

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**ВПЛИВ БІСФЕНОЛУ А НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ
АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ТА БІОДЕГРАДАЦІЇ
*CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM***

**Кваліфікаційна робота
Рівень вищої освіти - перший (бакалаврський)**

Виконала:

студентка 4 курсу, 407 групи
Спеціальності «Біотехнології та біоінженерія»

Щепановська Марія Андріївна

Керівник:

кандидат біологічних наук, доцент

Васіна Л.М.

До захисту допущено

на засіданні кафедри біохімії та біотехнології

протокол № _____ від _____ 2025 р.

Зав. кафедрою _____ доцент Волощук О.М.

Чернівці - 2025

АНОТАЦІЯ

У роботі досліджено вплив бісфенолу А у концентраціях 2.5, 5.0 та 7.5 мг/мл на Corynebacterium glutamicum. Встановлено, що ВРА індукував оксидативний стрес, про що свідчило зростання рівня малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів. Відзначено активацію ферментів антиоксидантного захисту: каталази, пероксидази, супероксиддисмутази та позаклітинних оксидаз - лаккази, лігнінпероксидази й марганецьзалежної пероксидази. Найвищу активність продемонстрував останній фермент, що вказує на його ключову роль у біотрансформації ВРА. Відмічено прогресуючий деструктивний вплив полютанта на розвиток бактерій обумовлений зростанням його концентрації, що підтверджувалося збільшенням діаметру лізису колоній при вирощуванні мікроорганізмів на твердому поживному середовищі.

Ключові слова: *бісфенол А, Corynebacterium glutamicum, антиоксидантні ферменти, біодеградація*

This study examined the impact of bisphenol A (BPA) at concentrations of 2.5, 5.0, and 7.5 mg/mL on Corynebacterium glutamicum. BPA exposure induced oxidative stress, as indicated by elevated levels of malondialdehyde and diene conjugates. A significant increase in the activity of antioxidant defense enzymes was observed, including catalase, peroxidase, and superoxide dismutase, as well as extracellular oxidases such as laccase, lignin peroxidase, and manganese peroxidase. The highest activity was demonstrated by the latter enzyme, suggesting its key role in the biotransformation of BPA. A progressive destructive effect of the pollutant on bacterial development was also observed with increasing BPA concentration, as evidenced by the enlargement of colony lysis zones on solid nutrient medium.

Key words: *bisphenol A, Corynebacterium glutamicum, antioxidant enzymes, biodegradation*

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	<u>5</u>
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	
1.1.Бісфенол А: хімічна структура, властивості, джерела забруднення та вплив на екосистеми.....	<u>7</u>
1.2.Токсичність ВРА та механізми його впливу на мікроорганізми.....	<u>9</u>
1.3.Біохімічні маркери окисного стресу та механізми антиоксидантного захисту.....	<u>12</u>
1.4.Екзоферментна утилізація ВРА.....	<u>15</u>
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	
2.1.Матеріали дослідження.....	<u>17</u>
2.2.Схема дослідження.....	<u>17</u>
2.3.Методи дослідження.....	<u>18</u>
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	
3.1.Вплив ВРА на ріст культури <i>C.glutamicum</i>.....	<u>24</u>
3.2.Біохімічні маркери ушкодження мембран у <i>C. glutamicum</i> за умов ксенобіотичного стресу.....	<u>25</u>
3.3. Адаптивна активація антиоксидантних ферментів у відповідь на дію бісфенолу А.....	<u>28</u>
3.4. Вплив бісфенолу А на екзоферментативну активність.....	<u>31</u>
ВИСНОВКИ.....	<u>35</u>
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	<u>36</u>
ДОДАТКИ.....	<u>44</u>

ВСТУП

Упродовж останнього десятиліття посилюється науковий інтерес до проблеми ксенобіотичного навантаження на довкілля. Серед них одним із найпоширеніших та найретельніше вивчених полютантів є бісфенол А (ВРА) - синтетична органічна сполука, яку застосовують у виробництві полікарбонатних пластиків, епоксидних смол та термочутливих барвників [1].

Завдяки використанню у споживчих товарах, ВРА набув статусу глобального забруднювача, що здатен проникати до організму людини різними шляхами: перорально, інгаляційно та трансдермально [2]. Бісфенол А є одним із значущих антропогенних контамінантів водного середовища, концентрації якого переважно фіксуються у прибережних зонах, річках та малих водотоках. Його повсюдне поширення зумовлює постійний щоденний контакт як людей, так і тварин із цією сполукою, що підвищує ризики хронічного токсичного впливу на живі системи.

Бісфенол А руйнується під впливом температури, ультрафіолетового опромінення або дії специфічних хімічних агентів. Ці фактори сприяють його вивільненню з полімерних матриць у навколишнє середовище, підвищуючи ризики екотоксичного забруднення. З огляду на підтверджений несприятливий вплив ВРА на біоту та здоров'я людини, останніми роками зростає науковий інтерес до розробки високоефективних стратегій його детоксикації.

Серед численних методів особливу увагу привертають біотехнологічні методи які базуються на використанні метаболічного потенціалу прокаріотичних організмів. Наразі активно досліджуються шляхи мікробного видалення ВРА із забруднених екосистем, однак основна частина експериментальних даних стосується впливу розчинених форм ксенобіотика. У той же час бракує наукової інформації щодо біологічної дії

ВРА у нерозчиненому агрегатному стані, що потребує подальших досліджень у цьому напрямі.

Метою роботи було дослідження механізмів відповіді *C. glutamicum* на токсичний вплив Бісфенолу А шляхом комплексної оцінки активності антиоксидантних ферментів та ферментів біодеградації.

Об'єктом дослідження виступав мікроорганізм *Corynebacterium glutamicum* – грампозитивна паличкоподібна бактерія, яка є класичним біотехнологічним об'єктом завдяки своїй здатності до синтезу амінокислот і широкому промислового застосуванню.

Відповідно до мети поставленні наступні завдання:

- Дослідити вплив різних концентрацій бісфенолу А на ріст культури *Corynebacterium glutamicum*
- Визначити рівень окисного стресу у клітинах *C. glutamicum* під дією ВРА шляхом кількісного аналізу продуктів пероксидного окиснення ліпідів - дієнових кон'югатів та ТБК-активних продуктів.
- Оцінити активність ключових ферментів антиоксидантного захисту у відповідь на ксенобіотичне навантаження.
- Проаналізувати зміну активності екзоферментів, що потенційно беруть участь у деградації ВРА.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Бісфенол А: хімічна структура, властивості, джерела забруднення та вплив на екосистеми

Бісфенол А (ВРА) - одна з найстаріших синтетичних сполук, відома своїм руйнівним впливом на ендокринну систему. Хімікат використовують як компонент для покращення фізико-хімічних властивостей багатьох споживчих товарів, зокрема, багаторазових пластикових пляшок, дитячих пляшечок, покриттів банок для їжі та напоїв, медичних та стоматологічних приладів тощо [3]. Молекулярна формула ВРА - $C_{15}H_{16}O_2$

Молекулярна маса 228.29 г/моль, за хімічною структурою це два фенольні кільця, з'єднані через центральний карбонільний міст (рис. 1).

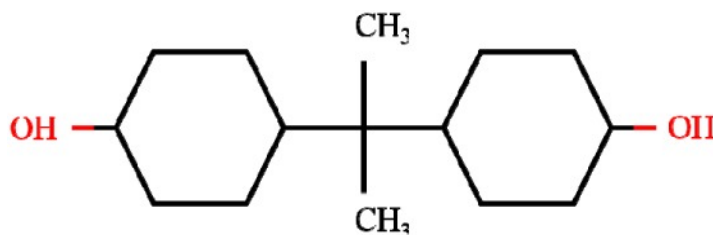


Рис.1.1. Хімічна формула бісфенолу А

Бісфенол А (ВРА), похідне фенолу й ацетону, синтезується при низькому рН за допомогою каталізатора. Його хімічна назва - 2,2-біс(4-гідроксифеніл)пропан. У чистому вигляді ВРА являє собою білий порошок із легким запахом, розчинний у різних органічних розчинниках, таких як етанол, ацетон і бензол, але майже нерозчинний у воді. Сполука характеризується температурою плавлення в діапазоні 150-155 °С і температурою кипіння 220 °С (при 0,53 кПа)[4].

Щоденне споживання продуктів із вмістом ВРА зумовило його розповсюдження у воді, ґрунті та навіть повітрі. Осередками масового забруднення є країни з розвинутою електронною промисловістю, де відсутній належний контроль за утилізацією побутових та промислових відходів [5]. Основними джерелами забруднення ґрунту ВРА є: осад стічних

вод, фільтрат зі звалищ та безконтрольне спалювання електронних відходів. Загалом сполуку виявляють в усіх природніх екосистемах. Глобальний ринок бісфенолу А у 2024 році становив приблизно 37 мільйонів тонн, і, за прогнозами, демонструватиме середньорічний темп зростання на рівні 5-15% упродовж прогнозованого періоду до 2035 року [6].

Згідно з проведеними дослідженнями, приблизно 56 мкг/л ВРА з водного середовища, 1-150 мкг/кг із ґрунту та 2-208 нг/м³ ВРА з атмосферного повітря може потрапити в організм людини [7].

Незважаючи на глобальне розповсюдження ксенобіотика, відомо про обмежену кількість опублікованих робіт, що стосуються його присутності в ґрунті. Наприклад, у ґрунтах, забруднених осадам стічних вод, концентрація поллютанта зазвичай становить до 150 мкг/кг.

У поверхневих водах концентрація досягала до 56 мкг/л. Дослідження охоплювали річкові райони, а також морські екосистеми, такі як Балтійське море, де зареєстровані найвищі концентрації в поверхневих водах 193 нг/л і в підземних водах 39 нг/л. У Франції середня концентрація ВРА у питній воді становить 14 нг/л, а максимальна сягає 1,3 мкг/л.

Незважаючи на низьку летючість і короткий період напіврозпаду ВРА в процесі фотоокислення (< 7 годин), його концентрації в атмосфері демонструє значні відмінності. У міських районах Індії, Китаю, Японії, Нової Зеландії та США зафіксовано концентрації ВРА від 0,004 до 17 нг/м³, а в сільській місцевості Китаю та Німеччини від 0,005 до 0,2 нг/м³[8].

Період напіврозпаду змінюється залежно від середовища, в якому знаходиться поллютант. У воді та ґрунті до 4-5 діб, у атмосферному повітрі менше доби [9].

Загалом вплив бісфенолу А на людину є поширеним явищем, згідно з дослідженнями біомоніторингу, в Сполучених Штатах, Німеччині та Канаді більш ніж у 90% людей виявили присутність бісфенолу А в сечі. На жаль, ВРА, як і інші хімічні речовини, може десорбуватися з різних

полімерних матеріалів, залежно від температури та рН, і мігрувати через їжу та повітря в шкіру, слину та кров людини [10].

Спираючись на нові наукові дані, експерти Європейського агентства з безпеки харчових продуктів (EFSA) визначили добову норму споживання бісфенолу А на рівні 0,2 кг/мт/добу, замінивши попереднє тимчасове значення 4 кг/мт/добу. Ця нова величина приблизно в 20 000 разів нижча за попередню [11].

1.2. Токсичність ВРА та механізми його впливу на мікроорганізми

Наукова спільнота безперервно вивчає ВРА з двох причин: перша пов'язана з його присутністю у найрізноманітніших споживчих товарах, а друга - з його здатністю забруднювати їжу та напої, спричиняючи токсичний вплив на тварин, людей та рослини.

ВРА класифікується як ендокринний руйнівник через його здатність імітувати естроген. Завдяки своїм антиандрогенним ефектам ксенобіотик діє як агоніст рецепторів естрогену та антагоніст рецепторів андрогену [12]. Бісфенол А проникає крізь плацентарний бар'єр, накопичується в тканинах матері та плоду і порушує фізіологічні функції та завдає шкоди здоров'ю [13]. Після перорального прийому ВРА утворює стабільну сполуку - ВРА - глюкуронат [14].

Завдяки своїй ліпофільній природі ($\log P$ 3,4) ксенобіотик може накопичуватися в тканинах людини та тварин. Дослідження показують, що сполука може підвищувати ризик ожиріння, сприяючи накопиченню ліпідів у жировій тканині та печінці та впливаючи на рівень цитокінів. Крім того, ВРА перешкоджає синтезу, секреції та передачі сигналів тиреоїдних гормонів. Ксенобіотик чинить негативний вплив на процес сперматогенезу, знижує рухливість сперматозоїдів і порушує репродуктивні функції чоловіків [15].

Бісфенол А асоціюється з підвищеним ризиком гіпертонії та серцево-судинних захворювань у людей хоча точний механізм цього ефекту ще невідомий [16]. Також, ВРА впливає на метаболізм глюкози, чинить нейродегенеративні ефект та може впливати на функцію вродженої та набутої імунної системи. За останніми оцінками, середньодобове надходження бісфенолу А в організм людини становить приблизно 30,76 нг/кг маси тіла на добу. Однак для вагітних жінок цей показник є значно вищим - близько 42,03 нг/кг маси тіла на добу, що перевищує раніше встановлені безпечні добові норми споживання ВРА.

На клітинному рівні ВРА порушує редокс-гомеостаз ініціюючи оксидативний стрес [17]. Встановлено, що полютант спричиняє внутрішньоклітинну дисфункцію органел, а саме: впливає на просторову організацію веретена поділу та формування взаємодій між кінетохорами та мікротрубочками [18,19].

Незважаючи на наявність певних мікроорганізмів, здатних біологічно розкласти бісфенол А, сама сполука може бути шкідливою для інших мікроорганізмів. Вплив ксенобіотика охоплює широкий спектр ефектів, серед яких пригнічення розмноження та скорочення чисельності окремих груп ґрунтової мікробіоти, залежно від його концентрації [20].

Фенольні сполуки адсорбуються на поверхні клітини завдяки водневим зв'язкам, гідрофобним та електростатичним взаємодіям, знижуючи ефективність синтезу пуринів, піримідинів та фосфоліпідних жирних кислот[21]. Порушення цілісності та функціонування мембрани бактеріальної клітини може бути зумовлене інтеркаляцією молекул бісфенолу А у її структуру, завдяки взаємодії з фосфоліпідними компонентами[22]. Через обмеження взаємодії між ланцюгами жирних кислот, вплив фенольної сполуки може призвести до пригнічення мікробного дихання та росту.

Дослідження впливу бісфенолу А на мікроорганізми є важливим для оцінки екологічних наслідків забруднення, оскільки мікроорганізми відіграють важливу роль у підтримці здоров'я екосистем і біогеохімічних циклів. На сьогодні ідентифіковано та охарактеризовано кілька прокариотів, які утилізують ВРА. Штами бактерій, що розкладають ВРА, виділені з ґрунту, річкової та морської води, навіть зі зразків їжі. Вони здатні використовувати бісфенол А як єдине джерело вуглецю та енергії. До цієї групи мікроорганізмів належать грамнегативні бактерії родів *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Pandoraea*, *Cupriavidus*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Achromobacter*, *Nitrosomonas*, *Serratia* та грампозитивні *Bacillus* і *Streptomyces* [23].

Мікроорганізми характеризуються високим потенціалом для біоремедіації середовищ від бісфенолів. У природних умовах ВРА переважно розкладається завдяки діяльності різних прокариот. На ефективність біодеградації полютанта впливає багато факторів навколишнього середовища, таких як нагромадження ґрунтової мікрофлори в середовищі, температура, рН, присутність кисню та біологічних сполук. На основі ідентифікованих продуктів метаболізму бісфенолу А, отриманих в ході мікробної деградації, було встановлено існування принаймні чотирьох основних біохімічних шляхів його трансформації (рис. 1.3.). Ці шляхи передбачають послідовне окиснення, редукцію, гідроксилування та розщеплення ароматичного кільця з утворенням нетоксичних або менш токсичних проміжних і кінцевих метаболітів.

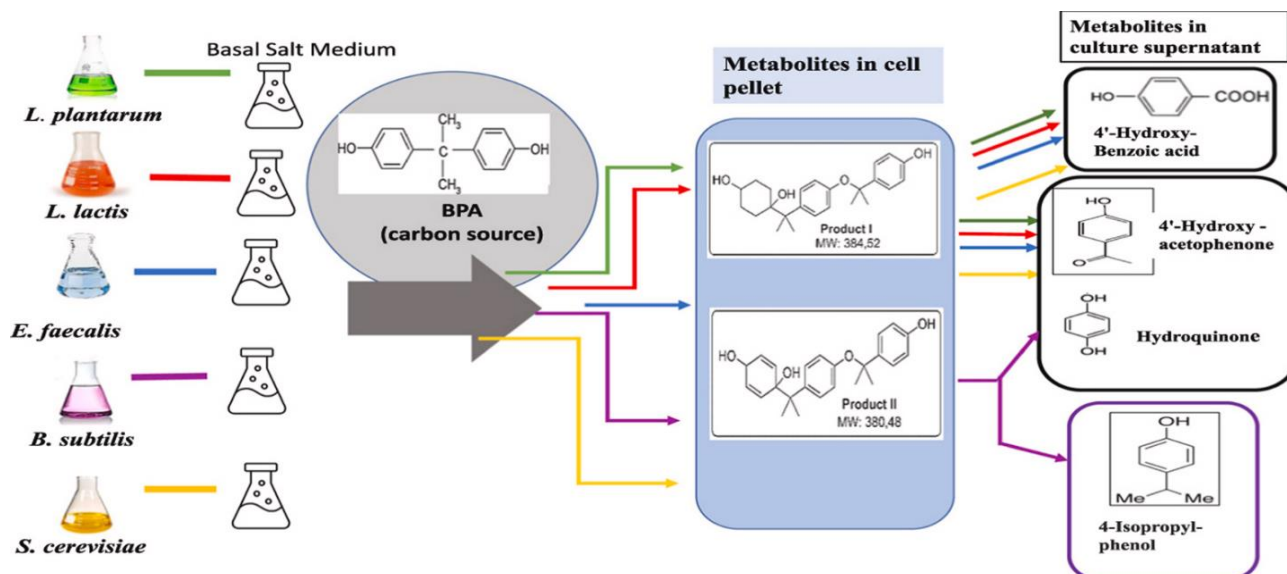


Рис.1.2. Шляхи деградації бісфенолу А та кінцеві метаболіти розпаду [24]

Більшість досліджуваних мікроорганізмів продемонстрували здатність метаболізувати ВРА з утворенням сполук, таких як гідрохінон та 4-гідроксиацетофенон - базових продуктів первинного окиснення. Деякі представники факультативної мікрофлори, зокрема *Lactococcus lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, а також дріжджові культури *Saccharomyces cerevisiae*, здійснюють подальші окиснення цих метаболітів до гідроксибензойної кислоти. У свою чергу, бактерії *Bacillus subtilis* здатні каталітично перетворювати ВРА до ізопропенілфенолу, що вказує на альтернативний шлях деградації, пов'язаний з розщепленням алкільних бокових ланцюгів [24].

1.3. Біохімічні маркери окисного стресу та механізми антиоксидантного захисту мікроорганізмів

Окислювальний стрес виникає внаслідок порушення балансу між утворенням активних форм кисню та здатністю клітини ефективно їх знешкоджувати за допомогою антиоксидантних механізмів захисту.

Активні форми кисню (АФК), зокрема O_2^- , H_2O_2 та $\cdot OH$, є природними побічними продуктами клітинного метаболізму і можуть утворюватись як у межах нормального метаболізму, так і під впливом зовнішніх або внутрішніх чинників, що ініціюють розвиток патологічних станів. За умов надмірного накопичення АФК клітинна антиоксидантна система виявляється неспроможною підтримувати гомеостаз, що призводить до виникнення оксидативного стресу [25]. Неконтрольоване утворення активних форм кисню може руйнувати основні біомолекули - ліпіди, амінокислоти, білки, вуглеводи та нуклеїнові кислоти.

Одним із ключових біохімічних проявів оксидативного стресу є пероксидне окислення ліпідів(ПОЛ) - процес, що супроводжується ушкодженням поліненасичених жирних кислот у складі клітинних мембран. Первинними маркерами пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) є дієнові кон'югати (ДК), які утворюються внаслідок ізомеризації подвійних зв'язків у поліненасичених жирних кислотах під дією вільних радикалів. Їх наявність свідчить про початкову фазу ушкодження ліпідних мембран, а також про активацію вільнорадикальних процесів. Накопичення ДК є передумовою для утворення гідропероксидів, які надалі можуть зазнавати розпаду з утворенням вторинних токсичних продуктів.

До вторинних продуктів ПОЛ належать малоновий діальдегід (МДА), пропаналь, гексаналь та 4-гідроксиноненаль (4-HNE). Ці сполуки є результатом деструкції гідропероксидів поліненасичених жирних кислот. Особливу увагу приділяють МДА, оскільки він є найбільш стабільним і широко використовуваним маркером ступеня окисного пошкодження. МДА, як активна форма альдегіду, здатна ковалентно взаємодіяти з аміногрупами білків, утворюючи шиффові основи, що змінюють третинну структуру білкових молекул та можуть призводити до утворення нерозчинних білок-ліпідних комплексів [26].

Окислення бічних ланцюгів амінокислот призводить до утворення карбонільних груп у складі білків, що вважається незворотнім та важко індукованим процесом, порівняно з іншими видами окислювальних модифікацій [27].

Антиоксидантний захист клітини реалізується завдяки багаторівневій системі, що включає ферментативні та неферментативні механізми, які координовано функціонують для знешкодження активних форм кисню і перешкоджання оксидативному ушкодженню біомолекул. Основне завдання антиоксидантів - запобігати або сповільнювати окиснення біомолекул, тим самим знижуючи рівень оксидативного стресу та пов'язане з ним клітинне пошкодження [28].

Найбільш небезпечними серед АФК вважаються гідроксильні радикали ($\cdot\text{OH}$) та пероксинітрил (ONOO^-), які мають надзвичайно високу реакційну здатність із білками та ліпідами клітинних мембран. Через високу швидкість цих реакцій нейтралізувати їх за допомогою екзогенних низькомолекулярних антиоксидантів (наприклад, вітамінів С і Е) практично неможливо. Основним ефективним підходом до попередження ушкодження є запобігання утворенню цих АФК шляхом їх первинної детоксикації ферментативними антиоксидантами.

Першу лінію антиоксидантного захисту забезпечують ферменти: супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатіонпероксидаза (GPx) та пероксиредоксин (Prx), які знешкоджують супероксид-аніони ($\text{O}_2^{\cdot-}$) і пероксид водню (H_2O_2), тим самим запобігаючи утворенню високореактивних гідроксильних радикалів. SOD каталізує дисмутацію супероксиду до H_2O_2 та O_2 , а каталаза і GPx - подальше розщеплення H_2O_2 .

Каталаза (EC 1.11.1.6) є тетрамерним ферментом, кожна субодиниця якого містить гемову групу, необхідну для каталітичної активності.

Пероксидази (EC 1.11.1.x), використовують електронні донори для

відновлення пероксидів, забезпечуючи захист від органічних і неорганічних пероксидних сполук.

Супероксиддисмутаза (ЕС 1.15.1.1) є металозалежним ферментом антиоксидантної системи, що забезпечує ефективну детоксикацію супероксид-аніон-радикалу $O_2^{\bullet-}$ шляхом його дисмутації до перексиду водню та молекулярного кисню. Каталітична активність ферменту реалізується завдяки окисно-відновним перетворенням перехідних металів у складі активного центру, зокрема іонів міді та заліза.

1.4. Екзоферментна утилізація ВРА

З метою зменшення забруднення навколишнього середовища бісфенолом А дослідники в усьому світі розробляють різноманітні методи його елімінації. Серед фізико-хімічних методів очищення найбільш поширеними є реакція Фентона, озонування та окиснення. Однак кожен з цих підходів має певні обмеження: висока вартість впровадження, тривалий період обробки, ймовірність утворення ще більш токсичних побічних сполук, необхідність частої заміни активованого вугілля та зниження ефективності при використанні насичених мембран. У зв'язку з цим усе більше уваги приділяється мікробній деградації ВРА - перспективному біотехнологічному рішенню, що базується на здатності певних мікроорганізмів розкладати ксенобіотики до нетоксичних сполук. Такий підхід вирізняється не лише екологічною безпечністю, а й економічною доцільністю, і вважається одним з найбільш ефективних біологічних методів очищення довкілля від органічних забруднювачів.

Механізм біодеградації бісфенолу А може відбуватись через адсорбцію молекул ВРА на поверхні бактеріальних клітин та/або активацію ферментних систем мікроорганізмів. Ферменти є ключовими компонентами в процесі утилізації ВРА. Найефективнішими ферментами

вважають: лігнінпероксидазу (LiP) (EC 1.11.1.14), марганецьзалежну пероксидазу - (MnP) (EC 1.11.1.13) та лаккази.

Лакказа здатна окислювати фенольні структури ВРА через передачу електронів до молекулярного кисню, який відновлюється до води без утворення токсичних проміжних сполук. Цей фермент утворює нерозчинні полімерні продукти, які легко видаляються з середовища, та продукти біодеградації, які не володіють естрогенною активністю, що підтверджує їх безпечність. Грибні лаккази зазвичай демонструють високу активність, проте їх промислове застосування ускладнене тривалим циклом культивування. Бактеріальні лаккази, навпаки, характеризуються підвищеною стабільністю і здатністю зберігати активність за екстремальних температур, змін рН, УФ-випромінювання та наявності іонів металів або хімічних інгібіторів [29].

Лігнінпероксидаза (EC 1.11.1.14) є гемвмісним ферментом, який функціонує за наявності пероксиду водню. Цей ензим демонструє високу окислювальну активність щодо різних ароматичних сполук, включно з фенольними та нефенольними субстратами, завдяки чому відіграє суттєву роль у деградації бісфенолу А.

Марганецьзалежна пероксидаза (MnP, EC 1.11.1.13) є гемвмісним ферментом, що каталізує окислення органічних сполук за участю пероксиду водню (H_2O_2) та іонів Mn^{2+} . У процесі реакції MnP окиснює Mn^{2+} до Mn^{3+} , який, у свою чергу, утворює комплекси з органічними кислотами, здатними окиснювати широкий спектр ароматичних сполук, включаючи ВРА [30].

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали досліджень

Матеріалами досліджень слугували чисті культури мікроорганізмів з колекції музейних культур ННІ біології, хімії та біоресурсів.

Corynebacterium glutamicum є грампозитивною, паличкоподібною форми, факультативно анаеробною бактерією, яка є універсальним продуцентом для виробництва широкого спектру корисних хімічних речовин у промислових умовах. Основними продуктами її біотехнологічного використання є амінокислоти, зокрема L-глутамат і L-лізин, які знаходять широке застосування в харчовій промисловості і фармацевтиці. *C. glutamicum* міститься у ґрунті.

C. glutamicum здатна до росту і виробництва амінокислот в аеробних умовах. Однак при обмеженні кисню, бактерія починає виробляти органічні кислоти, такі як L-лактат і сукцинат. Ця властивість дозволяє досліджуваному мікроорганізму адаптуватися до різних умов середовища і максимізувати виходи цінних продуктів у виробничих процесах [31].

2.2 Схема дослідження

Отримання робочих культур бактерій. Для відтворення музейної культури використовували м'ясо-пептонний бульйон (МПБ). Для отримання посівного матеріалу бактерії культивували у рідкому середовищі в пробірках впродовж 24 год, за температури 37 °С. Здійснення основної ферментації відбувалась у колбах Ерленмейера об'ємом 250 мл у МПБ (робочий об'єм 50 мл) за аналогічних умов 24 год. Вміст інокуляту складав 10%.

Дослідження впливу ВРА на ріст культури. Вплив досліджували на загальному агаризованому середовищі в стерильних чашках Петрі. На поверхню поживного середовища розкладали частки полімерного ВРА загальною концентрацією 2,5, 5, 7,5 мг/мл, що імітувало локальне забруднення середовища, яке в 2500, 5000 і 7500 разів перевищувало відомі рівні поллютанту в ґрунті. Культивування мікроорганізмів проводили в термостаті впродовж 24 годин за температури 37°C. Вимірювали діаметр лізису колоній культур протягом 8 діб після початку експерименту.

Підготовка безклітинних екстрактів. Після завершення культивування клітинну біомасу осаджували шляхом центрифугування при 3000g 1 годину. Надосадову рідину, що містила позаклітинні метаболіти, відбирали для аналізу ферментативної активності лігнінпероксидази, лаккази та марганецьзалежної пероксидази.

Осаджені клітини двічі промивали 50мМ трис-НСІ буфером (рН 7.0), після чого ресуспендували в попередньо охолоджену 50мМ трис-НСІ буфері (рН 7.5) та додавали 10^{-5} етилендіамідтетраоцтову кислоту. Отриманий клітинний матеріал використовували для подальшої підготовки безклітинних екстрактів.

Руйнування клітин здійснювали за допомогою ультразвукового гомогенізатора 5 хв за температури 0 °С. Опісля, клітинні уламки осаджували шляхом повторного центрифугування при 3500g протягом 30 хв. Отримані супернатанти використовували для подальших аналізів.

2.3. Методи досліджень

Визначення вмісту білка проводили за методом Лоурі. Вимірювання проводили на фотоелектроколориметрі при λ 750 нм.

Оцінку вмісту дієнових кон'югатів здійснювали шляхом додавання 0,2 мл екстракту до 1,8 мл суміші н-гептан : ізопропанол у співвідношенні 1:1.

Отриману суміш струшували та інкубували при кімнатній температурі впродовж 30 хв. Після центрифугування при 1500g, 10 хв верхній шар відбирали та додавали 0,1 мл води, знову струшували, відбирали 0,5 мл гептанової фази, додавали 2 мл етанолу та проводили вимірювання при λ 233 нм. Розрахунок концентрації дієнових кон'югатів здійснювали з використанням молярного коефіцієнта поглинання 28 000 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$.

Для **оцінки вмісту МДА**, як мажорного ТБК-активного продукту проводили спектрофотометричне визначення за реакцією з тіобарбітуровою кислотою.

До 0,4 мл безклітинного екстракту додавали 3 мл 10 мМ фосфатного буферу (рН 7.4). Для ініціації пероксидного стресу двічі з інтервалом 10 хв вводили 125 мкл 10 мМ $FeSO_4$. Реакцію зупиняли внесенням трихлороцтової кислоти. Центрифугували 1500g 10 хв. До 2 мл супернатанту додавали 0.5 мл 1н HCl і 1 мл 0.7 мМ ТБК, інкубували при температурі 95-100 °С протягом 20 хв. Після охолодження додавали 3 мл бутанолу, перемішували та центрифугували. Поглинання вимірювали у верхньому бутаноловому шарі при λ 532 нм [32]. Розрахунок вмісту МДА здійснювали з використанням молярного коефіцієнта поглинання 156 000 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$.

Каталазну активність оцінювали за кількістю пероксиду водню (H_2O_2), який залишався після ферментативної реакції. Для одержання ферментного екстракту 1 г біомаси мікроорганізмів гомогенізували у фарфоровій ступці з 3 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4). Суміш витримували 5 хв на льоду, після чого центрифугували при 5000 об/хв

протягом 15 хв. Надосадову рідину використовували для подальших аналізів.

Для оцінки активності каталази готували дві проби: контрольну і дослідну. У контрольну пробу додавали 1 мл екстракту, 2 мл розчину H_2O_2 , і одразу ж додавали 0,5 мл 4% розчину молібдату амонію для зупинки реакції. У дослідну пробу додавали ті ж самі об'єми екстракту і H_2O_2 , однак інкубували її при 25 °С протягом 1 хв, після чого реакцію також зупиняли молібдатом амонію. Вимірювання здійснювали при 450 нм [33]. Активність каталази розраховували за формулою:

$$E = \frac{(HP_0 - HP_1)}{(T - P)}$$

де

HP_0 - концентрація H_2O_2 у контрольній пробі (мкмоль),

H_1 - у дослідній,

T - час інкубації (хв),

P - вміст білка в пробі (мкг)

Пероксидазну активність визначали колориметричним методом за Бояркіним [34], заснованим на окисненні бензидину в присутності H_2O_2 під дією пероксидаз з утворенням синього забарвлення. Для приготування екстракту 1 г біомаси гомогенізували з 2 мл ацетатного буфера (рН 4,7) та витримували 10 хв при кімнатній температурі. Після центрифугування при 3000 об/хв (10 хв) надосадову рідину використовували для аналізу.

Реакційну суміш готували у кварцових кюветах, додаючи по 2 мл екстракту, 2 мл 2% H_2O_2 та 2 мл 1% бензидину. В контрольній пробі H_2O_2 замінювали дистильованою водою. Після додавання компонентів включали секундомір, і через 60 с реєстрували поглинання при 590 нм [35]. Активність розраховували у відносних одиницях за формулою:

$$A = \frac{E \cdot (a \cdot b)}{N \cdot c \cdot t}$$

A - активність форм на 1 г наважки

E - екстинція (0,125 або $Q - 250$)

a - об'єм витяжки 50 мл

b - ступінь розведення витяжки в реакційній суміші

N - наважка

c - товщина шару рідини в кюветі

t - час (секунда)

Активність СОД визначали за інгібуванням автоокиснення адреналіну до адренохрому, що має максимум поглинання при 347 нм. Дослідна проба складалась з 2,7 мл 0,2 М карбонатного буфера (рН 10,6), 100 мкл дослідного екстракту та 200 мкл розчину адреналіну. Контрольна проба містила 2,8 мл буфера та 200 мкл адреналіну без екстракту. Оптичну щільність вимірювали кожні 30 с протягом 3 хв при 347 нм [36].

Відсоток інгібування автоокиснення обчислювали за формулою:

$$I\% = (1 - (D_k \div D_d)) \cdot 100\%$$

D_d та D_k - швидкість утворення адренохрому в контролі та дослідній пробах.

Одиниця СОД-активності відповідала 1% інгібування. Остаточне значення активності розраховували як:

$$A = \frac{I\%}{100\% - I\%} \cdot \frac{2}{a}$$

$I\%$ - відсоток гальмування

a - концентрація білка

Активність марганецьзалежної пероксидази визначали спектрофотометричним методом за швидкістю окиснення Mn^{2+} до Mn^{3+} у присутності пероксиду водню при 25 °С. Утворення Mn^{3+} реєстрували за зростанням оптичної щільності при довжині хвилі 240 нм [37]. Реакційна суміш містила: 2,4 мл ацетатного буфера (0,1 М, рН 4,5); 0,1 мл 1 мМ $MnSO_4$; 0,1 мл 0,1 мМ H_2O_2 ; 0,3 мл дослідного зразка. Реакцію ініціювали додаванням пероксиду водню до реакційної суміші. Контрольну пробу

готували без ферментного зразка. Оптичну щільність вимірювали протягом 3 хвилин у кварцовій кюветі. Активність ферменту обчислювали за формулою:

$$A = \frac{\Delta A \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot t \cdot C}$$

де:

ΔA - зміна поглинання при 240 нм,

V - об'єм реакційної суміші (л),

ε - молярний коефіцієнт поглинання Mn^{3+} , $6500 M^{-1} \cdot cm^{-1}$

d - товщина шару в кюветі,

t - час інкубації (хв),

C - концентрація білка у зразку (мг/мл)

Для визначення активності лігнінпероксидази використовували метиленовий синій як субстрат. Реакційна суміш складалася з 2,2 мл культуральної рідини, 0,1 мл метиленового синього (1,2 мМ), 0,6 мл натрій-ацетатного буферу (0,5 М, рН 4) і 0,1 мл H_2O_2 (2,7 мМ) [38]. Реакцію ініціювали додаванням пероксиду водню. Вимірювання оптичної щільності проводили одразу після додавання всіх компонентів, з інтервалом 1 хв протягом 3 хв при довжині хвилі 664 нм.

Лакказну активність визначали спектрофотометричним методом, що базується на окисненні 2-нафтолу до продукту, який абсорбує світло при 520 нм. Реакційна суміш загальним об'ємом 2,5 мл складалась з 2,0 мл ацетатного буферу (50 мМ, рН 5,0), 0,2 мл 10 мМ розчину 2-нафтолу в 96% етанолі, 0,3 мл культуральної рідини. Перед додаванням зразка фіксували початкову оптичну щільність при 520 нм. Після внесення культуральної рідини реакційну суміш інкубували при 30 °С протягом 60 хв, після чого вимірювали кінцеву оптичну щільність [39].

Лакказну та лігнінпероксидазну активність розраховували за формулою:

$$A = \frac{\Delta OD \cdot V_{\text{заг}}}{\varepsilon \cdot l \cdot t \cdot V_{\text{зраз}} \cdot C}$$

Де:

ΔOD - зміна оптичної щільності

$V_{\text{заг}}$ - загальний об'єм реакційної суміші (мл)

ε - молярний коефіцієнт екстинції,

l - довжина кювети (см)

$V_{\text{зразка}}$ - об'єм культуральної рідини (мл)

t - час реакції (хв)

$C_{\text{білка}}$ - концентрація білка у зразку (мг/мл)

Всі експерименти проводили в 5 повторах. Результати представлені як середнє арифметичне значення та відхилення від нього.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою ПЗ Microsoft Excel. Значущість відмінностей підтверджена за критерієм Стюдента, на рівні $p \leq 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив ВРА на ріст культури *C.glutamicum*

Бісфенол А надходить у навколишнє середовище переважно внаслідок деградації або переробки полімерних матеріалів на основі пластмас. Окрім цього, його надходження у воду, ґрунт та атмосферне повітря може зумовлюватися промисловими викидами, експлуатацією виробів, що містять бісфенол А, а також потраплянням побутових і промислових стічних вод у каналізаційні системи.

Початковим етапом дослідження було оцінювання впливу ВРА у нерозчинній формі на ріст *C. glutamicum*. Результати свідчать про концентраційно залежне гальмування росту культури під впливом ксенобіотика (рис.3.1.).

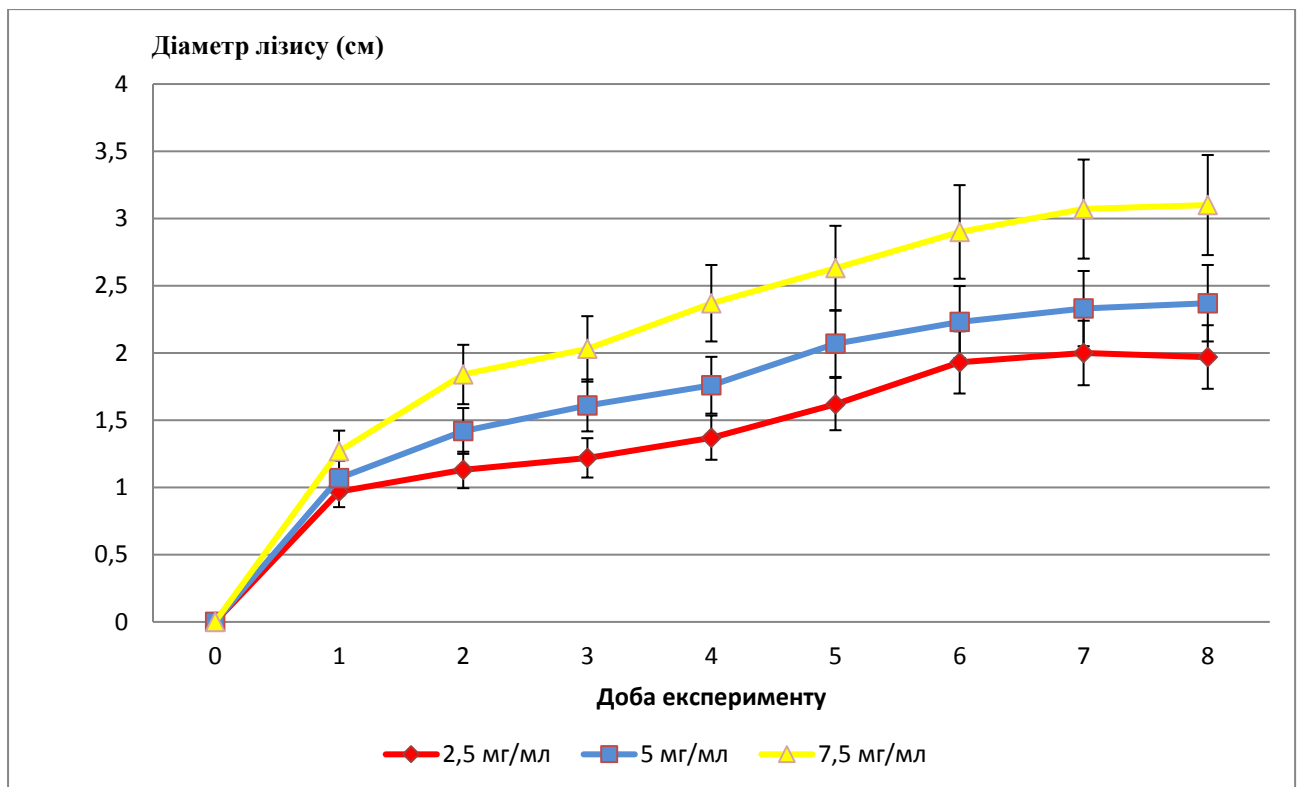


Рис.3.1. Динаміка росту культури *C.glutamicum* за умови пролонгованої дії ВРА

Здійснено аналіз динаміки росту клітин *Corynebacterium glutamicum* під впливом бісфенолу А в концентраціях 2,5; 5,0 та 7,5 мг/мл протягом восьмидобового експериментального періоду. Уже на першій добі зафіксовано формування лізисних зон, що свідчить про ранню чутливість мікроорганізму до дії ксенобіотика. Надалі спостерігалось поступове розширення зони інгібування росту, причому найінтенсивніший приріст відмічено між другою та шостою добою інкубації. У подальшому зростання діаметру лізису уповільнюється, однак на завершальному етапі експозиції, зокрема на восьму добу, для всіх варіантів досліду були досягнуті максимальні значення. Така тенденція свідчить про сталий цитотоксичний вплив бісфенолу А на досліджуваний штам, що має як концентраційну, так і часову залежність. Отримані результати демонструють пролонгований характер пригнічення життєдіяльності *C. glutamicum* за умов тривалої дії досліджуваного ксенобіотика. Цитотоксична дія бісфенолу А, ймовірно, реалізується шляхом специфічної взаємодії з ліпідними компонентами цитоплазматичної мембрани прокаріотичних клітин. З огляду на відсутність стерольних сполук, зокрема холестеролу, у структурі мембран бактерій, що відповідають за підтримання мембранної ригідності та функціональної цілісності, поліютант здатен інкорпоруватись у ліпідний бішар, зумовлюючи зниження ригідності мембрани. У випадку грампозитивних бактерій було встановлено, що зазначений ксенобіотик спричиняє дестабілізацію мембранної структури через порушення ліпідної асиметрії, що, вочевидь, сприяє його накопиченню в клітині та ініціює каскад порушень на рівні бар'єрних та метаболічних функцій [40].

3.2. Біохімічні маркери ушкодження мембран у *C. glutamicum* за умов ксенобіотичного стресу

З урахуванням встановлених порушень структурної організації цитоплазматичної мембрани, зумовлених специфічною взаємодією

бісфенолу А з ліпідним бішаром, можна припустити активацію пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) як однієї з провідних патобіохімічних ланок цитотоксичної дії ксенобіотика. Для кількісної оцінки ступеня індукованого оксидативного стресу в клітинах *C. glutamicum* проаналізували вміст дієнових кон'югатів - стабільних хромофорних сполук, що є характерними маркерами ініціальної фази ПОЛ, а також концентрацію ТБК-активних продуктів, зокрема малонового діальдегіду, який формується внаслідок деградації гідропероксидів ліпідів у пізніших стадіях окисного ушкодження.

Результати дослідження продемонстрували, що вже за дії найнижчої концентрації ВРА фіксується значне зростання обох показників (рис.3.2.).

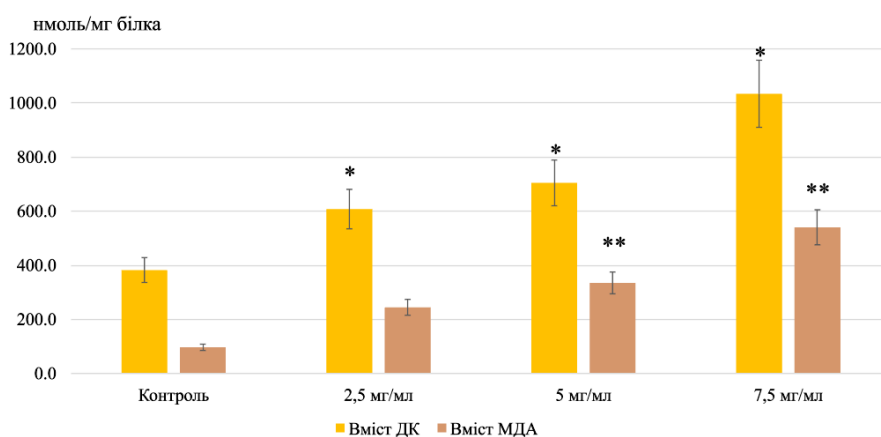


Рис.3.2. Вміст первинних (дієнові кон'югати, ДК) та вторинних (МДА) метаболітів пероксидного окиснення ліпідів *Corynebacterium glutamicum* за дії різних концентрацій бісфенолу А

Примітка * - статистично достовірна різниця порівняно з контрольним значенням для вмісту дієнових кон'югатів

** - статистично достовірна різниця порівняно з контролем для вмісту малонового діальдегіду

Так, вміст ДК перевищував контрольні значення у понад півтора раза, тоді як МДА зростав більш ніж утричі. Із подальшим збільшенням концентрації ксенобіотика в середовищі, інтенсивність ПОЛ прогресивно

зростала: при максимальному навантаженні на систему рівень дієнових кон'югатів сягав значень, у понад 2,5 раза вищих за контрольні, а ТБК-активні продукти перевищували вихідний рівень практично у 7 разів.

Підвищення рівнів дієнових кон'югатів та ТБК-активних продуктів свідчить про глибоке порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в бактеріальних клітинах під впливом бісфенолу А. У ході пероксидного окиснення ліпідів, ініційованого надмірною генерацією активних форм кисню, первинною мішенню у клітині виступають ненасичені жирні кислоти, що входять до складу фосфоліпідів цитоплазматичної мембрани. Саме вони схильні до реакцій з радикалами з утворенням первинних продуктів ПОЛ, зокрема дієнових кон'югатів, які є індикаторами початкових стадій деструкції ліпідного бішару. Послідовна дестабілізація мембран, спричинена інтеграцією ВРА в ліпідну матрицю, сприяє прогресуванню ПОЛ до стадії утворення вторинних продуктів, серед яких малоновий діальдегід є найбільш стабільним і інформативним маркером. Вміст МДА корелює з інтенсивністю радикальних ушкоджень мембран та є свідченням глибокого окислювального стресу. Зростання малонового діальдегіду у декілька разів порівняно з рівнем дієнових кон'югатів може свідчити не лише про деструктивний пролонгований вплив ксенобіотика, а й про інтенсивну деградацію гідропероксидів до альдегідів, що властиво завершальній стадії ПОЛ[41].

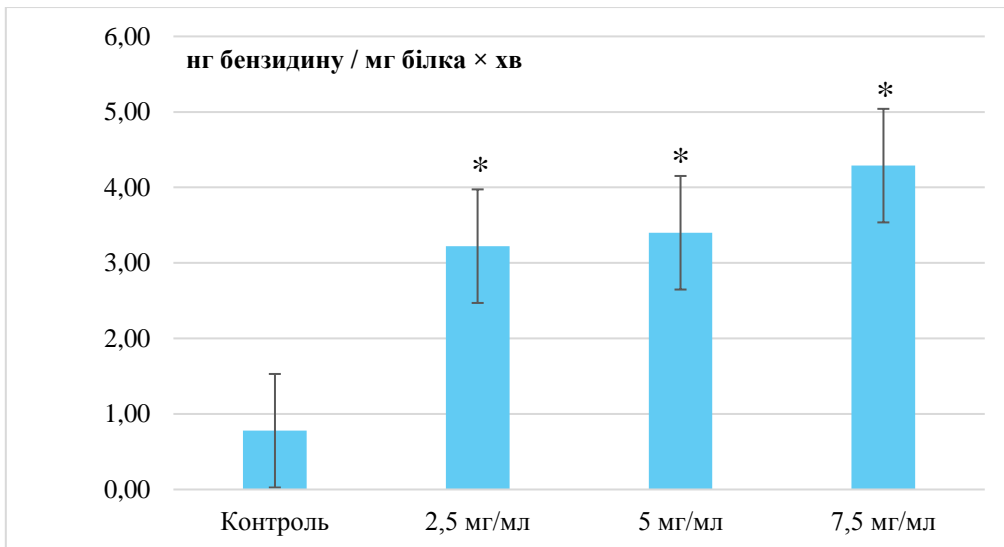
Таке поєднане зростання обох маркерів у відповідь на підвищення концентрації ВРА в середовищі культивування *S. glutamicum* є прямим доказом залучення механізмів ліпопероксидації у токсичну дію сполуки. Імовірно, накопичення ДК і МДА є наслідком не лише безпосередньої дії АФК, а й зниження ефективності внутрішньоклітинних систем детоксикації, що не встигають нейтралізувати продукти вільнорадикальних реакцій за умов ксенобіотичного навантаження.

3.3. Адаптивна активація антиоксидантних ферментів у відповідь на дію бісфенолу А

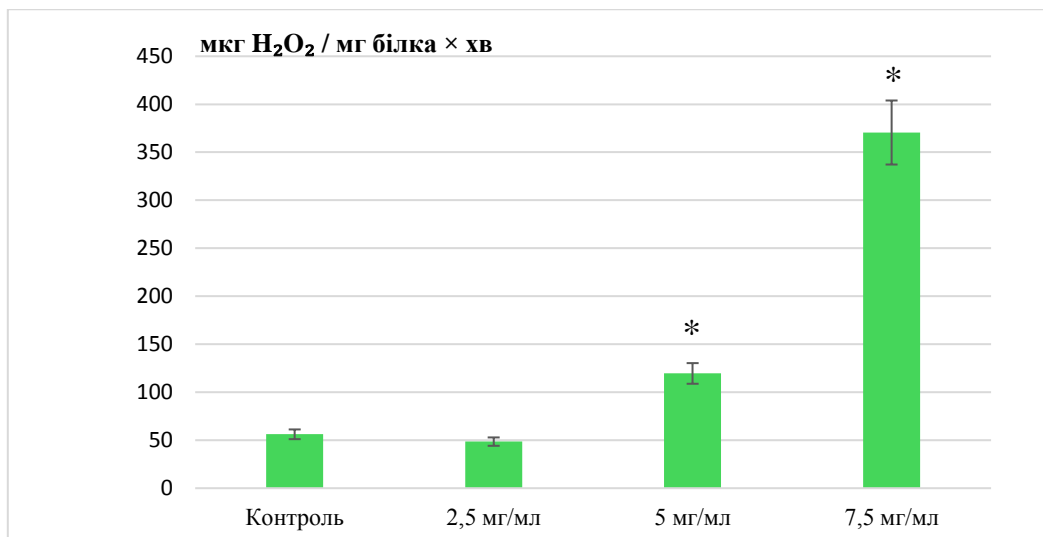
Низка досліджень засвідчила, що бісфенол А здатен генерувати вільні радикали [42], спричиняючи активацію процесів пероксидного окиснення та утворення АФК, що, своєю чергою, порушує функціональну цілісність ендогенної системи антиоксидантного захисту клітин еукаріотичних організмів. Окислювальний дисбаланс, індукований накопиченням активних форм кисню, порушує гомеостаз між прооксидантами й антиоксидантами, зміщуючи метаболічну рівновагу у напрямку пероксидних реакцій.

Ключовими компонентами ферментативної відповіді є супероксиддисмутаза, каталаза та пероксидаза, які забезпечують знешкодження надлишкових активних форм кисню й підтримання редокс-балансу в клітині. У рамках дослідження було проаналізовано зміну активності зазначених ферментів у культурі *Corynebacterium glutamicum* за дії різних концентрацій бісфенолу А з метою з'ясування ефективності реалізації внутрішньоклітинних компенсаторних механізмів.

Активність каталази та пероксидази, як базових компонентів антиоксидантної ферментативної системи *C. glutamicum*, досліджували з метою оцінки реакції клітин на оксидативний стрес, спричинений впливом бісфенолу А (рис. 3.3.).



a



б

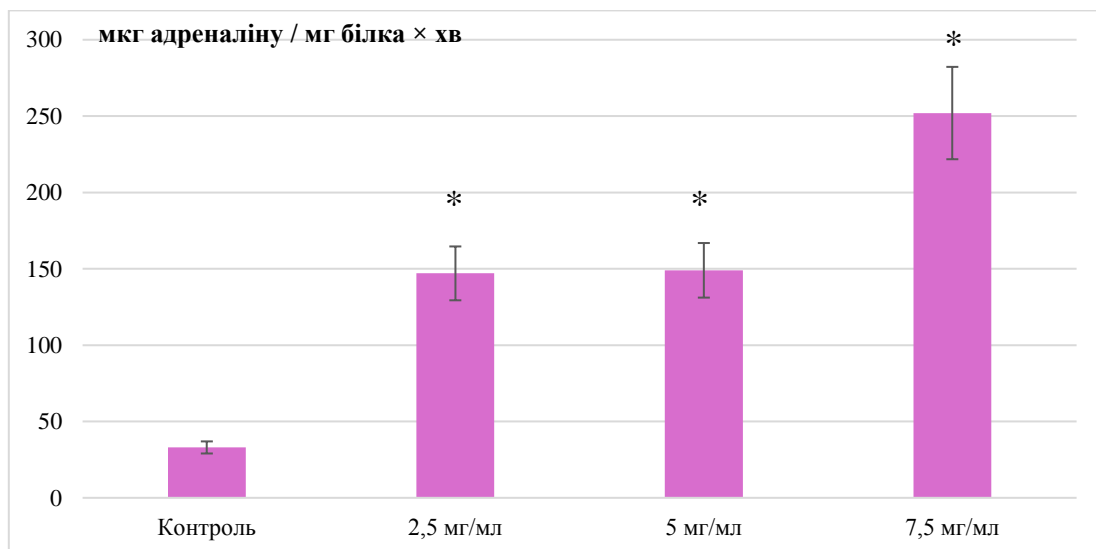


Рис.3.3. Активність ферментів антиоксидантного захисту *Corynebacterium glutamicum*

Примітка: а - каталазна активність

б - пероксидазна активність

в - супероксиддисмутазна активність

Примітка * - статистично достовірна різниця порівняно з контролем

Оцінка функціональної активності ключових пероксиддеградуючих ферментів під впливом різних концентрацій ксенобіотика засвідчила суттєву активацію внутрішньоклітинної антиоксидантної відповіді. Найбільш чутливою до дії ВРА виявилась супероксиддисмутаза, активність якої суттєво зростала вже за мінімального концентраційного навантаження, демонструючи високу чутливість до надлишку супероксид-аніонів у клітинному середовищі. Уже за концентрації 2,5 мг/мл активність СОД зросла у 4 рази порівняно з контролем, а при 7,5 мг/мл - у 7 разів. Така реакція є типовою для стартового етапу розвитку оксидативного стресу, коли СОД забезпечує перетворення O_2^- у H_2O_2 як попередній захисний бар'єр [43].

Каталазна активність, що забезпечує дисмутацію H_2O_2 до води та молекулярного кисню, виявила концентраційно залежну тенденцію до зростання під впливом бісфенолу А. За експозиції 2,5 мг/мл активність ферменту залишалася на рівні контрольного значення, не демонструючи статистично достовірних відхилень, що, ймовірно може бути наслідком первинного гальмівного ефекту або транзиторної дестабілізації каталазної системи. Водночас при концентрації 5 мг/мл активність каталази зросла у 2 рази, а при 7,5 мг/мл — у 6 порівняно з контролем. При підвищенні концентрації ВРА до 5 та 7,5 мг/мл активність ферменту зростала експоненційно, досягаючи піку при максимальному навантаженні. Така

активація є компенсаторною і свідчить про мобілізацію внутрішньоклітинних захисних резервів на тлі посилення ПОЛ [44].

Активність пероксидази виявила концентраційно залежне зростання під впливом бісфенолу А: при внесенні 2,5 мг/мл показник перевищував контроль майже у 4 рази, а подальше підвищення концентрації полютанта до 5 та 7,5 мг/мл супроводжувалося поступовим нарощуванням ферментативної активності до максимального значення. Така динаміка свідчить про стійку індукцію пероксидазної системи в умовах оксидативного стресу та потенційну залученість ферменту до регуляції внутрішньоклітинного редокс-гомеостазу, зокрема, через елімінацію пероксидних субстратів, що утворюються внаслідок дії ВРА.[45].

Літературні джерела свідчать, що за умов тривалої або надмірної дії ВРА каталаза може втрачати активність унаслідок її інактивації чи структурної дестабілізації, тоді як СОД і пероксидаза зберігають підвищену функціональність, компенсуючи дисбаланс у системі клітинного захисту [46]. Натомість результати, отримані в ході дослідження, демонструють дещо відмінну модель відповіді. Зокрема, активність каталази за дії найвищої концентрації полютанта значно зростала порівняно з контролем, що, ймовірно, свідчить про мобілізацію компенсаторних механізмів детоксикації H_2O_2 , який формується як внаслідок супероксиддисмутазної активності, так і в результаті автооксидативних процесів у клітині.

Показники активності СОД та пероксидази, які в усіх варіантах дії бісфенолу залишались суттєво вищими за контрольні значення, узгоджуються з загальновідомими патернами антиоксидантної відповіді на стресогенне навантаження [47].

3.4. Вплив бісфенолу А на екзоферментативну активність

Після встановлення змін у внутрішньоклітинній ферментній системі антиоксидантного захисту, доцільно було оцінити реакцію позаклітинної ланки мікробного метаболізму на ксенобіотичне навантаження. Одним із потенційних напрямів біодеструкції ксенобіотиків фенольної природи є активація позаклітинних ферментів, здатних каталітично окиснювати структури, подібні до ВРА. Лакказа (ЕС 1.10.3.2), лігнінпероксидаза (ЕС 1.11.1.14) та марганецьзалежна пероксидаза (ЕС 1.11.1.13) досліджуються як ферменти, здатні окиснювати ароматичні кільця, фенольні сполуки та інші ксенобіотики за участі молекулярного кисню або перекису водню. Саме екзоферменти можуть бути важливою ланкою первинної детоксикації ксенобіотика ще до його проникнення в клітину або одночасно з дією внутрішньоклітинних систем.

Оцінка активності позаклітинних оксидаз виявила суттєву активацію цих ферментів під впливом бісфенолу А (рис.3.4).

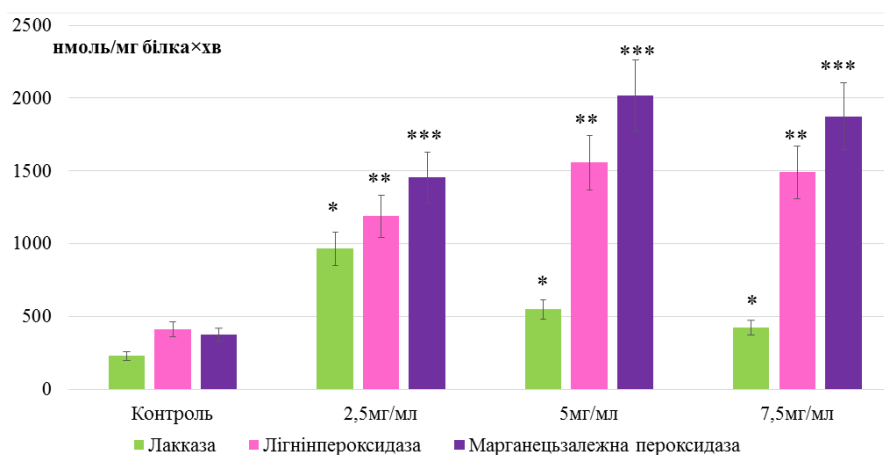


Рис. 3.4. Активність ферментів, залучених у деградацію ксенобіотиків (лакказа, лігнінпероксидаза, марганецьзалежна пероксидаза) у культуральному середовищі *C. glutamicum*

Примітка * - статистично достовірна різниця порівняно з контролем для лакказної активності

** - статистично достовірна різниця порівняно з контролем для лігнінпероксидазної активності

*** - статистично достовірна різниця порівняно з контролем для марганецьзалежної пероксидази

Для всіх трьох ферментів найвищі показники активності було зафіксовано у дослідному варіанті з концентрацією ВРА 2,5 мг/мл, що, ймовірно, відображає ефект "первинної індукції" - активацію ферментогенезу у відповідь на помірне стресове навантаження. Найвищу чутливість до дії ВРА виявила марганецьзалежна пероксидаза: її активність зростала зі збільшенням концентрації полютанта до 5 мг/мл, після чого залишалась на підвищеному рівні навіть за умов подальшого зростання токсичного тиску. Така динаміка свідчить про стійку індукцію MnP, ймовірно, пов'язану з її участю у безпосередньому окисненні фенольних сполук, включаючи ВРА та продукти його окиснення.

Лігнінпероксидаза, в свою чергу, демонструвала наростання активності при зростанні концентрації ВРА до 5 мг/мл, після чого її рівень дещо знижувався, що може бути наслідком інактивації ферменту за умов кумулятивного токсичного впливу продуктів субстратного окиснення або структурної деструкції клітинного апарату, відповідального за секрецію LiP. Найменш стабільну динаміку показала лаккази: після початкової гіперіндукції при 2,5 мг/мл ВРА її активність суттєво знижувалась із подальшим зростанням концентрації ксенобіотика. Цей ефект може свідчити про зворотний зв'язок у регуляції синтезу лаккази або про її чутливість до інгібіторів, які можуть утворюватись у процесі окиснення ВРА.

Варто відзначити, що при кожній концентрації ВРА марганецьзалежна пероксидаза демонструвала вищу активність порівняно з лакказою та лігнінпероксидазою. Це вказує на провідну роль MnP у

детоксикації або трансформації ВРА. Така перевага може бути зумовлена широким субстратним спектром MnP та її здатністю генерувати сильні окисники - манган(III)-комплекси, які можуть ініціювати деградацію ароматичних кілець бісфенолу.

Отримані результати добре корелюють з наявними літературними даними. Зокрема, встановлено, що ферменти лігнінпероксидазного та манганпероксидазного типу здатні індукувати свою активність у присутності цього ксенобіотика, що супроводжується зростанням рівня їх експресії [48]. У роботі Шуняо Лі та його колег, проведеної із залученням базидіоміцета *Pleurotus ostreatus*, показано, що MnP більш стійка до продуктів власної ферментативної реакції та не зазнає такого пригнічення, як лакказа, що підтверджує спостережену в нашому дослідженні тенденцію [49]. Крім того, описано здатність цього ферменту ініціювати окиснення ВРА навіть за відсутності прямих кофакторів, опосередковано через участь хелатів мангану(III), що додатково підсилює його ефективність у процесі детоксикації ксенобіотика це може пояснювати її провідну активність і у нашому експерименті [50].

Отже, марганецьзалежна пероксидаза виявила відносно вищу та стабільнішу активність порівняно з лігнінпероксидазою та лакказою, що може свідчити про її важливу участь у процесах біотрансформації бісфенолу А в умовах оксидативного стресу.

Таким чином, за результатами проведених досліджень встановлено, що бісфенол А чинить багатовекторний токсичний вплив на *Corynebacterium glutamicum*, порушуючи ріст клітин, індукуючи оксидативний стрес і активуючи ферментативні системи антиоксидантного захисту та потенційної біотрансформації ксенобіотика. Найбільш чутливими індикаторами дії ВРА виявилися супероксиддисмутаза та Mn-залежна пероксидаза, що свідчить про залучення останньої до механізмів детоксикації полютанта.

ВИСНОВКИ

1. Бісфенол А інгібує ріст *Corynebacterium glutamicum*, що підтверджується появою зон лізису, величина діаметру яких зростає зі збільшенням концентрації полютанту у середовищі культивування.
2. Внесення Бісфенолу А в середовище культивування призводить до порушення прооксидантної-антиоксидантної рівноваги у клітинах *C. glutamicum*, свідченням чого є зростання вмісту дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів, та мобілізація ферментативної ланки антиоксидантного захисту.
3. Поява Бісфенолу А в культуральному середовищі *C. glutamicum* призводить до зростання активностей потенційних ферментів його утилізації, найбільшою мірою Mn-залежної пероксидази.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Rahman, M. S., Pang, W. K., Ryu, D. Y., Park, Y. J., & Pang, M. G. (2020). Multigenerational and transgenerational impact of paternal bisphenol A exposure on male fertility in a mouse model. *Human reproduction* (Oxford, England), 35(8), 1740-1752. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa139>
2. Rahman, M. S., Adegoke, E. O., & Pang, M. G. (2021). Drivers of owning more BPA. *Journal of hazardous materials*, 417, 126076. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126076>
3. Kataria, A., Trasande, L., & Trachtman, H. (2015). The effects of environmental chemicals on renal function. *Nature reviews. Nephrology*, 11(10), 610-625. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.94>
4. Han, Y., Dai, H., Rong, X., Jiang, H., & Xue, Y. (2023). Research Progress of Methods for Degradation of Bisphenol A. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(24), 8028. <https://doi.org/10.3390/molecules28248028>
5. Vasiljevic, T., & Harner, T. (2021). Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: Properties, sources and global levels. *The Science of the total environment*, 789, 148013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148013>
6. Bisphenol A (BPA) Market Size, Share and Forecast 2035. Global Chemical and Petrochemicals, Specialty Chemicals, Elastomer and Rubber, Fertilizer and Feedstock - Latest Chemical Prices, News and Market Analysis | ChemAnalyst. <https://www.chemanalyst.com/industry-report/bisphenol-a-market-57>
7. Manzoor, M. F., Tariq, T., Fatima, B., Sahar, A., Tariq, F., Munir, S., Khan, S., Nawaz Ranjha, M. M. A., Sameen, A., Zeng, X. A., & Ibrahim, S. A. (2022). An insight into bisphenol A, food exposure and its

adverse effects on health: A review. *Frontiers in nutrition*, 9, 1047827.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1047827>

8. Corrales, J., Kristofco, L. A., Steele, W. B., Yates, B. S., Breed, C. S., Williams, E. S., & Brooks, B. W. (2015). Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, 13(3), 1559325815598308.
<https://doi.org/10.1177/1559325815598308>

9. Santos, J. D. S., Pontes, M. D. S., de Souza, M. B., Fernandes, S. Y., Azevedo, R. A., de Arruda, G. J., & Santiago, E. F. (2023). Toxicity of bisphenol A (BPA) and its analogues BPF and BPS on the free-floating macrophyte *Salvinia biloba*. *Chemosphere*, 343, 140235.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140235>

10. Acconcia, F., Pallottini, V., & Marino, M. (2015). Molecular Mechanisms of Action of BPA. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, 13(4), 1559325815610582.
<https://doi.org/10.1177/1559325815610582>

11. Bisphenol A. European Food Safety Authority.
<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol#see-also>

12. Rotondo, E., & Chiarelli, F. (2020). Endocrine-Disrupting Chemicals and Insulin Resistance in Children. *Biomedicines*, 8(6), 137.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8060137>

13. Ziv-Gal, A., & Flaws, J. A. (2016). Evidence for bisphenol A-induced female infertility: a review (2007-2016). *Fertility and sterility*, 106(4), 827-856. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.06.027>

14. Andra, S. S., Austin, C., Yang, J., Patel, D., & Arora, M. (2016). Recent advances in simultaneous analysis of bisphenol A and its conjugates in human matrices: Exposure biomarker perspectives. *The*

Science of the total environment, 572, 770-781.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.062>

15. Cimmino, I., Fiory, F., Perruolo, G., Miele, C., Beguinot, F., Formisano, P., & Oriente, F. (2020). Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease. *International journal of molecular sciences*, 21(16), 5761. <https://doi.org/10.3390/ijms21165761>

16. Pan, M. H., Wu, Y. K., Liao, B. Y., Zhang, H., Li, C., Wang, J. L., Hu, L. L., & Ma, B. (2021). Bisphenol A Exposure Disrupts Organelle Distribution and Functions During Mouse Oocyte Maturation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 661155. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661155>

17. Castellini, C., Totaro, M., Parisi, A., D'Andrea, S., Lucente, L., Cordeschi, G., Francavilla, S., Francavilla, F., & Barbonetti, A. (2020). Bisphenol A and Male Fertility: Myths and Realities. *Frontiers in endocrinology*, 11, 353. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00353>

18. Adamakis, I. D., Panteris, E., & Eleftheriou, E. P. (2016). Bisphenol A disrupts microtubules and induces multipolar spindles in dividing root tip cells of the gymnosperm *Abies cephalonica*. *Chemosphere*, 149, 202-210. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.082>

19. Kim, S., Gwon, D., Kim, J. A., Choi, H., & Jang, C. Y. (2019). Bisphenol A disrupts mitotic progression via disturbing spindle attachment to kinetochore and centriole duplication in cancer cell lines. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 59, 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.04.009>

20. Zaborowska, M., Wyszowska, J., Borowik, A., & Kucharski, J. (2021). Bisphenol A-A Dangerous Pollutant Distorting the Biological Properties of Soil. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12753. <https://doi.org/10.3390/ijms222312753>

21. Li, C., Lu, Q., Ye, J., Qin, H., Long, Y., Wang, L., & Ou, H. (2018). Metabolic and proteomic mechanism of bisphenol A degradation by *Bacillus thuringiensis*. *The Science of the total environment*, 640-641, 714-725. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.352>
22. Zaborowska, M., Wyszowska, J., Borowik, A., & Kucharski, J. (2023). Bisphenols-A Threat to the Natural Environment. *Materials (Basel, Switzerland)*, 16(19), 6500. <https://doi.org/10.3390/ma16196500>
23. Zhang, W., Yin, K., & Chen, L. (2013). Bacteria-mediated bisphenol A degradation. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(13), 5681-5689. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4949-z>
24. Kyrila, G., Katsoulas, A., Schoretsaniti, V., Rigopoulos, A., Rizou, E., Doulgeridou, S., Sarli, V., Samanidou, V., & Touraki, M. (2021). Bisphenol A removal and degradation pathways in microorganisms with probiotic properties. *Journal of hazardous materials*, 413, 125363. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125363>
25. Virant-Klun, I., Imamovic-Kumalic, S., & Pinter, B. (2022). From Oxidative Stress to Male Infertility: Review of the Associations of Endocrine-Disrupting Chemicals (Bisphenols, Phthalates, and Parabens) with Human Semen Quality. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(8), 1617. <https://doi.org/10.3390/antiox11081617>
26. Tsikas, D., Tsikas, S. A., Mikuteit, M., & Ückert, S. (2023). Circulating and Urinary Concentrations of Malondialdehyde in Aging Humans in Health and Disease: Review and Discussion. *Biomedicines*, 11(10), 2744. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102744>
27. Ďurovcová, I., Goffa, E., Šestáková, Z., Mániková, D., Gaplovská-Kyselá, K., Chovanec, M., & Ševčovičová, A. (2021). Acute Exposure to Bisphenol A Causes Oxidative Stress Induction with Mitochondrial Origin in *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(7), 543. <https://doi.org/10.3390/jof7070543>

28. Gulcin İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
29. Guo, E., Zhao, L., Li, Z., Chen, L., Li, J., Lu, F., Wang, F., Lu, K., & Liu, Y. (2024). Biodegradation of bisphenol A by a *Pichia pastoris* whole-cell biocatalyst with overexpression of laccase from *Bacillus pumilus* and investigation of its potential degradation pathways. *Journal of hazardous materials*, 474, 134779. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.134779>
30. Sun, Y., Wang, C., May, A. L., Chen, G., Yin, Y., Xie, Y., Lato, A. M., Im, J., & Löffler, F. E. (2023). Mn(III)-mediated bisphenol a degradation: Mechanisms and products. *Water research*, 235, 119787. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119787>
31. Tsuge, Y., & Yamaguchi, A. (2021). Physiological characteristics of *Corynebacterium glutamicum* as a cell factory under anaerobic conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 105(16-17), 6173-6181. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11474-w>
32. Reitznerová, A., Šuleková, M., Nagy, J., Marcinčák, S., Semjon, B., Čertík, M., & Klemková, T. (2017). Lipid Peroxidation Process in Meat and Meat Products: A Comparison Study of Malondialdehyde Determination between Modified 2-Thiobarbituric Acid Spectrophotometric Method and Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(11), 1988. <https://doi.org/10.3390/molecules22111988>
33. Zhang, J., Chen, R., Yu, Z., & Xue, L. (2017). Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) Activity Assay Protocols for *Caenorhabditis elegans*. *Bio-protocol*, 7(16), e2505. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2505>

34. Flors, V., Miralles, M. C., González-Bosch, C., Carda, M., & García-Agustín, P. (2003). Induction of protection against the necrotrophic pathogens *Phytophthora citrophthora* and *Alternaria solani* in *Lycopersicon esculentum* Mill. by a novel synthetic glycoside combined with amines. *Planta*, 216(6), 929-938. <http://www.jstor.org/stable/23387699>
35. Purev, D., Bayarmaa, J., Tsevelmaa, S., & Zolzaya, A. (2014). Biocatalytic properties of horseradish root extract peroxidase (HRP). *Mongolian Journal of Chemistry*, 15, 101-103. <https://doi.org/10.5564/mjc.v15i0.332>
36. Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*, 247(10), 3170-3175.
37. Wang, N., Ren, K., Jia, R., Chen, W., & Sun, R. (2016). Expression of a fungal manganese peroxidase in *Escherichia coli*: a comparison between the soluble and refolded enzymes. *BMC biotechnology*, 16(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0317-2>
38. Ingale S., Patel K., Sarma H. et al. Bacterial Biodegradation of Bisphenol A (BPA). *Biotechnology for Sustainable Environment*. Singapore. 2021: 95-110. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1955-7_4
39. Unuofin, J. O., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2019). Recovery of laccase-producing gammaproteobacteria from wastewater. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 21, e00320. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00320>
40. Hąc-Wydro, K., Połec, K., & Broniatowski, M. (2019). The comparative analysis of the effect of environmental toxicants: Bisphenol A, S and F on model plant, fungi and bacteria membranes. *The studies on multicomponent systems. Journal of Molecular Liquids*, 289, 111136. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111136>

41. Dutta, M., & Paul, G. (2019). Gallic acid protects rat liver mitochondria ex vivo from bisphenol A induced oxidative stress mediated damages. *Toxicology reports*, 6, 578-589. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.011>
42. Kim, J. H., Lee, M. R., & Hong, Y. C. (2016). Modification of the association of bisphenol A with abnormal liver function by polymorphisms of oxidative stress-related genes. *Environmental research*, 147, 324-330. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.02.026>
43. Islam, M. N., Rauf, A., Fahad, F. I., Emran, T. B., Mitra, S., Olatunde, A., Shariati, M. A., Rebezov, M., Rengasamy, K. R. R., & Mubarak, M. S. (2022). Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(26), 7282-7300. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1913400>
44. Gebicka, L., & Krych-Madej, J. (2019). The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *Journal of inorganic biochemistry*, 197, 110699. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110699>
45. Heo, S., Kim, S., & Kang, D. (2020). The Role of Hydrogen Peroxide and Peroxiredoxins throughout the Cell Cycle. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(4), 280. <https://doi.org/10.3390/antiox9040280>
46. Wang, Q., Wang, L., Han, R., Yang, L., Zhou, Q., & Huang, X. (2015). Effects of bisphenol A on antioxidant system in soybean seedling roots. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(5), 1127-1133. <https://doi.org/10.1002/etc.2904>
47. Hakim, R. Hassan and Alghanmi, H. (2024). Toxic Effect of Bisphenol A Causes Oxidative Stress in cyanobacterium *Gloeocapsopsis crepidinum*. *Pollution*, 10(3), 997-1006. doi: 10.22059/poll.2024.374177.2295

48. Hirano, T., Honda, Y., Watanabe, T., & Kuwahara, M. (2000). Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(9), 1958-1962. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1958>
49. Li, S., Liu, Q., Liu, J., Sun, K., Yang, W., Si, Y., Li, Y., & Gao, Y. (2022). Inhibition mechanisms of Fe²⁺/Fe³⁺ and Mn²⁺ on fungal laccase-enabled bisphenol a polyreaction. *Chemosphere*, 307(Pt 1), 135685. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135685>
50. Sun, Y., Wang, C., May, A. L., Chen, G., Yin, Y., Xie, Y., Lato, A. M., Im, J., & Löffler, F. E. (2023). Mn(III)-mediated bisphenol a degradation: Mechanisms and products. *Water research*, 235, 119787. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119787>

ДОДАТКИ

Техніка безпеки в лабораторії біотехнологічного профілю

При проведенні робіт у біотехнологічній лабораторії потрібно ретельно дотримуватись вимог, наведених в інструкції з техніки безпеки. Якщо студент не ознайомлений з зазначеними вимогами, він повинен повідомити про це викладача.

Студент несе персональну відповідальність за власну безпеку під час виконання експериментальних робіт у лабораторії, що підтверджено його особистим підписом у журналі з техніки безпеки.

У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі. Усі студенти повинні працювати в чистих бавовняних халатах, які мають бути застебнуті на всі гудзики. Волосся необхідно прибрати з обличчя та сховати під шапочку. У лабораторії кожен працює на постійному місці та виконує завдання індивідуально. На робочому місці потрібно підтримувати зразковий порядок.

Під час виконання лабораторної роботи категорично забороняється користуватися мобільними телефонами та залишати їх увімкненими. У лабораторії забороняється вживати їжу та напої.

До роботи у біотехнологічній лабораторії не допускаються студенти, які мають пошкодження на відкритих ділянках шкіри, не оброблені та не заклеєні бактерицидним пластиром.

Працюючи з відкритим полум'ям (газовий пальник, спиртівка), потрібно дотримуватися таких вимог: запалювати спиртівку та газовий пальник лише за допомогою сірника, гасити запалену спиртівку потрібно, закривши

доступ повітря спеціальним ковпачком, а газовий пальник – перекриттям доступу газу. Розташовувати спиртівку потрібно на відстані не менш, ніж 20 см від краю робочого стола. У разі випадкового займання ватно-марлевого корка необхідно терміново загасити його, заклавши доступ повітря.

Під час роботи з живими культурами мікроорганізмів необхідно слідкувати за наявністю запобіжних ватних тампонів у піпетках та ватномарлевих корків у пробірках. У випадку потрапляння мікробного матеріалу на відкриті ділянки шкіри, стіл чи підлогу це місце треба ретельно обробити дезінфікувальним розчином та ретельно промити водою.

Роботу у мікробіологічному боксі дозволено проводити лише за проходження додаткового інструктажу з техніки безпеки, наявності відповідного захисного одягу (халат, шапочка, захисна маска та захисні окуляри).

Категорично забороняється заходити у бокс за увімкненої бактерицидної лампи.

Всі предмети, використані у роботі з живими мікроорганізмами, мають бути знезаражені фламбуванням (петлі, голки), кип'ятінням (пробірки, чашки Петрі), обробленням дезінфікувальними розчинами (шпателі, піпетки, предметні й накривні скельця). Забороняється користуватися скляним посудом, що має сколи, тріщини, гострі краї.

У лабораторії необхідно дотримуватися обережності під час роботи з хімічними речовинами. При потребі (робота з концентрованими хімічними речовинами) потрібно використовувати засоби індивідуального захисту (рукавички, респіратори, гумовий фартух, захисні окуляри). У процесі розведення концентрованої кислоти необхідно кислоту вносити у розчинник, а не навпаки. У випадку потрапляння будь-яких хімічних

речовин на шкіру необхідно змити реактив великою кількістю води; нейтралізувати кислоту необхідно слабким розчином соди, а луг – слабким розчином оцтової кислоти.

Роботу з концентрованими та леткими хімічними речовинами необхідно проводити під витяжною шафою.

Необхідно суворо дотримуватися вимог електробезпеки. Забороняється користуватися несправним електрообладнання і вмикати прилади без дозволу викладача або лаборанта, а також торкатися поверхні приладу мокрими руками.

Після закінчення роботи студент повинен упорядкувати робоче місце, руки необхідно ретельно вимити, а за потреби обробити дезінфікувальним розчином. Слід мати індивідуальний рушник або серветки для витирання рук.

Публікації за результатами дослідження