

**А.С. Петухова, С.Н. Городилова**

**ПРАКТИКУМ ПО БАТРАХОЛОГИИ  
ДЛЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ  
КЛАССОВ ПРИ РАБОТЕ С НОУ НА  
БАЗЕ КРАСНОЯРСКОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО  
ПЕДАГОГИЧЕСКОГО  
УНИВЕРСИТЕТА ИМ. В.П.  
АСТАФЬЕВА**



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ им. В.П. Астафьева»

А.С. Петухова, С.Н. Городилова

ПРАКТИКУМ ПО БАТРАХОЛОГИИ ДЛЯ  
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ КЛАССОВ ПРИ  
РАБОТЕ С НОУ НА БАЗЕ КРАСНОЯРСКОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО  
ПЕДАГОГИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА ИМ.  
В.П. АСТАФЬЕВА

Красноярск  
2018

## **Петухова А. С., Городилова С.Н.**

Практикум по батрахологии для специализированных классов при работе с НОУ на базе педагогических вузов. Красноярск. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева. Красноярск, 2018. 21 с.

Данное пособие предназначено для обучающихся специализированных классов при написании научно-исследовательских работ на базе Красноярского педагогического университета им. В. П. Астафьева. Пособием можно пользоваться на занятиях по следующим дисциплинам: «Зоология позвоночных», «Фоновые виды позвоночных животных», «Физиология позвоночных животных». Кроме этого, данным учебным пособием могут воспользоваться учителя и обучающиеся общеобразовательных школ при подготовке к НОУ.

Пособие включает методические рекомендации по сбору земноводных, а также биологию, экологию и физиологию амфибий (*Amphibia*).

Красноярский государственный  
педагогический университет  
им. В.П. Астафьева, 2018  
Петухова А. С., Городилова С.Н., 2018

## Содержание

<b>1. Подготовка к исследованиям</b> .....	5
<b>2. Методы изучения амфибий как в естественных условиях, так и в физиологической лаборатории</b> .....	6
2.1. Изучение амфибий (Amphibia) в естественных условиях.....	6
2.1.1. Изучение земноводных с помощью метода визуального учета..	7
2.1.2. Изучение земноводных с помощью метода ленточных трансект.....	8
2.1.3. Изучение земноводных методом мозаичных учетов.....	10
2.1.4. Использование ловчих заборчиков и ловчих канавок при изучении амфибий.....	10
2.1.5. Учет земноводных по голосам и с помощью подсчета кладок особей .....	11
2.1.6. Исследование жизненного цикла с помощью садка.....	13
2.1.7. Метод прижизненного взятия пищевой пробы у амфибий .....	13
2.1.8. Метод картирования .....	15
<b>2.2. Изучение амфибий в лабораторных условиях</b> .....	15
2.2.1. Взятие ткани для биохимического анализа .....	16
2.2.2. Гемиглобинцианидный метод.....	17
2.2.3. Фотоколлометрический метод .....	17
2.2.5. Белковый электрофорез.....	18
2.2.6. Изучение развития амфибий в аквариуме при разных вариациях температуры.....	19
Список литературы: .....	20

## 1. Подготовка к исследованиям

Сегодня в школе очень важно организовывать и проводить различные научные исследования, но такая работа должна проходить под руководством преподавателя. Учителю нужно обладать целым набором необходимых знаний, применимых для создания каждой методики обучения. Однако, в случае разработки исследований недостаточно общих знаний по биологии, так как научный поиск имеет свою, достаточно сложную структуру и специфику. Для того чтобы учитель мог руководить при создании научной работы ему необходимы особые знания, которые можно получить только из специальной научной литературы. Благодаря появившейся всемирной паутине, практически любую информацию можно легко черпать именно с интернета. Это всевозможные сайты, научные форумы, электронные статьи, социальные сети, которые доступны, как почти каждому учителю, так и ученикам.

Еще до начала разработки темы нужно выбрать объект исследования, а также обосновать критерии выбора именно этого объекта, такие как:

1. Доступность;
2. Относительно не малый размер избранной особи;
3. Простота в содержании в неволе;
4. Легкость в наблюдении за животными в естественных условиях;
5. Встречаемость данных животных в Вашем регионе.

При написании научных исследовательских работ крайне важно раскрыть тему достаточно понятно, но вместе с тем информативно. Существует несколько этапов, необходимых для выполнения начальной разработки исследовательской работы:

1. Осознание проблемы, по которой обучающийся, по которой обучающийся будет выполнять свою работу;
2. Формирование гипотезы, которая требует проверки;
3. Составление плана действий, необходимых для проверки гипотезы;
4. Формулирование вопросов, требующих решения;

5. Определение порядка создания вопросов и создание связи их друг с другом.

После последовательного выполнения всех этих этапов, нужно выяснить, какая информация, по теме выбранного исследования, на данный момент, уже известна и доступна.

Выбрав правильный путь исследования, следует переходить к методической части своей работы. Существует множество уже разработанных методик для решения схожих вопросов, и, вероятнее всего, вы можете подобрать из них какую-то, наиболее подходящую для выполнения вашего исследования. Однако, не исключено и создание собственной методики для решения поставленных задач, и достижения цели работы. После выбора подходящей вам методики уже можно приступать, непосредственно, к самому ходу исследования.

## **2. Методы изучения амфибий как в естественных условиях, так и в физиологической лаборатории**

### ***2.1. Изучение амфибий (Amphibia) в естественных условиях***

Батрахология – (от др.-греч. *βάτραχος* — лягушка), это раздел зоологии, в котором изучается класс земноводных, а также их особенности, характеристики и жизненный цикл.

Тему своей научно-исследовательской работы ученик может взять из практикума или же придумать свою, разработанную совместно с учителем.

*Темы для научных исследовательских работ учеников при исследовании экологии и биологии амфибий:*

1. Исследование сезонной и суточной миграции амфибий;
2. Изучение пространственно-биотопических перемещений земноводных;
3. Изучение трофических связей амфибий;
4. Изучение видовых морфологических характеристик амфибий внутри популяции;
5. Изучение жизненного цикла амфибий;

6. Исследование процесса размножения земноводных в естественных условиях;
7. Исследование биоразнообразия земноводных;
8. Этологические исследования амфибий;
9. Учет гибели амфибий на дорогах;
10. Исследование динамики численности животных при полевых исследованиях.

Для раскрытия этих тем учитель предлагает обучающимся воспользоваться следующими методами:

1. Изучение земноводных с помощью метода визуального учета.
2. Изучение земноводных с помощью метода ленточных трансектов.
3. Изучение земноводных методом мозаичных учетов.
4. Использование ловчих заборчиков и ловчих канавок при изучении амфибий.
5. Учет земноводных по голосам и с помощью подсчета кладок особей.
6. Исследование жизненного цикла с помощью Садка.
7. Метод прижизненного взятия пищевой пробы у амфибий.
8. Метод картирования.

### 2.1.1. Изучение земноводных с помощью метода визуального учета

В этом случае происходит описание встреч с животными. Описание является наиболее простым, недорогостоящим и энергосберегающим методом изучения амфибий. Разрабатываются карточки, на которых отдельно для каждой особи записываются все необходимые сведения при встрече с ними.

Карточка встречи	
Вид животного	
Число особей	в том числе _____ самцов _____ самок
Размеры самцов	_____ самки _____
Дата наблюдения	_____ Время наблюдения _____
Погода: t _____	Осадки: дождь, изморось, туман, нет (подчеркнуть нужное)
Облачность: _____ %	Ветер: штиль, слабый, умеренный, сильный (подчеркнуть)
Место наблюдения	_____
(административный р-н, ближайший населенный пункт, расстояние от него в км и направление, для леса желательно указать название лесхоза, лесничества и № квартала)	
Местообитание	_____
Последнее наблюдаемое животное	_____
ФИО наблюдателя	_____

Рисунок 21 - Карточка встречи земноводных

В период фаунистических работ для установления видового разнообразия, особо важной будет являться информация о встречах с редкими животными, занесенными в Красную книгу области или России (зеленая жаба (*Bufo viridis*), обыкновенный тритон (*Lissotriton vulgaris*), и др.).

Если эти наблюдения проводить регулярно, то не обязательно делать большое количество этих карточек, в этом случае можно завести дневник наблюдений, в который периодически, при каждом выходе в естественные условия обитания земноводных записывать все сведения (рис. 21).

### 2.1.2. Изучение земноводных с помощью метода ленточных трансект

Методики визуального учета и учета на трансектах частично схожи между собой. Отличие их состоит только в том, что при методе визуального учета обследование можно проводить вдоль трансекты, на площадке, вдоль реки, вокруг пруда и т.д., отмечая всех видимых земноводных, а учеты на трансектах

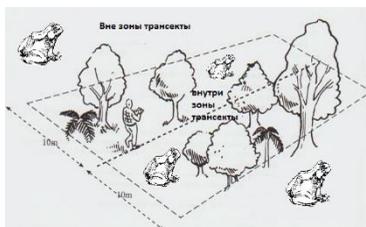


Рисунок 22 - Метод учета амфибий на трансектах

проводят на линиях фиксированной длины и местоположения (рис. 22). Длина и ширина трансекты зависит от исследуемого биотопа (его особенностей), так с «открытой» поверхностью учетная полоса может достигать в ширину до 8 м (где ширину трансекты ограничивают с помощью веревки), а на участке с густо поросшей растительностью (травянистый и кустарниковый ярус) ее сокращают до 2 м. При учете в «закрытом» ландшафте (темнохвойная с светлохвойная тайга, пойменный лес) ширина трансекты определяется на глаз или размахом вытянутых в стороны рук.

Метод учета на трансектах очень удобен для определения внутри и межвидовых изменений популяций земноводных, в соответствии с

изменениями внешней среды, потому что такие учеты позволяют отслеживать число видов и плотность в соответствии с градиентом условий внешней среды.

Основные требования при проведении маршрутных учетов, следующие: маршрут, должен проходить в пределах одного биотопа; длина и ширина его должны соответствовать характеру исследуемого участка; учеты следует вести при наиболее благоприятных погодных условиях и времени суток. В данном методе можно также разработать карточку маршрута, в которую нужно будет заполнять всю необходимую информацию (рис. 23).

Карточка учета амфибий на маршруте		
Дата наблюдения _____	Время начала учета _____	конца учета _____
Размер площадки: длина _____ (м), ширина _____ (м)		
Погода: t _____ °С	Осадки: <i>дождь, изморось, туман, <u>иет</u></i> (подчеркнуть нужное)	
Облачность _____ %	Ветер: <i><u>штиль</u>, слабый, умеренный, сильный</i> (подчеркнуть)	
Место наблюдения: _____		
(административный район, ближайший населенный пункт, расстояния от него в километрах и направление, для леса желательно указать название лесхоза, лесничества и № квартала)		
Стация: _____		
ФИО наблюдателя _____		

Рисунок 23 - Карточка учета амфибий на маршрутах

Для изучения зеленых (*Pelophulax ridibunda*) и бурых (*Rana arvalis*; *Rana amurensis*) лягушек (период размножения) в заболоченных и водных биотопах к дополнению методики визуального учета можно использовать закладку пробных площадок. Для этой цели закладывают площадку размером не менее 25 кв.м. и до 300 кв.м, которые или разбиваются при помощи колышков или устанавливаются по береговым предметам и растительности. Такие площадки необходимо располагать во всех основных растительных ассоциациях водоема. Подсчет амфибий ведется «невооруженным глазом» в разные периоды их активности. Если же в задачах исследования стоит идентификация видов и снятие морфометрических параметров, при первичном исследовании биотопа и данной популяции амфибий, то всех встреченных животных необходимо

отловить (либо вручную, либо с помощью водного сачка, в ночной период ослепляя животное светом фонаря), подсчитать, определить их видовую принадлежность, пол, при возможности взвешать и снять необходимые таксономические промеры (с помощью штангельциркуля) (рис. 24). Эти данные могут дать дополнительную информацию о состоянии популяции лягушек.



Рисунок 24 - Штангельциркуль – прибор, необходимый для измерения размеров тела и его частей у земноводных

### *2.1.3. Изучение земноводных методом мозаичных учетов*

Метод мозаичных учетов, актуален для определения численности, обилия или плотности амфибий, которая обычно варьирует в пределах биотопа. Особенность этого метода в том, что высокая плотность часто бывает связана со спецификой микробиотопа или пятнами (лежащие на земле стволы, корни-подпорки, кочкарники и т.д.), которые можно выделять и из которых можно брать случайные выборки (в каждом пятне берется независимая выборка). Этот метод применим для тех биотопов, в которых много валежника, например, в тайге, пойменном лесу, кочкарниковых болотах и.п.

### *2.1.4. Использование ловчих заборчиков и ловчих канавок при изучении амфибий*

Для выяснения полного состава обитающих на исследуемом ключевом участке амфибий применяют ловчие заборчики или траншеи (канавки).

Прямолинейные заборчики обычно представляют собой короткие ограждения, которые направляют животных, передвигающихся по поверхности, в ловушки, расположенные на концах или по бокам этих ограждений. Метод учета с помощью ловчих канавок схож с

вышеописанным методом, однако он применим в тех биотопах, где почва не является заболоченной (роются на суходолах при наличии достаточно мощного слоя почвы).

Канавки используются при стационарных работах, сохраняясь в одних и тех же местах в течение долгих лет. Для этого рулеткой отмеряется 50 м и штыком лопаты отбивается направляющая линия. Затем роется канавка шириной 20-25 см и глубиной 25-35 см (в качестве меры ширины и глубины можно использовать штыковую лопату: на ширину и глубину штыка). Стенкам канавки придается вертикальность. Дно ее также зачищается: оно должно представлять собой ровную дорожку по ширине канавки без каких-либо препятствий для передвижения животных. В дно канавки врываются 5 цилиндров на расстоянии по 5 м. от концов канавки и по 10 м. между собой. Верхние концы цилиндров должны быть вровень с дном канавки без каких-либо выступов и либо быть точно по ширине канавки, либо иметь преграды (камни, фанерки и др. подручный материал) со стороны стенок канавки, чтобы исключить возможность зверькам обегать цилиндр по дну канавки. Высота цилиндра 50-70 см, диаметр 20-25 см. (рис. 25).



Рисунок 25 - Установка ловчих цилиндров

### 2.1.5. Учет земноводных по голосам и с помощью подсчета кладок особей

Одним из простейших экологических методов, основанным на поведении животного является учет по голосам или изучение вокализации. Вокализация - это все звуки, которые издает данное животное. Звуки эти бывают абсолютно разными и нести различное значение. Так, например, из звука, издаваемого животным, мы можем определить некую интересную информацию о жизни животного или на каком жизненном цикле он на данный момент находится. У большинства видов бесхвостых земноводных

самцы в период размножения издают отчетливые специфические звуки, привлекая этим самок и отстраняя других самцов-конкурентов.

Такую возможность им предоставляют резонаторы, усиливающие вокализацию, поэтому в период их размножения можно услышать отчетливые, громкие звуки, при этом у разных самцов подача "брачной



Рисунок 26 - Резонаторы – приспособления лягушек для усиления издаваемых звуков в «брачный период»

песни" может быть очень различной (протяжная, резкая, с короткими интервалами или почти без них и т.д.) (рис. 26).

В период размножения подсчет размножающихся особей проводится с помощью методов учета по голосам «токующих» самцов и подсчета кладок. При учете земноводных с помощью подсчета кладок особей можно разработать карточку учета размножающихся амфибий. С помощью этой карточки вы можете регистрировать всех найденных особей (а также с помощью карточки встречи с животным) и фиксировать в ней характеристики, особенности и другие признаки (рис. 27).

<b>Карточка учета размножающихся амфибий</b>	
Дата наблюдения	Время начала учета _____ конца учета _____
Погода: t _____	Осадки: дождь, изморось, туман, нет (подчеркнуть нужное)
Облачность: _____ %	Ветер: штгиль, слабый, умеренный, сильный (подчеркнуть)
Место наблюдения	_____
(административный р-н, ближайший населенный пункт, расстояние от него в км и направление, для леса желательно указать название лесхоза, лесничества и № квартала)	
Название водоема (если есть)	_____
Тип водоема	его площадь _____
Используется амфибиями: по всей площади: в прибрежной полосе шириной _____ м.;	
На части площади (указать ее долю) _____	
Характеристика учета: охвачен весь водоем; заложены пробные площадки площадью _____, по берегу заложен маршрут длиной _____ м. и шириной учетной полосы на воде _____ м.	
ФИО наблюдателя _____	

Рисунок 27 – Карточка учета размножающихся амфибий

### 2.1.6. Исследование жизненного цикла с помощью садка

При помощи садка изучают развитие животных с момента икры до метаморфизированной сеголетки. Развитие жизненного цикла животных прослеживается от свежих кладок, помещенных в садки ( $n_{\min.} = 10$ ;  $n_{\max.} = 27$ , где  $n$  – изученное количество комков икры) (рис. 28). Перед началом работы садок (емкость размером около  $0,25 \text{ м}^2$ , изготовленная из нетонущего материала (полиуретановые кольца), к которому пришивается мелкаячеистая москитная сеть) помещают одну свежую кладку, в которой предварительно подсчитывают количество икринок и дальше ведут наблюдение за ее развитием.

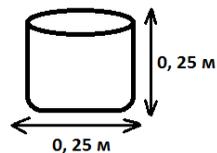


Рисунок 28 - Садок

После вылупления личинок посчитывают количество особей и количество погибших икринок. Отмечаются сроки выклева головастиков и их созревание. Затем на разных этапах развития осуществляется морфометрический анализ головастиков (определение длины тела, хвоста и общей длины тела) и определяются стадии их развития по таблице Дабагян Н.В., Слепцова Л.А.

### 2.1.7. Метод прижизненного взятия пищевой пробы у амфибий

Для изучения трофических связей (важный параметр экологии вида) чаще всего используют метод, при котором амфибий умерщвляют и при вскрытии изымают пищевые компоненты для дальнейшей их видовой идентификации. Этот способ является очень негуманным по отношению к животному, поэтому актуальнее всего воспользоваться методом прижизненного взятия пищевых проб, которые исключают высокую смертность земноводных. Самый простой и надежный метод прижизненного изучения питания лягушек – выдавливание пищевого комка. Для взятия проб достаточно иметь пробирки, фиксатор для пищевых проб, пергамент и карандаш для этикеток и пинцет. Пойманная лягушка берется в левую руку, брюхом вверх (к исследователю), ее задние

конечности прижимаются к руке 4-м и 5-м пальцами (Рис. 29. 1). Далее лягушка зажимается 1-, 2- и 3-м пальцами со стороны боков и подмышек с легким давлением от хребта и вперед так, чтобы кожа ее брюха натянулась и брюхо стало выпуклым (рис. 29. 2). Далее, чуть вперед от 3-го пальца (которым зажата лягушка) надо слегка надавить на брюхо 1-м и 2-м пальцами правой руки с двух сторон и довольно быстро, но непрерывно (это очень важно!) перемещать пальцы вперед, в сторону горла лягушки (рис. 29. 3). При этом обычно видно, как горло лягушки начинает «набухать», изо рта выворачивается желудок, из которого появляется пищевой комок (рис. 29. 4). Если желудок полный, пищевой комок нередко вываливается из него. Если этого не происходит, его следует взять небольшим пинцетом, аккуратно извлечь из желудка и положить в пробирку (рис. 29. 5). После этого лягушка часто самостоятельно заглатывает собственный желудок (рис. 29. 6-8). Но лучше его аккуратно заправить назад с помощью закругленной стеклянной палочки, тупого конца глазного пинцета и т.п. Это позволяет избежать повреждений желудка зубами лягушки и других травм.



Рисунок 29 - Последовательность манипуляций по извлечению пищевого комка у взрослой сибирской лягушки (*Rana amurensis*):

29.1 - Пойманная лягушка берется в левую руку, брюхом вверх, ее задние конечности прижимаются к руке 4-м и 5-м пальцами;

29.2 - Лягушка зажимается 1-, 2- и 3-м пальцами со стороны боков и подмышек с легким давлением от хребта (чтобы кожа ее брюха натянулась и брюхо стало выпуклым);

29.3 - Вперед от 3-го пальца слегка надавить на брюхо 1-м и 2-м пальцами правой руки с двух сторон и довольно быстро перемещать пальцы вперед, в сторону горла лягушки;

29.4 - Горло лягушки начинает «набухать», изо рта выворачивается желудок, из которого появляется пищевой комок;

29.5 - Если этого не происходит, его следует взять небольшим пинцетом, аккуратно извлечь из желудка и положить в пробирку;

29.6-8 - Лягушка самостоятельно заглатывает собственный желудок.

### *2.1.8. Метод картирования*

Рисунок на коже и окраска некоторых земноводных изменяется индивидуально, как отпечатки пальцев у человека. Этот рисунок зачастую регистрируется или копируется с помощью фотографии. Фотография должна отличаться четкостью, резкостью и отличным качеством. Для работы с этим методом необходимо иметь особое оборудование, это: фотоаппарат, лампа импульсная, пленка и ее проявка. Лучше всего пользоваться цветной пленкой, так как она более точно передает цветовосприятие и более отчетливо отображает рисунок. Картирование может использоваться при изучении морфологических внутрипопуляционных показателей, а также как метод мечения взрослых земноводных, то есть для получения детальной информации по характеру использования пространства, скорости роста амфибий, динамики численности их локальной популяции.

## **2.2. Изучение амфибий в лабораторных условиях**

Существует ряд физиологических характеристик, которые можно изучить только лишь в специализированной лаборатории при помощи специальных приборов и наборов необходимых реактивов.

*Темы для научных исследовательских работ учеников при исследовании земноводных в лабораторных условиях:*

1. Изучение кровеносной системы амфибий;
2. Изучение клеток крови земноводных;
3. Сравнительный анализ метаболитов в плазме крови амфибий;
4. Определение интегральных показателей белкового и углеводного обменов земноводных;
5. Исследование генетического полиморфизма популяций близкородственных видов амфибий;
6. Изучение развития амфибий в лабораторных условиях.

Для раскрытия этих тем учитель предлагает обучающимся воспользоваться следующими методами:

1. Взятие ткани для биохимического анализа;
2. Гемиглобинцианидный метод;
3. Фотоколориметрический метод;
4. Глюкозооксидазный метод;
5. Белковый электрофорез;
6. Изучение развития амфибий в аквариуме при разных вариациях температуры.

#### *2.2.1. Взятие ткани для биохимического анализа*

Для молекулярных аналитических методов анализа тканей пробы лучше замораживать, для этого необходим сухой лед (тв. CO<sub>2</sub>) или жидкий азот. Замороженные во льду ткани чаще всего остаются непригодными для биохимических анализов. Сухой лед очень быстро испаряется поэтому хранить его следует в пластиковом, хорошо запечатанном пакете. В поле сухой лед может храниться около недели при наличии специального контейнера. Приобрести сухой лед можно у продавцов замороженными продуктами. Резервуары с жидким азотом также в поле могут использоваться для замораживания тканей на несколько месяцев. Жидкий азот менее доступен, поэтому чаще используют для заморозки тканей сухой лед. Процесс замораживания тканей и органов происходит так:

животное умерщвляют с помощью анестезии до извлечения тканей; ткани извлекают в тени, во избежание обезвоживания; изымают органы и кровь у крупных особей и заполняют ими пробирки с завинчивающимися пробками и обозначают номер каждой пробирки (на этикетке) в соответствии с записями в полевом дневнике. Поместить в сухой лед образцы в пробирках и уже после этого необходимо тщательно вымыть все использованное оборудование по возможности с мылом.

#### *2.2.2. Гемиглобинцианидный метод*

С помощью этого метода происходит определение гемоглобина в крови амфибий. При этом необходим набор реактивов с набором реактивов для выполнения работы: «Клини Тест-ГемЦ» (НПУ «Эко-Сервис» СПб). Концентрацию гемоглобина в крови рассчитывают по формуле:  $C = E_o/E_k \times 120$ , где  $C$  – это концентрация гемоглобина в опытной пробе;  $E_o$  – оптическая плотность опытной пробы;  $E_k$  – оптическая плотность калибровочной пробы; 120 – концентрация гемоглобина в калибровочном растворе. Взятие крови производится сразу же после отлова амфибий путем декапитации. В качестве антикоагулянта используют гепарин (кислый серосодержащий гликозаминогликан в печени). Определение метаболитов проводится в плазме крови, которую получают путем ее центрифугирования при 3000 об./мин и до использования хранят в замороженном состоянии.

#### *2.2.3. Фотоколориметрический метод*

Альбумин в плазме крови определяется по интенсивности окраски с бромкрезоловым зеленым, при этом фотоколориметрически используют набор реагентов Агат (ООО Агат-Мед).

#### *2.2.4. Глюкозооксидазный метод*

Глюкозу определяют глюкозооксидазным методом с набором реагентов «Глюкоза-ФКД» (ООО «Фармацевтика и клиническая диагностика»).

### 2.2.5. Белковый электрофорез

Белковый электрофорез, наряду с методами цитогенетическим и секвенированием митохондриальной ДНК, может использоваться для приблизительной оценки генетического полиморфизма популяций, при выяснении филогенетической близости видов и популяций животных. Среди разных методик электрофореза денатурирующий полиакриламидный гель (ПААГ) отличается высокой разрешающей способностью и хорошей воспроизводимостью. Перед исследованием образцы плазмы в течение ночи диализуют против 5 мМоль/л Трис НСl рН=7,4. Белки плазмы разделяют в вертикальных пластинах ПААГ в буферной системе Laemmly [1970]. Рабочий гель должен иметь концентрацию акриламида 10%, концентрирующий – 5%. На трек наносится 100 мкг белка. В качестве белков маркеров используют бычий сывороточный альбумин (67 кДа), яичный альбумин (45 кДа) и карбоангидразу (29 кДа). Электрофорез проводят при постоянной силе тока 3 мА/см<sup>2</sup> и при комнатной температуре. Продолжительность разделения обычно составляет 3,5 – 4 ч. После завершения электрофореза белки на геле фиксируют и окрашивают Кумасси G250 в 3,5% хлорной кислоте в течение 1,5 ч. После этого отмывают от краски в растворе 7% СН<sub>3</sub>СООН. Гели с окрашенными полосами белков (электрофореграммы) фотографируют и для количественного анализа используют электронные фотографии.

Денситометрию электронных фотографий электрофореграмм, определение количества белковых полос, их относительной площади и положения проводят с помощью компьютерной программы, разработанной сотрудником Института вычислительного моделирования СО РАН В.А. Китаевым.

Получаем график распределения плотности на всем треке. Анализ денситограммы основан на представлении графика плотности суммой пиков гауссовой формы и постоянного в пределах анализируемой области фона. Интенсивность фона, амплитуда, ширина и положение каждого пика

подбираются по методу наименьших квадратов. Результаты – относительная площадь, амплитуда и положение центра каждого пика – записываются в специальный файл. Обработка полученных результатов проводится с использованием статистического пакета MS Excel 1997 по общепринятым алгоритмам.

#### *2.2.6. Изучение развития амфибий в аквариуме при разных вариациях температуры*

При изучении развития земноводных в аквариуме с разностью температурного режима можно проследить за жизненным циклом животных с момента икры до метаморфизированной сеголетки. Метод схож с методом садка, только в данном случае наблюдение за развитием происходит в лабораторных, а не в естественных условиях. Температуру изменяют для определения наилучших условий для развития животного, каждый раз фиксируя показатели на разных жизненных стадиях.

### Список литературы:

1. Басарукин А.М. О размножении сибирского углозуба на юге Сахалина // X конф. молодых ученых и специалистов Сахалина – КНИИ. Южно-Сахалинск, 1975. С. 38.
2. Булахов В.Л. Методика прижизненного изучения питания амфибий // Вопросы степного лесоведения и охраны природы. Днепропетровск: Изд-во Днепропетр. гос. ун-та., Вып. 6. 1976. С. 146 – 156.
3. Дабагян Н.В. Травяная лягушка *Ranatemporaria* L. / Н.В. Дабагян, Л.А. Слепцова // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 442 – 462.
4. Ермаков Л.Н., Чернышова О.Н. Амфибии и рептилии в Западной Сибири (сохранение биоразнообразия, проблемы экологической этики и экологического образования). Новосибирск: Изд. ООО Ревик-К, 2003. 152 с.
5. Измерение и мониторинг биологического разнообразия: стандартные методы для земноводных / С.М. Ляпков. М.: Изд-во КМК, 2003. 380 с.
6. Ливанов С.Г., Равкин Ю.С. Мониторинг разнообразия наземных позвоночных государственного биосферного заповедника «Катунский» (концепция, методы и вариант реализации) // Труды государственного природного биосферного заповедника «Катунский». Вып. 1. Барнаул: Изд-во Алт. Ун-та, 2001. С. 55-110.
7. Новиков Г.А. Полевые исследования экологии наземных позвоночных животных. Л.: Изд-во Сов. наука, 1949. 602 с.
8. Темников Д.А. Применение компьютерного сканера для анализа электрофореграмм / Д.А. Темников // Приборы и техника эксперимента. 1999. №6. С. 59 – 62.