

**Изучение микрофауны
почвы, её растворов и
условий жизни.**

Черчиев Исмаил

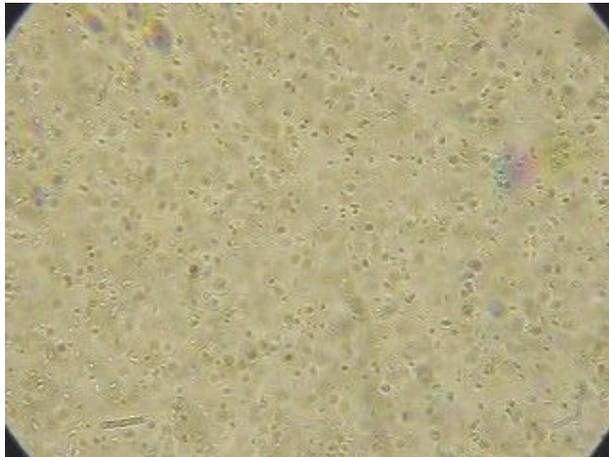
Почва как среда

Почва — удивительный биогенный материал, создаваемый неживой природой и микроорганизмами в союзе на протяжении тысяч лет. Почвенные покровы занимают огромные площади — как минимум, это один из тех факторов, отличающих нашу планету от множества небесных тел (экзопланет). Почва - это дом и среда обитания для самых разнообразных видов насекомых, грибков, простейших, бактерий, микроскопических нематод и др.

В данной работе я поставил цель исследовать гораздо больший спектр микроорганизмов, в том числе и простейших с круглыми червями. Всех их объединяет одно: адаптация к жизни в почвенной среде. На протяжении моего наблюдения я изучал не только случайные растворенные частички почвы с их обитателями, но и законсервированный раствор с определенными поддерживаемыми и стабильными условиями (например, температура 29-35 градусов по Цельсию, концентрация растворённой сахарозы от 0,25% до 10% процентов от объёма раствора, периодический доступ кислорода и т.п.).

Как все начиналось

Свои наблюдения за микроорганизмами я начал ещё в далёком 2014 году, хотя впервые я познакомился с микромиром в 2010-2011 году, т.е. Когда у меня появился мой собственный микроскоп. Таким образом, 5 лет назад мои наблюдения начались с изучения проб воды из стакана с прорастающей луковой головкой, пустившей корни в жидкость. Тогда я наблюдал за потемнением воды и решил проверить её на наличие каких-либо веществ. Когда я не обнаружил никаких подозрительных инородных предметов при увеличении в 80 раз, конечно же, увеличил до 400 раз. И тут обнаружилось движение: то перемещались в жидкости некие маленькие тельца, одинаковые на вид. Сначала я решил, что передо мной броуновское движение, однако затем усомнился в выводах. Вскоре я предположил, что это были бактерии, но спустя 5 лет пришлось убедиться в том, что тельца представляли собой скорее всего простейших. Дальнейшие опыты я провести не смог: соблюдение биологической безопасности. Лишь в этом году я решил возобновить свои исследования микроорганизмов, но теперь на примере почвы и на более качественном уровне.



Подготовка к работе

Как было сказано выше, в феврале 2019 года я решил возобновить наблюдение именно за микроорганизмами. Теперь мне потребовалась качественно новая среда, которая богаче в своём биологическом разнообразии, чем просто питательная жидкость для растений. Мой выбор остановился на почве.

Для исследования мне потребовались: *микроскоп с объективами на 80X, 400X и 900X масштабированием, специальные компьютерные программы для контраста изображений и их обработки, чашка Петри, дозатор (пипетка), ампула для хранения пробы, относительно защищённый ящик для хранения ампулы, мерная ложечка, шприц, растения-доноры почвы, лампа, предметное стекло, средства для дезинфекции (изопропиловый спирт, этанол, кипячение, хоз.мыло), фотокамера, сахароза.*



Встреча с первыми обитателями

В плоскости верхнего слоя не было почти ничего, кроме пузырьков газов и прозрачных телец. На нижнем слое осели чёрные кусочки перегноя, волокна, нити и прочие образования. Самое любопытное стало заметно на среднем слое. Прокручивая горизонтальные и вертикальные регуляторы у предметного столика, я взглядом перемещался по поверхности слоя. Так продолжалось около 4 минут, пока я не заметил нечто извивающееся и тонкое. Я быстро сфокусировал микроскоп на объекте и увидел, что он ещё и полупрозрачный. Мне не потребовалось много времени, чтобы понять, что это нематода. Я наблюдал за червем в течение 10 минут. Всё это время существо извивалось, скручивалось, распрямлялось и вытягивалось. Нематода почти не передвигалась по воде, а лишь «крутилась» на месте. При этом она была довольно сильной, т.к. она расталкивала кусочки материи вокруг себя, причём даже изрядного размера. Я предположил, что нематода извивается от обилия света и тепла, исходящих из моей лампы. Температура пробы достигла 26°C



Результат №1

Я проводил исследование червей с 09.02. по 11.02. **Результат: в воде почвенные нематоды ведут себя очень активно, особенно при повышении степени освещенности и нагревания. Они полупрозрачны, длиной от 20 до 60 мкм, кол-во: 1-2 особи на 1 мл.**



Знакомство с коловраткой

У меня загорелся ещё больший интерес к удивительному миру микроорганизмов. Я решил найти кого-нибудь ещё в толще воды, ведь я был уверен, что нематоды не единственные обитатели почвы. Однако сначала всё было не столь удовлетворительно, пробу я менял каждый вечер, доливал больше воды, ставил большее увеличение, подолгу сидел над микроскопом, всматриваясь в среду. Попытки мои не увенчались успехом, но так было лишь до 11.02., когда я обнаружил некий организм, прятаящийся под кусочком земли. Он вёл себя непохоже на червей: не извивался, а сновал своим концом в разные стороны, при этом не вылезая из-под «убежища». Я настроил освещение и стал наблюдать. Через пару минут организм вылез и быстро стал продвигаться сквозь тернии к противоположной стороне видимого мной изображения.

На фото ниже вы можете видеть большую часть существа, указанного стрелкой. Треугольный хвостик, образования в виде пузырей по бокам — вот характерные черты его. Помимо всего этого, организм мог сильно растягиваться в длину, а затем резко, импульсивно укорачивался и вырывался вперед, передвигая части тела друг за другом. За весь день я видел его всего раз, но этого мне было достаточно, чтобы попытаться идентифицировать его: скорее всего, это была коловратка. Однако подробно изучить таксономию не получилось, слишком мало информации.

Результат №2

Наблюдение проводилось в течение 11.02.-12.02. Более не обнаруживалось. **Результаты:** быстрое, проворное, длиной в 50 мкм, энергичное, перемещается импульсивно, возможно использует коловратновращательный-реснитчатый механизм для перемещения и питания, избегает высокой температуры и освещения, больше всего похоже на представителя коловраток. Численность: менее 1 особи на 1 мл.



Вот и бактерии...

Убедившись в имеющемся биологическом разнообразии раствора почвы, мне захотелось посмотреть на более «каноничных» обитателей: бактерий. Дело в том, что всех предыдущих жителей данной среды мы обнаруживали при увеличении всего в 80 раз, т.е. они достигали размеров в несколько десятков микрометров. Это довольно крупные существа, не считая макро- и мегафауны почв. Для моего микроскопа увеличение в 80 раз не предел, потому я в некотором роде был просто обязан найти кого-то помельче. Однако я каждый раз рассматривал поверхность и при большем масштабе и никого не обнаружил. Следовательно, населенного микромира с такими «пропорциями», возможно, не существовало. Но как получить бактерии? В моём растворе начало увеличиваться кол-во нематод (2 шт. на пробу), появились новые обитатели, не идентифицированные мной (о них, кстати, позже). Если эти животные не требуют какого-то ухода, то колонию бактерий нужно вывести самому, катализировать их размножение. Как? Я вспомнил свой пятилетний опыт по выращиванию бактерий и проектную работу 2016 года (молочнокислые бактерии и т.д.). Для того чтобы вырастить примитивную временную колонию мне потребовалось подкармливать некое первичное кол-во. Поэтому я не имею в виду, что бактерий в первичном растворе не было СОВСЕМ. Если бы их вовсе не было, то вырастить что-то из ничего я бы не смог. Очевидно, что некое очень малое кол-во всё же присутствовало, но по каким-то причинам я не увидел их ни разу.

Так что же? Мне потребовалось органическое вещество, более энергетически выгодное, чем прочие. Я оказался перед выбором меж сахарозой и бета-глюкозой. Почему бета? Просто она выгоднее альфа-глюкозы, вследствие обратного расположения -H и -OH групп на одном из узлов шестиугольной структуры молекулы.

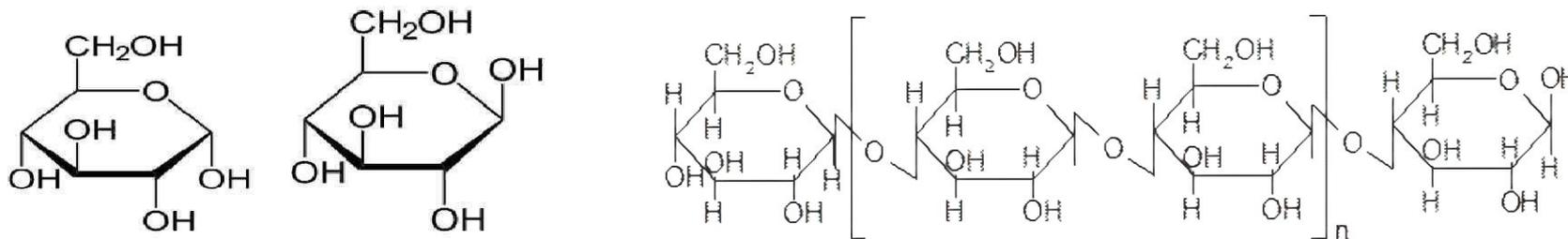
Главные «химические» претенденты

Слева: разница между структурой альфа- и бета-глюкозой.

Как видите, хоть состав одинаковый, но всё же изомерию не отменить, а потому свой-ва немного разные.

Справа: структура целлюлозы, при гидролизе которой получается бета-глюкоза, а промежуточный продукт — целлобиоза, но последнюю использовать я бы не смог.

Альфа-глюкоза и бета-глюкоза



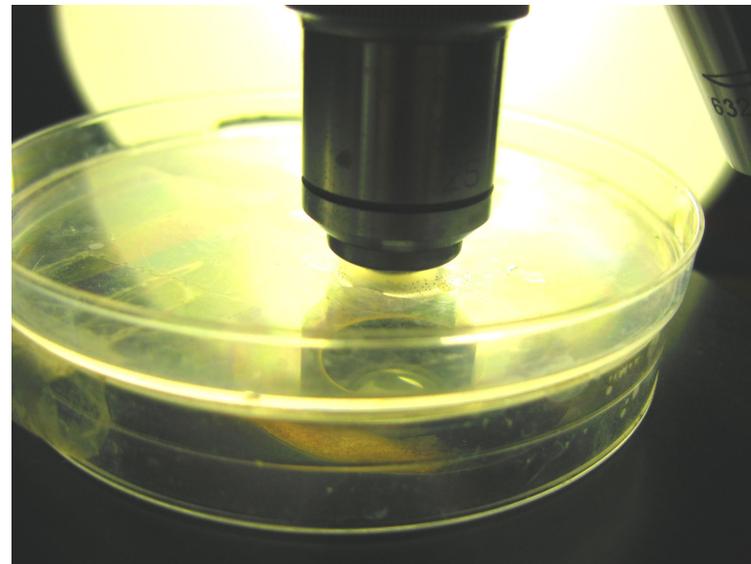
Появление первых бактерий

Вернёмся к бактериям. Взяв свою пробу, я влил туда тёплый 75%-ый раствор сахарозы и оставил на сутки. Заметьте, что раствор почвы уже не был коллоидным, неоднородным, а был в виде осевших нераспавшихся частиц земли и растительных волокон и массы воды. Таким образом, подождав определенное время, я при открывании ампулы с почвой заметил, что кверху всплыл комок земли, весь покрытый пузырьками воздуха. Газ из ниоткуда взяться не мог и в ходе хим. реакций образоваться также не мог без специальных ферментов. Это значит, что газ синтезировал кто-то посторонний — бактерии. Я тут же ринулся проверять раствор. Настроив увеличение в 400 раз, я наконец обнаружил некие черноватые точки, точнее, даже словно по две слипшихся. Объекты были почти неподвижны, но вместо перемещений по слою они слегка колебались на месте. Почему я был убеждён, что это не просто сор, колеблющийся от вибраций? Во-первых, колебания были нерегулярными.



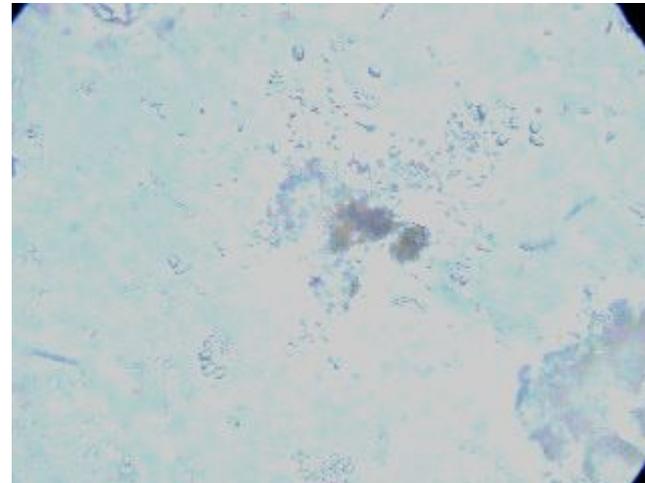
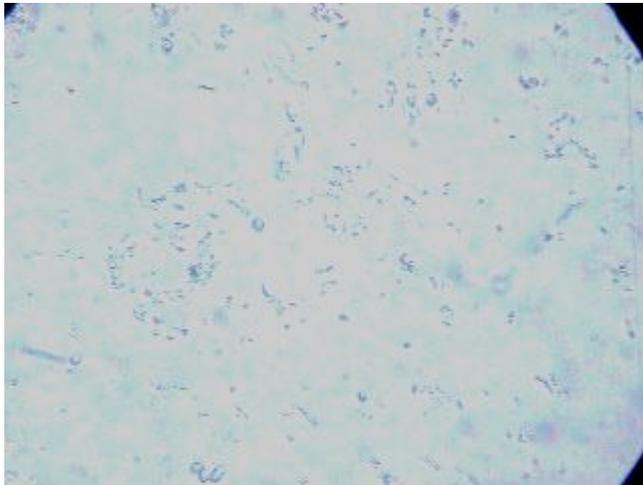
Первые колонии

Бактерии не попадались поодиночке, обычно скоплениями от 3 до 16 особей. Распределение по площади их было неравномерно. Несмотря на то, что я насчитал их чуть более 75 особей на 1 мл, мне было мало. Необходимо было продолжать опыт. Насладившись видом, я внёс в раствор уже крупницы сахарозы массой около 0,8 г. На следующий день обнаружил, что пузырьков у поверхности стало больше и крышка открывалась уже с хлопком. Заглянув в микроскоп, я нашел скопления бактерий уже 40 шт., образовавшие настоящие колонии.



Первые колонии

На фото представлены крупные скопления бактерий (увеличение в 900 раз, 60% контраст). С каждым днём бактерии проявляли всё большую активность, колебаний стали более активными, число особей росло в геометрической прогрессии. Так, с 14.02. по 17.02. их число возросло примерно в 130 раз. Я был готов продолжать дальнейшее подкармливание, но потом решил, что того достаточно. Зато я задумал проверить, выживут ли бактерии без ежедневной кормёжки. Вечером 18.02. я не стал добавлять сахарозу, а лишь прилил воды. Результат на вечер 19.02. оказался интересным: численность сократилась где-то на 5-10%, а сами бактерии перестали скапливаться в группы и «разбрелись». Видимо, в дни подкормки особи спланивались в местах наибольшей концентрации активного вещества и редко кто не присоединялся к ним, довольствуясь меньшей концентрацией.



Результат №3

Результаты: на 4-й день стояния воды я смог вывести бактерий самостоятельно. Они выглядели как овальные тельца, цветом не обладали (на фото они черные из-за фокусировки света), имели малоподвижный характер жизни, объединялись в группы во время кормёжки, могли вращаться на месте, слегка двигаться в пространстве. Выделяли газ (скорее всего CO₂) как побочный продукт переработки сахарозы. Длина — менее 2,5 мкм или 2500 нм.



«Таинственные и неуловимые»

В течение пяти условных глав мы изучили и описали некоторые организмы. Однако те, кого я видел 17.02. не поддаются никакому таксономическому изучению. На данный момент я не знаю принадлежность этих видов. В одной пробе было сразу две особи: побольше и та, что снизу на фото.

Данный организм размером всего в 16-18 мкм, движется быстро, по кривой, случайной траектории без остановки, непрерывно пульсируя и меняя форму своего тела, которая чаще округлая. Скорость движения около 167 мкм/с. Большого о принадлежности неизвестно. Могли быть в надтипе Альвеоляты.



Дополнительно об исследованиях.

- 1) Мой микроскоп был довольно старым по их меркам, поэтому внешние линзы объективов большого увеличения (в 400 и 900 раз) не были зеркально чистыми из-за большого срока работы. Однако во избежание темной и неконтрастной картинки я использовал маленький закреплённый фонарь в качестве доп. освещения, что и придало голубоватый оттенок фотографиям и улучшило качество изображений.
- 2) Каждый раз после погружения моих сильных объективов (уточню, что данные линзы работают только при погружении в среду, как правило жидкую), я обязательно дезинфицировал их спиртом.
- 3) Работал в основном в защитных перчатках (я уверен, что мои бактерии не заразные патогены, но лучше перебдеть).
- 4) Чашку Петри я мыл, затем обрабатывал спиртом. Предметное стекло кипятил. Пипетку-трубку кипятил. Микроскоп протирал. Шприц чистил при помощи втягивания в него сильных щелочей (гидроксиды кальция и натрия).
- 5) После того как появились бактерии, в испытуемом растворе исчезли все нематоды и другие крупные животные. Возможно, они не адаптировались к резко изменившимся условиям и погибли, лишившись пищи.
- 6) Исходя из соображений биоэтики, я не смывал объекты в раковину, а аккуратно возвращал их в ампулу. То есть, никто не пострадал.
- 7) Расчёты длины проводились так: на только что отснятом фото обзор тот же что и реальный в микроскопе (т.к. окуляр последнего равен фотоаппаратному объективу по диаметру). Следовательно, я измерял линейкой длину объекта на фото и делил на общее увеличение и полученную величину переводил в микрометры (например, длина в 4 мм делится на 80X увеличение: $4/80 = 0,05 \text{ мм} = 50 \text{ мкм}$). Если фотография на аппарате была увеличена в n раз относительно реальной, то общее увеличение будет: «увеличение окуляра» \times «увеличение объектива» \times „ n “. *Не судите за дотошность. В этом эксперименте это очень важно!*

Итоги

Мои исследования в рамках создания проекта длились в течение 12 дней (10.02.-21.02.). Но не думайте, что работа закончена, ведь я при возможности собираюсь изучать микрофауну почвы и дальше. К сожалению, в моём наблюдении я не нашёл амёб (раковинных и без неё), тихоходок, более распространённых коловраток. Однако моя работа ещё не завершена, и цель до конца ещё не выполнена. На данный момент можно судить лишь о небольшом разнообразии, но всё дело и различных подходах.

Слева вы видите всех наиболее часто встречающихся организмов в почвах. Я пока видел лишь немногих из них. Я считаю, что первый этап работы выполнен: обнаружены коловратки, нематоды, крупные бактерии. Было также обнаружено, что на протяжении эксперимента выделялся углекислый газ, вода приобрела неприятный резкий запах, цвет её не изменился. Полученные и высчитанные данные совпали с проверенными (о размере, свойствах, поведении). Обнаруж

