

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное агентство по образованию
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова
Кафедра физиологии человека и животных

Сравнительная и экологическая физиология животных

Методические указания

Рекомендовано
Научно-методическим советом университета для студентов,
обучающихся по специальности Биология

Ярославль 2009

УДК 612.014.49
ББК Е 903я73
С 75

*Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2009 года*

Рецензент
кафедра физиологии человека и животных
Ярославского государственного университета им. П. Г. Демидова

Составитель О. А. Ботяжова

Сравнительная и экологическая физиология животных: метод. указания / сост. О. А. Ботяжова; Яросл. гос. ун-т им. П. Г. Демидова. – Ярославль : ЯрГУ, 2009. – 56 с.

В методических указаниях описываются новые физиологические методы исследования регуляторных механизмов гомеостаза у животных разного систематического уровня в условиях постоянно меняющейся среды обитания.

Предназначены для студентов, обучающихся по специальности 020201.65 Биология (дисциплина «Сравнительная и экологическая физиология животных», блок СД), очной формы обучения.

УДК 612.014.49
ББК Е 903я73

© Ярославский государственный
университет им. П. Г. Демидова,
2009

Теоретическое изучение сравнительной и экологической физиологии должно обязательно сопровождаться выполнением студентами лабораторных работ, в ходе которых они получают непосредственное подтверждение теоретических положений, осваивают новые методы физиологических исследований, приобретают навыки постановки и проведения различных экспериментов, а также интерпретации, анализа и обобщения полученных результатов.

В первой части указаний приведены методики проведения лабораторных работ, которые необходимо выполнить студентам на занятиях по сравнительной и экологической физиологии под руководством преподавателя. Многие экспериментальные задачи являются разработками преподавателей кафедры физиологии человека и животных Ярославского госуниверситета. Большинству лабораторных работ предшествует краткое теоретическое введение. Каждая тема включает контрольные вопросы для самостоятельной теоретической подготовки студентов. Во второй части изложены методики проведения лабораторных работ, которые студенты могут выполнить индивидуально под руководством преподавателя, что дает право на получение экзаменационной отметки автоматически. Кроме того, приведены тематика рефератов, темы докладов на заключительную учебно-исследовательскую конференцию и список основной литературы для их подготовки. Приложение содержит таблицу с данными о составах основных физиологических растворов для различных животных и описание способов обездвиживания организмов, традиционно используемых в физиологических экспериментах.

1. Методики проведения лабораторных работ

Тема «Дыхание гидробионтов. Влияние экологических факторов на дыхание»

Лабораторная работа. Механизм жаберного дыхания рыбы

Цель работы: убедиться, что механизм жаберного дыхания рыбы основан на сочетании нагнетательного и всасывающего принципов действия.

Оборудование: стеклянная банка с водой, длинная пипетка с резиновой грушей, хорошо растертый уголь (взвесь кармина или другая цветная взвесь), резиновое колечко (отрезок резиновой трубки).

Объект исследования: рыба небольших размеров.

Наиболее совершенные по своему строению жабры рыб состоят из множества тонких лепестков с респираторными складками, которые значительно увеличивают дыхательную поверхность. Жаберные лепестки пронизаны многочисленными капиллярами и интенсивно омываются водой при помощи движения жаберных крышек.

Ход работы

Небольшого размера рыбу поместить в стеклянную банку с водой. Длинной пипеткой, снабжённой резиновым баллоном, ко рту рыбы подвести хорошо растертый древесный уголь. Проследить за дыхательными движениями рта и жаберных крышек при вдохе. Затем вставить рыбе в рот резиновое колечко так, чтобы она не могла закрывать рот. Снова пронаблюдать за движениями цветной взвеси. Сделать выводы. Оформить протокол опыта.

Лабораторная работа. Влияние температуры на частоту дыхательных движений рыбы

Цель работы: проследить, как влияет повышение температуры среды на частоту и глубину дыхательных движений рыбы.

Оборудование: невысокая стеклянная банка, фотопреобразователь, самописец Н 338 одноканальный, термостойкий стакан, термометр, горячая вода, хирургическая игла с ниткой, препаровальная доска.

Объект исследования: рыба небольших размеров.

Одним из существенных экологических факторов, влияющих на дыхательные движения рыбы, является температура окружающей среды. С повышением температуры частота дыхания увеличивается, с уменьшением – снижается. У некоторых рыб при пониженной температуре наблюдается аритмия дыхания, когда периоды учащения чередуются с периодами отсутствия дыхательных движений. При крайне высокой температуре наступает остановка дыхания и тепловая смерть. Частоту дыхания нельзя рассматривать в рамках простых физико-химических закономерностей уменьшения растворимости кислорода в воде с повышением её температуры. Здесь также играют роль температурные данные колебания кислородной ёмкости крови и интенсивность обмена веществ.

Ход работы

Установка для исследования влияния температуры на дыхание рыбы включает в себя рабочий аквариум (невысокая банка), фотопреобразователь с блоком питания и регистратор. Перед началом эксперимента соберите установку и проверьте ее работу. Закрепите в универсальном штативе фотопреобразователь и соедините его с гнездом блока питания. Соедините выход блока питания с входными штекерами самописца Н 338 с помощью соединительных проводов. Подсоедините к самописцу шнур сетевого питания, включите его в электросеть и нажмите на верхней панели самописца кнопку «сеть» (включится сигнальная лампочка). Блок питания также включите в сеть шнуром питания и тумблером на передней панели – зажжется сигнальная лампочка на блоке. Проверьте наличие бумаги и чернил в самописце. Включите лентопотяжный механизм са-

мописца на минимальную скорость 1 мм/с соответствующей клавишей. Несколько раз аккуратно нажмите пальцем на рычажок фотопреобразователя. Если установка собрана правильно, перо самописца будет отклоняться в соответствии с нажатием на рычажок. Установка готова к работе. Подготовьте горячую воду.

Рыбу с помощью бинта зафиксируйте на препаровальной дощечке в боковом положении и поместите в аквариум с водой. С помощью хирургической иглы прошейте жаберную крышку ниткой. Нитку присоедините к рычажку Энгельмана (рычажок фотопреобразователя). Перемещением фотопреобразователя на универсальном штативе отрегулируйте натяжение нити так, чтобы при поднимании и опускании жаберной крышки отклонялся рычажок фотопреобразователя и сигнал регистрировался на ленте самописца. В ходе опыта постарайтесь не задевать рычажок Энгельмана и не менять натяжение нити. В противном случае нельзя будет судить об изменении глубины дыхания рыбы. Запишите несколько дыхательных движений рыбы в спокойном состоянии (фон) при скорости движения ленты 5 мм/с. Затем, не останавливая самописца, медленно доливайте тёплую воду, повышая температуру в аквариуме до 25–30–35°C (остановка дыхания рыбы в пределах этих температур указывает на чрезмерно быстрое нагревание). Перемешивайте воду в аквариуме и контролируйте ее температуру с помощью термометра. Полученные пневмограммы вклейте в тетрадь. Проанализируйте влияние температуры на дыхательную активность рыбы. Зная скорость движения ленты самописца, рассчитайте частоту (дых.дв./мин) и определите глубину дыхания рыбы (амплитуда отклонения пера, мм) при спокойном состоянии и повышении температуры. Постройте графики зависимости частоты и глубины дыхания от температуры. Сделайте выводы.

Лабораторная работа. Влияние снижения содержания кислорода на дыхание рыбы

Цель работы: убедиться, что концентрация кислорода в воде оказывает выраженное влияние на дыхательные движения рыбы.

Оборудование: то же, что и в предыдущей работе, вода со сниженным содержанием O_2 .

Объект исследования: рыба небольших размеров.

Концентрация кислорода в воде оказывает выраженное влияние на частоту дыхания рыбы. При увеличении напряжения O_2 в воде частота дыхания уменьшается, при уменьшении – увеличивается. Это увеличение у некоторых видов рыб может достигать двух-, трёхкратного размера. Искусственно понижая напряжение кислорода в воде (кипячение, пропускание через воду азота), можно изучить влияние недостатка кислорода на дыхательные движения рыб.

Ход работы

Частота и глубина дыхания рыбы регистрируются на ленте самописца так же, как и в предыдущей работе. Включите лентопротяжный механизм клавишей «5 мм/с». Потом ручкой регулятора высоты штатива установите натяжение нити так, чтобы получить максимальную амплитуду отклонения пера самописца. В течение одной минуты запишите исходную дыхательную активность рыбы (фон, контроль). Затем добавьте в рабочий аквариум бескислородную воду, отметив при этом на диаграммной ленте момент добавления. В течение двух минут регистрируйте дыхательные движения рыбы. Опыт повторите 3 раза с интервалом 5 минут. Проанализируйте полученные данные пневмограммы. Рассчитайте частоту и глубину дыхания рыбы в контрольном и опытном вариантах. Сделайте выводы.

Лабораторная работа. Влияние накопления двуокиси углерода в воде на дыхание рыбы

Цель работы: убедиться, что у рыбы активность дыхания существенно зависит от наличия и концентрации углекислого газа в воде.

Оборудование: то же, что и в предыдущей работе, вода, насыщенная CO_2 .

Объект исследования: рыба небольших размеров.

Угольная кислота действует на дыхательную активность рыбы в двух направлениях. Во-первых, растворяясь в воде, она подкисляет её, а это, в свою очередь, вызывает изменение частоты дыхания. Во-вторых, углекислота легко диффундирует через оболочки жаберного и кожного эпителия, проникает в кровь и затем производит широкое действие на организм. Внешне это проявляется в учащении дыхательных движений и уменьшении его глубины. Растворимость CO_2 в воде в 30 раз больше, чем растворимость O_2 . Однако в связи с очень низким содержанием двуокиси углерода в атмосфере (0,03 %) общее её количество, растворённое в воде, очень мало (0,3 мл CO_2 на 1 л воды).

Ход работы

Искусственно повышая количество двуокиси углерода в воде, можно исследовать её активизирующее влияние на дыхание рыб. Частоту и глубину дыхания легко учитывать по записи движений жаберных крышек (пневмограмма) (подготовку прибора и объекта исследования смотрите в предыдущей работе). Рыбу фиксируйте на препаровальной доске, помещённой в банку с водой. Задний край жаберной крышки прошейте нитью, свободный конец которой прикрепите к рычажку Энгельмана, соединённого с фотопреобразователем. Переведите тумблер включения блока питания в положение «вкл» (загорается сигнальная лампа), тумблером «сеть» включите самописец. Проверьте работу системы. Слегка нажмите пальцем на длинный рычаг заслонки фотопреобразователя, убедитесь, что перо самописца при этом отклоняется вверх с амплитудой примерно 1,5 см. Включите лентопротяжный механизм, нажав клавишу «5 мм/с». Поворотом ручки регулятора высоты штатива установите натяжение нити так, чтобы получить максимальную амплитуду отклонения пера самописца. В течение 30 секунд запишите дыхательные движения рыбы в спокойном состоянии (фоновая пневмограмма). Затем в аквариум с рыбой добавьте воду, насыщенную CO_2 , отметив при этом на диаграммной ленте момент добавления воды с CO_2 . В течение 1 минуты регистрируйте дыхательные движения рыбы под воздействием двуокиси углерода. Опыт повторите 3 раза с интервалом в пять минут.

Проанализируйте полученные данные фоновой и опытной пневмограмм. Определите частоту и глубину дыхания рыбы. Сделайте выводы.

Контрольные вопросы

1. Значение дыхания. Преимущество окислительных процессов перед брожением и гликолизом.
2. Газовый состав атмосферного воздуха, содержание газов в пресной и морской воде.
3. Механизм газообмена между воздухом и кровь, между кровью и тканями. Состав и парциальное давление газов альвеолярного воздуха, напряжение газов в крови.
4. Понятие о лёгочных сурфактантах. Роль сурфактантов для внешнего обмена.
5. Диффузионные лёгкие беспозвоночных.
6. Лёгкие амфибий, рептилий и птиц.
7. Факторы, влияющие на потребление кислорода животными.
8. Зависимый и независимый типы дыхания. Факторы, влияющие на зависимость газообмена от pO_2 , и механизмы этих реакций.
9. Жаберное дыхание у беспозвоночных животных – червей, моллюсков, ракообразных. Трахейные жабры.
10. Водное дыхание рыб. Потребности разных рыб к содержанию кислорода в воде.
11. Строение жаберного аппарата круглоротых, элазмобранхий и костистых рыб. Кровоснабжение жабр.
12. Механизм вентиляции жаберного аппарата костистых рыб.
13. Влияние разных факторов на дыхание рыб.
14. Воздушное дыхание рыб (кожное, кишечное).
15. Дериваты пищеварительного аппарата рыб, обеспечивающие их воздушное дыхание. Роль плавательного пузыря у разных рыб. Наджаберные и лабиринтовые органы.

Тема «Пищеварение и обмен веществ»

Лабораторная работа. Прием пищи у простейших

Цель работы: изучить особенности образования и работы пищеварительной вакуоли парамеции-туфельки.

Оборудование: микроскоп, осветитель, тушь, предметные стекла, препаровальная игла, гигроскопическая вата, фильтровальная бумага, глазная пипетка.

Объект исследования: представитель типа Простейшие – парамеция-туфелька.

Пищеварительная функция у инфузорий более совершенна, чем у амёб, т. к. она протекает внутри пищеварительной вакуоли, которая, сформировавшись в ротовой воронке, проходит длительный путь по всему телу парамеции.

Ход работы

На предметное стекло положить небольшой, хорошо расщипанный кусочек гигроскопической ваты или фильтровальной бумаги с тем, чтобы ограничить подвижность парамеций. Каплю культуры парамеций поместить на предметное стекло в тонко расщипанную вату. Добавить каплю туши к культуре парамеций. Движением ресничек парамеции создают ток пищевых частиц к цитофарингсу – ротовой воронке, которая располагается у заднего конца перистомы. Перистом представляет собой открытый спереди желоб, тянущийся вдоль передних двух третей тела. В конце пищеварения можно отметить формирование пищеварительных вакуолей, определить частоту этого процесса. Проследить и зарисовать путь передвижения вакуолей в цитоплазме. Определить время прохождения их по всему телу от цитофарингса до порошицы.

Лабораторная работа. Исследование фильтрационной способности двустворчатых моллюсков

Цель работы: определить скорость фильтрации воды моллюсками и ее зависимость от размерно-весовых параметров животных.

Оборудование: 3 цилиндрических сосуда емкостью по 2 литра, мерный стакан на 1 литр, весы чашечные с разновесами, весы торсионные, фотоэлектроколориметр (ФЭК), кюветы на

10 мм, фильтровальная бумага, миллиметровая бумага, шпатель, каолин.

Объект исследования: двустворчатые моллюски.

Двустворчатые моллюски получают пищевой материал и необходимый для дыхания кислород из воды, которая засасывается ими внутрь раковины вододвижущим аппаратом.

Двустворчатые моллюски играют большую роль в самоочищении водоемов, т. к. их фильтрующий аппарат обладает высокой улавливающей способностью. Эти животные могут удалять 92–100 % всех частиц, взвешенных в фильтруемом ими объеме воды.

В качестве количественной характеристики фильтрующей способности моллюсков обычно используют скорость фильтрации воды животными, которую выражают как объем воды, пропущенной моллюском через его вододвижущий аппарат за определенный отрезок времени.

Ход работы

В сосуды налить по 1 литру аквариумной воды и внести по 300 мг каолина (навески сделать на торзионных весах). Тщательно перемешать взвесь в каждом сосуде, используя магнитную мешалку. В два сосуда поместить моллюсков, имеющих разные размеры тела, у которых предварительно измерены длина раковины (см) и вес (г). Один сосуд оставить без моллюска для определения небιологического осаждения взвеси. Через два часа проколориметрировать на фотоэлектроколориметре растворы из всех трех сосудов, используя 10 мм кюветы. Определить величину светопропускания (E , %), а затем по калибровочному графику установить конечную концентрацию взвеси. Данные занести в таблицу:

№ n/n	Размер (см), вес (г) моллюсков	E % (через 2 часа)	C мг/л (через 2 часа)	Скорость филътра- ции (мл/час)	Удельная скорость	
					к размеру мл/час см	к весу мл/час г
1	2	3	4	5	6	7

Рассчитать скорость фильтрации воды моллюсками по формуле Виллиамсена:

$$V = m \left(\frac{\ln C_0 - \ln C_t}{t} - a \right),$$

где V – скорость фильтрации (мл/час);

C_0 и C_t – соответственно начальная (300 мг/л) и конечная (через 2 часа) концентрации взвеси (мг/л) в двух экспериментальных сосудах;

m – объем воды в сосуде (1000 мл);

t – продолжительность опыта (2 часа);

a – поправка на небиологическое оседание, равная:

$$a = \frac{\ln C_{01} - \ln C_{t1}}{t},$$

где C_{01} и C_{t1} – соответственно начальная (300 мг/л) и конечная (через два часа) концентрации взвеси (мг/л) в третьем сосуде без моллюска.

Порядок работы на фотозлектроколориметре (КФК)

1. Включить прибор в сеть тумблером, находящимся на задней панели. Прогреть 5 минут.

2. Наполнить контрольную кювету дистиллированной водой, а опытную – исследуемой взвесью. Поместить кюветы в гнезда держателя кювет так, чтобы контрольная кювета находилась против луча.

3. Настроить КФК на «0» по дистиллированной воде. Для этого при открытой крышке кюветного отсека прибора ручкой «Установка 0» установить стрелку на «0».

4. Настроить КФК на «100». Для этого при закрытой крышке прибора ручкой «Установка 100» установить стрелку на «100%».

5. Ручкой «Кюветы» установить против луча кювету с образцом. При этом крышку прибора не открывать.

6. Определить светопропускание (снять показания по верхней шкале E , %) при закрытой крышке прибора. Использовать красный светофильтр. Для повышения точности результатов провести по три измерения с каждым образцом и вычислить среднее арифметическое в каждом опыте.

Построение калибровочного графика

1. Приготовить взвесь каолина с концентрацией 400 мг/л. Для этого сделать навеску каолина в 40 мг и растворить её в 100 мл воды.

2. На колориметре определить способность этой взвеси к светопропусканию.

3. Приготовить взвеси каолина с концентрациями 200, 100 мг/л и 50 мг/л путем последовательного разведения первого раствора (400 мг/л) в 2, 4 и 8 раз.

4. Проколориметрировать эти взвеси и определить их способность к светопропусканию.

5. Построить калибровочный график зависимости светопропускания (E , %) от концентрации взвеси (C , мг/л) по четырем точкам.

Рассчитать среднюю скорость фильтрации воды для двух моллюсков и удельную скорость по отношению к размеру и к весу для каждого моллюска. Сделать выводы.

Лабораторная работа. Расчет баланса азота у рыбы

Решить задачу. Рыбой за сутки съедено 5600 мг мотыля, 1000 мг трубочника и 850 мг ручейника. В суточных экскрементах содержится 63,7 мг азота, а в 100 мл воды из аквариума содержание азота равно 0,18 мг. Опыт проводился в двухлитровом аквариуме.

Рассчитать баланс азота у одной рыбы по сырому и сухому веществу, используя данные таблицы.

Содержание азота в кормовых организмах

<i>Наименование организма</i>	<i>Содержание азота, %</i>	
	<i>в сыром веществе</i>	<i>в сухом веществе</i>
Трубочник	1,36	8,32
Мотыль	1,55	9,45
Ручейник	1,81	8,80
Моллюски	0,67	2,27

Дать характеристику полученного азотистого баланса, указать, сухим или сырым кормом выгоднее кормить рыб, и почему.

Лабораторная работа. Расчет пищевого рациона рыбы

Решить задачу. Молодь сазана весом 6 граммов должна получать в сутки 17,9 мг азота. На основании анализа содержимого кишечника установлено, что сазан питается мотылем и моллюсками. Причем реконструированный вес как мотыля, так и моллюсков в кишечнике сазана составлял по 400 мг.

Определить: какова величина суточного рациона (мг) молодки сазана?

Какую долю от веса тела сазана (в процентах) составляет его суточный рацион? Расчеты провести по сухому и по сырому веществу, используя данные таблицы.

Контрольные вопросы

1. Основные типы пищеварения и их характеристики.
2. Происхождение пищеварения (теории А. Флоркена, Х. С. Коштыянца, А. М. Уголева).
3. Выбор пищи у простейших и многоклеточных беспозвоночных.
4. Прием пищи у простейших. Пищеварительные вакуоли.
5. Гидролиз основных пищевых веществ у беспозвоночных. Распространенность ферментов.
6. Гидролиз основных пищевых веществ в отделах желудочно-кишечного тракта позвоночных животных.
7. Возникновение мембранного пищеварения.
8. Обмен и роль основных питательных веществ.

Тема «Свойства крови гидробионтов»

Лабораторная работа. Техника взятия крови у рыб

Цель работы: освоить метод взятия крови у рыб из хвостовой артерии.

Оборудование: марлевая салфетка, скальпель, пробирки, гепарин или другой антикоагулирующий раствор.

Объект исследования: разные виды рыб.

У рыб кровь для подсчета лейкоцитов, эритроцитов, лейкоцитарной формулы и других анализов можно брать из сердца, после вскрытия грудной полости, из жаберных сосудов, но наиболее простым методом является получение крови из хвостовой артерии.

Ход работы

Тело рыбы протереть, обернуть салфеткой так, чтобы хвост и анальный плавник остались свободными. Лезвием скальпеля убрать чешую около плавника. Взять рыбу за голову. Удерживая ее в вертикальном положении, оттянуть хвост и отсечь его. Вытекающую из хвостовой артерии кровь собрать в пробирку, предварительно ополоснув ее гепарином.

Из пробирки кровь можно набирать в смесители для разведения, определения количества форменных элементов и лейкоцитарной формулы, а также для приготовления и изучения мазков.

Лабораторная работа. Определение удельного веса крови рыбы, лягушки и теплокровного животного

Цель работы: определить и сопоставить с данными литературы удельный вес крови разных животных.

Оборудование: 48 маркированных стаканчиков, маточный раствор медного купороса, гепарин или смесь щавелевокислого аммония и щавелевокислого калия, глазные пипетки, вазелин.

Объект исследования: кровь рыбы, лягушки и теплокровного животного.

Капля крови погружается в сосуд с раствором медного купороса определенного удельного веса. Если капля тяжелее раствора, она идет ко дну, а если легче – всплывает. При соприкосновении капли белковой жидкости с раствором медного купороса проис-

ходит немедленное свертывание – на поверхности капли образуется медно-белковая оболочка. Эта пленка препятствует смешиванию капли с реактивом, и он вследствие этого не портится.

Определяя удельный вес плазмы и цельной крови, можно по номограмме вычислить количество гемоглобина, процент белка и объем, занимаемый эритроцитами в крови (гематокрит).

Для определения используют растворы, приготовленные с точностью до 0,0002 при интервалах 0,001: для плазмы готовят 20 растворов, удельный вес от 1,015 до 1,035, а для цельной крови – 40 растворов с удельным весом от 1,035 до 1,075.

Для более грубых определений можно использовать укороченные серии из 16 растворов с интервалами 0,004, приготовленных с точностью до 0,001.

Кровь перед определением необходимо стабилизировать, добавляя 0,2 мг гепарина на 1 мл крови, или смесь из 3 частей щавелевокислого аммония и 2 частей щавелевокислого калия. Раствор, содержащий эти соли, высушивают в пробирке. Кровь добавляют с таким расчетом, чтобы на 1 мл крови приходилось не более 1 мг сухого антикоагулянта. **Внимание! Соли лимонной кислоты применять нельзя.**

Ход работы

С помощью глазной пипетки взять каплю крови и перенести ее в раствор медного купороса. Носик пипетки рекомендуется предварительно смазать вазелином. Капать следует, установив кончик пипетки на 1 см над уровнем жидкости.

Высушенная капля проникает через поверхностный слой и опускается на глубину 2 см. После этого в течение 30 секунд решается вопрос, останется ли капля на месте, будет ли она погружаться глубже или всплывет. Но в последнем случае она начнет погружаться через 10–15 секунд, после того как поднимется на несколько миллиметров.

Наблюдая за поведением капель в тестирующих растворах с разным удельным весом, находят тот раствор, в котором сначала капля «повисает», а затем начинает медленно опускаться. Удельный вес исследуемой жидкости (крови) и будет равен удельному весу этого тестирующего раствора. Определите и сравните

удельный вес крови разных животных. Полученные результаты сопоставьте с данными литературы.

Лабораторная работа. Определение количества эритроцитов в крови рыб

Цель работы: изучить устройство счетной камеры Горяева, определить и сравнить содержание эритроцитов в крови рыб разных видов, возрастов и полов.

Оборудование: марлевая салфетка, скальпель, часовое стекло, пробирки, смеситель крови для эритроцитов, счетная камера Горяева, покровные стекла, глазная пипетка, микроскоп, пипетка на 0,02 и 1 мл, фильтровальная бумага, вата, гепарин, 1 %-ный раствор хлорида натрия.

Объект исследования: рыба разных видов, возрастов и пола.

Ход работы

В смеситель для эритроцитов набрать кровь до метки 0,5 и до метки 101 – разводящую жидкость (1%-ный раствор хлорида натрия), следя, чтобы в капилляр не попадали пузырьки воздуха. Для подсчета количества эритроцитов использовать счетную камеру Горяева. Перед началом работы необходимо разобраться в устройстве сетки счетной камеры. Для этого, поместив камеру под микроскоп, рассмотреть малые и большие квадраты сетки с объективом 8, а затем и на большом увеличении.

Подготовить камеру для заполнения кровью. Для этого слегка смочить пластинки камеры, накрыть камеру покровным стеклом и притереть его к камере до появления радужных пятен (кольца Ньютона).

Взять смеситель. Выпустить из него на ватный тампон 1–2 капли крови, а следующую каплю осторожно поднести к краю покровного стекла. Заполненную камеру не наклонять.

Провести подсчет эритроцитов в 80 мелких квадратах, что будет соответствовать пяти большим. Во избежание двукратного подсчета одной и той же клетки руководствуются правилом Егорова: считают эритроциты, лежащие внутри и на левой верхней границе. Эритроциты, лежащие на нижней границе, не подсчитываются. Подсчитав количество клеток в пяти больших

квадратах, рассчитывают содержание эритроцитов в 1 мм³ крови по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 4000 \cdot 200}{80},$$

где X – искомое число эритроцитов в 1 мм³;

A – число клеток в 80 малых квадратах (5 больших).

После работы тщательно вымыть смеситель и камеру дистиллированной водой. Смеситель после промывки хорошо высушить! Определить и сравнить содержание эритроцитов в крови разных видов рыб, сопоставить полученные результаты с данными литературы.

Количество эритроцитов в 1 мм³ крови костистых рыб

Щука	2.572.000	Судак	1.780.000	Карп	1.837.000
Сом	1.220.000	Окунь	1.380.000	Плотва	1.910.000
Лещ	1.720.000	Жерех	1.850.000		

Сделать выводы.

Лабораторная работа. Подсчет количества лейкоцитов в крови рыб

Цель работы: определить количество лейкоцитов в крови разных рыб.

Оборудование: марлевая салфетка, скальпель, часовое стекло, пробирки, смеситель крови для эритроцитов, счетная камера Горяева, покровные стекла, глазная пипетка, микроскоп, пипетки на 0,02 и 1 мл, фильтровальная бумага, вата, стеклянные бюксы с притертыми крышками для растворов А и Б, гепарин, 1 %-ный раствор хлорида натрия; реактивы для приготовления раствора А: нейтральный красный, хлорид натрия, дистиллированная вода, реактивы для приготовления раствора Б: кристаллический фиолетовый, формалин, натрий лимоннокислый.

Объект исследования: рыба разных видов, возрастов и пола.

Нормальное количество лейкоцитов в крови рыб значительно выше, чем у человека и млекопитающих (у некоторых костистых рыб свыше 100000 в мм³). Количество лейкоцитов у одного и то-

го же вида рыб сильно колеблется в зависимости от возраста, сезона и состояния зрелости половых продуктов.

В связи с таким большим количеством лейкоцитов кровь для их подсчета разводят в смесителе для эритроцитов.

Ход работы

Кровь из часового стекла как можно быстрее набирают в смеситель для эритроцитов до метки 1 и затем разбавляют до метки 101. Таким образом, кровь разводится в 100 раз.

Кровь разбавляют специальными растворами, всасывающими витальное окрашивание лейкоцитов. Для этого перед исследованием готовят растворы А и Б.

РАСТВОР А		РАСТВОР Б	
Нейтральный красный	25 мг	Кристаллический фиолетовый	12 мг
Хлорид натрия	600 мг	Лимоннокислый натрий	3,8 мг
Дистиллированная вода	100 мл	Формалин	0,4 мл, 40 %-ный р-р
		Дистиллированная вода	100 мл

Срок хранения растворов не более 1 суток.

Сначала растворяют краски. Соли добавляют только тогда, когда краска полностью растворилась.

Растворы А и Б перед исследованием разливают в низкие стеклянные чашечки.

Набрав кровь в смеситель до метки 1, из чашечки насасывают раствор А приблизительно до половины расширения смесителя, после чего кончик смесителя переносят в чашечку с раствором Б и наполняют до отметки 101. Концы смесителя зажимают пальцами и перемешивают путем встряхивания. После перемешивания смеситель оставляют в горизонтальном положении на 5–10 минут, после чего снова перемешивают, выпускают 1–2 капли на вату. Затем заполняют камеру Горяева.

В результате наступившей окраски лейкоциты легко различимы, т. к. их ядра окрашены в темный фиолетово-красный цвет, а протоплазма становится розовой. В эритроцитах бывают слабо окрашены лишь ядра. Подсчитывают количество лейкоцитарных клеток в 10 больших квадратах, а затем по формуле определяют количество лейкоцитов в 1 мм^3 крови. При пересчете надо помнить, что кровь разведена в 100 раз:

$$X = \frac{B \cdot 4000 \cdot 100}{160},$$

где X – число лейкоцитов в 1 мм³ крови;

B – число лейкоцитов в 10 больших квадратах (160 малых).

Определить и сравнить количество лейкоцитов в крови разных рыб, используя данные литературы. Сделать выводы.

Лабораторная работа. Определение соотношения плазмы и форменных элементов крови рыбы, лягушки и млекопитающего животного

Цель работы: определить и сравнить гематокриты разных животных.

Оборудование: гематокрит с центрифугой, капилляры, антикоагулянт.

Объект исследования: кровь рыбы, лягушки и теплокровного животного.

Для определения соотношения плазмы и форменных элементов цельную кровь разделяют на составные части путем центрифугирования. Прибор для определения объема плазмы и форменных элементов называется гематокритом.

Кровь для исследования у рыбы получают путем отсечения хвостового стебля, у лягушки – отрезанием пальца задней конечности, а также берут цельную кровь теплокровного животного.

Для предотвращения свертывания крови используют вещества – антикоагулянты (например, порошок щавелевокислого натрия, который помещают рядом с местом забора крови и немедленно смешивают его с каплей появившейся крови). Кровь можно также собрать на часовое стекло или в пробирку, предварительно обработанные гепарином.

Ход работы

Необходимо заполнить исследуемой кровью каждого животного по два капилляра. Для этого узкий конец капиллярной трубки подводят сбоку к капле крови, помещенной на часовое стекло или стекло с лункой; в силу капиллярности кровь будет подниматься по трубке. Заполненные капилляры поместить в ячейки центрифуги, так, чтобы они обоими концами упирались в резино-

вые кольца, расположенные в центре и по краю центрифуги. Закрывать ее крышкой и туго затянуть гайку на крышке. Центрифугировать при скорости 3,5–4 тыс. оборотов в минуту в течение 10–15 минут. **Внимание! Крышку центрифуги можно открывать только после полной остановки!** Вынуть капилляры из ячеек, в которых отчетливо видно разделение крови на плазму и форменные элементы. Для определения объемов плазмы и форменных элементов капилляры поочередно устанавливают в капилляродержатель гематокрита, перемещают их в горизонтальном направлении до тех пор, пока темная риска диагональной линейки не совпадет с границей раздела плазмы и форменных элементов. Вертикальная черта капилляродержателя укажет на шкале, расположенной в верхней части прибора, соотношение плазмы и форменных элементов (гематокрит, %). Берется среднее значение из показателей двух капилляров, заполненных кровью одного животного. Определить и сравнить гематокриты разных животных.

Контрольные вопросы

1. Функции крови. Сравнительные данные о количестве крови у разных животных.
2. Физико-химические свойства крови: удельный вес, pH, осмотическое давление.
3. Белковый состав плазмы и сыворотки крови. Роль белков плазмы.
4. Дыхательные белки крови и гемолимфы.
5. Физиологическая роль гемоцианинов.
6. Физиологические свойства гемоглобинов.
7. Эволюция клеточного состава крови.
8. Клеточные элементы гемолимфы беспозвоночных (насекомых, ракообразных, моллюсков). Роль базофильных и эозинофильных гемоцитов.
9. Особенности лейкоцитарной формулы крови у рыб.
10. Клеточные элементы крови амфибий и рептилий.
11. Гемостаз у разных видов беспозвоночных животных и его отличия от гемостаза у позвоночных.

Тема «Сравнительная физиология осморегуляции»

Лабораторная работа. Осморегуляторная функция метанефридиев беззубки

Цель: убедиться, что метанефридии моллюсков выполняют осморегулирующую функцию в организме беспозвоночных животных.

Оборудование: весы для взвешивания моллюсков, эксикатор с притертой крышкой, эфир,

Объект исследования: двустворчатый моллюск-беззубка.

Деятельность метанефридиев у беззубки можно исключить эфиром или другими веществами наркотического действия.

Ход работы

Взвесить беззубку, затем поместить ее в эксикатор с небольшим количеством воды, в которую предварительно добавлен эфир. Эксикатор плотно закрыть крышкой. **Внимание! Работу проводить в вытяжном шкафу!** Через каждые 10 минут извлекать моллюска из эксикатора и взвешивать его, предварительно обсушив фильтровальной бумагой. Взвешивание повторить 6–7 раз. Проанализировать изменения веса тела моллюска. Прибавки в весе обозначают задержку выведения воды, поступающей в организм животного.

Сделать выводы.

Лабораторная работа. Частота сокращений контрактильной (сократительной) вакуоли парамеции в зависимости от осмотического давления среды

Цель работы: определить зависимость осморегуляторной деятельности сократительной вакуоли парамеции от солености среды.

Оборудование: бинокулярный микроскоп (объектив * 40, окуляр * 12,5), раствор поваренной соли, фильтровальная бумага, вата, предметные и покровные стекла, пипетка.

Объект исследования: культура парameций.

Ход работы

Расщипать тонким слоем на предметном стекле кусочек гигроскопической ваты и нанести на нее каплю культуры парамеции-туфельки. Накрыть покровным стеклом. Отыскать неподвижную или малоподвижную парамецию. Под большим увеличением микроскопа хорошо видны две сократительные вакуоли на дорсальной стороне передней и задней частей тела инфузории. В спокойном состоянии они шарообразны, во время сокращения становятся звездчатыми. В момент сокращения достаточно явно видны радиальные каналы в количестве 7–10 штук. Пронаблюдать сократительную активность контрактильных вакуолей. В процессе наблюдения отметить, совпадают ли сокращения вакуолей во времени и по частоте. Определить частоту сокращения вакуолей, взяв среднее из нескольких определений. Затем удалить воду из капли культуры и заменить ее 0,3 %-ным раствором поваренной соли. Для этих целей, не сдвигая препарата, каплю раствора соли нанести глазной пипеткой у одного края покровного стекла и удалить воду кусочком фильтровальной бумаги у другого края. Вновь подсчитать частоту сокращений вакуолей. Затем заменить 0,3 %-ный раствор NaCl на 1,5 %-ный, подсчитать частоту сокращений. Отмыть препарат водой и вновь определить число сокращений контрактильной вакуоли. Сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Понятие о гомеостазе. Значение гомеостаза.
2. Приспособление животных к осмотическим условиям окружающей среды.
3. Стеногалинные и эвригалинные животные. Понятие о гипотонической и гипертонической осморегуляции.
4. Пойкилоосмотические животные.
5. Осморегуляция у беспозвоночных животных. Экскреторные органы у беспозвоночных.
6. Осморегуляция у элазмобранхий. Значение «физиологической уремии».
7. Осморегуляция у морских и пресноводных костистых рыб.
8. Гломерулярные и агломерулярные почки рыб.

9. Регуляция осмотической концентрации крови у амфибий, рептилий и птиц. «Носовая» железа и ее роль.

10. Водный баланс млекопитающих животных. Значение эндогенной воды.

11. Строение почки млекопитающих. Нефрон. Элементы почечного фильтра.

12. Механизм образования первичной мочи. Процессы, протекающие в канальцевом аппарате. Поворотно-противоточные механизмы.

13. Осморегулирующий рефлекс. Осморецепторы, волюмо-рецепторы и их роль в осморегулирующем рефлексе.

Тема «Сенсорные системы»

Лабораторная работа. Различие чувствительности наружных и внутренних вкусовых рецепторов у рыбы

Цель работы: выявить наличие хеморецепторов у рыб и отметить особенности реакции на различные химические вещества.

Оборудование: аквариум, кусочки хлеба, вымоченные в 0,1 %-ном растворе хинина, кусочки хлеба, вымоченные в 5 %-ном растворе соляной кислоты, длинный пинцет.

Объект исследования: рыба небольших размеров (контрольный и предварительно ослепленный экземпляры).

Вкусовые рецепторы рыб, как и у высших позвоночных животных, расположены в полости рта, но в связи с водным образом жизни могут выходить на наружные покровы и встречаться на губах и усиках, а у некоторых рыб на всем теле. При выходе наружу вкусовые рецепторы функционируют как экстерорецепторы. Наиболее специализированные в морфологическом отношении образования, приспособленные нести вкусовые рецепторы, – это усики – нитевидные лучи плавников многих рыб, а также свободные плавниковые лучи. Вкусовые рецепторы усиков и полости рта могут различаться по своей чувствительности к разным веществам.

Ход работы

Небольшие кусочки хлеба вымочить в 0,1 %-ном растворе хинина, 5 %-ном растворе соляной кислоты и 5 %-ном растворе сахара. С помощью длинного пинцета поочередно поднести вы-

моченные кусочки хлеба к усикам рыбы. Приманку, пропитанную хинином, карп берет после опробования усиком. Однако после опробования внутриротовыми рецепторами рыба выплевывает хлеб. На сладкие вещества реакция может быть иной. Пища, обработанная 5 %-ном раствором соляной кислоты, вызывает реакцию ухода, как только рыба коснулась приманки усиком.

Отметить особенности пищевой реакции карпа на кусочки хлеба, обработанные различными химическими веществами. Оценить чувствительность наружных (на усиках) и внутренних (в полости рта) вкусовых рецепторов у рыб.

Лабораторная работа. Реакция инфузорий на химические вещества

Цель работы: убедиться в наличии у парамеций хеморецепции и реакции выбора различных химических агентов.

Оборудование: бинокулярный микроскоп, стёкла с лунками, 3 бюкса с плотными крышками, пинцет, мелкие кусочки силикагеля, 1 %-ный медный купорос, 1 %-ная уксусная кислота, 1 %-ный едкий натр.

Объект исследования: культура парамеций.

У парамеций отмечается реакция выбора некоторых химических веществ, которая проявляется в предпочтении или избегании простейшими различных химических субстратов.

Ход работы

Для опыта следует взять мелкие кусочки силикагеля и поместить их на 30 минут в бюксы с 1 %-ной уксусной кислотой, 1 %-ным едким натром, 1 %-ным раствором медного купороса. Через 30 минут на предметное стекло с лункой нанести культуру парамеций, поместить на дно лунки кусочки силикагеля, вымоченный в уксусной кислоте.

На протяжении 15 минут через каждые 2 минуты подсчитать под бинокуляром количество парамеций, осевших на частицах силикагеля. Отметить поведенческие реакции парамеций по отношению к разным химическим веществам, определить предпочитаемые и избегаемые парамециями субстраты. Повторить опыт с кусочками силикагеля, предварительно вымоченными в едкой

щёлочи, в медном купоросе и других веществах. Полученные результаты оформить в виде таблицы. Сделать выводы.

Лабораторная работа. Хеморецепция у дождевого червя

Цель работы: убедиться в наличии и качественных изменениях реакции дождевого червя на химические вещества различной природы.

Оборудование: установка для графической регистрации сокращений тела червя: самописец Н 338 одноканальный, чернила и бумага для самописца, фотопреобразователь с блоком питания, изогнутая (П – образная) стеклянная трубка; невысокий аквариум, стакан, нитки для лигатур, ножницы, глазные пипетки для нанесения растворов на тело червя, вода, растворы соляной кислоты, медного купороса, хлористого натрия (все 1 %).

Объект исследования: дождевой червь.

В коже червей имеется большое количество хеморецепторов. В частности, вся поверхность тела чувствительна к кислотам. Указывают, что дождевые черви способны отличать морковь от сельдерея, цветную капусту от белокочанной и т. д. (Ч. Дарвин).

Убедиться в наличии хеморецепции у дождевого червя можно несколькими способами – смазыванием поверхности тела различными растворами, методом выбора пути в ветвящемся коридоре из киноплёнки, где в одно из колен помещается фильтровальная бумага, смоченная каким-либо химическим веществом, электрофизиологическим методом и т. д.

Ход работы

Весьма наглядные результаты получаются при некоторой модификации опыта Грея и Лиссмана. Опыт состоит в следующем. У дождевого червя перевязывают головной и задний концы тела, а затем отрезают головную часть. С помощью лигатур, оставленных на концах тела, червя укрепляют горизонтально в рамке параллельно ее основанию. Накладывают лигатуру на среднюю часть тела червя и прикрепляют ее к рычажку фотопреобразователя. Налаживают графическую регистрацию сокращений тела. На воздухе червь, лишенный головного конца, обнаруживает ритмические сокращения. Если же погрузить его в воду,

то сокращения исчезают. В этом и состоит опыт Грея и Лиссмана. Если же вместо воды взять растворы веществ, то при каких-то концентрациях сокращения в жидкости не прекращаются, а иногда и усиливаются. Испытать слабые растворы кислот, солей и других веществ. Диаграммы сокращений тела червя вклеить в тетрадь, проанализировать и сравнить. Полученные результаты оформить в виде таблицы. Сделать выводы.

Лабораторная работа. Хеморецепция у двустворчатых моллюсков

Цель: изучить особенности хеморецепции у двустворчатых моллюсков.

Оборудование: 4 аквариума, 4 глазные пипетки (или пастеровские) для взвесей кармина, взвесь кармина в воде, взвесь кармина в 0,5 %-ном растворе соляной кислоты, взвесь кармина в 1 %-ном растворе сахара, в 1 %-ном растворе KCL.

Объект исследования: двустворчатые моллюски (анодонта, перловица).

У двустворчатых или пластинчатожаберных моллюсков наиболее чувствительна к химическим веществам сифонная часть мантии.

Ход работы

Для опыта необходимо взять 4 низких стеклянных аквариума. В каждый аквариум поместить по одному двустворчатому моллюску и налить небольшое количество воды, чтобы она покрывала раковину моллюска. Внимательно рассмотреть моллюсков и найти вводной (всасывающий) и выводной сифоны. Выждать, когда ракушки раскроются и выставят сифоны.

К всасывающему сифону одного из моллюсков подвести пипетку со взвесью тонко растертого в воде кармина и убедиться, что она поступает в сифон, а затем выбрасывается из другого сифона. Приготовить взвесь кармина в разных растворах: в слабом растворе соляной кислоты, в растворах сахара и хлористого калия. Подводя эти взвеси к сифонам разных ракушек, определить и описать характер реакций, сравнивая их с реакцией первого моллюска, которому подавалась взвесь кармина в воде. Выявить предпочитаемые и избегаемые взвеси кармина. Сделать выводы

об избирательной чувствительности моллюсков к химическим веществам.

Контрольные вопросы

1. Классификация рецепторов.
2. Преобразование сигналов в рецепторах.
3. Кодирование информации в рецепторах. Способы кодирования.
4. Механорецепторы беспозвоночных. Кутикулярные рецепторы. Проприорецепторы. Рецепторы растяжения.
5. Механорецепторы позвоночных.
6. Механорецепторы органов чувств.
7. Хеморецепция беспозвоночных животных. Хеморецепция у кишечнополостных, червей, моллюсков.
8. Хеморецепция у насекомых.

Тема «Влияние экологических факторов на поведение гидробионтов»

Лабораторная работа. **Влияние освещенности на двигательную активность дафнии**

Цель работы: определить зависимость частоты движений *Daphnia magna* от уровня освещенности среды обитания.

Оборудование: бинокулярный микроскоп, осветитель с понижающим трансформатором, кювета для дафний, люксметр.

Объект исследования: *Daphnia magna*.

Дафнии, как и другие ветвистоусые ракообразные, распространены в самых различных водоемах – стоячих или с замедленным течением, по преимуществу среди водных растений, являясь всюду составной частью планктона. Движения дафний своеобразны: ударами антенн дафния рывками поднимается вверх, а затем, расставив их в стороны, медленно погружается под тяжестью своего тела, повисая на антеннах, как на парашюте.

Двигательную активность дафний определяет возбуждение нервных ганглиев, которое поддерживается непрерывными потоками импульсов от рецепторов. Воздействуя на рецепторы, мож-

но изменять в широких пределах уровень двигательной активности животного. Так, например, частота плавательных движений дафнии зависит от степени освещенности окружающей среды.

Ход работы

В кювету (можно использовать предметное стекло с лункой) с водой поместить крупную дафнию. Кювету поставить под объектив бинокулярного микроскопа. Включить сетевой шнур осветителя, соединенного с понижающим трансформатором. Ручкой понижающего трансформатора установить максимальную яркость освещения кюветы с дафнией. Переключатель увеличений МБС-9 должен находиться в положении 0,6 или 1,0. После наведения на резкость наблюдать за движениями дафнии и по прошествии 5–7 минут адаптации рачка к условиям освещенности среды, определить двигательную активность дафнии, подсчитывая число «порхающих движений» плавания за одну минуту. Затем ручкой понижающего трансформатора подобрать такой минимальный уровень освещенности кюветы, при котором дафнию достаточно хорошо видно, и через 5–7 минут, необходимых для адаптации рачка к новым условиям освещения, подсчитать число движений дафнии за единицу времени (за минуту). Повторить опыт при разных уровнях освещенности (50, 100, 200, 300, 400, 500 люкс), устанавливая их ручкой понижающего трансформатора под контролем люксметра.

Методика измерения уровня освещенности

Измерение освещенности проводят при помощи люксметра. Объективный люксметр представляет собой малогабаритный прибор, позволяющий определять уровень освещения непосредственно по шкалам измерителя. Люксметр состоит из светоприемника в виде селенового фотоэлемента в оправе, насадки-поглотителя, измерительного электромагнитного прибора и футляра, в который укладываются все перечисленные составные части.

Фотоэлемент люксметра заключен в металлический корпус с ручкой, через которую проходит гибкий провод для соединения с клеммами измерителя. На лицевой панели измерителя расположена ручка переключателя, которая может быть установлена на цифрах 25, 100 и 500 люкс. Соответственно положению переключателя

чателя определение уровня освещенности проводится по одной из трех шкал, также имеющихся на передней панели измерительного блока люксметра. Прибор проградуирован для измерения освещенности, создаваемой лампами накаливания. Поэтому при измерении уровня освещенности в конкретных условиях необходимо вводить поправки. Для ламп дневного света поправочный коэффициент равен 0,9. При измерении естественного освещения поправочный коэффициент равен примерно 0,8 (он изменяется в зависимости от состояния облачности).

Для определения уровня освещенности измерительный блок прибора устанавливают горизонтально и проверяют правильность положения стрелки. В условиях исключения возможности попадания света на фотоэлемент стрелка должна быть на нуле. Далее фотоэлемент устанавливают на поверхности (предметный столик микроскопа), где необходимо измерить уровень освещенности. По шкале прибора определяют ее величину. Если она оказывается не менее 100 люкс, то для более точного измерения ручку переключателя переводят на цифру 500. Если освещенность оказывается выше 500 люкс, то необходимо пользоваться насадкой, а результат измерения умножать на 100. Важно, чтобы при измерении уровня освещенности датчик (селеновый фотоэлемент) всегда находился в одном положении.

Полученные данные оформить в таблицу. Построить график зависимости числа «порхающих» движений от освещенности, нанося по оси абсцисс уровень освещенности (в люксах), а по оси ординат – количество движений дафнии за одну минуту.

Проанализировать, как изменяется двигательная активность дафний при разных уровнях освещенности среды. Сделать выводы.

Лабораторная работа. Поведение гидробионтов в поле электрического тока

Цель работы: провести анализ поведенческих реакций рыбы в поле постоянного электрического тока.

Оборудование: экспериментальная камера, соответствующая размерам рыбы, соединительные провода, комбинированный прибор: источник и измеритель тока, дистиллированная вода, на-

сыщенный раствор поваренной соли, аквариумная биологизированная вода.

Объект исследования: рыба.

Реакции организмов на электрическое поле давно интересовали исследователей и были изучены рядом авторов. Опыты проводились на гидробионтах различных систематических групп, для которых устанавливалась последовательность реакций животных на электрический ток, направление гальванотаксиса, порог, время электронаркоза и другие параметры.

В поведенческих реакциях гидробионтов на электрический ток различают три уровня. Первичная реакция – легкое видимое подрагивание, подергивание тела или его частей. Второй уровень – положительный (к источнику тока) или отрицательный (от источника) гальванотаксис – поворот или плавание животного в зависимости от направления электрического поля. Третий уровень реакции – электронаркоз – иммобилизирующий эффект электрического поля.

Реакция животных на электрический ток зависит от силы тока, длительности его воздействия, уровня организации животного.

Было показано, что среди простейших инфузории обладают катодным гальванотаксисом, а жгутиконосцы – анодным. Для червеобразных личинок жука-плавунца, водолюба, слепня характерны такие реакции, как вздрагивание, резкие броски тела, его скручивание, сворачивание в кольцо, судороги и обездвиживание. Разнообразные реакции на ток наблюдаются у личинок в отряде стрекоз, а именно: вздрагивание лап, хвостовых жабр (р. *Coenagrion*) или придатков анальных пирамид (р. *Aeschna*, р. *Libellula*), «умывание» передними лапками лицевой маски, движение ротового аппарата, изгибание грудных сегментов, изгибание всего туловища, судороги лап, зависание вниз головой (р. *Libellula*), кроме того, может наблюдаться гальванотаксис или реакция избегания – попытки покинуть камеру, подрагивание, потеря равновесия, отрыв задними лапами хвостовых жабр и электронаркоз. У личинок поденки наблюдаются сходные со стрекозами реакции.

У взрослых насекомых – представителей отряда клопов можно выделить первичную реакцию – подрагивание лапок, затем

парение в толще воды, стадию усиления активности – попытки уйти из зоны действия тока, а при дальнейшем увеличении силы тока – резкие беспорядочные движения, судороги конечностей, третий уровень реакции – электронаркоз.

У жука-плавунца отмечается «почесывание лап», парение у поверхности, судороги, выпускание возле рта щупиков. У водяного ослика отмечаются такие реакции: вставание на задние лапы, усиление активности, гальванотаксис, обездвиживание с поджатыми к туловищу лапками. Для моллюсков, имеющих раковину (прудовик, живородка), можно отметить такую однотипную реакцию, как втягивание туловища в раковину.

Ход работы

Для исследования поведенческих реакций гидробионтов в поле постоянного тока используется специальная камера из органического стекла, заполненная водой. Через свинцовые электроды, вмонтированные в боковые стенки камеры, она подсоединяется к комбинированному прибору, который служит одновременно источником тока и измерителем силы тока. Сила тока регулируется специальной ручкой, расположенной на передней панели, и измеряется в миллиамперах (мА) по шкале прибора.

Соединить источник тока и экспериментальную камеру с помощью штекеров соединительных проводов, идущих от комбинированного прибора. Включить шнур сетевого питания и тумблер на передней панели прибора. Загорится сигнальная лампочка. Исследуемого гидробионта поместить в экспериментальную камеру. Дать животному время для адаптации и пронаблюдать за его поведенческими реакциями. Визуально отметить характерные особенности поведения в обычной воде. Затем, медленно и плавно поворачивая ручку, расположенную на передней панели прибора, постепенно увеличивать величину силы тока. Отмечать все последовательно протекающие реакции животного под действием электрического поля, например, конвульсивные движения тела животного (первичная реакция). На измерительном приборе фиксировать величину тока, которая вызывает данную реакцию.

Увеличивая ток, добиться полного обездвиживания животного (порог электронаркоза), отметить показания тока. После пребывания животного в электронаркозе в течение 30 секунд вы-

ключить электрический ток. Определить, через какое время животное восстановит подвижность (время электронаркоза). Опыт провести с аквариумной биологизированной водой, дистиллированной водой и водой, насыщенной NaCl.

Описать поведенческие реакции рыбы и моллюска в поле постоянного электрического тока при разной солености водной среды. Сделать выводы.

Лабораторная работа. Влияние магнитного поля на поведение инфузорий

Цель работы: убедиться в наличии магнитотаксиса у простейших на примере парамеции.

Оборудование: тонкостенные капилляры, предметные стекла, бинокулярный микроскоп, осветитель, постоянный магнит.

Объект исследования: культура инфузорий.

Ход работы

Взять отрезок тонкостенного капилляра с внутренним диаметром 0,2–0,5 мм, длиной – 5–7 см. На предметное стекло нанести каплю культуры парамеций и, прикасаясь к ней концом наклоненного капилляра, наполнить его так, чтобы внутрь попала только одна инфузория. Наличие в капилляре только одной парамеции и ее хорошую подвижность проверить при помощи бинокулярного микроскопа.

Капилляр поместить на предметное стекло с вертикальной меткой так, чтобы середина капиллярной трубочки оказалась на метке. Выдержать 10 минут, а затем следить за движениями парамеции, которая проплывает к одному концу капилляра, поворачивает обратно, достигает другого конца, снова поворачивает, регулярно совершая такие движения с довольно постоянной скоростью. Учитывая по секундомеру момент перехода средней линии, отмеченной на предметном стекле, в течение 10–15 минут измеряют время пребывания инфузории на правой и левой половинах капилляра.

На капиллярную трубочку с парамецией осторожно накладывают постоянный магнит так, чтобы трубочка оказалась на линии, соединяющей его полюса. Продолжают наблюдения и учитывают время пребывания инфузории у южного и северного полюсов маг-

нита. Обычно уже через 1–2 минуты можно заметить замедление поступательного движения парамеции в зоне южного полюса магнита и ускорение движения в зоне северного. После 5–10-минутного пребывания парамеции в магнитном поле магнит убирают. Наблюдение продолжают ещё несколько минут до восстановления исходного характера передвижения инфузории по капилляру.

Результаты опыта представляют графически в виде кривой, где по оси абсцисс откладывают поочередно пребывание на правой и левой половинах капиллярной трубочки, которые на время действия магнита становятся северным и южным полюсами. По оси ординат откладывается продолжительность (в секундах) каждого пребывания. Время пребывания на одной половине откладывают вверх (над осью абсцисс), на другой – вниз (под осью абсцисс), которая играет роль середины межполюсного промежутка. Обратить внимание на постепенное нарастание притягивающего действия южного и отталкивающего действия северного полюса магнита.

Контрольные вопросы

1. Понятие о кинезах и таксисах. Виды кинезов и их характеристика (ортокинез, клинокинез, оптокинез).
2. Таксисы и их характеристика (клинотаксис, фототаксис, гальванотаксис, теплотаксис, менотаксис, мнемотаксис).
3. Понятие об инстинктах.
4. Виды несигнальных и сигнальных форм поведения: привыкание, суммационный рефлекс, импретинг, условный рефлекс.
5. Взаимодействие между животными при помощи химических веществ.
6. Виды телергонов (феромонов) и их биологическое значение.
7. Естественный репеллент рыбы, его значение в организации поведения.
8. Электрогенераторные и электрорецепторные органы рыб. Их строение и функции.
9. Роль электрогенераторных и электрорецепторных органов в поведении.

2. Самостоятельная и индивидуальная работа студентов

2.1. Методики проведения лабораторных работ

Лабораторная работа. Изменение двигательной активности створок моллюсков под влиянием факторов среды

Цель работы: освоить методику регистрации движения створок моллюсков и изучить влияние экзогенных факторов на двигательную активность этих гидробионтов.

Оборудование: электрический фотопреобразователь, рычажок Энгельмана, блок питания, регистрирующий прибор (ленточный самописец), эксикатор с водой, универсальный штатив, герметик, скальпель, жидкое мыло.

Объект исследования: двустворчатый моллюск.

Открывание и захлопывание створок у двустворчатых моллюсков является важным показателем их двигательной активности. Он характеризует взаимодействие моллюска с окружающей водной средой, в том числе и скорость реакции животного на происходящие в ней изменения (изменение температуры воды, появление токсикантов, механические процессы и т. д.).

Двигательную активность створок моллюска можно изучать с помощью установки, разработанной на кафедре физиологии человека и животных ЯрГУ (рис. 1).

Основная часть установки – фотопреобразователь (1, 2) с усилителем (3). Датчик фотопреобразователя представляет собой фотодиод (1), соединенный с подвижным стержнем (2), один конец которого снабжен флажком, а второй – рычажком Энгельмана (5). Когда моллюск (6) открывает створку, флажок стержня, соединенный с помощью рычажка Энгельмана со створкой раковины, открывает лампочку, свет от которой попадает на фотодиод. Под влиянием света фотодиод становится источником электродвижущей силы. Если промодулировать световой поток по интенсивности, то амплитудное значение возникающего в цепи тока также будет изменяться по закону модулирующего сигнала.

В данной работе роль модулирующего фактора светового сигнала выполняет механический рычаг – рычажок Энгельмана на стержне с флажком. Ко второму концу рычажка Энгельмана крепится створка раковины моллюска. При движении створки моллюска флажок осуществляет модуляцию светового сигнала, который после усиления (3) подается на вход самописца (4).

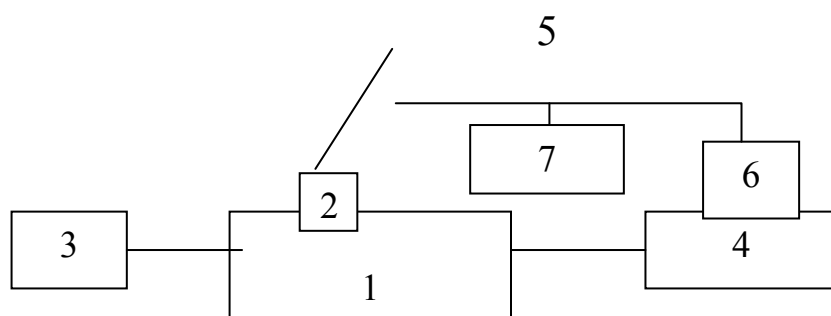


Рис. 1

- 1. Фотопреобразователь (фотодатчик). 2. Стержень датчика.*
- 3. Блок питания фотопреобразователя. 4. Регистрирующий прибор (самописец). 5. Рычажок Энгельмана. 6. Эксикатор с водой и моллюском.*
- 7. Универсальный штатив с держателем для моллюска*

Настройка установки

1. Включить в сеть блок питания фотопреобразователя и тумблер, находящийся на передней панели блока, после чего загорится сигнальная лампочка.

2. Включить вилку шнура питания самописца в розетку и рычажок лентопротяжного механизма на передней панели прибора.

3. Проверить работоспособность установки, нажимая рукой рычажок Энгельмана. При этом перо самописца должно отклоняться в горизонтальном направлении.

Ход работы

Собрать по схеме установку и настроить. Створки крупного моллюска тщательно осушить, зачистить скальпелем среднюю часть нижней створки и часть верхней створки ближе к краю. Укрепить моллюска в подставке, поместив его нижней створкой на герметик. К верхней створке с помощью герметика прикрепить крючок, соединенный с рычажком Энгельмана. Подставку с моллюском закрепить в штативе и опустить в эксикатор с водой. От-

регулировать положение стержня датчика так, чтобы перо самописца заняло самое крайнее правое положение. Включить лентопротяжный механизм и провести запись двигательной активности створок моллюска в течение 3–4 часов в нормальных условиях и под влиянием экзогенных факторов (постукивание по столу, повышение температуры воды, добавление химических веществ и т. д.). Определить скорость движения ленты самописца. Вклеить диаграмму опыта в протокол и рассчитать в норме и под воздействием факторов:

- среднюю частоту движения створок за один час;
- среднее время одного цикла;
- среднюю продолжительность периода с открытыми створками;
- среднюю продолжительность периода с закрытыми створками.

Проанализировать и сравнить полученные данные. Сделать выводы.

Лабораторная работа. Измерение осмотического давления в малых количествах гемолимфы (метод Бардже – Раста)

Цель работы: определить зависимость осмотического давления гемолимфы моллюсков от осмотического давления водной среды.

Оборудование: капилляры диаметром 1 мм длиной 6 см – 10 шт., шприц, предметные стекла – 10 шт., микроскоп с окуляр-микрометром, стандартные растворы поваренной соли от 0,1 % до 0,5 %, часовые стекла – 10 шт.

Объект исследования: перловицы из аквариума и перловицы, выдержанные в 3 %-ном растворе хлористого натрия в течение суток.

Принцип тензометрии основан на способности растворенных веществ понижать упругость паров растворов. Упругостью пара называют то давление, при котором он находится в равновесии с жидкостью. Понижение упругости пара, вызванное растворенным веществом, пропорционально его осмотическому давлению, т. е. молекулярной концентрации.

Один из контрольных растворов NaCl наливают на часовое стекло. Конец капилляра опускают в раствор, который начинает подниматься по капиллярной трубке. Набрав раствор до середины капилляра, переворачивают его. Свободный конец опускают в раствор гемолимфы неизвестной концентрации. Гемолимфа постепенно поднимается по капилляру так, что между менисками контрольного раствора и гемолимфой остается промежуток воздуха в 5 мм, который оказывается приблизительно на середине капилляра. Концы капилляра тщательно протирают ватой и закрывают герметиком. Капилляр помещают на предметном стекле и рассматривают под микроскопом, используя окуляр-микрометр (x7), наводя фокус на один из менисков. На поверхности того раствора, осмотическое давление которого меньше, а упругость пара больше, вода испаряется, одновременно пар конденсируется на поверхности раствора, имеющего более высокое осмотическое давление и более низкую упругость пара. Поэтому объем первой капли уменьшается, а второй увеличивается. В результате мениск смещается в сторону раствора с меньшей концентрацией.

Для наблюдения мениск в капилляре совмещают с одним из делений шкалы окуляр-микрометра и ведут наблюдения в течение 10 минут. Исходя из направления, в котором движется мениск, устанавливают, какой из двух растворов имеет большую концентрацию. Последовательно сравнивают исследуемый раствор с рядом контрольных растворов NaCl в концентрациях 0,1–0,5 %. Находят такой контрольный раствор, при котором объем обеих капель остается без изменений, т. е. мениски не движутся. В этом случае осмотическое давление исследуемого и контрольного растворов равны. Для удобства работы следует во всех пробах наблюдать мениск либо контрольного, либо исследуемого растворов и помещать данный раствор на предметный столик всегда с одной и той же стороны. Результаты оформляют в виде таблицы.

<i>Концентрация контрольного раствора, NaCl (%)</i>	<i>Исследуемый раствор (гемолимфа)</i>	<i>Направление движения мениска</i>
0,4	X	←
0,5	X	←
0,6	X	0
0,7	X	→

Растворы в течение всего опыта следует держать в закрытых сосудах во избежание испарения воды и изменения концентрации растворов.

Установив концентрацию исследуемого раствора, вычисляют его осмотическое давление по формуле:

$$P = \eta CRT, \text{ где}$$

P – осмотическое давление раствора в атм.,

C – концентрация раствора в моль / л,

T – температура в градусах Кельвина,

R – газовая постоянная (0,082 л атм. / град. моль),

η – число ионов.

Например, по данным измерений, биологическая жидкость изотонична 0,6 %-ному раствору NaCl, температура во время измерений 17° С. Молярный раствор NaCl содержит 58,5 г соли в одном литре воды, таким образом, 0,6 %-ный раствор – $6/58,5 = 0,102$ 0,1 молярный раствор.

Каждая молекула поваренной соли диссоциирует на 2 иона. Подставляя данные в формулу, получаем:

$$P = 2 \cdot 0,1 \cdot 0,082 (273 + 17) = 4,756 \approx 4,8 \text{ атм.}$$

Ход работы

Из моллюска, надрезав запираательные мышцы, с помощью шприца получить гемолимфу. Последовательно используя контрольные растворы поваренной соли, определить направление движения мениска в капилляре. Найти контрольные растворы поваренной соли, которые изотоничны гемолимфе перловицы из аквариума, и перловицы, выдержанной сутки в 3 %-ном растворе поваренной соли. Результаты оформить в виде таблицы, вычислить осмотическое давление по формуле. Сравнить полученные результаты и сделать выводы.

Лабораторная работа. Лейкоциты крови рыб и клетки гемолимфы беспозвоночных

Цель работы: провести сравнительный филогенетический анализ клеточных элементов крови разных животных.

Оборудование: ножницы, обезжиренные предметные стекла, покровное стекло со шлифованным краем, покровные стекла, бинокулярный микроскоп (объектив с увеличением 90), осветитель, глазная пипетка, иммерсионное масло, антикоагулянты для крови, смесь Никифорова, краска Романовского – Гимзы.

Объект исследования: кровь рыбы, лягушки, теплокровного животного, гемолимфа моллюска, готовые препараты мазков крови различных животных.

Ход работы

Приготовить и окрасить мазки крови теплокровного животного, лягушки, рыбы и гемолимфы анодонты.

Способы приготовления мазков крови всех животных в принципе не отличаются один от другого. Капельку стабилизированной крови поместить на предметное стекло, тщательно промытое и обезжиренное путем погружения в смесь спирта и эфира (смесь Никифорова). Чтобы сделать мазок, к капельке крови, нанесенной на предметное стекло, прикасаются чистым покровным стеклом со шлифованным краем, наклонив последнее к поверхности предметного стекла на 45°. Кровь в силу капиллярности растекается по краю покровного стекла. После этого проводят покровным стеклом вдоль предметного таким образом, чтобы капля тянулась за покровным стеклом. Мазок, по возможности, не должен иметь просветов, но и не быть слишком густым.

После того как мазок подсохнет, его погружают для фиксации на 3 минуты в метиловый спирт или смесь Никифорова. Дают мазку высохнуть на воздухе и окрашивают краской Романовского – Гимзы. Для окрашивания маточный раствор краски разводят дистиллированной водой, имеющей рН 7,0, из расчета 1–2 капли на 1 мл воды непосредственно перед окраской мазка. Разведенную краску берут пипеткой и наносят достаточно толстым слоем на поверхность фиксированного мазка. Мазок окрашивается в течение 20–40 минут. После этого краску сливают с мазка, остатки смывают слабой струей водопроводной воды и ма-

зок высушивают, осторожно прикладывая к его поверхности фильтровальную бумагу.

Окрашенный мазок рассматривают под микроскопом с иммерсией. У лягушки кровь для приготовления мазка можно взять, отрезав ножницами один из пальцев задней лапки. В мазке крови лягушки видно большое количество эритроцитов, которые представляют собой эллипсовидные тельца, несколько вытянутые и вогнутые в центре. Внутри имеется ядро, соответствующее форме клетки.

Лейкоциты обычно значительно меньше эритроцитов и имеют неправильную форму. Различают несколько видов лейкоцитов. Крупные лимфоциты составляют 5–19 % общего числа лейкоцитов. Лимфоциты мелкие – 19–50 %, многоядерные лейкоциты (полинуклеары) – 8,5–17 %, базофилы 8–37 % и эозинофилы – 6–25 %. Ядра лимфоцитов круглые и заполняют почти всю клетку. В протоплазме больших лимфоцитов обнаруживается зернистость, которая может наблюдаться у малых лимфоцитов. Величина базофильных лейкоцитов сильно колеблется, все они зернистые, имеют ядра средней величины, округлой формы. Эозинофильные лейкоциты имеют хорошо выраженную зернистость и крайне разнообразные по форме ядра.

Кровь рыб для приготовления мазка можно получить из хвостовой артерии. Рыбу фиксируют в специальном станке брюшком кверху. Слизь позади анального плавника вытирают сухой салфеткой. Кожу прокалывают препаровальной иглой. В образовавшееся отверстие вводят конец пастеровской пипетки и вращательными движениями углубляют пипетку в мышцы до тех пор, пока конец ее не упрется в кости позвоночника. При вращательных движениях пипетки хвостовая артерия, лежащая с брюшной стороны позвоночника, прорезается ее краями, и кровь начинает поступать в просвет пипетки. Перед забором крови не забудьте обработать пипетку изнутри раствором антикоагулянта.

Незернистые формы лейкоцитов рыб состоят из лимфоцитов, моноцитов и полиморфноядерных лейкоцитов. Лимфоциты – небольшие по величине клетки, протоплазма которых расположена в виде узкого ободка вокруг круглого ядра круглой формы. Вторым видом незернистых лейкоцитов рыб – моноциты, состоят из

крупных клеток, протоплазма которых занимает большую часть клетки. Ядро моноцитов имеет бобовидную форму, иногда слегка лапчатую, и обычно сдвинуто к краю клетки.

Полиморфноядерные лейкоциты по величине несколько меньше моноцитов. Они имеют дольчатое, иногда сильно сегментированное ядро, и значительное количество протоплазмы.

Ко второй группе – зернистые лейкоциты – принадлежат две формы: нейтрофилы и эозинофилы. По величине нейтрофилы представляют собой клетки среднего размера и имеют ядро овальной формы, расположенное обычно у края клетки. В протоплазме нейтрофилов есть многочисленные мелкие зернышки, которые окрашиваются краской Романовского – Гимзы в темно-фиолетовый цвет. Эозинофилы являются также клетками среднего размера с бобовидным или дольчатым ядром. В их протоплазме расположены в значительном количестве зернышки, окрашивающиеся в розовый цвет.

В гемолимфе виноградной улитки и анодонты отмечается небольшое количество клеток-гемоцитов, имеющих крайне непостоянную форму. Различить какие-либо виды гемоцитов не удастся.

Гемолимфа насекомых при взятии довольно быстро «свертывается» (например, у черного таракана). Свертывание гемолимфы состоит в образовании клеточного «сгустка» из гемоцитов; клетки гемолимфы теряют присущую им дискоидальную или веретенообразную форму, округляются, начинают преломлять свет, затем выпускают тонкие отростки и, наконец, дегенерируют и слипаются вместе. Этот процесс можно полностью или частично затормозить, нагревая насекомое до 60°С в течение 10 минут; гемоциты, взятые у таких «нагретых» насекомых, сохраняют свой нормальный вид (Шовен, 1953).

Предупредить процесс «свертывания» гемолимфы можно также путем умерщвления животного парами уксусной кислоты (Фишер, 1935).

Гемолимфу можно получить, отрывая у животного лапки или надкрылья.

Гемоциты насекомых, осевшие на поверхности органов, приобретают столь разнообразные формы, что невозможно уловить

морфологические закономерности их строения. Среди циркулирующих же в гемолимфе клеток можно различить несколько типов. Пролейкоциты, гемоциты с интенсивно прокрашивающейся протоплазмой и крупным ядром, занимающим почти всю клетку; их часто считают юными формами. Макронуклециты – гемоциты с сильно базофильной цитоплазмой и довольно крупным ядром. Эти клетки являются переходной формой к пролейкоцитам. Пролейкоциты и макронуклециты в гемолимфе часто делятся. Микронуклециты – гемоциты со слабо окрашивающейся цитоплазмой и небольшим ядром. Зернистые лейкоциты – гемоциты, цитоплазма которых содержит различные гранулы, встречаются у жесткокрылых. Клетки со сферическими включениями – клетки с цитоплазмой, заполненной крупными сферической формы включениями, появляются в гемолимфе жесткокрылых в период окукливания, подобные же клетки, но сильно вакуолизированные на стадии куколки наблюдаются и у чешуекрылых. Адиполейкоциты – гемоциты с многочисленными липидными включениями.

Лабораторная работа. Спектральные и оптические свойства гемоглобина разных животных

Цель работы: сравнить спектральные свойства гемоглобина разных животных.

Оборудование: спектроскоп, ножницы, шприц, пробирки, пипетка на 5 мл, пипетки от гемометра Сали, тонкий капилляр, большая инъекционная игла, дистиллированная вода.

Объект исследования: стабилизированная кровь теплокровного животного, лягушки, рыбы, гемолимфа моллюска.

Ход работы

В четыре пробирки с помощью пипетки налить по 5 мл дистиллированной воды. Затем в каждую пробирку отдельными пипетками от гемометра Сали добавить по 0,02 мл крови теплокровного животного, лягушки, рыбы, гемолимфы катушки и сразу же перемешать с водой.

Гемолимфу катушки берут следующим образом. Острой branшей ножниц осторожно просверливают раковину на втором витке справа от входа в раковину. Образовавшееся отверстие

расширяют пинцетом. Обе эти операции следует производить очень осторожно, чтобы не повредить лежащие ниже органы. При нажатии пальцем на улитку, спрятавшуюся в раковину, из отверстия выступает брюшина. Ее прокалывают инъекционной иглой. Из прокола начинает поступать гемолимфа, ее осторожно всасывают в капилляр и затем выливают в пробирку с водой.

Кровь рыбы можно взять из надреза жаберной дуги или хвостовой вены. Кровь лягушки – путем отрезания пальца лапки или при декапитации. **Внимание! Не забудьте использовать стабилизатор крови, предварительно ополоснув им пробирки, в которые будете собирать кровь!**

После взятия крови просмотреть все пробы в спектроскоп прямого зрения, зарисовать спектры поглощения, сделать выводы.

Лабораторная работа. Исследование проницаемости кожи лягушки

Цель работы: освоить метод приготовления «кожного мешочка» как модели биологической мембраны. Убедиться, что проницаемость биологической мембраны неодинакова для различных веществ.

Оборудование: препаровальный набор инструментов, стаканчики, стеклянные цилиндры диаметром 10 мм, резиновая трубка, нитки, термостат с температурой 22°C, ФЭК, кюветы, миллиметровая бумага, спирт 70°, 0,65 %-ный раствор NaCl, 0,05 %-ный раствор красителя метиленового синего, приготовленный на 0,65 %-ном растворе NaCl, 0,125 М раствор KCl.

Объект исследования: кожа лягушки как модель биологической мембраны.

Ход работы

Приготовление «кожного мешка». Для изучения влияния различных химических веществ на проницаемость красителя через биологическую мембрану Вам необходимо приготовить четыре пары «кожных мешочков». Для этого лягушку тщательно отмывают от слизи. Заворачивают в марлевую салфетку и обездвигивают разрушением ЦНС с помощью зонда или декапитацией. В последнем случае после отрезания головы не за-

будьте разрушить спинной мозг зондом. Далее берут лягушку за задние конечности и перерезают позвоночник на 1 см выше сочленения тазовых костей. Отделяют всю свисающую часть туловища и внутренние органы. Взяв остаток позвоночника марлевой салфеткой, захватывают пинцетом кожу и быстро снимают ее с обеих лапок, как «колготки», так, чтобы она вернулась наизнанку. **Внимание! При снятии кожи постарайтесь ее не разорвать!** Разделяют препарат кожи на два «чулка». Каждый из них перевязывают ниткой выше стопы. Образуются «кожные мешки», дном которых служат стопы. Проверяют каждый мешок на герметичность, для чего заполняют их физиологическим раствором и наблюдают, не вытекает ли NaCl. Оставляют один мешок в нормальном положении – эпителием наружу, а другой выворачивают так, что эпителий оказывается внутри. После проверки на герметичность «кожные мешки» натягивают на полые стеклянные цилиндры. Перед натягиванием на цилиндр кожу во избежание разрывов, вызванных подсыханием, смачивают физиологическим раствором NaCl изнутри и водой снаружи. «Кожные мешки» фиксируют на стеклянных цилиндрах с помощью колец, изготовленных из резиновой трубки. В каждый мешок наливают по 1 см³ раствора красителя метиленового синего.

«Кожные мешки» с красителем погружают в бюксы (или стаканчики), в которые предварительно налиты равные объемы физиологического раствора (например, по 30 мл). При погружении следят за тем, чтобы уровень раствора красителя в цилиндрах и физиологического раствора в бюксах совпадали друг с другом. Бюксы с препаратами помещают на 2 часа в термостат с температурой 22°C. По истечении этого времени бюксы вынимают из термостата и колориметрируют окрашенные растворы, находящиеся в них. Определяют величину светопропускания, а затем по калибровочному графику – абсолютное количество красителя (%), прошедшего через «кожный мешочек» в окружающий физиологический раствор, служащий моделью биологической мембраны. Для построения калибровочного графика берут маточный раствор красителя метиленового синего в концентрации 0,05 %, готовят из него рабочие растворы в

концентрациях от 0,005 % до 0,00005 %. Все приготовленные растворы колориметрируют на ФЭКе в кюветах на 10 мм (необходимо подобрать нужный светофильтр). Определяют величину светопропускания (%). Затем строят график зависимости величины светопропускания от концентрации раствора красителя метиленового синего.

Опыты провести с «кожными мешками», предварительно помещенными на 30 минут в: 1) дистиллированную воду; 2) спирт 70°; 3) 0,125 М (0,93 %) раствор KCl; 4) физиологический раствор. Результаты опытов занести в таблицу:

Объект	Количество красителя, прошедшего через мембрану			
	в NaCl	В H ₂ O	В 70° спирте	В KCl
Нормальный мешок				
Вывернутый мешок				

Проанализировать полученные результаты. Сопоставить данные о количестве красителя, прошедшего через мембрану нормального и вывернутого «кожного мешочков». Сравнить проницаемость мешочков, предварительно выдержанных в разных растворах. Сделать выводы.

Лабораторная работа. Влияние вытяжки из задней доли гипофиза на проницаемость биологической мембраны к воде

Цель работы: проследить влияние (питуитрина) на проницаемость стенки мочевого пузыря лягушки к воде.

Оборудование: препаровальный набор, шприц с канюлей, раствор Рингера, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, торзионные весы, химический стаканчик, питуитрин.

Объект исследования: мочевой пузырь лягушки.

Влияние гормонов нейрогипофиза на проницаемость биологической мембраны к воде можно изучать на мочевом пузыре лягушки, учитывая сравнительно простое строение его стенки. Стенка мочевого пузыря лягушки состоит из трех слоев. Снаружи мочевой пузырь покрыт эпителием брюшины, а внутри – пло-

ским эпителием. Между ними находится соединительнотканная прослойка, в которой проходят отдельные мышечные пучки и кровеносные сосуды.

Ход работы

Лягушку обездвигить обычным способом, широко вскрыть брюшную полость. Мочевой пузырь с помощью глазной пипетки через клоаку заполнить раствором Рингера, разведенным водой 1:10. Шейку пузыря перевязать тонкой лигатурой. Пузырь изолировать из организма. Наружную поверхность пузыря обсушить фильтровальной бумагой, определить вес пузыря на торсионных весах, а затем поместить его в стаканчик с обычным раствором Рингера для холоднокровных животных. Далее необходимо каждые 15 минут извлекать пузырь из раствора Рингера, подсушивать фильтровальной бумагой и взвешивать. Через 30–45 минут в раствор Рингера, омывающий наружную поверхность пузыря, добавить питуитрин до конечной концентрации 100–150 миллиединиц в 1 мл раствора. Наблюдения продолжать еще 1,5–2,5 часа. Затем по изменениям веса следует определить количество воды (мг), которое прошло через 1 см² поверхности пузыря за весь период наблюдений и за 1 минуту. Форму пузыря, заполненную жидкостью, можно принять за шар. Вычертить график. Сделать выводы.

2.2. Тематика рефератов

Тема «Дыхание»

1. Органы дыхания беспозвоночных.
2. Наджаберный и лабиринтовый органы, газовая железа и плавательный пузырь как органы дыхания.
3. Дыхательный центр и его функциональная организация.
4. Водное и воздушное дыхание гидробионтов и их сменяемость в онтогенезе.
5. Влияние экологических факторов на дыхание.
6. Дыхание гидробионтов в токсической среде.

Тема «Кровь и сердечно-сосудистая система»

7. Кривые диссоциации гемоглобина и их особенности у разных видов животных.
8. Дыхательные белки беспозвоночных животных.
9. Сердца беспозвоночных и позвоночных животных (особенности строения, физиологические свойства, автоматия).
10. Газотранспортная функция эритроцитов в онтогенезе.
11. Дыхательные пигменты и их распространение у позвоночных животных.
12. Гемостаз у беспозвоночных и позвоночных животных.

Тема «Осморегуляция»

13. Осморегулирующий рефлекс. Центры регуляции водно-солевого обмена.
14. Основные принципы эволюции экскреторных органов у беспозвоночных животных.
15. Осморегуляция у позвоночных животных.
16. Пойкилоосмотические животные.
17. Почки млекопитающих животных.
18. Критическая соленость биологических процессов.

Тема «Питание и пищеварение гидробионтов»

19. Сравнительно-физиологические данные о мембранном пищеварении.
20. Приспособление пищеварительных желез к характеру питания.

21. Происхождение и эволюция кишечной гормональной системы.

22. Влияние внешних факторов на перевариваемость пищи у различных животных.

23. Понятие о пищевых эквивалентах.

24. Сравнительные данные о структуре пищеварительного аппарата у разных животных.

Тема «Электрофизиология»

25. Физиологические свойства электровозбудимых и электроневозбудимых мембран.

26. Электрофизиология одноклеточных животных типа Простейшие.

27. Электрические явления у многоклеточных животных.

28. Потенциал покоя и потенциал действия.

29. Электрофизиология химических синапсов.

30. Электрические синапсы и их распространение.

31. Медиаторы беспозвоночных и позвоночных животных.

Тема «Обмен веществ и энергии»

32. Температура среды и энергообмен у водных животных.

33. Показатели энергообмена у разных животных: дыхательный коэффициент, калорический эквивалент кислорода, основной обмен, поддерживающий обмен, генеративный обмен.

34. Энергообмен и движение животных.

35. Изменения обмена веществ и энергии у животных в особых физиологических состояниях.

36. Метаболизм и размеры животных.

Тема «Сенсорные системы и поведение гидробионтов»

37. Общие принципы деятельности сенсорных систем.

38. Особенности строения и функционирования анализаторов у позвоночных животных.

39. Анализатор боковой линии рыб.

40. Органы чувств беспозвоночных гидробионтов.

41. Магнитная ориентация у рыб и птиц.

42. Эхолокация у животных.

43. Взаимодействие между животными при помощи химических веществ.

44. Эколого-физиологические закономерности стайного поведения рыб.

45. Поведенческие основы адаптаций и гомеостатическое поведение.

2.3. Темы докладов на учебно-исследовательскую конференцию

1. Эволюция системы крови.
2. Эволюция нервной системы и проблемы управления локомотий у беспозвоночных животных.
3. Эволюция интегративной деятельности мозга домлекопитающих животных.
4. Эволюция и физиология электрорецепторов.
5. Вкус и обоняние позвоночных животных.
6. Основные принципы эволюции экскреторных органов у беспозвоночных животных.
7. Врожденные и приобретенные формы поведения животных.
8. Сравнительно-физиологические данные о мембранном пищеварении.
9. Сущность обмена веществ, его значение и роль в обеспечении потребностей организма.
10. Регуляция обмена веществ и энергии. Пойкилотермия и гомойотермия.
11. Системы дыхания в процессе адаптации.
12. Происхождение и эволюция эндокринной системы.
13. Сравнительные данные о ферментных адаптациях в пищеварении.
14. Понятие о кинезах и таксисах. Виды и характеристики кинезов и таксисов.
15. Метаболизм и размеры животных.
16. Ритмы поведения у беспозвоночных и позвоночных животных.

Список литературы

1. Ботязова, О. А. Физиология системы крови (сравнительные, экологические и эволюционные аспекты) / О. А. Ботязова. – Ярославль: ЯрГУ, 2000.
2. Ботязова, О. А. Теплообмен и терморегуляция / О. А. Ботязова. – Ярославль: ЯрГУ, 2007.
3. Волков, В. М. Обмен веществ и энергии (сравнительно-экологические аспекты) / В. М. Волков. – Ярославль: ЯрГУ, 1988.
4. Коштоянц, Х. С. Основы сравнительной физиологии / Х. С. Коштоянц. – М.; Л.: АН СССР, 1950.
5. Проссер, Л. П. Сравнительная физиология животных / Л. П. Проссер. – М.: Мир, 1977.
6. Проссер, Л. П. Сравнительная физиология животных / Л. П. Проссер, Ф. Браун. – М.: Мир, 1967.
7. Сабуров, Г. Е. Механизмы водно-солевого равновесия (вопросы сравнительной и экологической физиологии осмотического баланса) / Г. Е. Сабуров. – Ярославль: ЯрГУ, 1982.
8. Сабуров, Г. Е. Сравнительная физиология органов внешнего газообмена / Г. Е. Сабуров. – Ярославль: ЯрГУ, 1982.
9. Сабуров, Г. Е. Сравнительная физиология пищеварения / Г. Е. Сабуров, О. А. Ботязова. – Ярославль: ЯрГУ, 1984.
10. Сабуров, Г. Е. Сравнительная электрофизиология / Г. Е. Сабуров, О. А. Ботязова. – Ярославль: ЯрГУ, 1986.
11. Строганов, Н. С. Экологическая физиология рыб / Н. С. Строганов. – М.: МГУ, 1962.
12. Физиология человека / под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса. – М.: Мир, 1986.
13. Шмидт-Ниельсен, К. Физиология животных. Приспособление и среда / К. Шмидт-Ниельсен. – М.: Мир, 1982.
14. Эволюционная физиология: в 3 ч. // Руководство по физиологии / отв. ред. В. Н. Черниговский. – Л.: Наука, 1979.
15. Эккерт, Р. Физиология животных. Механизмы и адаптация / Р. Эккерт, Д. Рэнделл, Дж. Огастин. – М.: Мир, 1991.
16. Экологическая физиология животных: в 2 ч. // Руководство по физиологии / отв. ред. В. Н. Черниговский. – Л.: Наука, 1979.

Приложения

Приложение 1

Физиологические растворы для разных животных

<i>Концентрация NaCl (%)</i>	<i>Вид животного, для которого готовится раствор</i>
0,45	дождевой червь
0,75	медицинская пиявка
0,15	анодонта, перловица
0,70	виноградная улитка
1,0	наземные насекомые
1,25	плавунец окаймленный
1,20	речной рак
0,65	лягушка, рыба
0,85	теплокровное животное

Способы обездвиживания разных животных в физиологических экспериментах

Проведение физиологических опытов требует обездвиживания животных и фиксации их на препаровальной доске. Ограничение подвижности достигается разными способами, зависящими как от вида животного, так и от цели эксперимента.

Простейшие. Из простейших, используемых для физиологических опытов, наиболее сложно ограничить подвижность парameций. В зависимости от целей эксперимента обездвиживание их может быть достигнуто несколькими способами. Для прижизненной микроскопии процессов пищеварения, изучения работы пищеварительной вакуоли и т. п. на предметное стекло помещается небольшое количество сильно расщипанной гигроскопической ваты или фильтровальной бумаги. После нанесения капли культуры препарат прикрывается покровным стеклом и под контролем микроскопа слегка придавливается препаровальной иглой.

Существует несколько способов обездвиживания парameций путем увеличения вязкости среды. Для этой цели используют добавление желатина, агара, вишневого клея и т. п. Однако микроскопия в этих средах затруднена тем, что инфузория продолжает штопорообразное движение.

Для исследования мембранных потенциалов парameций используют фиксацию на микроприсосках (Доронин Ю. К., Галкин А. А., 1974).

Гидры. Обездвиживание гидр достигается помещением их в 5–10 %-ный раствор желатина. Пребывание в такой среде безвредно для гидры в течение 1–2 часов.

Черви. Дождевых червей обычно наркотизируют в 10 %-ном растворе спирта или в 3 %-ной эмульсии эфира. Медицинских пиявок можно прикалывать булавками.

Ракообразные. Ветвистоусых ракообразных можно обездвигнуть между волокнами гигроскопической ваты. В этом случае следует брать предметное стекло с лункой. Однако в таких усло-

виях довольно быстро наступает кислородное голодание, что может привести к извращенным реакциям на раздражители. Значительно лучше фиксировать дафний током воды в капилляре.

Высших раков обездвиживают путем бинтования и прикалывания к препаровальной доске.

Насекомые. Ограничение подвижности насекомых достигается прикалыванием энтомологическими булавками или приклеиванием лапок пластилином, скотчем и т. п.

Моллюски. Различных моллюсков обездвиживают обычно вдавливанием раковины в пластилин.

Рыбы. Рыбам можно давать различного вида наркоз, добавляя в воду эфир, уретан и другие наркотические вещества. В зависимости от целей эксперимента можно использовать миорелаксанты, вводя их внутримышечно. При этом необходимо поддержание искусственного дыхания путем пропускания аэрированной воды через трубку, вставленную в ротовую полость. Фиксируют рыб в специальных станках различной конструкции.

Млекопитающие. Мелких животных — мышей, крыс, морских свинок наркотизируют различными нелетучими наркотическими веществами — уретаном, хлоралгидратом и другими. Для измерения температуры, взятия крови и подобных операций мелких животных нередко обездвиживают бинтованием и помещением в специальные клетки, изготовленные по размерам животного. Наркотизированных животных для проведения препаровки фиксируют привязыванием тесемками на препаровальных досках, изготовленных из дерева, оргстекла или пенопласта. Для мелких животных используется также ингаляционный наркоз, для чего животное помещают в герметично закрытую камеру, куда кладут вату, смоченную эфиром или хлороформом.

Оглавление

1. Методики проведения лабораторных работ	4
Тема «Дыхание гидробионтов. Влияние экологических факторов на дыхание»	4
Контрольные вопросы	9
Тема «Пищеварение и обмен веществ»	10
Контрольные вопросы	14
Тема «Свойства крови гидробионтов»	15
Контрольные вопросы	21
Тема «Сравнительная физиология осморегуляции»	22
Контрольные вопросы	23
Тема «Сенсорные системы»	24
Контрольные вопросы	28
Тема «Влияние экологических факторов на поведение гидробионтов»	28
Контрольные вопросы	34
2. Самостоятельная и индивидуальная работа студентов	35
2.1. Методики проведения лабораторных работ	35
2.2. Тематика рефератов	48
2.3. Темы докладов на учебно-исследовательскую конференцию	50
Список литературы	51
Приложения	52
Приложение 1. Физиологические растворы для разных животных	52
Приложение 2. Способы обездвиживания разных животных в физиологических экспериментах	53

Учебное издание

Сравнительная и экологическая физиология животных

Методические указания

Составитель **Ботяжова** Ольга Александровна

Редактор, корректор И. В. Бунакова
Верстка Е. Л. Шелехова

Подписано в печать 30.12.09. Формат 60×84 ¹/₁₆.
Бум. офсетная. Гарнитура "Times New Roman".
Усл. печ. л. 3,25. Уч.-изд. л. 2,2.
Тираж 100 экз. Заказ

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе Ярославского
государственного университета им. П. Г. Демидова.

Отпечатано на ризографе.

Ярославский государственный университет
им. П. Г. Демидова.
150000, Ярославль, ул. Советская, 14.

Сравнительная и экологическая физиология животных

