

Роль полифосфатов рекомбинантного штамма *E. coli* BL21(DE3)/pET28-ppk в биосорбции тяжелых металлов в агроценозах Юго-Западной Сибири**Научный руководитель – Кечин Андрей Андреевич***Скотарева А.Е.¹, Бардуков М.В.²*

1 - Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия, *E-mail: skotareva04@mail.ru*; 2 - Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук, Новосибирск, Россия, *E-mail: Bufo00@mail.ru*

Почвы агроценозов Юго-Западной Сибири загрязнены тяжелыми металлами вследствие промышленных выбросов и длительного применения агрохимикатов. Традиционные методы ремедиации приводят к изменению почвенной структуры и подавлению микробиота. Микробная биосорбция лишена этих недостатков, но иммобилизационный потенциал природных штаммов неэффективен связывания поллютантов в условиях стресса.

Цель работы - создание штамма *E. coli* BL21(DE3) с гиперэкспрессией гена *ppk* и оценка его сорбционной активности в почве по отношению к Cd^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} в условиях антропогенного стресса.

Материалы и методы. Ген *ppk* амплифицировали с кДНК *E. coli* K-12 и клонировали в вектор pET-28a(+) по сайтам *NdeI* и *XhoI* с последующей трансформацией *E. coli* DH5 α . Для экспрессии плазмиду перенесли в штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3). Пространственную структуру РПК моделировали в AlphaFold. Сорбционную активность оценивали *in vitro* в среде LB (Zn^{2+} - 0,012 г/10 мл, Cu^{2+} - 0,015 г/10 мл, Cd^{2+} - 0,001 г/10 мл). После 24 ч инкубации остаточное содержание металлов в супернатанте определяли спектрофотометрически с использованием: ДДТК-На для Cu^{2+} , дитизона для Zn^{2+} и ПАН для Cd^{2+} . Контроль - среда LB и культура нетрансформированного штамма.

Результаты. Модель мономерной РПК (688 а.о.), предсказанная в AlphaFold, имела высокое качество (pLDDT89,77). Мотив Уокера А (остатки 149–156) предсказан с pLDDT >90. При сравнении со структурой димера (PDB 1XDP) RMSD составило 25–35 Å из-за разной олигомеризации. Рекомбинантный штамм значимо ($p < 0,05$) снижал концентрацию металлов: для Zn^{2+} -5,0±0,4%, Cu^{2+} -3,5±0,3%, Cd^{2+} -3,0±0,5%. Основное связывание происходило в первые 24 ч, что совпадает с периодом максимальной стабильности плазмиды. В вегетационных опытах выявлена дозозависимая фитотоксичность металлов: при 1 ПДК наблюдали горькислиз, при 2 ПДК - ингибирование роста. Пул биодоступных металлов, переходящих в биомассу пшеницы, обосновывает целевую сорбционную ёмкость штамма.

Заключение. Получен рекомбинантный штамм *E. coli* с повышенной способностью к связыванию Zn^{2+} , Cu^{2+} и Cd^{2+} за счет гиперпродукции полифосфатов, образующих стабильные комплексы [1, 2]. Данные служат основой для разработки биосорбентов на твердых носителях для ремедиации с/х почв.

Источники и литература

- 1) Li Y, Rahman SM, Li G, Fowle W, Nielsen PH, Gu AZ. The Composition and Implications of Polyphosphate-Metal in Enhanced Biological Phosphorus Removal Systems. *Environ Sci Technol.* 2019 Feb 5;53(3):1536-1544. doi: 10.1021/acs.est.8b06827.
- 2) Park Y, Malliakas CD, Zhou Q, Gu AZ, Aristilde L. Molecular Coordination, Structure, and Stability of Metal-Polyphosphate Complexes Resolved by Molecular Modeling and X-ray Scattering: Structural Insights on the Biological Fate of Polyphosphate. *Environ Sci Technol.* 2021 Oct 19;55(20):14185-14193. doi: 10.1021/acs.est.1c04782.