



2. Чернов В. Н. Новые данные флоры Саратовского Поволжья // Известия Саратов. о-ва естествоиспыт. 1924. Т. 1, вып. 1. С. 49–56.
3. Богдановская-Гиенэф И. Д. Материалы к познанию озер поймы Волги в Саратовской области // Тр. Ленинградского об-ва естествоиспыт. 1950. № 70, вып. 3. С. 192–217.
4. Лепилова Г. К. Инструкция для полевого исследования высшей водной растительности // Инструкция по биол. исслед. водоемов. Л., 1934. Ч. 2, разд. А, вып. 5. С. 1–48.
5. Катанская В. М. Методика исследования высшей водной растительности // Жизнь пресных вод СССР. М.; Л., 1956. Т. 4, ч. 1. С. 160–182.
6. Катанская В. М. Высшая водная растительность континентальных водоемов СССР: Методы изучения. Л., 1981. 187 с.
7. Белавская А. П. К методике изучения водной растительности // Бот. журн. 1979. Т. 64, № 1. С. 32–41.
8. Папченков В. Г. Растительный покров водоемов и водотоков Среднего Поволжья. Ярославль, 2001. 213 с.
9. Матвеев В. И., Соловьева В. В., Саксонов С. В. Экология водных растений: учеб. пособие. 2-е изд. доп. и перераб. Самара, 2005. 282 с.
10. Матвеев Н. М. Биоэкологический анализ флоры и растительности (на примере лесостепной и степной зоны): учеб. пособие. Самара, 2006. 311 с.
11. Черепанов С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). СПб., 1995. 992 с.
12. Маевский П. Ф. Флора средней полосы Европейской части СССР. Л., 1964. 879 с.
13. Маевский П. Ф. Флора средней полосы Европейской части России. 10-е изд. М., 2006. 600 с.
14. Матвеев В. И. Динамика растительности водоемов бассейна Средней Волги. Куйбышев, 1990. 192 с.
15. Петрова Е. А. Особенности зарастания стариц реки Суры на разных стадиях эволюции водоемов // Гидробиология 2005: материалы VI Всероссийской шк.-конф. по водным макрофитам. Рыбинск, 2006. С. 328–331.

УДК 595.77 (470.44)

## ХРОМОСОМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ВИДА *CRYPTOCHIRONOMUS DEFECTUS* (KIEFFER, 1913) (DIPTERA, CHIRONOMIDAE) ИЗ ВОДОЕМОВ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Е. Е. Морозова

Саратовский государственный университет  
E-mail: moroz @san.ru

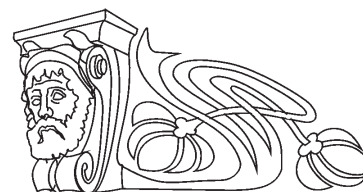
Приведены данные по хромосомному полиморфизму (описание кариотипа, спектр и частота хромосомных перестроек) личинок *Cryptochironomus defectus* (Kieffer, 1913), собранных из разнотипных водоемов Саратовской области (участки открытого и защищенного мелководий водохранилища, пруды) в течение весенне-летних сезонов 2001–2003 гг. и 2010 г. Зарегистрирован высокий уровень хромосомного полиморфизма *C. defectus*: доля особей с гетерозиготными инверсиями у личинок *C. defectus* колеблется от 57.1 до 71.1%; среднее число гетерозиготных инверсий на особь меняется от 1.06 до 1.52. Обнаружены 3 различных по локализации инверсии.

**Ключевые слова:** хирономиды, личинки, хромосомный полиморфизм, инверсии.

**Chromosomal Polymorphism of the Species  
*Cryptochironomus Defectus* (Kieffer, 1913)  
(Diptera, Chironomidae) from the Reservoirs  
Saratov Areas**

Е. Е. Morozova

Data on chromosomal polymorphism (the karyotype description, a spectrum and frequency of chromosomal reorganizations) larvae *Cryptochironomus defectus* (Kieffer, 1913) is cited, collected from



polytypic reservoirs of the Saratov region (sites of the open and protected shoal of a water basin, ponds) during spring-year-old seasons 2001–2003 and 2010. High level of chromosomal polymorphism *C. defectus* is registered: a share of individuals with heterozygotic inversions at larvae *C. defectus* fluctuates from 57.1 to 71.1%; the average of heterozygotic inversions on the individual changes from 1.06 to 1.52. Three various on inversion localization are found out.

**Key words:** chironomids, larvae, chromosomal polymorphism, inversions.

Кариологический метод исследования хирономид основан на использовании особенностей строения политенных хромосом из клеток слюнных желез личинок. Применение указанного метода обеспечило значительный прогресс в систематике хирономид и в накоплении данных по инверсионному полиморфизму природных популяций разных видов этой группы насекомых. Так, кариологические исследования семейства Chironomidae существенно изменили за последние десятилетия знания о распространении и механизмах поддержания хромосомного по-



лиморфизма инверсионного типа [1–7]. Итогом этих исследований стало раскрытие адаптивного характера инверсионного полиморфизма. Показано, что у хирономид и других двукрылых (дрозофил, симулид) виды с хромосомным полиморфизмом превосходят близкородственные мономорфные виды по величине ареалов и эколого-климатической пластичности, занимая обычно территории с контрастными условиями существования. Обнаружено, что уровень инверсионного полиморфизма существенно уменьшается от центра ареала к периферии, где обычно фиксируются те или иные инверсионные последовательности. Доказаны адаптивно значимые различия между генотипическими классами особей – носителями инверсий в гомозиготном (гомокариотипном) и гетерозиготном (гетерокариотипном) состояниях. Тем самым, значимость кариологических исследований заключается не только в точном определении видовой принадлежности отдельных особей, но и в возможности оценки цитогенетической структуры популяций, в выявлении уровня межвидовой и межпопуляционной дивергенции, что в настоящее время успешно продемонстрировано на примере родов *Chironomus* и *Glyptotendipes* [8].

В настоящее время комплексный анализ цитогенетической и морфологической дифференциации хирономид, заселяющих различные экологические ниши прибрежных зарослей, вносит вклад в изучение эволюционных тенденций у видов, вступающих в коэволюционные связи с обитающими другими видами животных или растений. Так, для личинок видов рода *Glyptotendipes* установлена зависимость спектра и частоты хромосомных перестроек от типа заселяемого субстрата, проанализированы особенности пространственной организации хромосом (в интерфазных ядрах) в связи со специфическими условиями их существования, рассчитаны цитогенетические расстояния между межпопуляционными и внутривидовыми группировками видов и установлен уровень их цитогенетической дивергенции [9].

Кариологическое изучение видов рода *Cryptochironomus* находится на начальном этапе: отсутствие удовлетворительных цитофотокарт для большинства видов этого рода не позволяет проводить их сравнительного кариологического анализа. В связи с этим дальнейшее кариологическое изучение р. *Cryptochironomus* в совокупности с другими методами видовой диагностики является актуальным.

Нами описан кариотип, определены спектр и частота хромосомных перестроек *C. defectus* из водоемов Саратовской области, проанализирова-

ны материалы по хромосомному полиморфизму этого вида. Исследования осуществлялись на 38 станциях отбора проб (районы защищенного и открытого мелководья Волгоградского водохранилища в пределах Саратовской области, пруды урбанизированной территории г. Саратова и Саратовской области) в течение весенне-летних сезонов 2001–2003 гг., а также 2010 г. Рассматриваемые станции принадлежат к различным экотопам: участкам открытого, защищенного мелководья водохранилища и прудам, статистически значимо отличающимся друг от друга по ряду показателей (БПК<sub>5</sub>, общей минерализации, T °C воды, содержание кремния). Личинок хирономид собирали и фиксировали с помощью общепринятых методов [4, 10]. Всего было кариологически исследовано 1300 личинок.

*Cryptochironomus defectus* (Kieffer, 1913) – один из видов р. *Cryptochironomus*, морфологически хорошо изучен на стадии личинки, куколки, имаго – самца и имаго – самки [11–19]. Как показали наши исследования, у данного вида  $2n = 6$  (рисунок). Центромерные районы морфологически хорошо выражены. Во всех трех хромосомах центромерные районы расположены медиально и, следовательно, они могут считаться мета- или субметацентрическими. Хромосомы примерно одинаковые по длине. Хромосома I разделена на 30 отделов. Центромерный район (отдел 15) сложный, представлен несколькими дисками. Хромосома II разделена на 30 отделов. Центромерный район расположен на границе 11–12-го отделов.

В геноме вида один ядрышковый организатор, локализованный в середине хромосомы II (район 12). Хорошими маркерами хромосомы II являются перетяжка на границе 5–6-го отделов и расширенный теломерный район плеча L (отдел I). Хромосома III разделена на 30 отделов. Центромерный район расположен в 15 отделе, маркерами этой хромосомы являются перетяжки на границе 3–4-го и 8–9-го отделов. Необходимо отметить, что в хромосомах волжских особей активность ядрышек и колец Бальбиани различается в клетках основной и специальной долей: в основной доле они развиты хорошо, в специальной – часто редуцированы. В клетках специальной доли хромосомы имеют значительно более высокий уровень политемии. Во всех хромосомах обнаружены гетерозиготные парацентрические инверсии: I R 15–18; II L 7–10; III R 16–20.

Анализ результатов кариологической изменчивости личинок *C. defectus* из водохранилища (участки защищенного мелководья водохранилища) показал, что более 60% исследованных личинок гетерозиготны по парацентрическим и перичентрическим инверсиям. В 2001 г. этот



показатель составил 69,6%; в 2002 г. – 70.8%; в 2003 г. – 68.2%; в 2010г. – 71.1%. Среднее число гетеротерозиготных инверсий на особь равнялось в 2001 г. – 1.47, в 2002 г. – 1.47, в 2003 г. – 1.50, в 2010 г. – 1.52. Среди исследованного материала обнаружены 3 различных по локализации инверсий. Хромосома I несет гетерозиготную инверсию в отделах I R 15–18. Хромосома II несет гетерозиготную инверсию в отделах II L 7–10. Хромосома III несет гетерозиготную инверсию в отделах III R 16–20. Обнаруженные инверсии встречались с частотой 11.4 – 63.6%. Всего за наблюдаемые периоды было зарегистрировано 6 инверсионных комбинаций. Одну инверсию в кариотипе содержали до 63,7 личинок; одновременно две – до 30.1; три – до 16.6% личинок.

У личинок *C. defectus* из водохранилища (участки открытого мелководья водохранилища) более 60% исследованных личинок гетерозиготны по парацентрическим инверсиям. В 2001 г. этот показатель составил 64.2%; в 2002 г. – 65.1%; в 2003 г. – 66.7%, в 2010 г. – 67.2%. Среднее число гетерозиготных инверсий на особь равнялось в 2001 г. 1.33; 2002 г. – 1.32; 2003 г. – 1.34; в 2010 г. – 1.36. Среди исследованного материала обнаружены 3 различных по локализации инверсии, которые встречались с частотой 23.8–60.3%. Одну инверсию в кариотипе содержали до 72.4 личинок; одновременно две – до 26.7; три – до 5.0% личинок. У личинок *C. defectus* на открытом мелководье водохранилища также зарегистрированы 6 комбинаций инверсий.



Кариотип *C. defectus* из клеток специальной доли: I, II, III – номера хромосом. L и R – левое и правое плечи хромосомы. N – ядрышковый организатор. Центромеры указаны стрелками (10 × 40)



Частоты инверсий в анализируемых условиях (участки открытого и защищенного мелководья водохранилища) различны, однако в целом параметры, характеризующие хромосомный полиморфизм *C. defectus*, свидетельствуют о цитогенетической однородности личинок на исследованном пространстве.

Тем самым, доля особей с гетерозиготными инверсиями в популяциях *C. defectus*, обитающих в водохранилище, колеблется от 64.3 до 71.1%. Среднее число гетерозиготных инверсий на особь в популяциях меняется от 1.32 до 1.52. Наибольшие значения отмеченных признаков зарегистрированы у личинок *C. defectus* на участках защищенного мелководья водохранилища.

В пруду более 50% исследованных личинок *C. defectus* гетерозиготны по парацентрическим инверсиям. В 2001 г. этот показатель составил 57.1%; 2002 г. – 58.1%; 2003 г. – 57.6 %, 2010 – 58.7%. Среднее число гетерозиготных инверсий на особь равнялось в 2001 г. – 1.06; 2002 г. – 1.08; 2003 г. – 1.06, в 2010 г. – 1.09. Среди исследованного материала обнаружены, как и в условиях водохранилища, 3 различные по локализации инверсии. Всего за наблюдаемый период было зарегистрировано 6 инверсионных комбинаций: одну инверсию в кариотипе содержали до 92.6; две – до 7.7% личинок.

Таким образом, можно констатировать, что обнаруженный нами уровень хромосомного полиморфизма *C. defectus* из водоемов Саратовской области является довольно высоким (доля особей с гетерозиготными инверсиями 57.1–71.1%; среднее число гетерозиготных инверсий на особь 1.06–1.52.). *C. defectus* можно отнести к высокополиморфным видам хирономид. По показателям изменчивости хромосомного полиморфизма между популяциями личинок *C. defectus* из водохранилища и прудов установлены достоверные отличия (при  $p = 0,01$ ). Наибольшие значения отмеченных кариотипических признаков зарегистрированы у личинок *C. defectus* для участков водохранилища защищенной мелководной зоны. Можно предположить, что большая вариабельность показателей полиморфизма *C. defectus* в этих популяциях обусловлена большим разнообразием минерального состава воды и ее pH в этих условиях.

#### Список литературы

1. Чубарева Л. А. Характеристика кариотипических признаков плезиоморфных видов мошек и предполагаемые пути эволюции кариотипа семейства Simuliidae // Зоол. журн. 1977. Т. 54, № 10. С. 1492–1501.
2. Белянина С. И. Кариотипический анализ хирономид (Chironomidae, Diptera) фауны СССР : дис. ... д-ра биол. наук. Саратов, 1983. 455 с.
3. Петрова Н. А. Политенные хромосомы хирономид и мошек : их использование для изучения систематики и эволюции этих групп насекомых (Diptera : Chironomidae, Simuliidae) : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 1992. 49 с.
4. Кикнадзе И. И., Истомина А. Г., Гундерина Л. И., Салова Т. А., Айманова К. Г., Савинов Д. Д. Кариофонды хирономид криолитозоны Якутии : Триба *Chironomini*. Новосибирск, 1996. 166 с.
5. Шобанов Н. А. Род *Chironomus* Meigen (Diptera, Chironomidae). Систематика, биология, эволюция : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2000. 52 с.
6. Сергеева И. В. Экология и фауна хирономид подсемейства Tanypodinae (Diptera, Chironomidae) разных зоографических зон России : дис. ... д-ра биол. наук. Саратов, 2006. 350 с.
7. Истомина А. Г., Кикнадзе И. И., Зинченко Т. Д. Кариотип и хромосомный полиморфизм *Chironomus Salinarius* Kieffer (Diptera, Chironomidae) // Экология малых рек в XXI веке : биоразнообразие, глобальные изменения и восстановление экосистем (Тольятти, 5–8 сентября 2011 г.). Тольятти, 2011. С. 75.
8. Дурнова Н. А. Хирономиды перифитона водоемов Саратовской области : экологические особенности, морфология, цитогенетика (Diptera, Chironomidae, Chironomini) : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2010. 48 с.
9. Kiknadze I. I. The role of chromosome polymorphism in divergence of populations and species of the genus *Chironomus* // Entomol. Rev. 2008. Vol. 88, w. 5. P. 509–524.
10. Макаrenchенко Е. А. Сем. Chironomidae. Комары-звонцы // Определитель насекомых Дальнего Востока России. Т. IV. Двукрылые и блохи, ч. 4. Владивосток, 2006. С. 204–773.
11. Kiffer J. J. Nouveaux Chironomides (Tendipedides) d'eclosion // Bull. Soc. Hist. Natur. Metz. 1913. T. 28. P. 113–177.
12. Kiffer J. J. Beschreibung neuer auf Lazarettsschiffen des ostlichen Kriegsschauplatzes und bei Ignalino in Litauen von Dr. W. Horn gesammelten Chironomiden mit Übersichtstabellen einiger Gruppen von palaarktischen Arten // Ent. Mitt. 1918. Bd. 7. S. 35–53.
13. Kieffer J. J. Neue Chironomiden aus Mitteleuropa // Arch. Hydrob. II. 1921. Bd. 2. S. 785–808.
14. Harnisch O. Metamorphose und System der Gattung *Cryptochironomus* K.s.I. Ein Beitrag zum Problem der Differenzierung der Entwicklungsstadien Chironomiden // Zool. Jahrb. Abt. Syst. 1923. Bd. 47. S. 271–307.
15. Goetghebuer M. Tendipedidae (Chironomidae). b) Subfamilie Tendipedinae (Chironominae). A. Die Imagines // Die Fliegen der palaarktischen Region. 13C. Stuttgart /ed. E. Lindner. 1937. Bd. 107. S. 1–138.



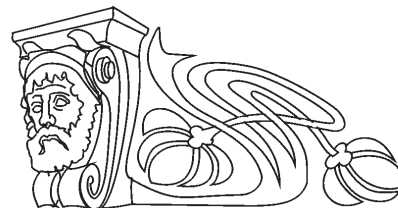
16. Шилова А. И. К систематике *Cryptochironomus* gr. defectus Kief. (Diptera, Chironomidae) // Тр. Ин-та биол. внутр. вод АН СССР. 1966. Т. 12(15). С. 214–238.
17. Шилова А. И. Семейство Chironomidae (Tendipedidae)-звонцы // Определитель насекомых Европейской части СССР. Л., 1969. Т. 5. С. 163–201.
18. Шилова А. И. Хируномиды Рыбинского водохранилища. Л., 1976. 249 с.
19. Морозова Е. Е. Эколого-морфологический анализ хируномид рода *Cryptochironomus* Kieffer (Diptera, Chironomidae) Палеартики : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Саратов, 2008. 48 с.

УДК 579.25

## СЕЛЕКЦИЯ ШТАММОВ *ALCALIGENES DENITRIFICANS* ВКПМ В-9582 И ВКМ В-2243D С ПОВЫШЕННОЙ НИТРИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

С. А. Глинский, С. В. Козулин, Т. Н. Козулина, С. В. Полтавская

Закрытое акционерное общество «Биоамид», Саратов  
E-mail: GlinskiyS@gmail.com



Выявлена и изучена диссоциация штаммов *Alcaligenes denitrificans* ВКПМ В-9582 и ВКМ В-2243D при культивировании на плотных питательных средах различного состава. Создана селективная среда, на которой каждый из вариантов диссоциантов формирует несколько морфологических типов колоний. Установлена корреляция между величиной нитрилазной активности и морфологическими особенностями колоний диссоциантов. Показано, что диссоцианты S-типа проявляют более высокую активность нитрилазы по сравнению с диссоциантами R-типа. Разработан экспресс-метод качественной оценки нитрилазной активности у микроорганизмов. Изучено влияние плотности засева, способа, времени культивирования, условий хранения клеток на их нитрилазную активность. На основании полученных результатов оптимизированы методы поддерживающей селекции, хранения и подготовки клеточного посевного материала.

**Ключевые слова:** штамм *Alcaligenes denitrificans* ВКПМ В-9582, *Alcaligenes denitrificans* ВКМ В-2243D, нитрилаза, нитрилазная активность, селекция, диссоциация, селективная среда, культивирование.

### Selection of Strains *Alcaligenes Denitrificans* VKPM В-9582 and VKM В-2243D Possessing High Nitrilase Activity

S. A. Glinskiy, S. V. Kozulin,  
T. N. Kozulina, S. V. Poltavskaya

Dissociation of strains *Alcaligenes denitrificans* VKM В-2243D and VKPM В-9582, which takes place at cultivation on dense nutrient media having various contents, is detected and studied. Selection medium is created, on which medium each of dissociants forms colonies of several morphological types. Dependence of value of nitrilase activity on morphological features of colonies of dissociants is found. It is shown, that the S-type dissociants show higher nitrilase activity than the R-type ones. Express method of qualitative evaluation of nitrilase activity of microorganisms is developed. Influence of the sowing density, way and time of cultivation, and also conditions of storage of cells on their nitrilase activity is studied. On the basis of the data obtained, methods of maintenance selection, storage and preparation of cellular sowing material are optimized.

**Key words:** strain *Alcaligenes denitrificans* VKPM В-9582, *Alcaligenes denitrificans* VKM В-2243D, nitrilase, nitrilase activity, selection, dissociation, selective medium, cultivation.

### Введение

На сегодняшний день ферментативный катализ в синтезе органических соединений все чаще приходит на смену классическим процессам, принятым в крупнотоннажной химии. Основным источником ферментов для подобных процессов служат микроорганизмы [1]. Одним из успешных примеров использования биокаталитического синтеза является ферментативный гидролиз нитрила акриловой кислоты в акрилат аммония с использованием штамма *Alcaligenes denitrificans* ВКМ В-2243D, который был изучен в компании ЗАО «Биоамид» и в 2004 г. внедрен в производство [2]. Акриловые мономеры, получаемые биотехнологическим способом, отвечают всем требованиям, необходимым для синтеза полимеров различных марок. Тем не менее, важной критической точкой, определяющей целесообразность использования данного процесса, является выход готового продукта на единицу катализатора. Проведенные испытания опытных партий биокатализатора в процессе получения акриловых мономеров показали его недостаточно высокую продуктивность, что привело к низкой рентабельности производства.

В результате совместной работы сотрудников ЗАО «Биоамид» и ФГУП «ГосНИИГенетика» был получен мутантный штамм *Alcaligenes denitrificans* ВКПМ В-9582 с более высокой нитрилазной активностью [3]. У большинства описанных в литературе микроорганизмов синтез фермента нитрилазы индуцибельный, индукторами являются нитрилы [4–9]. Но известны некоторые культуры