a/rapport-miljogifter-i-norske-barn-2023-v2.pdf>
- Ramirez, J., Guarner, F., Bustos Fernandez, L., Maruy, A., Sdepanian, V. L., & Cohen, H. (2020). Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(10). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572912>
- Średnicka, P., Roszko, M., Emanowicz, P., Wójcicki, M., Popowski, D., Kanabus, J., & Juszczuk-Kubiak, E. (2024). Influence of bisphenol A and its analogues on human gut microbiota composition and metabolic activity: Insights from an in vitro model. *Science of the Total Environment*, 956, 177323. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.177323>
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010) *The population genetics of commensal Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207-217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
- Yokoyama, M. (2020, May 28). *E. coli as a Model Organism*. News-Medical.net. <https://www.news-medical.net/life-sciences/E-coli-as-a-Model-Organism.aspx>
- Wassenaar, T. M. (2016). *Insights from 100 years of research with probiotic E. coli*. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 6(3), 147-161. <https://doi.org/10.1556/1886.2016.00029>
- Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*, 30(6), 492-506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>