

УДК 639.3.041.2

**КРИТИКА ОЦЕНКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИНКУБАЦИИ ИКРЫ РЫБ
В ЭКСПЕРИМЕНТАХ**

В. Л. Печкуренок, Э. В. Орлов

Биологические эксперименты, в которых изучается влияние какого-либо мутагена или фактора среды, обычно организуются таким образом, что оценка влияния исследуемого мутагена или фактора среды проводится по доле поврежденных клеток, доле погибших клеток, доле погибших или видоизмененных организмов и т. п. В таком случае сравнение опытных и контрольных вариантов проводится по критерию X^2 или как сравнение выборочных долей (с употреблением в нужных случаях преобразования Фишера) (Урбах, 1964).

Известно, что оценка истинного значения должна быть несмещенной, состоятельной и эффективной (Румшинский, 1971, с. 26). Оценка называется несмещенной, если ее математическое ожидание совпадает с истинным значением величины. Оценка называется состоятельной, если при неограниченном увеличении числа измерений (величины выборки) она стремится по вероятности к истинному значению величины, т. е. при $n \rightarrow \infty$

$$P [(|g - a| < \varepsilon] \xrightarrow{1} 1, \\ \varepsilon > 0$$

где n — объем выборки;
 g — оценка;
 a — истинное значение величины;
 ε — как угодно малая величина;
 P — вероятность.

Несмещенная оценка называется эффективной, если она имеет наименьшее рассеяние среди всех несмещенных оценок значения истинной величины по результатам измерения.

В большинстве биологических экспериментов требования к оценке истинного значения исследуемой величины (средней арифметической) априорно считаются выполняющимися. Невыполнение хотя бы одного требования к оценке может привести к каким угодно выводам и именно этим, по-видимому, объясняется странность данных Темплетона (Templeton, 1966) и наших (Шеханова, Печкуренок, 1968). Мы уже высказывали сомнение в выполняемости требования состоятельности средней арифметической в экспериментах по инкубации икры рыб в растворах радионуклидов (Печкуренок, Шеханова, Телышева, 1972). Предложенный нами коэффициент воспроизводимости результатов эксперимента показывает вероятность получения воспроизводимых в одинаковых условиях данных, и было замечено, что величина этого коэффициента уменьшается при увеличении сравниваемых выборок. Это давало основания сомневаться в выполняемости требования состоятельности сред-

ней арифметической в условиях наших (и многих других) экспериментов. Цель предлагаемой работы — проверить это положение.

Мостеллер, Рурке и Томас (1969) пишут, что более 100 объектов невозможно перемешать достаточно тщательно. В экспериментах с икрой проводятся манипуляции с гораздо большим числом объектов, поэтому мы относили невыполнение требования состоятельности средней арифметической в наших экспериментах к качеству перемешивания икры перед распределением ее по вариантам опыта (Печкуренков, Шеханова, Тельшева, 1972).

Для проверки качества перемешивания был поставлен эксперимент по перемешиванию пшена. 500 зерен пшена из 10000 (5%) окрашивали чернилами, остальные смачивали водой и сушили в одинаковых условиях. После просушки зерна высыпали в миску и перемешивали пересыпанием из одной миски в другую. После определенного количества пересыпаний зерно высыпали в лоток с бортиками и располагали на всей его площади в один слой. Затем лоток накрывали оргстеклом, расчерченным на квадраты. На площади одного квадрата оказывалось 100 зерен пшена. В каждом из 100 квадратов подсчитывали количество окрашенных зерен. Затем данные по квадратам объединяли по таблице случайных чисел и определяли процент окрашенных зерен на 200, 400 и 800 зерен. После этого сравнивали данные двух выборок. Пары для сравнения составляли по таблице случайных чисел. Данные по парам сравнивали как выборочные доли, количество окрашенных зерен (в %) преобразовывали в радианы (используя преобразование Фишера). Уже при 20 пересыпаниях ни в одной из 100 пар выборок (при $n = 100, 200, 400$ и 800) не обнаружилось достоверных отличий, что позволяло считать зерна после 20 пересыпаний хорошо перемешанными.

После этого было проведено восемь серий экспериментов на икре вьюна. Икру от одной самки оплодотворяли спермой одного самца в эмалированной миске. После набухания икру вместе с водой 20 раз переливали из миски в миску, после чего при помощи специальной пипетки с оплавленными краями раскладывали в чашки Петри. В первые пять чашек (N') помещали по 100 икринок, в следующие пять чашек (N'') по 250, в оставшиеся пять чашек (N''') — по 500 икринок. В каждой чашке Петри икру инкубировали в 50 см³ отстоянной водопроводной воды, температура которой колебалась в пределах 16—18°С. Учитывалось количество погибшей икры, личинок с тяжелыми уродствами и с нарушением осевого скелета. Смену воды и отбор мертвой икры проводили 1 раз в сутки.

В каждой серии рассчитывали среднее арифметическое изучаемого показателя для чашки Петри с одинаковым количеством икры и для каждой чашки — отклонение от средней. Отклонения по каждому показателю для каждой выборки осредняли по всем восьми сериям, для среднего отклонения по восьми сериям для выборки данного объема рассчитывали коэффициент вариации. То же самое было сделано ранее для 40 выборок зерен пшена (объемы выборок — 100, 200, 400 и 800 зерен). Кроме того, в экспериментах с икрой вьюна оценивалась вероятность появления достоверных различий между данными по выборкам равного объема. В каждой серии число сравниваемых пар выборок одинакового объема было равно числу размещений из 5 по 2. Различия считались достоверными на уровне 0,05. Вероятность появления различий оценивалась как отношение количества различающихся пар к общему количеству. После этого данные по изучаемому показателю осреднялись для каждой величины выборки по восьми сериям.

Таблица 1

Отклонения от генеральной средней в экспериментах по перемешиванию пшена (20 пересыпаний) по 40 выборкам

Объем выборки, шт.	Средняя арифметическая отклонений, %	Коэффициент вариации, %	Вероятность появления различий
100	1,32	80,0	0
200	1,12	75,5	0
400	0,87	66,0	0
800	0,42	80,0	0

Примечание. Вероятность появления различий оценивалась по ста сравниваемым парам.

Таблица 2

Отклонения от средней арифметической изучаемых показателей в опытах по инкубации икры вьюна в чашках Петри (восемь серий, 40 выборок)

Показатели	Объем выборки, шт.	Средняя арифметическая отклонений, %	Коэффициент вариации	Вероятность появления различий
Гибель икры	100	3,9	94,5	0,10
	250	3,7	92,0	0,25
	500	3,9	84,0	0,34
Тяжелые уроды	100	2,8	109,0	0,10
	240	2,5	105,0	0,20
	500	5,3	128,0	0,45
Нарушения осевого скелета	100	3,4	90,5	0,16
	250	2,2	77,0	0,10
	500	4,3	112,0	0,67

На результаты эксперимента, несомненно, оказывал какое-то влияние и сам способ инкубации икры в чашках Петри. Поэтому было поставлено два эксперимента по инкубации икры вьюна в сосудах из газа, которые плавали в аквариуме емкостью 30 л. В первом опыте в четырех плавающих сосудах инкубировалось по 1400 икринок в каждом (после такого же перемешивания, как и перед распределением икры по чашкам Петри) без аэрации воды. Во втором опыте в девяти сосудах инкубировалось по 350 икринок в каждом и в девяти сосудах по 670 икринок в каждом, в этом опыте проводилась аэрация воды. Сравнение тех же показателей, что и в предыдущих экспериментах, проводилось такими же способами.

Как видно из табл. 1, среднее отклонение от генеральной средней в опытах по перемешиванию пшена уменьшается при увеличении объема выборки, т. е. принцип сходимости по вероятности в данном случае соблюдается и требования состоятельности оценки также выполняются. Из этой же таблицы видно, что оценочная вероятность появления различий между парами выборок при объеме выборки от 100 до 800 равна нулю, т. е. перемешивание путем 20 пересыпаний зерна из миски в миску можно считать достаточно хорошим.

Из табл. 2 видно, что в опытах по инкубации икры вьюна в чашках Петри все это не соблюдается. Среднее отклонение от средней арифметической с увеличением выборки не уменьшается, а в некоторых случаях возрастает, т. е. принцип сходимости по вероятности не соблюдается, что делает оценку несостоятельной. Из данных табл. 2 видно, что по всем изученным показателям вероятность появления различий увеличивается с увеличением объема выборки. Из этого следует, что, несмотря на хорошее качество перемешивания, инкубация икры вьюна в чашках Петри имеет свою специфику. По-видимому, неодинаковый темп гибели икры создает неодинаковые условия в разных чашках Петри, особенно в чашках с большим количеством икры, что приводит к увеличению вероятности появления различий по изучаемым показателям. Особенно это характерно для уродов. В табл. 3 объединены данные двух опытов по инкубации икры вьюна в сосудах, плававших в объеме воды, равном 30 л.

Таблица 3

Отклонения от средней арифметической изучаемых показателей в опытах по инкубации икры вьюна в сосудах, плавающих в объеме воды, равном 30 л

Изучаемый показатель	Объем выборки, шт.	Количество выборок, шт.	Средняя арифметическая отклонений, %	Коэффициент вариации, %	Вероятность появления различий
Гибель икры	350	9	2,3	46,0	0,0
	670	9	0,78	67,3	0,0
Уроды	1400	4	0,22	86,5	0,0
	350	9	0,98	43,5	0,0
	670	9	0,69	65,0	0,0
	1400	4	3,8	72,5	0,5

Как видно из табл. 3, в опыте с аэрацией воды (объемы выборки 350 и 670 шт.) наблюдается тенденция к уменьшению отклонений от средней арифметической при увеличении объема выборки; вероятность появления различий между отдельными выборками равна нулю. При инкубации икры в воде без аэрации (объем выборки 1400 шт.) по гибели икры прослеживается тенденция к уменьшению отклонений от средней арифметической и вероятность появления различий равна нулю, но этого нельзя сказать об уродках.

Возможно, что темп гибели икры в разных сосудах был разным, отбор мертвой икры проводился 1 раз в сутки. В разных сосудах степень разложения мертвой икры и концентрация продуктов разложения была разной и при отсутствии аэрации, которая еще и перемешивает воду, это определило различия в количестве уродов в разных сосудах. Судить об истинной причине трудно, так как количество опытов мало. Во всяком случае проведенные в чашках Петри эксперименты позволяют считать, что средняя арифметическая, полученная в такого рода экспериментах, часто оказывается несостоятельной, и это делает применение параметрических критериев (и χ^2 -критерия, схема 2×2) для сравнения данных опыта и контроля некорректным. По-видимому, в этом случае более надежные выводы можно сделать, применяя такой критерий, как критерий Колмогорова—Смирнова (λ^2 -критерий). Мы использовали этот критерий для сравнения данных по гибели икры и уродствам личи-

нок в опытах по инкубации икры вьюна в чашках Петри. Сравнивали данные по выборкам разного объема, и ни по одному показателю различий обнаружено не было.

Выводы

1. В экспериментах по инкубации икры рыб в чашках Петри трудно настолько хорошо выровнять условия инкубации, чтобы средняя арифметическая величина исследуемого показателя была состоятельной.

2. Несостоятельность средней арифметической не позволяет применять параметрические критерии для сравнения опытных и контрольных вариантов. Мы предлагаем использовать для этой цели критерий Колмогорова—Смирнова.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Мостеллер Ф., Рурке Р., Томас Дж. Вероятность. М., «Мир», 1969, с. 151.
Печкуренков В. Л., Шеханова И. А., Тельшева И. Г. Влияние малых доз хронического облучения на эмбриональное развитие рыб и правомерность различных способов его оценки.—«Вопросы ихтиологии», 1972, т. 12, вып. 1, с. 84.
Румшинский Л. З. Математическая обработка результатов эксперимента. М., «Наука», 1971. 26 с.
Урбах Ю. В. Биометрические методы. М., «Наука», 1964, с. 166—237.
Шеханова И. А., Печкуренков В. Л. Накопление растворенного в воде стронция-90 и иттрия-90 и влияние его на эмбриональное развитие вьюна.—«Вопросы ихтиологии», 1968, т. 8, вып. 4 (51), с. 689—701.
Templeton W. L. Resistance of fish eggs to acute and chronic irradiation. Disposal Radioactive Wastes into Seas, Oceans and Surface Waters», Vienna, 1966, p. 847.

SUMMARY

It is frequently assumed a priori that the requirement to the assessment of the true value of an index, particularly the requirement to justifiability of the assessment in biological experiments is met. However the data obtained in experiments may cause doubts. The experiments with eggs incubated in Petri dishes show that with a certain increase in the volume of samples deviations from the arithmetic mean value do not diminish, that is there is no similarity in respect to probability and thus the arithmetic mean value is not justifiable. So there is no sense to use parametric criteria for the purpose of comparison. The data obtained in experimental and control samples are recommended to compare with the use of Kolmogorov—Smirnov's criterium (λ^2).