

МЕТОДИКА АБСОЛЮТНОГО УЧЕТА ЧИСЛЕННОСТИ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ ПРОСТЕЙШИХ У РЫБ

С. М. Соусь

Биологический институт СО АН СССР, Новосибирск

В статье рассматривается новая методика абсолютного учета численности паразитических простейших у рыб.

В настоящее время существует лишь относительный учет численности паразитических простейших у рыб. Этот количественный метод имеет ряд существенных недостатков. В предварительном сообщении, сделанном о новой методике (Соусь, 1974), изложено математическое обоснование и не дано критической оценки предыдущего метода, нет подробного описания учета простейших в рыбе, не приведены примеры и указания о том, как лучше использовать эту методику для дальнейшего проведения статистической обработки материала.

В предлагаемой статье дано подробное описание методики с изложением затронутых вопросов.

Методика абсолютного учета численности паразитических простейших у рыб выполнена при участии математика Биологического института СО АН СССР Н. Н. Завалишина, за что автор приносит ему искреннюю признательность.

Учет численности паразитических простейших у рыб

Относительная оценка численности паразитических простейших (ресничных и сосущих инфузорий), встречающихся на поверхности тела и жабер рыб, а также в кровеносных сосудах последних (жгутиковые), до сих пор производится путем подсчета их количества в одном мазке или поле зрения микроскопа (Хайбулаев, 1970 и др.). Этот способ имеет следующие недостатки: 1) оценка количества паразитов значительно изменяется в связи с тем, что берется только одна повторность; 2) невозможно найти степень доверия к оценке, т. е. определить ее дисперсию (Плохинский 1970); 3) относительная характеристика заражения не позволяет предсказать абсолютную численность простейших в рыбе.

Абсолютный учет паразитов производили в слизи, взятой с поверхности тела или жабер живых и реже, свежеуснувших рыб. Рыбу помещали на препаровальное стекло и тыльной стороной скальпеля тщательно соскабливали всю слизь, сначала с левой стороны рыбы, затем с правой. Эту слизь помещали в градуированную склянку.

Все жаберные дуги вырезали согласно общепринятой методике (Догель, 1932; Ляйман, 1960 и др.). Каждую дугу помещали на предметное стекло.левой рукой придерживали жаберную дугу препаровальной иглой или пинцетом, а правой тщательно соскабливали слизь с жаберных лепестков всей дуги, не обрезая их, тыльной стороной скальпеля или изогнутых глазных ножниц. Под нажимом инструмента кровеносные сосуды

повреждались и кровь попадала в слизь. Остатки слизи со стекла и инструмента смывали водой из пипетки в ту же склянку. Слизь тщательно взбалтывали с таким количеством воды, чтобы капли смеси хорошо просматривались под микроскопом. Объем воды учитывался. Учет паразитов производили в выборке из этой смеси — трех каплях, последовательно нанесенных пипеткой на предметное стекло. Подбирали такую пипетку, объем капли которой равномерно заполнял пространство под покровным стеклом, не выходя за его пределы и не образуя пузырьков воздуха. Покровные стекла клались так, чтобы их стороны были параллельны сторонам предметного стекла.

Подсчет паразитов производили в 50—100 полях зрения микроскопа. Увеличение микроскопа подбирали по величине паразита.

Учет паразитов проводили в неперекрывающихся полях зрения микроскопа по горизонтальной линии с помощью препаратодителя. В одном поле зрения могли встретиться разные виды паразитов. Количество паразитов каждого вида подсчитывали во всех полях зрения отдельно. Общее количество паразитов в рыбе рассчитывали по формуле. Повторный соскоб слизи с жабер или поверхности тела, сделанный для контроля, содержал не более 5% от общего числа обнаруженных паразитов.

На соскоб слизи с жабер, смыв ее в склянку, приготовление временного препарата, просмотр 60 полей зрения и вычисление численности простейших у одной рыбы затрачивается 3—5 мин.

Приводим пример учета численности паразитических простейших у пяти карасей и оценки их абсолютной и относительной численности (табл. 1). Учет численности у первого карася описываем подробно.

Таблица 1

Оценка абсолютной и относительной численности простейших у карасей

№ исследованной рыбы	Всего просмотрено полей зрения	Всего найдено паразитов (экз.)	Частота встречаемости полей зрения с количеством паразитов				Среднее количество паразитов в одном поле зрения (экз.)	Стандартная ошибка среднего количества паразитов в одном поле зрения (экз.)	Абсолютная численность паразитов в рыбе (тыс. экз.)	Стандартная ошибка оценки абсолютного количества паразитов в рыбе (тыс. экз.)	Относительная численность простейших в рыбе (экз.)		
			0	1	2	3					минимальная	средняя	максимальная
1	60	9	52	7	1	0	0.15	+0.05	15	+5	1	1.1	2
2	60	14	50	6	4	0	0.23	+0.07	23	+7	1	1.4	2
3	60	16	49	7	3	1	0.27	+0.08	28	+8	1	1.2	3
4	60	20	44	13	2	1	0.33	+0.08	34	+8	1	2.0	3
5	60	26	47	4	5	4	0.43	+0.12	44	+12	1	1.5	3
Итого	300	85	242	37	15	6	0.28	+0.04	29	±4	1	1.3	3

Подсчет паразитов одного вида производили в смеси слизи с водой объемом 2 мм. Три капли смеси после взбалтывания брали пипеткой, имеющей объем капли 0.01 мл. Каждую каплю смеси покрывали покровным стеклом, размером 18×18 мм. Учет простейших производили под большим увеличением микроскопа (7×40) в 60 полях зрения под тремя покровными стеклами. В одном покровном стекле по горизонтальной линии длиной 18 мм просматривалось 20 полей зрения (см. рисунок). Площадь поля зрения вычисляли путем обратного расчисления. Диаметр одного поля зрения равен 18 мм : 20 полей зрения. Радиус равен (18 : 20 : 2).

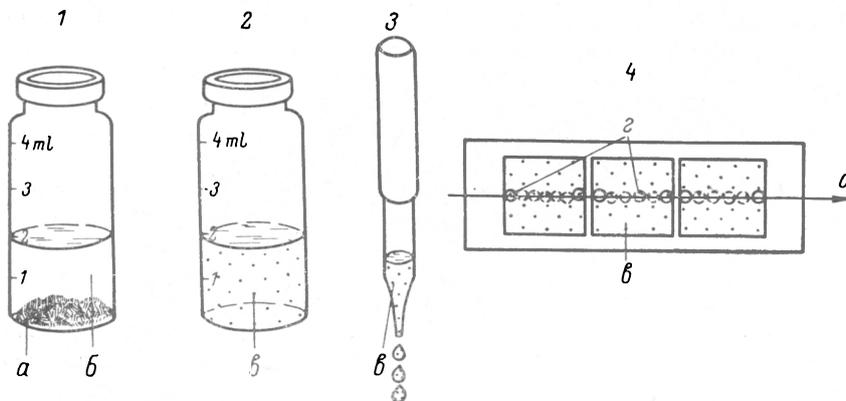
При π равном 3.14 площадь поля зрения равна

$$\pi r^2 = 3.14 \cdot \left(\frac{18 : 20}{2}\right)^2 = 0.636 \text{ мм}^2.$$

В одном покровном стекле размером 18×18 мм укладывалось

$$\frac{18 \times 18}{0.636} = 509 \text{ полей зрения.}$$

Таким образом, чтобы подсчитать паразитов в одной капле смеси, необходимо просмотреть под большим увеличением микроскопа 509 полей зрения. Далее, находили количество капель во всей смеси — объем всей смеси делили на объем капли 2 мл : 0.01 мл и получали, что вся смесь



Лабораторное оборудование, используемое для проведения абсолютного учета численности простейших у рыб.

1 — слизь (а) на дне градуированной склянки с водой (б); 2 — склянка после встряхивания слизи с водой. Паразиты находятся во взвешенном состоянии и обозначены точками (е); 3 — пипетка для взятия капель смеси; 4 — временный препарат, изготовленный из трех капель смеси, с условно изображенными неперекрывающимися полями зрения (z) по горизонтальной линии (с).

состоит из 200 капель. Для учета паразитов во всей смеси необходимо просмотреть $509 \times 200 = 101800$ полей зрения. Это число составляет произведение числа полей зрения в одной капле и капель всей смеси. Таким образом, чтобы определить количество простейших во всей рыбе, необходимо просмотреть ≈ 102 тыс. полей зрения большого увеличения микроскопа.

Среднее количество паразитов в одном поле зрения определяли по выборке из трех капель смеси в 60 полях зрения большого увеличения микроскопа. У карася № 1 при просмотре 60 полей зрения (табл. 2) обнаружено

Таблица 2

Учет численности одного вида простейших у карася № 1 в шестидесяти полях зрения большого увеличения микроскопа

Поле зрения	Число простейших в поле зрения	Поле зрения	Число простейших в поле зрения	Поле зрения	Число простейших в поле зрения	Поле зрения	Число простейших в поле зрения
1	0	16	0	31	0	46	0
2	0	17	1	32	0	47	0
3	0	18	0	33	0	48	0
4	1	19	0	34	0	49	0
5	0	20	0	35	0	50	0
6	0	21	0	36	0	51	1
7	0	22	0	37	0	52	0
8	0	23	1	38	0	53	0
9	0	24	0	39	0	54	0
10	0	25	0	40	1	55	0
11	0	26	0	41	0	56	0
12	1	27	0	42	0	57	0
13	0	28	0	43	0	58	0
14	0	29	2	44	0	59	0
15	0	30	0	45	0	60	1

$1+1+1+1+2+1+1+1=9$ паразитов. В среднем на одно поле приходилось $9 : 60 = 0.15$ экз. паразитов.

Для определения паразитов во всей смеси умножали среднее количество паразитов в одном поле зрения 0.15 на ≈ 102 тыс. полей зрения, которые необходимы для просмотра всей смеси. Полученное произведение ≈ 15 тыс. экз. составило общее количество простейших в рыбе.

Определение ошибки проводилось следующим образом. Из числа обнаруженных паразитов (табл. 2) строили вариационный ряд с классовым промежутком, равным единице, — $0, 1, 2$.

К первому классу с числом паразитов в одном поле зрения, равном нулю, относилось 52 поля зрения; ко второму с числом паразитов, равном единице, — 7 и к третьему с числом паразитов, равном двум, — одно поле зрения. При таком распределении паразитов в классах ошибка в полях зрения будет равна среднеквадратическому отклонению

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{1}{60(60-1)} \cdot [7(1^2 - 2 \cdot 1 \cdot 0.15 + 0.15^2) + 1(2^2 - 2 \cdot 2 \cdot 0.15 + 0.15^2)]} = \\ = \pm 0.05 \text{ экз.}$$

Ошибка среднего количества паразитов во всей смеси увеличивалась согласно количеству полей зрения, необходимого для просмотра всей смеси $\sigma = \pm 0.05 \text{ экз.} \times 102 \text{ тыс. полей зрения} \approx \pm 5 \text{ тыс. экз.}$

Математическое обоснование метода абсолютного учета численности паразитических простейших у рыб

В результате просмотра m полей зрения и учета количества простейших в каждом поле, получаем ряд целых чисел: n_1, n_2, \dots, n_m , где n_m — количество паразитов одного вида, обнаруженных в k -м поле зрения.

Для оценки общего количества простейших в рыбе (N), определим дискретную случайную величину n как количество паразитов, обнаруженных в k -ом поле зрения микроскопа. Предположим, что случайные величины $n_1, n_2, n_3, \dots, n_m$ независимы и одинаково распределены. Для этого необходимо, чтобы смесь была однородной и поля зрения микроскопа не перекрывались. Из центральной предельной теоремы (Гнеденко, 1965)

следует, что величина $n = \frac{1}{m} \sum_{k=1}^m n_k$ распределена по нормальному закону

с математическим ожиданием и среднеквадратическим отклонением σ . Поэтому, с вероятностью $1 - \alpha$ величина n находится в пределах

$$n = \bar{n} \pm t\sigma, \quad (1)$$

где t для обычно принятых в практике уровней значимости и $\alpha = 0.01$ есть $t_{0.05} = 1.96$ и $t_{0.01} = 2.58$ (предполагается, что m достаточно велико). Введем следующие обозначения: s — площадь поля зрения микроскопа, S — площадь покровного стекла, v — объем капли, V — объем смеси. Количество капель во всей смеси равно отношению $V : v$, а количество полей зрения, просматриваемых в одной капле, — $S : s$. Следовательно, количество полей зрения (M) во всех каплях смеси составит

$$M = \frac{VS}{vs}. \quad (2)$$

Из уравнений (1) и (2) получим

$$N = Mn = Mn \pm tM\sigma,$$

или

$$N = \frac{VS}{vs} (\bar{n} \pm t\sigma). \quad (3)$$

Таким образом, с вероятностью $1 - \alpha$ количество паразитов в рыбе будет находиться в интервале, определяемом формулой (3).

Среднее количество паразитов на одну рыбу вычислено по формуле (3). Стандартная ошибка среднего найдена по формуле

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{1}{m(m-1)} \sum_{k=1}^m (n_k - \bar{n})^2}. \quad (4)$$

Результаты абсолютных учетов простейших в пяти карасях можно объединить, ввиду того что среднее количество паразитов в одном поле зрения во всех пяти рыбах не отличается на 5%-м уровне значимости. Оценка абсолютного количества простейших во всех пяти рыбах получена также из формулы (3).

Для получения оценки зараженности с нужной степенью точности необходимо просмотреть определенное количество полей зрения. Здесь можно воспользоваться тем обстоятельством, что точность оценки возрастает как корень квадратный из числа повторностей. Так, например, пятикратное увеличение полей зрения ($60 \times 5 = 300$) при объединении результатов учета простейших у пяти карасей увеличило точность общей оценки (29 ± 4) по сравнению с индивидуальной (например, у карася № 3 — 28 ± 8) в $\sqrt{5} \approx 2$ раза.

Объем воды для разведения слизи, площадь поля зрения микроскопа и объем капли необходимо подбирать так, чтобы на одно поле зрения микроскопа приходилось в среднем от 0.1 до 1.0 паразита. Такой выбор сокращает время работы и очень часто обеспечивает распределение количества паразитов в полях зрения по закону Пуассона. Последнее обстоятельство может быть использовано при последующей статистической обработке материала.

Приводим пример сравнения количества простейших в одной рыбе, полученных разными методами (табл. 1). У карася золотого № 1 абсолютная численность простейших составляла 15 (± 5) тыс. экз., а относительная — 1 — 2, средняя — 1.1 экз. в поле зрения большого увеличения микроскопа.

По данной методике в 1971 и 1972 гг. был проведен учет численности *Trichodina reticulata*, *Tetrachymena pyriformis*, *Apiosoma piscicola*, *Sphaerospora carassii* и других простейших у 304 экз. разных видов рыб (длина тела 65 — 270 мм, вес 4 — 250 г, возраст 2 — 6+ лет) — карася золотого и серебряного, сибирской плотвы, голяка озерного и окуня озер Карасукской системы (Кротовая Ляга, Кусган, Мелкое).

Абсолютная численность *Trichodina reticulata* на жабрах одной рыбы составляла $\approx 1-300$ тыс. экз.; *Tetrachymena pyriformis* $\approx 1-5$, *Apiosoma piscicola* $\approx 1-37$, *Sphaerospora carassii* $\approx 1-30$ тыс. экз.

Определена также численность *Trypanosoma carassii* в крови жабер карася золотого. Она составляла $\approx 5-44$ тыс. экз. Эту численность можно считать абсолютной, так как трипанозомы крови хвостовой артерии, мазках селезенки и почек не встречались, возможно, в результате суточной миграции.

Предлагаемая здесь методика была применена также для учета яиц трематод, обнаруженных в крови жабер. Количество яиц сосальщиков рода *Sanguinicola* в одной рыбе составляло ≈ 1 тыс. экз.

Ошибка абсолютной численности паразитов у рыб не превышала 1/3 от общего количества.

Л и т е р а т у р а

- Гнеденко Б. В. 1965. Курс теории вероятностей. Изд. «Наука», М.: 1—95.
 Догель В. А. 1932. Паразитарные заболевания рыб. КИИЗ, Л.: 1—151.
 Ляйман Э. М. 1966. Курс болезней рыб. М.: 278—284.
 Плехинский Н. А. 1970. Биометрия. М.: 1—338.
 Соусь С. М. 1974. Оценка численности паразитических простейших у рыб. VI Всесоюзное совещание по болезням и паразитам рыб. 3—6 апреля 1974. Тез. докл. М.: 234—237.
 Хайбулаев К. Х. 1970. Кровепаразитические простейшие рыб Каспийского моря. Автореф. канд. биол. наук. Баку: 1—6.

A TECHNIQUE OF ABSOLUTE CALCULATION
OF THE NUMBER OF PARASITIC PROTOZOA IN FISHES

S. M. Sous

S U M M A R Y

A new technique is given of the absolute calculation of parasitic *Protozoa* in fishes. The mucus from the body and gills of fishes was mixed with such volume of water (V) that the drop of mixture (v) was clearly seen under the microscope. The calculation of *Protozoa* was done in a sample from three drops of mixture covered with three slides (S). From 50 to 100 viewing fields were seen the them and an average number of *Protozoa* in one field was calculated. The total number of *Protozoa* in one fish (N) was equal to an average number of parasites in a viewing field (n) multiplied by the total number of viewing fields (m) which could be obtained at the examination of the whole mixture. The latter was calculated conventionally $\left(\frac{V}{v} \cdot \frac{S}{s}\right)$ where s — a square of a viewing field. Plus,

$$N = \frac{V}{v} \cdot \frac{S}{s} (nk \pm \sigma) \text{ where the error } \sigma = \sqrt{\frac{1}{m(m-1)} \sum_{k=1}^m (n_k - n)^2}.$$
