

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nataša KRAČUN

**STRUKTURA IN AKTIVNOST MIKROBNE
ZDRUŽBE VZDOLŽ SLANOSTNEGA GRADIENTA
V SEČOVELJSKIH SOLINAH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nataša KRAČUN

**STRUKTURA IN AKTIVNOST MIKROBNE ZDRUŽBE VZDOLŽ
SLANOSTNEGA GRADIENTA V SEČOVELJSKIH SOLINAH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**STRUCTURE AND ACTIVITY OF MICROBIAL COMMUNITY
ALONG SALINITY GRADIENT OF SEČOVLJE SALTERNS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Vzorčenje je bilo opravljeno na solinskih bazenih Sečoveljskih solin. Del raziskovalnega dela je bil opravljen v mikrobiološkem laboratoriju Morske biološke postaje v Piranu (Nacionalni inštitut za biologijo), drugi del pa na Katedri za mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Davida Stoparja, za somentorico doc. dr. Valentino Turk in za recenzentko prof. dr. Nino Gunde - Cimerman.

Mentor: prof. dr. David STOPAR

Somentorica: doc. dr. Valentina TURK

Recenzentka: prof. dr. Nina GUNDE - CIMERMAN

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ines MANDIČ MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Valentina TURK
Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja Piran

Član: prof. dr. Nina GUNDE - CIMERMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nataša Kračun

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 579.26:574.5(043)=863
KG	mikrobne združbe/halofilni mikroorganizmi/ekologija mikroorganizmov/ slanostni gradient/soline/Sečoveljske soline/vrednost pH/klorofil/prokariontska aktivnost/ ³ H-timidin/T-RFLP
AV	KRAČUN, Nataša
SA	STOPAR, David (mentor)/TURK, Valentina (somentor)/GUNDE-CIMERMAN, Nina (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2006
IN	STRUKTURA IN AKTIVNOST MIKROBNE ZDRUŽBE VZDOLŽ SLANOSTNEGA GRADIENTA V SEČOVELJSKIH SOLINAH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 52 str., 3 pregl., 16 sl., 6 pril., 39 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI Iz petih različno slanih solinskih bazenov v Sečoveljskih solinah (trije so bili kristalizacijski) smo poleti leta 2005 štirikrat vzorčili solinsko vodo. Slanostni gradient za vsa vzorčenja skupaj je bil med 85 ‰ in 370 ‰. Ugotavljali smo vpliv slanostnega gradienta na strukturo in aktivnost mikrobne združbe prisotne v slanici. Določali smo osnovne fizikalne lastnosti slanice (temperaturo, pH in slanost) in ugotavljali njihov vpliv na mikrobno združbo. Prisotnost avtotrofne združbe smo določali s pomočjo določanja količine klorofila *a*. Število prokariontskih celic, ki smo ga določali s pomočjo barvila DAPI in epifluorescentnega mikroskopa, je ostajalo enako ali se je celo malo povečevalo vzdolž slanostnega gradienta. Strukturo prokariontske združbe smo določali s pomočjo metode T-RFLP. Aktivnost prokariontske združbe, ki smo jo merili s pomočjo vgradnje ³H-timidina, je z naraščanjem slanosti padala. Število aktivnih celic v primerjavi z vsemi prokariontskimi celicami je bilo v kristalizacijskih bazenih najnižje. Najvišjo skupno korelacijo smo zasledili med številom prokariontskih celic/ml in količino klorofila *a* ($r^2 = 0,86$). Dobra skupna negativna korelacija obstaja tudi med slanostjo in pH ($r^2 = -0,77$). Ostali parametri kažejo nižje skupne korelacije. Pomemben rezultat te naloge je ugotovitev, da obstaja korelacija med spremembo slanosti in spremembo strukture prokariontske združbe. Korelacija med tema dvema parametroma je visoka ($r^2 = 0,80$).

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
DC UDK 579.26:574.5(043)=863
CX microbial communities/halophilic microorganisms/microbial ecology/salinity gradient/salterns/Sečovlje salterns/pH value/chlorophyll/microbial activity/³H-thymidine/T-RFLP
AU KRAČUN, Nataša
AA STOPAR, David (supervisor)/TURK, Valentina (co-advisor)/GUNDE-CIMERMAN, Nina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2006
TI STRUCTURE AND ACTIVITY OF MICROBIAL COMMUNITY ALONG SALINITY GRADIENT OF SEČOVLJE SALTERNS
DT Graduation thesis (university studies)
NO XII, 52 p., 3 tab., 16 fig., 6 ann., 39 ref.
LA sl
AL sl/en

AB The saline water from Sečovlje salterns has been sampled four times during summer 2005. Five saltern ponds, which differed in NaCl concentration, have been analyzed. The salinity gradient for all samplings together was between 85 ‰ and 370 ‰. The aim of the study was to obtain the influence of the salinity gradient on the structure and activity of the microbial community. Basic physical properties of the saline water (temperature, pH and salinity measurements) have been measured. The autotrophic community was quantified by chlorophyll *a*. The number of prokaryotic cells was determined by counting under epifluorescent microscopy and straining by DAPI. The number of prokaryotic cells has either not changed or slightly increased along the salinity gradient. The activity of prokaryotic community was measured by the incorporation of ³H-thymidin and has decreased along the salinity gradient. The number of active cells in comparison with the total prokaryotic cells count was lowest in the crystallizers. The number of prokaryotic cells correlated with chlorophyll *a* concentration ($r^2 = 0,86$). A good negative correlation was observed between salinity and pH ($r^2 = -0,77$). Other parameters had lower correlation coefficients. The structure of the prokaryotic community was determined with T-RFLP method. The important result of this study was the finding, that there exists a well defined correlation between salinity and changes in the structure of the prokaryotic community. The correlation between those two parameters is high ($r^2 = 0,80$).

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
ZAHVALA.....	VII
PRILOGE.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SOLINE.....	3
2.1.1 Spreminjanje fizikalno-kemijskih značilnosti solinske vode	4
2.2 SEČOVELJSKE SOLINE.....	5
2.2.1 Geografski in zgodovinski pregled nastanka Sečoveljskih solin.....	5
2.2.2 Postopek pridobivanja soli v Sečoveljskih solinah	6
2.2.3 Slanica	7
2.2.4 Petola	8
2.3 SOLINSKI ORGANIZMI	9
2.3.1 Zmerno halofilni organizmi	10
2.3.2 Ekstremno halofilni organizmi	11
2.3.3 Raziskave na področju halofilnih mikroorganizmov v Sečoveljskih solinah.....	12
2.4 STRUKTURA IN AKTIVNOST MIKROBNE ZDRUŽBE	13
2.4.1 Molekularni pristop določanja strukture prokariotske združbe	13
2.4.2 Določanje števila prokariotskih celic v vzorcih	15

2.4.3 Določanje biomase avtotrofov	16
2.4.4 Določanje prokariontske produkcije oz. heterotrofne prokariontske aktivnosti.....	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Reagenti	18
3.1.2 Kompleti	19
3.1.3 Encimi.....	19
3.1.4 Pufri in raztopine	19
3.1.5 Začetni oligonukleotidi (sintetizirani v Applied Biosystems, UK)	19
3.2 ODVZEM VZORCEV	20
3.3 DOLOČANJE OSNOVNIH FIZIKALNIH LASTNOSTI SLANICE	21
3.4 DOLOČANJE KOLIČINE KLOOROFILA <i>a</i>	21
3.5 DOLOČANJE PROKARIONTSKE PRODUKCIJE	22
3.6 DOLOČANJE ŠTEVILA PROKARIONTSKIH CELIC Z EPIFLUORESCENTNIM MIKROSKOPOM.....	23
3.7 DOLOČANJE STRUKTURE PROKARIONTSKE ZDRUŽBE	24
3.7.1 Izolacija skupne mikrobne DNA iz solinske vode	24
3.7.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	25
3.7.3 Izvedba agarozne gelske elektroforeze.....	27
3.7.4 Rezanje (restrikcija) DNA	27
3.7.5 Čiščenje DNA po restrikciji - etanolna precipitacija.....	27
3.7.6 Izvedba T-RFLP	28
3.7.6.1 Ločevanje fluorescentno označenih restrikcijskih fragmentov s kapilarno elektroforezo ABI 310.....	28
3.7.6.2 Analiza kromatogramov	28
3.7.6.3 Določitev spremembe v strukturi prokariontskih združb med sosednjima vzorčevalnima bazenoma	29
4 REZULTATI.....	30
4.1 SLANOST VODE V SOLINSKIH BAZENIH	30
4.2 TEMPERATURA SLANICE V SOLINSKIH BAZENIH	31
4.3 VREDNOSTI pH SLANICE V SOLINSKIH BAZENIH	31
4.4 KOLIČINA KLOOROFILA <i>a</i> V SOLINSKIH BAZENIH	32
4.5 ŠTEVILO PROKARIONTSKIH CELIC/ML V SOLINSKIH BAZENIH.....	33
4.6 AKTIVNOST PROKARIONTSKE ZDRUŽBE – PROKARIONTSKA PRODUKCIJA V SOLINSKIH BAZENIH.....	34

4.7 KORELACIJE MED PARAMETRI	36
4.8 STRUKTURA PROKARIONTSKE ZDRUŽBE	38
4.8.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	38
4.8.2 Analiza T-RFLP fragmentov	38
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	42
5.1 RAZPRAVA	42
5.2 SKLEPI	45
6 POVZETEK	46
7 VIRI	48
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Pregl. 1 Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo	26
Pregl. 2 Pogoji verižne reakcije s polimerazo	26
Pregl. 3 Koeficient korelacije med merjenimi parametri glede na posamezno vzorčenje in za vsa vzorčenja skupaj	37

KAZALO SLIK

	Str.
Sl. 1 Lega Sečoveljskih solin. Lera je območje še delujočih solin, Fontanigge je opuščeni del solin (Ogorelec in sod., 1981)	6
Sl. 2 Zemljevid Sečoveljskih solin, območje Lera (Ogorelec in sod., 1981)	7
Sl. 3 Shema potovanja vode med vzorčevalnimi bazeni in mesta vzorčenja slanice	20
Sl. 4 Slanost slanice v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005	30
Sl. 5 Temperatura slanice v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005	31
Sl. 6 Vrednosti pH slanice v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005	32
Sl. 7 Količina klorofila <i>a</i> v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005	33
Sl. 8 Mikroskopska slika vzorca bazena A (08.09.2005; 1 ml, 2000x povečava) obarvanega z barvilom DAPI	34
Sl. 9 Število prokariontskih celic/ml v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005	34
Sl. 10 Vrednosti prokariontske produkcije v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005	35
Sl. 11 Razmerje med številom novo nastalih celic in številom prokariontskih celic v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005	36
Sl. 12 Primer elektroforeznega gela PCR pomnožkov	38

Sl. 13	Elektroferograma vzorcev vzorčenja 08.09.2005	39
Sl. 14	Dendrogram vzorčenja 08.09.2005	40
Sl. 15	Razlike v podobnosti strukture prokariontske združbe med sosednjima bazenoma v odvisnosti od spremembe slanosti	41
Sl. 16	Povprečno število taksonomskih enot v odvisnosti od slanosti	41

KAZALO PRILOG

- Pril. A Vremenske razmere in podatki o dolivanju vode v solinske bazene za obdobje od 01.06.2005 do 08.09.2005
- Pril. B Dendrogrami po posameznih vzorčenjih
- Pril. C Dendrogram vseh vzorčenj skupaj
- Pril. D Zbirka vseh meritev po vzorčenjih in bazenih
- Pril. E Elektroferogrami vseh vzorčenj skupaj
- Pril. F Spremembe slanosti in razlike v strukturi med bazenoma

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DAPI	4'6 diamido-2-fenilindol
dpm	število razpadov na minuto (disintegration per minute)
³H-timidin	radioaktivno označen timidin
PP	prokariontska produkcija
TCA	trikloroacetna kislina
T-RFLP	metoda določanja dolžine označenih fragmentov nastalih po rezanju (terminal restriction fragment length polymorphism)

1 UVOD

Soline spadajo zaradi razmer, ki omogočajo preživetje samo najbolj prilagojenim organizmom, med ekstremna okolja. V solinah je vzpostavljen gradient soli. Voda, ki vstopi v sistem solinskih bazenov, je po slanosti enaka morski vodi, z izparevanjem pa se zgoščuje in pridobiva na deležu soli. V vsakem posameznem solinskem bazenu so razmere večinoma stabilne, zato predstavljajo soline idealen kraj za ugotavljanje vpliva soli na razvite mikrobne populacije (Rodriguez in sod., 1985). V solinah najdemo različne skupine organizmov (arheje, eubakterije, alge, glive in tudi višje evkarionte), ki so različno prilagojene na spremembe slanosti (od halotolerantnih in zmernih halofilov do halofilnih organizmov) (Javor, 1989).

Sečoveljske soline najdemo na izlivu reke Dragonje v Piranski zaliv. Območje, ki se razprostira na osmih kvadratnih kilometrih je razdeljeno na dva dela. Južni del solin, imenovan Fontanigge, je opuščen in predstavlja zgodovinski in etnografski spomenik. Diplomsko nalogo smo opravili na vzorcih iz severnega območja imenovanega Lera, kjer še vedno pridobivajo sol (Ogorelec in sod., 1981).

V Sečoveljskih solinah so že bile narejene in še vedno potekajo raziskave na področju filogenetske analize arhej (Črnigoj, 2003), tudi področje gliv je dobro raziskano (Gunde-Cimerman in sod., 2005). Relativno malo pa je znanega o prokariontski združbi, zato smo jo proučevali v diplomski nalogi.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen dela

O organizmih prisotnih v slanici in njihovih mehanizmih prilagoditve na povišane količine soli je relativno veliko informacij (Ventosa in sod., 1998). Bistveno manj pa je raziskav o strukturi in aktivnosti mikrobne združbe v takšnih okoljih. Zato smo se odločili, da izvedemo ekološko študijo, kjer bi sledili spremembam strukture in aktivnosti prokariontske združbe vzdolž slanostnega gradienta. V vsakem od štirih časov vzorčenja smo sledili toku vode od bazena z najnižjo slanostjo, do kristalizacijskega bazena kjer pridobivajo sol. Iz posameznih bazenov smo izolirali DNA celotne združbe in z metodo T-RFLP dobili profil združbe. Aktivnost prokariontske združbe smo merili z metodo vgradnje ^3H -timidina. Število prokariontskih celic smo določili s pomočjo epifluorescentnega mikroskopa in barvila DAPI. Z merjenjem prisotnosti klorofila *a* smo ocenili biomaso primarnih producentov. Spremljali smo tudi fizikalne parametre solinske vode in ugotavljali njihovo povezanost z ostalimi meritvami. Glavni namen dela je bilo sledenje spremembam v strukturi in aktivnosti prokariontske populacije z naraščajočo slanostjo.

Delovne hipoteze

Postavili smo naslednje delovne hipoteze:

- struktura prokariontske združbe se vzdolž slanostnega gradienta spreminja;
- aktivnost prokariontske združbe se z naraščanjem slanosti zmanjšuje;
- število prokariontskih celic in koncentracija klorofila *a* z naraščanjem slanosti padata;
- sprememba slanosti ima v solinah, izmed vseh fizikalno-kemijskih dejavnikov okolja največji vpliv na število prokariontskih celic, aktivnost in pestrost prokariontske združbe.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SOLINE

Tretjina svetovne letne proizvodnje soli pripada pridelavi soli iz morske vode v solinah, ostalo sol nakopljejo v rudnikih kamene soli (Davis, 2000). Za izparevanje sta pomembna veter in energija sonca. Soline zato najdemo vzdolž morskih obal v toplih in suhih delih sveta. Pridobivanje soli je lahko sezonske narave ali pa poteka skozi celo leto (Gunde-Cimerman, 2005; Davis, 2000).

Večina solin je sestavljena iz umetnih plitvih bazenov z različnimi koncentracijami soli (Javor, 1989). Ko voda izhlapeva in slanost narašča, je prečrpana ali s pomočjo prostega pada prestavljena v naslednji bazen, tako da je slanost v vsakem bazenu konstantna (Pedros-Alio in sod., 2000).

Morska voda vsebuje do 35 gramov soli na liter. Kuhinjska sol (NaCl) predstavlja 78 % vseh soli morske vode. V morski vodi so prisotni še drugi ioni: magnezijevi, kalcijevi, kalijevi, sulfatni, karbonatni, bikarbonatni. Če bi vsa voda naenkrat izparela, bi dobili sol, ki bi bila mešanica vseh teh ionov in bi bila zaradi magnezijevega sulfata grenkega okusa. Soli se razlikujejo po topnosti in se med izparevanjem vode izločajo postopoma in zaradi večjega števila bazenov tudi v različnih bazenih (Gunde-Cimerman in sod., 2005). Najprej pride do precipitacije kalcijevega karbonata (CaCO_3), v obliki aragonita ali kalcita. Morska voda mora biti približno 4-krat koncentrirana, da poteče naravna precipitacija CaCO_3 (Schneider in Herrmann, 1979). Nato pride do izločana kalcijevega sulfata v obliki sadre ($\text{CaSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$). Slanost vode je tu od tri do sedemkrat višja kot v morski vodi (Rodriguez-Valera in sod., 1981). Ko koncentracija soli doseže 300 do 350 gramov na liter, se začne izločati v velikih količinah NaCl. Po obarjanju glavnine natrijevega klorida ostane grenka raztopina, ki vsebuje magnezijev sulfat in magnezijev klorid ter kalcijev klorid (Schneider in Herrmann, 1979). Ta raztopina se imenuje »grenčica« in jo vrnejo nazaj v morje. Pridobivanje soli je postopen proces pri katerem pridobimo čisto sol (NaCl) (Gunde-Cimerman in sod., 2005).

Soline zaradi visoke koncentracije soli uvrščamo med ekstremna okolja. Ekstremna okolja so tista okolja, kjer je vrstna sestava majhna in kjer manjkajo cele taksonomske skupine, ki niso prilagojene na ekstremne razmere (Rodriguez-Valera in sod., 1985).

2.1.1 Spreminjanje fizikalno-kemijskih značilnosti solinske vode

Med zgoščevanjem solinske vode se veliko fizikalno-kemijskih parametrov spremeni. Vodna aktivnost (a_w) se zmanjša (Javor, 1989). Vodna aktivnost je količina vode, ki je na voljo v substratu, npr. v hranilu ali gojišču (Likar, 1987). Vrednosti a_w lahko variirajo med 0 in 1 (Madigan in sod., 2000). Večina bakterij ne raste, če je a_w gojišča pod 0,92 (Likar, 1987). Delež vode, dostopne organizmom v solinah se giblje od 0,98 v morski vodi do 0,75 ob nasičenju vode z NaCl (Madigan in sod., 2000).

Tudi vrednosti pH so odvisne od slanosti in biološke dejavnosti. Vrednosti pH solinske vode se gibljejo med 7,5 in 8,5 (Madigan in sod., 2000) in padajo z naraščajočo slanostjo (Javor, 1989).

Navkljub velikemu razmerju med površino in prostornino, so kristalizacijski bazeni zelo slabo preskrbljeni s kisikom. Raztapljanje plinov se manjša s povečano količino raztopljenih soli v raztopini ali z naraščajočo viskoznostjo raztopine (viskoznost solinske vode narašča vzdolž slanostnega gradienta). Poleg tega se zmanjša tudi kapaciteta zadrževanja raztopljenih plinov. Topnost kisika pri 22 °C se tako zmanjša od 7 mg/kg v morski vodi na 2 mg/kg v solinski vodi ob nasičenju z NaCl. Vira kisika v solinski vodi sta atmosferski kisik in kisik proizveden s strani primarnih producentov in če se poraba kisika poveča lahko pride do nastanka anoksičnega okolja (Javor, 1989).

Redoks potencial (Eh), ki predstavlja razmerje med oksidiranimi in reduciranimi snovmi v okolju, vzdolž slanostnega gradienta pada. Vzporedno s padcem vrednosti Eh se znižuje tudi vsebnost kisika. Zelo pozitivne Eh vrednosti so v močno oksidirajočih okoljih, nizke vrednosti pa najdemo v reducirajočih okoljih. Striktno aerobni mikroorganizmi so metabolno aktivni le pri pozitivnih redoks potencialih, striktno anaerobni organizmi pa le

pri negativnih redoks potencialih. Eh je močno odvisen od prisotnosti molekularnega kisika (Atlas in Bartha, 1997). V solinah se vrednosti Eh gibljejo od +400 mV do -100mV v kristalizacijskih bazenih. To kaže na redukcijsko okolje z anaerobnimi pogoji. (Ogorelec in sod., 1981).

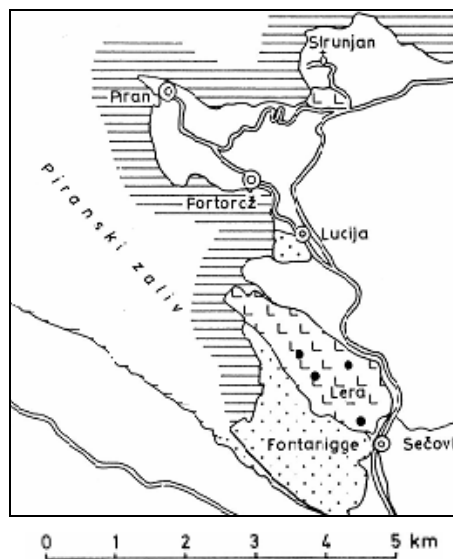
Specifična toplotna kapaciteta solinske vode pada z naraščanjem slanosti. Za določen volumen solinske vode je potrebne manj energije za dvig temperature, kot je to potrebno za enak dvig temperature pri čisti vodi (Javor,1989).

2.2 SEČOVELJSKE SOLINE

2.2.1 Geografski in zgodovinski pregled nastanka Sečoveljskih solin

Sečoveljske soline najdemo ob izlivu reke Dragonje v Piranski zaliv na površini okrog osem kvadratnih kilometrov. Sediment v podlagi solin, ki je ponekod debel tudi do 90 metrov, je večidel naplavila reka Dragonja, ki si je vrezala strugo na meji med flišem in apnencem ter ustvarila manjšo delto.

Že za časa Rimljanov naj bi na območju današnjih solin pridobivali sol. Prvi znani viri o piranskih solinah izvirajo iz druge polovice 13. stoletja, ko je to ozemlje pripadalo Benečanom (Ogorelec in sod., 1981). Dragonja je naplavljal sediment vedno dlje v morje, zato so solinarji opuščali stare soline in urejali nove (Žagar, 1985). Piranska sol do 14. stoletja ni imela prave barve in okusa, ker je kristalizirala na glineni podlagi. V 14. stoletju so začeli pridobivati sol na enak način kot so to počeli na otoku Pag. Na dnu solnih gred so mikroorganizmi skupaj s kalcitom in sadro ustvarili preprogo, imenovano petola. S pomočjo spremenjenega postopka so pridobivali in še pridobivajo sol, ki je bela in dobrega okusa. Največji obseg so imele soline konec 19. stoletja. Kot je razvidno iz slike 1, danes pridobivajo sol le na severnem polju Sečoveljskih solin, imenovanem Lera. Južni del solin, imenovan Fontanigge, je opuščen in predstavlja zgodovinski in etnografski spomenik (Ogorelec in sod., 1981).

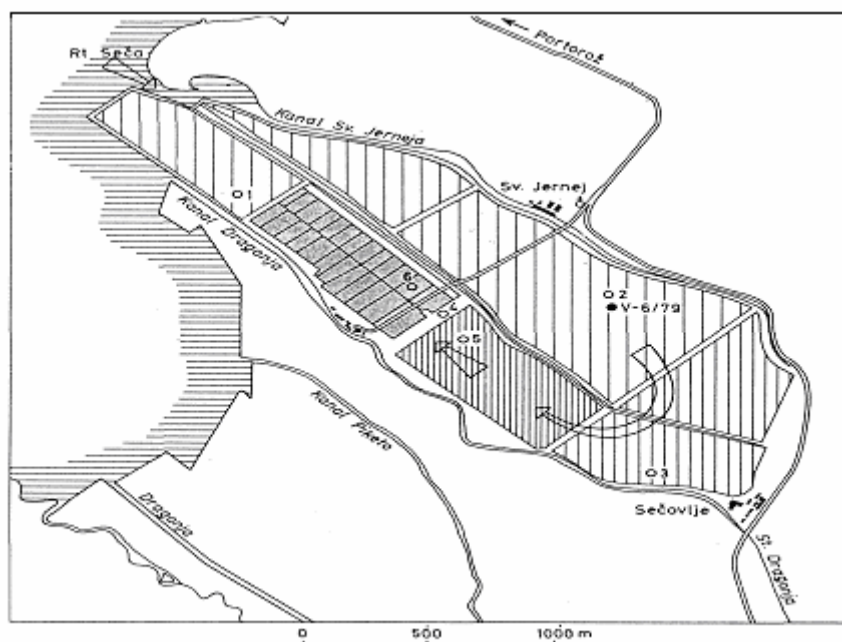


Slika 1: Lega Sečoveljskih solin. Lera je območje še delujočih solin, Fontanigge je opuščeni del solin (Ogorelec in sod., 1981).




2.2.2 Postopek pridobivanja soli v Sečoveljskih solinah

Morsko sol, to je mineral halit (NaCl), pridobivajo v Sečoveljskih solinah po naravnem postopku izhlapevanja in zgoščevanja morske vode v poletnem obdobju. Posamezni solinski bazeni, kjer se z izhlapevanjem zgoščuje slanica, merijo približno 50×100 metrov. Sol pa prične kristalizirati v posebej grajenih, nekaj deset m^2 velikih kristalizacijskih bazenih. Pogostnost pobiranja soli je odvisna predvsem od vremenskih razmer. Višja temperatura in vetrovi pospešujejo izhlapevanje slanice ter kristalizacijo soli. Tako poteka na višku solinarske sezone žetev soli tudi večkrat dnevno (Ogorelec, 1985).

Izhlapevanje poteka postopoma v 16 bazenih in 3 kanalih do prve kristalizacije halita (slika 2). Prvih 10 bazenov je namenjenih izhlapevanju brez zaznavne precipitacije mineralov. V nadaljnjih bazenih pride do precipitacije CaCO_3 . Morska voda mora biti približno 4-krat koncentrirana, da poteče naravna precipitacija CaCO_3 . Nato poteče precipitacija $\text{CaSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in nazadnje kristalizacija NaCl (Schneider in Herrmann, 1979).



Legenda:

-  Solinski bazeni za postopno izhlapevanje morske vode
-  Kristalizacijski bazeni
-  Smer toka morske

Slika 2: Zemljevid Sečoveljskih solin, območje Lera (Ogorelec in sod., 1981).

2.2.3 Slanica

Raziskovalci so z vidika kemije in fizike proučevali slanico Sečoveljskih solin v celotnem procesu njenega zgoščevanja. Določili so koncentracije kationov in anionov v slanici (Na, Cl, Ca, Mg, K, Br, SO₄), specifično težo, temperaturne spremembe, pH in nasičenost s kisikom. Ugotovili so, da se kristalizacija začne zaradi kombiniranega učinka prenasičenosti raztopine s Ca²⁺, znižanja vsebnosti CO₂ in HCO³⁻ ter zaradi delovanja cianobakterij. Za kalcijevim karbonatom se izloča kalcijev sulfat kot sadra. Nato prične kristalizirati halit, ko doseže raztopina približno desetkratno zgostitev (ko se en liter vode zgosti na 95 g). Ob izpadu halita iz slanice se poveča koncentracija Mg od 7,9 do 15,9 krat v primerjavi z navadno morskovo vodo. Vrednost pH se zniža iz 8,32, kolikor je pH morske vode pred pričetkom koncentracije, na 6,65, ko se izloči kalcijev karbonat. Prav tako se

zniža tudi vrednost Eh iz +393mV na okrog -100mV v kristalizacijskih gredah, to kaže na redukcijsko okolje z anaerobnimi pogoji (Ogorelec in sod., 1981).

2.2.4 Petola

Petola je 1 do 2 cm debela, trdno sprijeta želatinasta preproga cianobakterij, ki je črne barve in prepredena s sadro, karbonatnimi minerali ter v manjši meri z glino (Ogorelec in sod., 1981). Alge rastejo na sedimentu in stabilizirajo njegovo površje (Schneider in Herrmann, 1979).

Petola ima dvojno vlogo. Prva je ta, da prepreči mešanje soli s sedimentom v podlagi. Druga naloga pa je delovanje v obliki biološkega filtra, saj zadržuje vgrajevanje posameznih ionov, npr. železovih in manganovih, v halit. Sol je zato izredno čista, kar je še posebej pomembno v prehrabeni industriji. Pred vsako solinarsko sezono izravnavajo vdolbine na bazenskem dnu z morskim blatom. To blato v nekaj tednih kolonizirajo cianobakterije (Ogorelec in sod., 1981).

V sedimentu se tvorijo mikrocone s tipičnim redoks gradientom. Debelina mikrocon se lahko meri v milimetrih. Na površju je okolje primerno za rast fotoavtotrofov (cianofitov, alg – klorofitov in diatomej), ki ustvarjajo sloj bogat s kisikom. Gornji sloj je rjave barve in v njem prevladujejo cianofiti, kot sta *Entophysalis* in *Lyngbya*. V spodnjem sloju pa prevladuje *Microcoleus chthonoplastes*, ena najbolj trdoživih vrst cianobakterij, ki je sposobna prenašati tudi desetkratno koncentracijo morske vode (Schneider in Herrmann, 1979).

2.3 SOLINSKI ORGANIZMI

Soline so izjemno zanimiv ekosistem, saj noben drug sistem nima tako kompleksnega slanostnega gradienta na tako kratki razdalji (Pedros-Alio in sod., 2000).

Obstajajo različne klasifikacijske sheme, ki delijo mikroorganizme glede na sposobnost rasti pri različnih koncentracijah soli. Največkrat uporabljena je Kushnerjeva shema, ki razdeli organizme glede na optimalno koncentracijo soli potrebno za rast na:

- nehalofilne (optimalna rast na gojišču z manj kot 0,2 M NaCl),
- delno halofilne (optimalna rast med 0,2 in 0,5 M NaCl),
- zmerno halofilne (optimalna rast med 0,5 in 2,5 M NaCl),
- ekstremno halofilne organizme (optimalna rast med 2,5 in 5,2 M NaCl).

Poleg teh razredov poznamo še halotolerantne organizme. Ti organizmi lahko preživijo tudi pri povišanju slanosti, vendar bolje uspevajo pri nižjih slanostih (Ventosa in sod., 1998).

Združbe razvite v solinskih bazenih so zaradi konstantnih pogojev v različnih bazenih dobro prilagojene na določene slanostne razmere. Soline so posebej zanimive z vidika mikrobne ekologije, saj se z naraščanjem slanosti zmanjšujeta raznolikost in številčnost evkariontov, delež prokariontov pa se povečuje (Pedros-Alio in sod., 2000). Zaradi pomanjkanja plenilcev in pogosto visoke ravni hranil gostota prokariontskih celic 10^7 - 10^8 /ml ni neobičajna (Oren, 2002).

Ko planktonski organizmi prilagojeni na nižjo stopnjo slanosti dosežejo območje z višjo slanostjo, propadejo, sprostijo se njihove sestavine, ki predstavljajo vir hranil za organizme višjih slanosti (Davis, 2000). Pri višjih slanostih lahko zaradi hranil uspevajo tudi heterotrofni in ne samo avtotrofni organizmi (Rodriguez-Valera in sod., 1981).

Pri nižjih slanostih, najdemo mikroorganizme, ki so raznoliki in v marsičem podobni tistim v morski vodi. Z naraščanjem slanosti pa ti organizmi izginjajo in s tem prepustijo prostor novi, drugačni mikrobni flori (Gunde-Cimerman in sod., 2005).

2.3.1 Zmerno halofilni organizmi

Eubakterije, ki so prisotne v večini v solin, spadajo večinoma v skupino zmerno halofilnih organizmov, ki optimalno rastejo pri koncentraciji NaCl med 0,5 in 2,5 M. Med zmerno halofilne bakterije prištevamo:

- halofilne predstavnike po Gramu negativnih aerobnih ali fakultativno anaerobnih bakterij, ki spadajo v družino *Halomonadaceae* (dva rodova: *Halomonas* in *Chromohalobacter*) in druge rodove: *Pseudomonas*, *Flavobacterium* (*F. halmephilum*), *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Salinivibrio* (*S. costicola*) in *Halomonas* (*H. elongata*);
- halofilne predstavnike po Gramu pozitivnih eubakterij iz rodov: *Halobacillus*, *Bacillus*, *Marinococcus* (*M. halophilus*), *Salinococcus*, *Nesterenkonia*, *Tetragenococcus*, *Micrococcus* (*M. varians*, *M. halobius*), *Paracoccus* (*P. halodenitrificans*);
- halofilne predstavnike fototrofnih bakterij: zelene bakterije (*Chlorobium* sp., *Pelodictyon* sp., *Prosthecochloris* sp.), škrlatne žveplove bakterije (*Ectothiorhodospira mobilis*, *E. shaposhnikovii*, *E. vacuolata*), škrlatne nežveplove bakterije (*Rhodospirillum salexigens*, *R. salinarum*) (Javor, 1989).

Drugi organizmi prisotni pri zmernih slanostih, ki plavajo na površju slanice ali v njej lebdiijo, so še:

- predstavniki kremenastih in enoceličnih zelenih alg (*Dunaliella parva*, *D. viridis*);
- predstavniki enoceličnih cianobakterij (*Aphanothece halophytica*, *Dactylococcopsis salina*);
- nekatere praživali (*Fabrea salina*);
- predstavniki diatomej (*Amphora coffeaeformis*, *Nitzschia* sp., *Navicula* sp.);

- predstavniki gliv (*Alternaria* sp., *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis*, črne kvasovke in njim sorodne vrste iz rodu *Cladosporium*, vrste iz rodov *Wallemia*, *Eurotium*, *Emericella*);
- drobni solinski rakec *Artemia salina* in solinska muha *Ephydra*, kot predstavnika višjih evkariontov (Das Sarma in Arora, 2001; Avčin, 1987; Gunde-Cimerman in sod., 2005; Javor, 1989).

Mikrobno odejo, ki prekriva dno, običajno sestavljajo:

- nitaste cianobakterije (*Microcoleus chthonoplastes*, *Halospirulina* sp., *Phormidium* sp., *Oscillatoria* sp.);
- enocelične cianobakterije (*Halothece* sp.)
- fotosintetske škrlatne žveplove bakterije (*Halochromatium* sp., *Chromatium* sp., *Thiocapsa* sp., *Ectothiorhodospira* sp.);
- nežveplove bakterije (*Rhodospirillum* sp.);
- zelene žveplove bakterije (*Chlorobium* sp.);
- zelene nežveplove bakterije (*Chloroflexus* sp.) (Das Sarma in Arora, 2001; Gunde-Cimerman in sod., 2005).

2.3.2 Ekstremno halofilni organizmi

V okolju, kjer je slanica deset do dvajsetkrat bolj slana kot morska voda, so biološko najbolj zanimivi mikroorganizmi prisotni v slanici (Gunde-Cimerman in sod., 2005).

Najpogostejši predstavniki ekstremno halofilnih mikroorganizmov so:

- zelena alga *Dunaliella salina*;
- halofilne arhebakterije (red *Halobacteriales*);
- eubakterija *Salinibacter ruber*.

Mnogo halofilnih mikroorganizmov ima visoko vsebnost karotenoidnih pigmentov in kot rezultat njihove prisotnosti se voda pogosto obarva svetlo rdeče. Veliko vlogo pri tem ima

enocelična alga *Dunaliella salina*. Kot vse zelene alge je obligatni aerob, fotosintetski, enocelični evkariontski mikroorganizem. Pri visokih slanostih proizvajajo oranžno obarvane pigmente β -karotene (Oren, 2002).

V vodnih okoljih, kjer je slanost blizu nasičenja najdemo še eno vrsto slanoljubnih mikroorganizmov, ki vsebuje rdeče pigmente. To so arheje iz reda *Halobacteriales* in družine *Halobacteriaceae* (Oren, 2002). V redu *Halobacteriales* je opisanih 35 vrst, ki so razdeljene v 14 rodov. Najpogostejši predstavniki so iz rodov: *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halococcus*, *Halorubrum*, *Haloterrigena* (Javor, 1989).

Rdeče pigmente vsebuje tudi halofilna eubakterija *Salinibacter ruber*, ki se prav tako kot arheje pojavlja v okoljih z najvišjimi slanostmi (Oren in Rodriguez-Valera, 2002). Ta organizem iz domene *Bacteria* je gibljiv, paličast, kemoorganotrofen in striktno aeroben. Optimalno raste pri slanosti med 20 in 30 %, pod 15 % slanostjo pa ne raste (Anton in sod., 2002). Največ jih je prisotnih v kristalizacijskih bazenih, kjer predstavlja skoraj celotno bakterijsko populacijo (Anton in sod., 2000) in 5-25 % celotne prokariotske populacije (Anton in sod., 2002). Fiziološko je *Salinibacter ruber* presenetljivo podoben arhejam iz družine *Halobacteriaceae* (Oren in Mana, 2003).

2.3.3 Raziskave na področju halofilnih mikroorganizmov v Sečoveljskih solinah

V dosedanjih raziskavah so iz kristalizacijskih bazenov Sečoveljskih solin izolirali ekstremne halofilne, aerobne arheje. Glede na fenotipske lastnosti so jih razvrstili v štiri skupine. Predstavniki skupin so bili podobni vrstam rodov *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum* in *Haloterrigena*. S pomočjo filogenetske analize delnega zaporedja genov so potrdili, da so bili izolati podobni vrstam iz teh štirih rodov. Ugotovili so, da je raznolikost halofilnih arhej v Sečoveljskih solinah, ki se jih da gojiti, primerljiva z drugimi preučevanimi solarnimi solinami (Črnigoj, 2003).

Kljub podatkom iz literature, da je okolje v Sečoveljskih solinah preveč slano, da bi uspevale glive, jih tam najdemo. Njihovo populacijsko dinamiko glede na fizikalno-

kemijske dejavnike v okolju so spremljali celo leto. Seve, ki so jih izolirali na gojiščih nizke vodne aktivnosti, so taksonomsko določili z uporabo morfoloških, fizioloških in genetskih metod. Ugotovili so, da voda v solinah vsebuje poleg ozmotolerantnih tudi halofilne glive. Večino izoliranih halofilnih gliv predstavljajo vrste črnih kvasovk *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis* ter na novo opisana vrsta *Trimmatostroma salinum*. Poleg teh so halofilno naravo izkazali tudi različni izolati iz rodu *Cladosporium*. Vrsto *Aureobasidium pullulans*, ki je kozmopolitska, prištevamo med halotolerantne glive. Soline so naravna ekološka niša vseh naštetih vrst črnih kvasovk. Vse črne kvasovke iz Sečoveljskih solin spadajo v isti red askomicetnih gliv, *Dothideales*. Njihove skupne značilnosti so debele, melanizirane celične stene, razmnoževanje z endokonidiacijo ter počasna, pogosto meristemska rast (Zalar, 1999).

O halofilnih bakterijah Sečoveljskih solin nismo zasledili nobene objave.

2.4 STRUKTURA IN AKTIVNOST MIKROBNE ZDRUŽBE

2.4.1 Molekularni pristop določanja strukture prokariontske združbe

Uvedba molekularnih metod v namene določanja mikroorganizmov v okoljskih vzorcih je verjetno največji dosežek mikrobne ekologije v zadnjem desetletju. (Atlas in Bartha, 1997). Raziskave strukture mikrobnih združb so povečale potrebo po razvoju in uporabi metod neodvisnih od kultiviranja. Te metode zajemajo verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Ker večina mikroorganizmov prisotnih v okolju ni sposobna rasti pri laboratorijskih pogojih je prednost molekularnih metod pred kultivacijskimi ta, da s pomočjo molekularnih metod lahko dokažemo obstoj tudi tistih vrst, ki ne uspevajo na doslej poznanih mikrobioloških gojiščih. Natančno informacijo o dominantnih predstavnikih v neki združbi lahko dobimo s pomočjo sekveniranja PCR produktov. Poleg tega lahko spremljamo dinamiko mikrobne združbe na podlagi spreminjanja fizikalno-kemičnih in/ali bioloških pogojev skozi čas, kar je ključno za spremljanje delovanja združbe (Osborn in sod., 2000).

Pestrost mikrobne združbe je mogoče analizirati s pomočjo različnih molekularnih metod. Ena izmed bolj uporabnih je metoda določanja dolžine označenih fragmentov nastalih po rezanju (T-RFLP). Tehnika zajema verižno reakcijo s polimerazo (PCR), v kateri je eden od dveh začetnih oligonukleotidov fluorescentno označen. Pomnožuje se regija, ki kodira 16S rRNA in ne celotna DNA (Liu in sod., 1997). Molekula 16S rRNA je zelo primerna za preučevanje, saj je prisotna pri vseh organizmih, pri vseh ima enako vlogo, struktura molekule je zelo ohranjena, v celici je molekula prisotna v več kopijah, poleg tega obstaja danes že zelo velika baza podatkov, ki vsebuje sekvence tega gena pri različnih mikroorganizmih (Amann in sod., 1995).

Nastali PCR produkt je nato razrezan z restrikcijskim encimom - endonukleazo in fluorescentno označeni fragmenti nastali po rezanju so merjeni z avtomatskim DNA sekvenatorjem. Metoda je hitra ter predstavlja dobro orodje za določanje pestrosti kompleksnih prokariotskih združb in za primerjanje strukture in raznolikosti združbe različnih ekosistemov (Liu in sod., 1997). Rezultate analize lahko podamo v obliki elektroferograma, na katerem je prikazan profil združbe ali v numerični obliki (v obliki tabele). Profili variirajo. Različni so po številu in dolžini fragmentov. Razlikujejo pa se tudi po višini posameznih vrhov. Višina vrhov predstavlja relativni delež vsake komponente populacije (Osborn in sod., 2000).

Do napak lahko pride zaradi različne afinitete naleganja začetnih oligonukleotidov na vzorčno DNA, zato je potrebno biti previden pri podajanju absolutnih vrednosti. Zgodi se lahko, da so nekateri označeni fragmenti podobni po velikosti med različnimi organizmi. To lahko pomeni, da so določeni vrhovi bolj visoki in ni nujno, da vsi fragmenti zbrani v enem vrhu pripadajo isti vrsti organizma. To še posebej velja za fragmente označene na 3' koncu 16S rRNA. Boljše ločevanje fragmentov označenih na 5' koncu (večje število različno dolgih označenih fragmentov) je posledica večje heterogenosti v dolžini regije 5' konca. Če so fragmenti označeni na 5' koncu jih je številčno več, intenziteta fluorescence pa je nižja. Pri fragmentih označenih na 3' koncu pa je ravno obratno. Ko analiziramo določen profil je potrebno določiti tudi najnižjo vrednost fluorescence, ki jo bomo upoštevali (Osborn in sod., 2000). Ugotovili so, da so rezultati analize odvisni tudi od

sestavin in pogojev PCR. Ob zmanjšanju koncentracije vzorčne DNA pride do zmanjšanja številčnosti in intenzivnosti prisotnih fragmentov v neki združbi. Tudi zmanjšanje števila ciklov pri podvajanju DNA privede do podobnih rezultatov. Največja razlika med profili enakih vzorcev nastane pri uporabi različne Taq DNA polimeraze. Spremembe v temperaturi pomnoževanja ne privedejo do večjih razlik (Osborn in sod., 2000).

Metodo T-RFLP lahko uporabljamo v različne namene analize mikrobnih združb. Profili označenih fragmentov so lahko uporabljeni za razlikovanje med združbami, za primerjanje relativne pestrosti in strukture določene združbe ter za ugotavljanje specifičnih organizmov v združbi (Dunbar in sod., 2001).

2.4.2 Določanje števila prokariontskih celic v vzorcih

Za štetje prokariontskih celic v vodnih sistemih se največ uporablja epifluorescentna mikroskopija z uporabo dodanih fluorokromov, med katere spada tudi 4'6-diamido-2-fenilindol (DAPI) (Atlas in Bartha, 1997). Barvilo DAPI je visokospecifično in občutljivo barvilo, ki se veže na DNA. Uporaba omogoča boljšo vidljivost in štetje prokariontskih celic manjših od 1 μ m ter omogoča štetje pravilno pripravljenih in shranjenih vzorcev tudi 24 tednov ali več. Direktno štetje prokariontov na membranskem filtru in obarvanih z fluorescentnim barvilom daje višje število celic kot druge tehnike in uvršča to metodo med najbolj zanesljive in uporabne metode. Ko pogledamo vzorec pod UV svetlobo nam je omogočeno opazovanje tudi celic, ki jih z svetlobnim mikroskopom zaradi manjše ločljivosti ne moremo. Preparat osvetlimo s svetlobo valovne dolžine 365 nm, DNA-DAPI kompleks fluorescira svetlo modro. Nevezan DAPI in DAPI vezan na material brez DNA fluorescira svetlo rumeno. Obarvane celice se tako z lahkoto ločijo od drugega materiala v vzorcu (Porter in Feig, 1980).

Poleg barvila DAPI se v epifluorescentni mikroskopiji pogosto uporabljajo še druga barvila, kot je akridin oranž (AO), SyBr Green in fluorescein izotiocianat (FITC) (Atlas in Bartha, 1997). S pomočjo epifluorescentne mikroskopije lahko določimo tudi biomaso

prisotne mikrobne združbe ter določimo stopnjo rasti na podlagi števila delečih in nedelečih se celic (Atlas in Bartha, 1997).

2.4.3 Določanje biomase avtotrofov

Ob odsotnosti rastlin je s pomočjo določanja količine klorofila in drugih pigmentov mogoče določiti biomaso fotosintetskih alg in bakterij. Klorofil *a*, glavni fotosintetski pigment alg in cianobakterij, je uporabna mera za določanje biomase fotosintetskih mikroorganizmov, kljub temu, da ni vedno konstantne povezave med biomaso in vsebnostjo klorofila. Količino klorofila *a* lahko določamo spektrofotometrično z uporabo svetlobe pri valovni dolžini 665nm. Druga možnost kvantificirana klorofila *a* je s pomočjo spektrofluorometra. Klorofil *a* ima ekscitacijsko valovno dolžino približno 430 nm in valovno dolžino maksimalne fluorescence približno pri 685 nm. Spektrofluorometrična določitev je bolj natančna in selektivna kot spektrofotometrična (Atlas in Bartha, 1997).

2.4.4 Določanje prokariontske produkcije oz. heterotrofne prokariontske aktivnosti

Hitrost prokariontske produkcije je pomembna za določanje hitrosti rasti in je pokazatelj mikrobnega odziva na spremembe dejavnikov okolja. Poznanih je več različnih metod merjenja prokariontske produkcije. Najbolj razširjeni sta dve: vgradnja radioaktivno označenega nukleotida ³H-timidin v DNA in vgradnja radioaktivno označene aminokislina ³H-leucin v proteine (Chin-Leo in Kirchman, 1988).

Med različnimi metodami uporabljanimi za določanje prokariontske produkcije, je vgradnja ³H-timidina najbolj razširjena (Chin-Leo in Kirchman, 1988). Merjenje hitrosti rasti na podlagi vgradnje radioaktivno označenega nukleotida temelji na predpostavki, da je sinteza DNA v rastočih celicah sorazmerna naraščanju celične biomase. Hitrost sinteze DNA zato lahko predstavlja hitrost rasti mikroorganizmov (Atlas in Bartha, 1997). Timidin se vgradi v material, ki je netopen v trikloroacetni kislini (TCA), takšen material predstavlja poleg drugih makromolekul tudi DNA (Fuhrman in Azam, 1982).

Nekaj temeljnih predpostavk na katerih temelji metoda:

- bakterije lahko vgrajujejo timidin dodan v nizkih koncentracijah (nmol);
- vse žive bakterije lahko vgrajujejo timidin med rastjo;
- najmanj 80 % vsega timidina se vgradi v DNA.

Pozitivna stran te metode je kratek inkubacijski čas, kljub morebitni počasni rasti celic. To zmanjšuje možnost kontaminacije, ki se s časom povečuje. Druga prednost metode je, da ni potrebna prefiltracija in celice so zato minimalno poškodovane (Fuhrman in Azam, 1980).

Metodo so preizkusili tudi v solinah. Tudi pri visokih slanostih (nasičenje z NaCl) so ugotovili hitro vgrajevanje ^3H -timidina. Za ločevanje aktivnosti med halofilnimi arheobakterijami in halofilnimi eubakterijami so dodajali različne zaviralce rasti. Halofilne arheobakterije ob dodatku žolčnih soli lizirajo. Te soli pa ne vplivajo na druge organizme. Ob dodatku specifičnih antibiotikov pa je inhibirana sinteza halofilnih eubakterij (Oren, 1990).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti

- aceton (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- agaroz (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- bromfenolmodro (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- deionizirani formamid (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- dNTP set (MBI Fermentas, Litva),
- EDTA (Fluka, St. Gallen, Switzerland),
- etanol (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- etidijev bromid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, Litva),
- glicerol (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- glukoza (Kemika, Zagreb, Hrvaška),
- KCl (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- ledocetna kislina (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- Na acetat (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA),
- saharoza (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- Tris Base (Merck KgaA, Darmstadt, Germany),
- Tris HCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- TAMRA (1000 fragment length standard, PE Biosystems, UK),
- trikloroocetna kislina (TCA)
- TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- TTF (2,3,5-triphenyltetrazolium formazan, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

3.1.2 Kompleti

- Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MOBIO, CA, USA)

3.1.3 Encimi

- Taq polimeraza s pripadajočim 10x pufrom (Biotools B&M Labs., S.A. Spain)
- *Hae*III s pripadajočim pufrom (*Bsu*RI, MBI Fermentas, Litva)

3.1.4 Pufri in raztopine

1) TAE pufer 50x (Sambrook in Russel, 2001):

- 242 g Tris Base,
- 37,1 ml ledocetne kisline,
- 100 ml 0,5 M EDTA, pH=8,
- dH₂O do 1000 ml, skupni pH=8,5

2) TAE pufer 1x:

Narejen iz 50x TAE pufra z redčitvijo.

3) Nalagalni pufer za gelsko elektroforezo (5x):

- 50 % (wt/vol) saharoza,
- 0,1 % (wt/vol) bromfenolmodro

4) Etidijev bromid (10x) (Ausubel in sod., 1991):

- 5 mg/l (wt/vol) etidijevega bromida v dH₂O

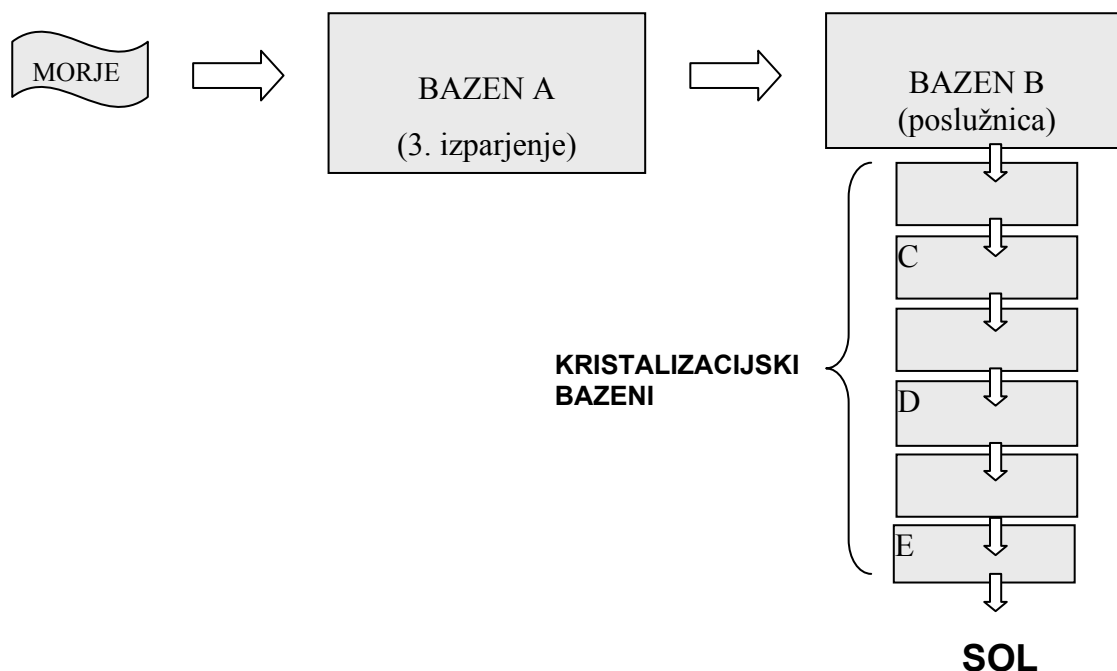
3.1.5 Začetni oligonukleotidi (sintetizirani v Applied Biosystems, UK)

- 27f-FAM: 5'-FAM-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3', $T_m = 51,6$ °C
- Pol 927R: 5' CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT 3', $T_m = 46,5$ °C

3.2 ODVZEM VZORCEV

Vzorčili smo poleti leta 2005 v Sečoveljskih solinah, na območju Lera. Vzorčenja smo opravili: 14.06.2005 (začetek solinarske sezone), 28.06.2005, 07.07.2005 in 08.09.2005 (konec solinarske sezone). Ura odvzema vzorcev je bila vedno okoli 12. ure. Vsak vzorec smo zajeli s siringo pod gladino solinske vode - slanice in nad podlago - petolo. Nekateri vzorci so zaradi mešanja slanice vsebovali večje število delcev iz podlage.

Slanico smo zajeli pri vsakem vzorčenju iz 5 bazenov, ki smo jih označili s črkami od A do E (slika 3). Bazeni A je na območju, kjer poteka začetno zgoščevanje morske vode. Začetno zgoščevanje morske vode poteka v treh delih. Bazeni A, ki vsebuje približno 315 m³ vode, predstavlja zadnjo – 3. stopnjo začetnega zgoščevanja morske vode. V bazenu B se nahaja približno 172 m³ poslužnice. To je voda, ki služi solinarjem kot skladišče zgoščene vode, s katero polnijo kristalizacijske bazene. Bazeni C, D in E so kristalizacijski bazeni in volumen slanice v njih je približno 4,8 m³. V teh bazenih pride do končnega koncentriranja vode in kristalizacije NaCl. V obdobju pobiranja soli solinarji dnevno dolivajo slanico v kristalizacijske bazene.



Slika 3: Shema potovanja vode med vzorčevalnimi bazeni in mesta vzorčenja slanice.

3.3 DOLOČANJE OSNOVNIH FIZIKALNIH LASTNOSTI SLANICE

Temperaturo vode v solinskih bazenih smo izmerili na kraju vzorčenja s termometrom. Meritev smo opravili približno 5 cm pod gladino slanice. pH vrednost vzorcev smo določili s pH metrom (744 pH Meter, Metrohm) po vrnitvi v laboratorij. Slanost smo izmerili z refraktometrom (ATAGO/KUEBLER), ki deluje na podlagi lomnega količnika vzorca. Ker ima skalo od 0 do 100 ‰, smo vzorce z višjo slanostjo redčili z destilirano vodo (1:10).

3.4 DOLOČANJE KOLIČINE Klorofila *a*

Količino klorofila *a* (Chl*a*) smo določali po metodi Holm-Hansen in sod. (1965). Vzorce slane vode (2ml) smo koncentrirali s filtracijo na celulozne filtre, s porami velikosti 0,22 µm (Millipore). Izjema je bil D bazen, vzorčen 07.07.2005, kjer smo koncentrirali samo 0.5ml vzorca. Filtre smo do obdelave shranili na -20 °C v temi. Ob nadaljnji obdelavi smo filtre homogenizirali s homogenizerjem, dodali 90 % aceton in centrifugirali. V supernatantu smo merili količino prisotnih fotosintetskih barvil s spektrofleurometrom (Turner fluorometer, Model 112). Po spodaj navedeni formuli (1) smo izračunali količino klorofila *a* v µg Chl*a*/l.

$$\textit{klorofil } a = Rb * Fd * Fr \quad \dots (1)$$

Rb – količina svetlobe, ki jo zazna spektrofleurometer

Fd – pretvorni faktor spektrofleurometra

Fr – redčitveni faktor

3.5 DOLOČANJE PROKARIONTSKE PRODUKCIJE

Prokariontsko produkcijo smo merili z metodo vgrajevanja radioaktivno označenega ^3H -timidina (Furman in Azam, 1982). Meritve smo opravili v sodelovanju s sodelavci usposobljenimi za delo z radioaktivnimi snovmi.

Vsakemu podvzorcju (1,7 mL) smo dodali ustrezen volumen ^3H -timidina (20 μM koncentracija, sp. aktivnost 79 Ci/mmol) in jih inkubirali 60 min v temi pri sobni temperaturi. Za vsak vzorec smo naredili tri ponovitve. Ena ponovitev je služila za kontrolo (5ml) in tej smo dodali 100 % TCA pred inkubacijo in dodatkom ^3H -timidina ter pustili stati 10min. Po inkubaciji smo reakcijo v vzorcu prekinili z dodatkom 0,89 μL 100 % TCA in vzorce centrifugirali 10 min pri 16000g. Supernatant smo odstranili in oborino sprali z ledeno hladno 100 % in 5 % TCA ter 80 % etanolom. Po zadnjem centrifugiranju smo oborini dodali 10 ml scintilacijske mešanice (Ultima Gold XR). Radioaktivnost vzorcev smo izmerili s tekočinskim scintilacijskim števcem (Canberra Packard TriCarb Liquid Scintillation Analyzer, model 2500 TR).

Iz izmerjenih vrednosti radioaktivnosti vgrajenega timidina z dpm (disintegration per minute) smo ocenili množino vgrajenega ^3H -timidina (mol) po spodaj navedeni formuli (2).

$$X = R * SA^{-1} * k \quad \dots (2)$$

X – množina vgrajenega ^3H -timidina v 1 liter vzorca v 1 uri ($\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

R – radioaktivnost izmerjena v 1 ml vzorca v 1 uri ($\text{dpm ml}^{-1} \text{h}^{-1}$)

SA – specifična aktivnost ^3H -timidina (Ci/mmol)

k – $4,5 \times 10^{-13}$ (število Ci/dpm)

Število novo nastalih celic v časovni enoti (št. celic $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$) smo preračunali iz množine vgrajenega ^3H -timidina v časovni enoti, pomnoženim s faktorjem $1,7 \times 10^{18}$ (Furman in Azam, 1982), po formuli 3.

$$N = X * F * 10^{-3} \quad \dots (3)$$

N – število novo nastalih celic v časovni enoti (št. celic ml⁻¹ h⁻¹)

X - množina vgrajenega ³H-timidina na 1 liter vzorca v 1 uri (mol L⁻¹ h⁻¹)

F – faktor (1,7 x 10¹⁸), ki podaja oceno za število celic, ki vgradijo 1 mol ³H-timidina

Metoda vgrajevanja radioaktivno označenega timidina, temelji na ocenjevanju hitrosti prokariotske vgradnje radioaktivno označenega timidina v novo nastalo DNA.

3.6 DOLOČANJE ŠTEVILA PROKARIOTSKIH CELIC Z EPIFLUORESCENTNIM MIKROSKOPOM

Število prokariotskih celic v vzorcih smo določili z metodo štetja z epifluorescentnim mikroskopom. Vzorce smo obarvali z barvilom 4,6-diamino-2-fenilindol (0,1M DAPI) po metodi Porter in Fleig (1980).

Vzorce smo na dan odvzema fiksirali s formalinom (končna koncentracija 10 %) in jih pred obdelavo shranili vsaj za 1 uro na 4°C. Z inkubacijo na 4°C smo upočasnili razmnoževanje celic v času, ko fiksacija še ni bila popolna. Vzorce smo redčili 1:10 (1ml vzorca + 9ml morske vode, prefiltrirane skozi filter Millipore s porami 0,22 µm). Homogeno razporeditev celic smo povečali z 1 minutnim soniciranjem vzorcev (sonikator: Sonics & Materials inc., Danbury, CT U.S.A). V nadaljevanju smo 5ml razredčenega vzorca (vzorčenje 08.09.2005 samo 1ml), kateremu smo dodali 500µl (100µl) 0,1M DAPI, inkubirali 5 minut na filtru. Vzorec smo filtrirali na črn polikarbonatni filter s porami velikosti 0,22µm (Poretics) s pomočjo vakumske črpalke (Millipore). Mikroskopski preparat smo pripravili tako, da smo na objektno steklo kanili kapljico imerzijskega olja, nanj položili filter, zopet dodali kapljico imerzijskega olja in pokrili s krovnim steklom. S pomočjo epifluorescentnega mikroskopa Olympus BX 51 - DP 70 (vir svetlobe 50W HBO, vzbujevalni filter B365 in zaporni filter FT390), smo preparate pogledali in vsako vidno

polje poslikali s pomočjo kamere (Image system DP70). Vse vzorce smo pogledali pri 2000x povečavi (100x2x10) in prešteli 90 naključno izbranih vidnih polj vsakega vzorca. Na podlagi dobljenih rezultatov smo izračunali število prokariontskih celic/ml vzorca po formuli 4.

$$N=X * P * R/p * V \quad \dots (4)$$

N – št. prokariontskih celic/ml vzorca
X – povprečno število prokariontskih celic v 90 vidnih poljih
P –filtrirna površina (μm^2) $\rightarrow r = 7500\mu\text{m}$; $P = \pi r^2 = 176625000\mu\text{m}^2$
R – redčitev vzorca
p – površina vidnega polja (μm^2) $\rightarrow p = a*b = 28,8\mu\text{m}*21,7\mu\text{m} = 626,1\mu\text{m}^2$
V- volumen vzorca (5ml oz. 1ml)

3.7 DOLOČANJE STRUKTURE PROKARIONTSKE ZDRUŽBE

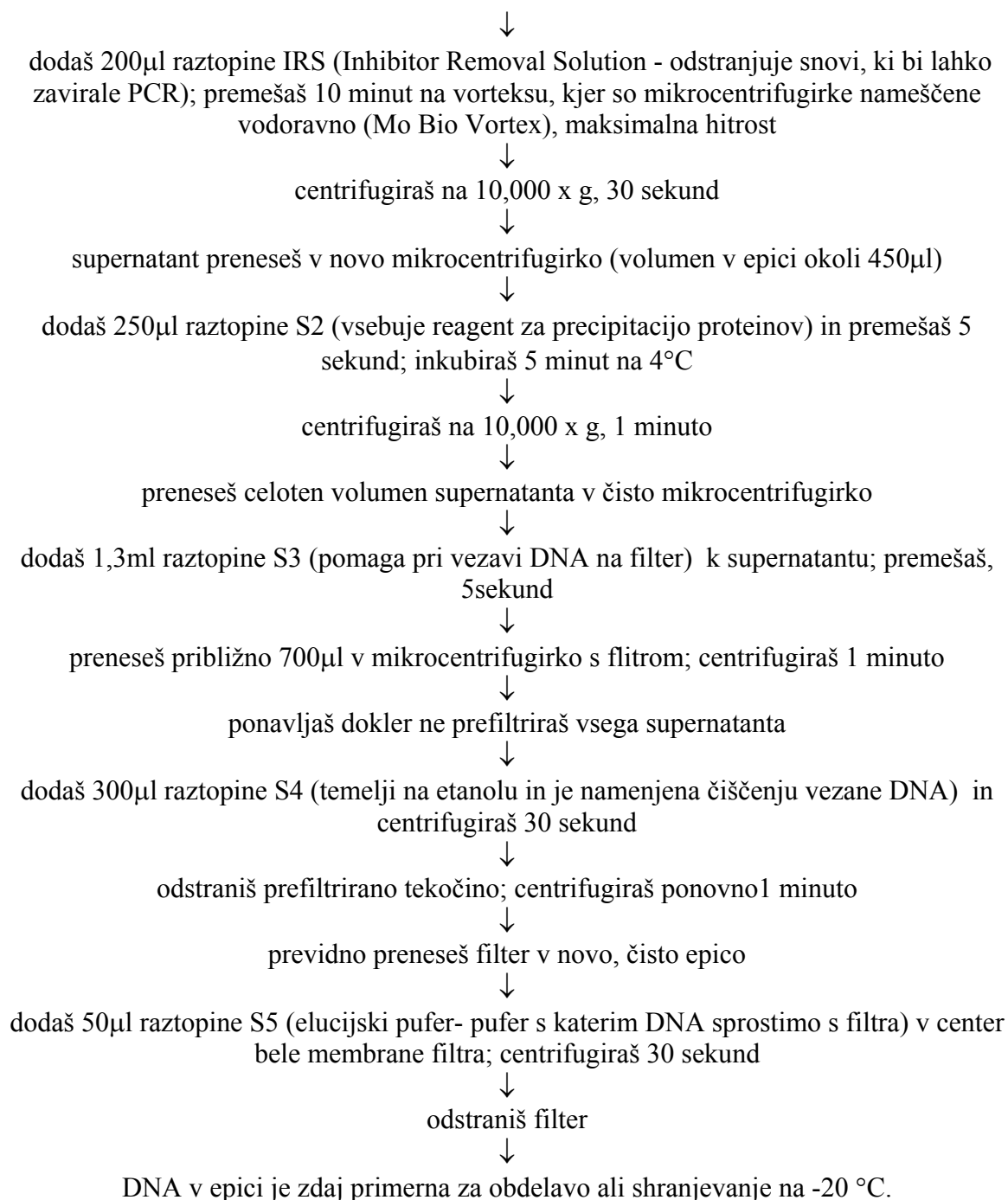
3.7.1 Izolacija skupne mikrobne DNA iz solinske vode

Vzorce smo centrifugirali pri 16000 obr./min v več ponovitvah, 20 minut pri 4°C. Volumen vzorcev je bil različen med posameznimi vzorčenji (3ml ali 4,5ml). Vzorce smo shranili na -20°C.

Izolacijo DNA smo izvedli s pomočjo temperaturnega šoka in kompleta za izolacijo DNA Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories, Inc.). Centrifugiran vzorec smo 3x izmenično segrevali 10 minut pri 100°C in zamrznili na -80°C. Sledila je izolacija po protokolu, priloženem izolacijskemu kitu.

Shema izolacije s kitom:

temperaturni šok
↓
dodaš 60 μ l raztopine S1 (vsebuje SDS, ki sodeluje pri celični lizi); premešaš



3.7.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Pri verižni reakciji s polimerazo smo pomnoževali cca. 900 bp dolg del gena za 16S rRNA. Uporabili smo začetna oligonukleotida specifična za bakterije, ki sta se v raziskavah izkazala za najprimernejša (Liu in sod., 1997). Začetni oligonukleotid 927R je bil neoznačen, 27f pa je bil označen s fluorokromom 6-FAM. Polimerazo smo dodali vedno

na koncu priprave mešanice. Pripravili smo svežo mešanico vseh sestavin in jo potem razdelili na manjše volumne (preglednica 1). Priprava je potekala na ledu in vse sestavine so bile ves čas postopka na ledu. Končni volumen PCR reakcije je bil 26 μl (24 μl reakcijske mešanice + 2 μl DNA vzorca). Za vsak vzorec smo naredili tri ponovitve. Vedno smo naredili tudi pozitivno in negativno kontrolo PCR-ja. Pogoji pri PCR reakciji so prikazani v preglednici 2.

Preglednica 1: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo.

REAKCIJSKA MEŠANICA	začetna koncentracija	končna koncentracija	količina sestavin za eno reakcijo (26 μl)
MiliQ			16,35 μl
DNA vzorca			2 μl
PCR pufer (brez Mg)	10 x	1 x	2,50 μl
MgCl ₂	25 mM	3,50 mM	2,00 μl
Formamid	100 %	1 %	0,25 μl
BSA	10 mg/ml	0,40 mg/ml	1,00 μl
dNTP's	10 mM	200 μM	0,50 μl
6FAM 27f	10 μM	200 nM	0,50 μl
927R	10 μM	200 nM	0,50 μl
Taq polimeraza	5000 U/ml	2 U	0,40 μl

Preglednica 2: Pogoji verižne reakcije s polimerazo.

	TEMPERATURA	ČAS
ZAČETNA DENATURACIJA	95 °C	300 sekund
DENATURACIJA DNA	95 °C	60 sekund
PRILEGANJE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV	53 °C	60 sekund
PODALJŠEVANJE	72 °C	90 sekund
LOČITEV ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV	72 °C	600 sekund
HLAJENJE	4 °C	~

3.7.3 Izvedba agarozne gelske elektroforeze

Velikost in čistost produktov verižne reakcije s polimerazo smo preverili v agaroznem gelu. Gel za elektroforezo smo pripravili iz: 0,3 g agaroze (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 35 ml 1x Tris-acetat-EDTA pufra (TAE) in 1,5 μ l etidijevega bromida (EtBr). Agarozo in TAE smo dali v čašo in v mikrovalovni pečici segrevali 1 minuto na 800 W moči. Počakali smo, da se je mešanica ohladila in nato dodali EtBr. Mešanico smo dali v model za gel in pustili, da se strdi. Gel smo dali v elektroforezno banjico in vanjo dodali toliko TAE pufra, da je zapolnil luknjice na gelu. 3 μ l vzorca smo zmešali z 1 μ l barvila bromfenolmodro (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). V luknjice na gelu smo nanegli vse obarvane vzorce in standard. Napetost smo uravnali na 90 mV/cm. Gel smo na koncu pogledali pod UV svetlobo.

3.7.4 Rezanje (restrikcija) DNA

Pomnoženo DNA smo razrezali s pomočjo endonukleaze *Hae* III. Za eno reakcijo smo potrebovali: 1 μ l encima *Hae* III (*Bsu*RI, MBI Fermentas, Litva), 3 μ l 10x pufra (MBI Fermentas, Litva), 11 μ l sterilna MQ in 15 μ l PCR produkta. Volumen vsakega vzorca je bil na koncu postopka 30 μ l. Vzorce smo inkubirali preko noči na 37 °C.

3.7.5 Čiščenje DNA po restrikciji - etanolna precipitacija

Soli in inaktivirane encime smo odstranili z etanolno precipitacijo (Ausubel in sod., 1991). Volumen DNA raztopine po restrikciji je bil 30 μ l. Dodali smo 1/10 volumna (3-5 μ l) 3M Na-acetata in premešali. Dodali smo 2 volumna (70 μ l) ledeno hladnega 100 % etanola, premešali in pustili 15-30 minut na ledu. Centrifugirali smo pri 15000 obr./min, 4 °C, 30 minut. Odstranili smo supernatant. Dodali smo 500 μ l 70 % etanola in zopet centrifugirali 10 minut pri enakih pogojih. Odstranili smo supernatant, odprte epice smo postavili ob

gorilnik in počakali, da je ves etanol izhlapel. Do nadaljne uporabe smo vzorce shranili v temi, pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.7.6 Izvedba T-RFLP

3.7.6.1 Ločevanje fluorescentno označenih restrikcijskih fragmentov s kapilarno elektroforezo ABI 310

Ločevali smo fluorescentno označene fragmente, ki so nastali po rezanju z encimom *Hae* III. Za ločitev smo uporabili kapilarno elektroforezo ABI 310. Mešanica je bila sestavljena iz: 2 μl inaktivirane restrikcijske mešanice, 2 μl deioniziranega formamida, 0,5 μl pufru za nalaganje, 2 μl standardne DNA (TAMARA 1000 fragment length standard, PE Biosystems). Pred nalaganjem v kapilarno elektroforezo smo vzorce 5 min denaturirali pri $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ in jih nato takoj ohladili na ledu. 2,5 μl mešanice smo pod standardnimi pogoji proizvajalca elektrokinetično injicirali v kapilarno elektroforezo.

3.7.6.2 Analiza kromatogramov

Profile T-RFLP smo primerjali v mejah velikosti pomnožkov PCR, od 1-1000bp gena za 16S rRNA bakterij. Dobljene T-RFLP profile smo analizirali s programi GenScan in Genotyper (Applied Biosystems). Podobnost T-RFLP profilov (prisotnost/odsotnost vrhov in njihovo fluorescenco) smo primerjali s programom BioNumerics 3.0 (Applied Maths, Belgija).

Metod za rekonstrukcijo filogenetskih dreves je več. Osnovna delitev je na distančne metode (upoštevajo evolucijske razdalje) in na diskretne metode (temeljijo na morfoloških in diskretnih znakih). Mi smo uporabili metodo, ki se imenuje Neutežna metoda parnih skupin z aritmetično sredino (NMPSA, angleško UPGMA). Distančne metode, med katere spada tudi metoda NMPSA, zahtevajo matriko paroma izračunanih razdalj med vsemi taksoni. Metoda primerja vse vrednosti v matriki in tista dva taksona, med katerima je razdalja najmanjša, združi v nov takson. Algoritem se ponavlja, dokler niso združeni vsi

taksoni. Rezultat je koreninjeno drevo. Metoda je hitra in enostavna za primerjave enot, kjer gre za združevanje v skupine po podobnosti (npr. primerjave združb). Veljati mora aditivnost oz. seštevanje dolžine vej, drugače lahko dobimo napačno sliko (Jerman in Štern, 1999).

3.7.6.3 Določitev spremembe v strukturi prokariontskih združb med sosednjima vzorčevalnima bazenoma

Spremembo v strukturi prokariontskih združb med sosednjima vzorčevalnima bazenoma smo določili na podlagi dolžine vej dendrogramov. Razvejišče med vzorcema na dendrogramu predstavlja odstotek podobnosti med vzorcema, dolžina vej pa predstavlja odstotek različnosti dveh primerjanih vzorcev. Za določitev spremembe med bazenoma A in B smo določili % podobnosti obeh ponovitev bazena A in % podobnosti obeh ponovitev bazena B. Izračun smo naredili po spodnji formuli (5).

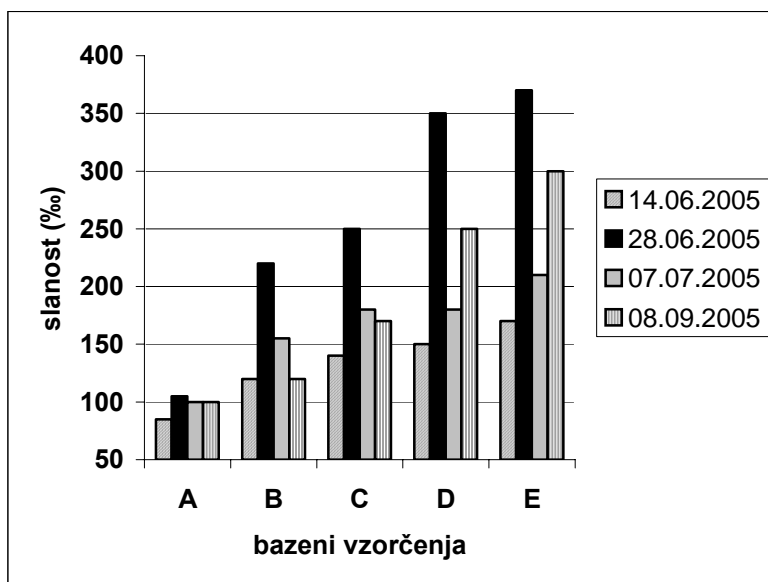
$$\begin{aligned} & (\% \text{ podobnosti obeh ponovitev bazena A} - \% \text{ podobnosti na razvejišču med bazenoma A in B}) \\ & \qquad \qquad \qquad + \\ & (\% \text{ podobnosti obeh ponovitev bazena B} - \% \text{ podobnosti na razvejišču med bazenoma A in B}) \\ & \qquad \qquad \qquad \dots (5) \end{aligned}$$

Enak postopek smo ponovili za določitev razdalje med bazenoma B in C, C in D ter D in E.

4 REZULTATI

4.1 SLANOST VODE V SOLINSKIH BAZENIH

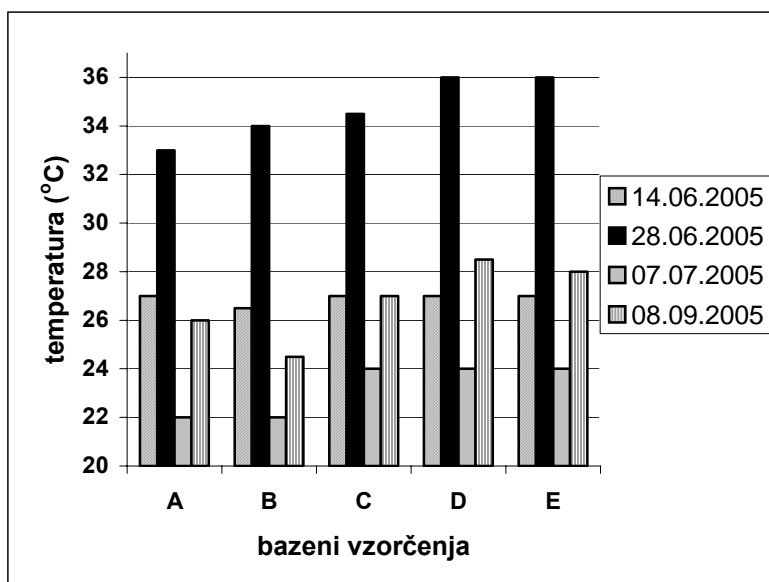
Ob vsakem vzorčenju smo merili slanost s pomočjo refraktometra, ki določa slanost na podlagi lomnega količnika vzorca. Kot je razvidno iz slike 4 je slanost od bazena A do bazena E vedno naraščala. Najvišja zabeležena slanost 370 ‰ je bila dosežena 28.06.2005 v bazenu E. Gradienti slanosti v bazenih od A do E so bili v različnih vzorčnih časih različni. Največji slanostni gradient 265 ‰ od bazena A do bazena E je bil dosežen 28.06.2005, najmanjši 85 ‰ pa 14.06.2005. Iz podatkov o padavinah (priloga 1) je razvidno, da je bilo pred vzorčenjem 28.06.2005 in 08.09.2005 daljše obdobje brez padavin, kar je vplivalo na večje slanosti vode v solinskih bazenih. Na slanost je vplivalo tudi dolivanje vode v solinske bazene (priloga 1). 14.06.2005 so v vse vzorčevalne bazene dolili manj slano vodo in posledica tega je bila manjša slanost.



Slika 4: Slanost slanice v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005.

4.2 TEMPERATURA SLANICE V SOLINSKIH BAZENIH

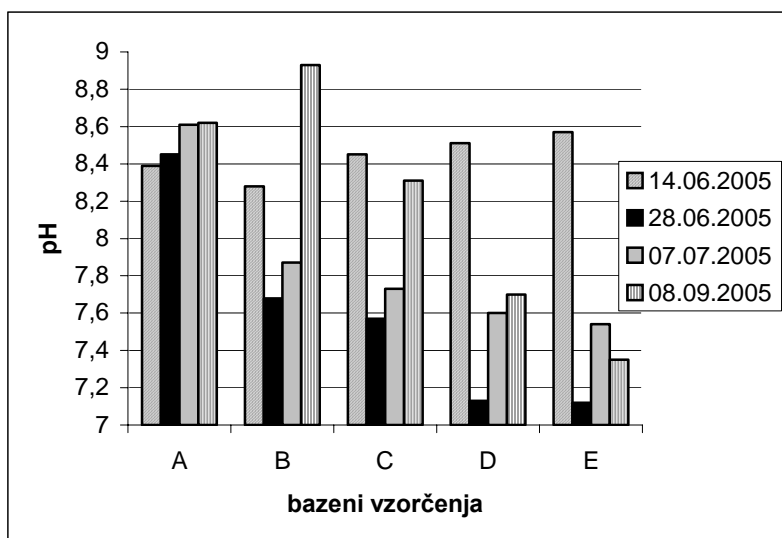
Temperatura v različnih bazenih je prikazana na sliki 5. Temperatura slanice je od bazena A do bazena E naraščala ali ostajala enaka. Najvišja izmerjena temperatura 36 °C je bila izmerjena pri vzorčenju 28.06.2005, v bazenih D (slanost 350 ‰) in E (slanost 370 ‰). Najnižja temperatura 22 °C je bila izmerjena v bazenih A (slanost 100 ‰) in B (slanost 155 ‰) 07.07.2005. Največja temperaturna razlika med bazeni od A do E je bila 4 °C pri vzorčenju 08.09.2005.



Slika 5: Temperatura slanice v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005.

4.3 VREDNOSTI pH SLANICE V SOLINSKIH BAZENIH

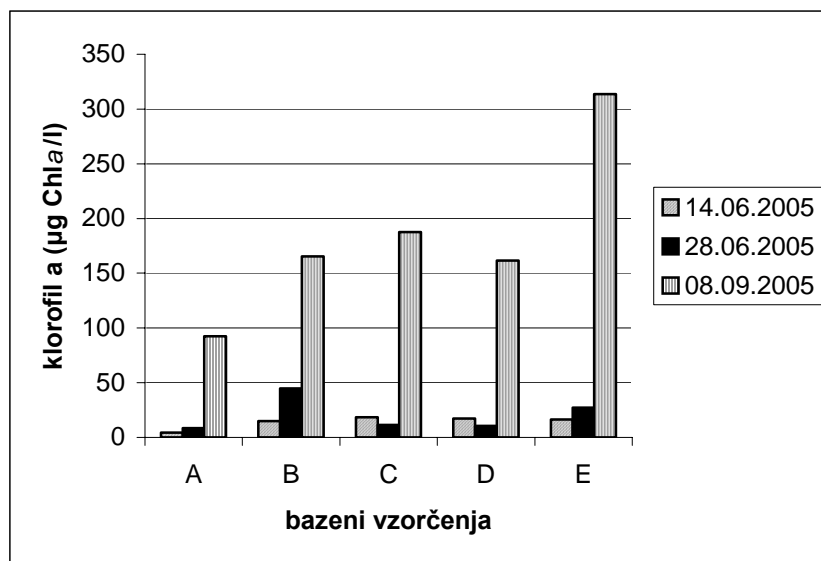
Na sliki 6 vidimo, da vrednosti pH v slanici vedno padajo od bazena A proti bazenu E. Izjema je vzorčenje 14.06.2005, kjer so vrednosti pH v vseh bazenih približno enake oz. je zaznati celo majhno naraščanje. Vrednosti pH se gibljejo od 8,93 do 7,12.



Slika 6: Vrednosti pH slаницe v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005.

4.4 KOLIČINA Klorofila *a* V SOLINSKIH BAZENIH

Količino klorofila *a* smo merili pri treh vzorčenjih. Slika 7 prikazuje veliko razliko v količini prisotnega klorofila *a* med prvima dvema vzorčenjema in zadnjim vzorčenjem. Pri vseh vzorčenjih je opazno povečanje količine klorofila *a* med bazenoma A in B. Pri vzorčenju 08.09.2005 so vrednosti klorofila *a* od bazena A (slanost 100 ‰) do bazena E (slanost 300 ‰) narasle za več kot 3x. Najvišja izmerjena vrednost 313,61 µg/l je bila v bazenu E (slanost 300 ‰). Slanica je bila pri tem vzorčenju v vseh bazenih obarvana rdeče.



Slika 7: Količina klorofila *a* v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005.

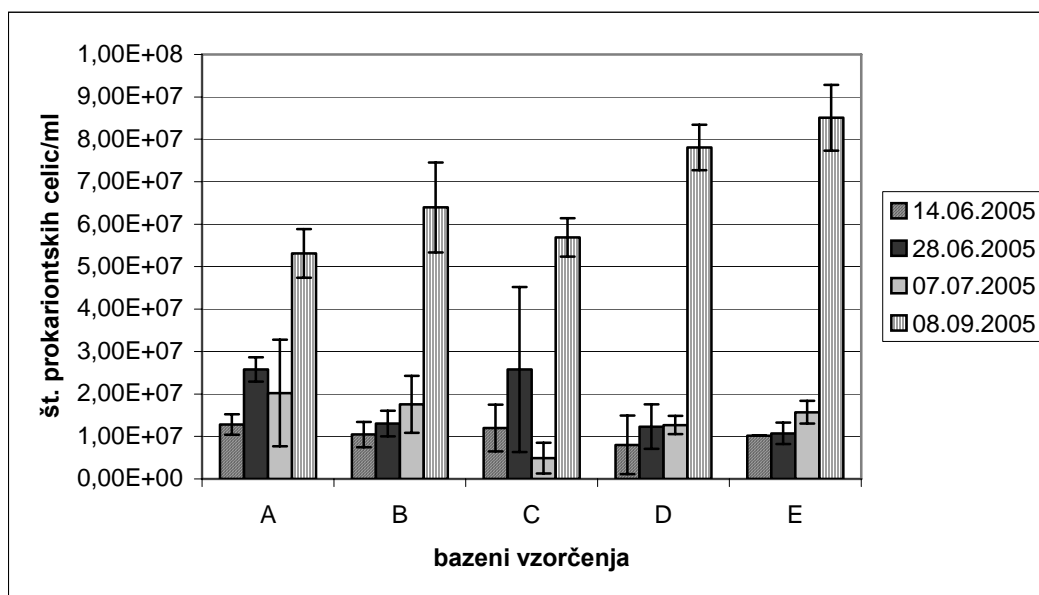
4.5 ŠTEVILO PROKARIONTSKIH CELIC/ML V SOLINSKIH BAZENIH

Število heterotrofnih prokariotov smo določali s pomočjo epifluorescentnega mikroskopa in barvila DAPI. Tehnika omogoča natančnejše določanje števila prokariotskih celic kot nam to omogočajo gojitvene metode. Slika vzorca pod mikroskopom je prikazana na sliki 8. Modri delci so celice obarvane z barvilom DAPI. Modro se obarvajo tako eubakterije kot tudi arhebakterije. Prokariotske celice so bile v obliki krajših in daljših palčk. Štetje je bilo pri nekaterih vzorcih težavno zaradi velikega števila anorganskih in organskih delcev, ki so se nahajali v slanici in smo jih ob vzorčenju zajeli skupaj s slanico.

Slika 9 prikazuje število prokariotskih celic v posameznih bazenih pri različnih vzorčenjih. Skupno število celic se pri prvih treh vzorčenjih ni statistično spreminjalo vzdolž slanostnega gradienta. Najvišje število celic smo zasledili pri vzorčenju 08.09.2005, kjer so se vrednosti gibale od $6,1 \times 10^7$ v bazenu A (slanost 100 ‰) do $8,3 \times 10^7$ v bazenu E (slanost 300 ‰). Pri tem vzorčenju je število prokariotskih celic naraščalo od bazena A do bazena E. Število celic pri prvih treh vzorčenjih se je gibalo od $9,5 \times 10^6$ do $2,7 \times 10^7$. Ocenjena relativna napaka je pri vseh vzorčenjih visoka.



Slika 8: Mikroskopska slika vzorca bazena A (08.09.2005; 1 ml, 2000x povečava) obarvanega z barvilom DAPI.



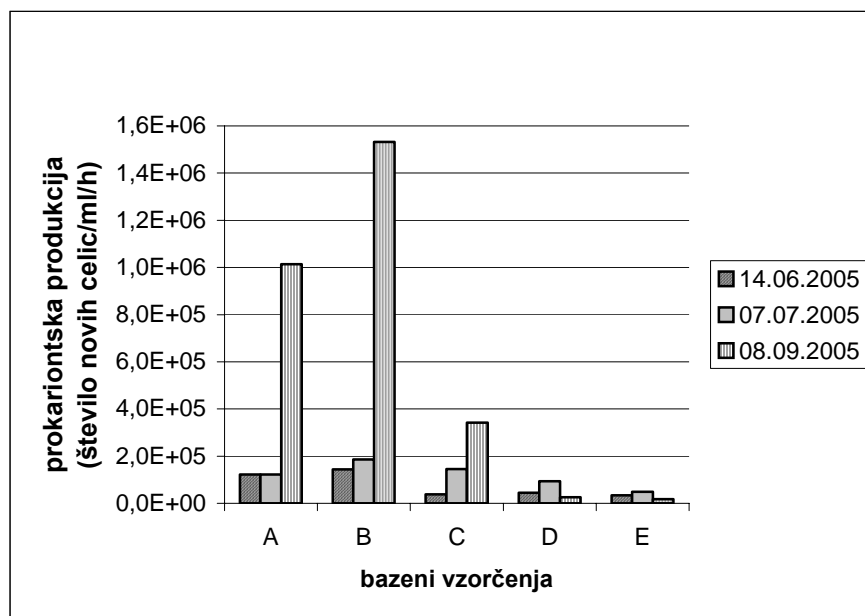
Slika 9: Število prokariotskih celic/ml v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005.

4.6 AKTIVNOST PROKARIONTSKE ZDRUŽBE – PROKARIONTSKA PRODUKCIJA V SOLINSKIH BAZENIH

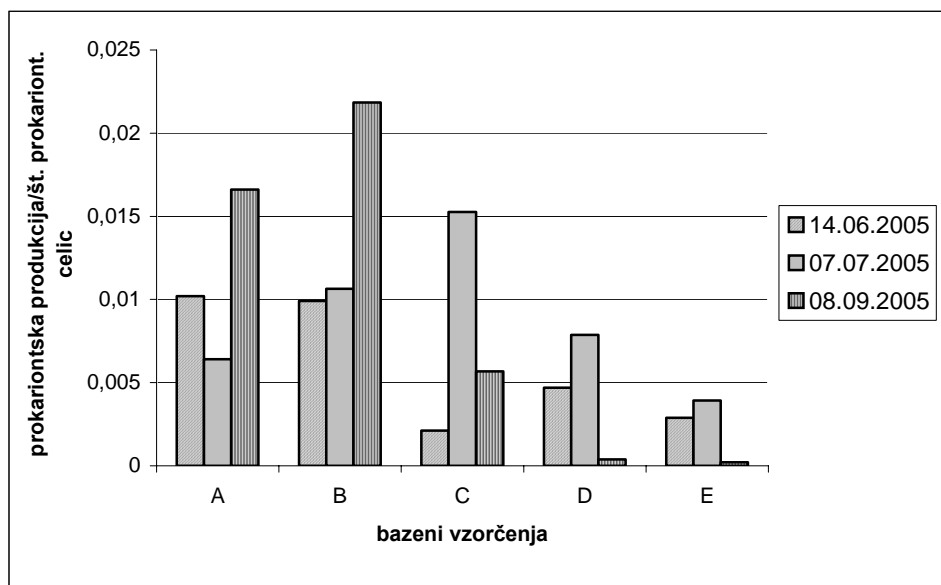
Prokariotsko produkcijo smo merili s pomočjo vgradnje radioaktivno označenega timidina (^3H -timidin). Meritve smo opravili za tri vzorčenja. Slika 10 prikazuje trend

upadanja prokariontske produkcije ob poveševanju slanosti. Najvišjo produkcijo smo zasledili v bazenih pri zadnjem vzorčenju, vrednosti teh meritev zelo odstopajo od drugih dveh vzorčenj. Pri vseh treh vzorčenjih je najvišja produkcija izmerjena v bazenu B in najnižja v bazenu E. Prokariontska produkcija pri vzorčenju 08.09.2005 je bila pri najvišji slanosti približno 10x nižja kot v bazenu B.

Slika 11 prikazuje razmerje med številom novo nastalih prokariontskih celic in skupnim številom prokariontskih celic. Vidimo lahko, kolikšen je delež aktivnih celic v posameznih bazenih v primerjavi s skupnim številom prokariontskih celic. Razmerje med parametroma vzdolž slanostnega gradienta najprej narašča, v zadnjih dveh bazenih pa pade, kar pomeni da je bakterijska produkcija pri visokih slanostih zelo nizka v primerjavi s skupnim številom prokariontskih celic. Npr. pri vzorčenju 08.09.2005 je razmerje med številom novo nastalih celic in skupnim številom prokariontskih celic najvišje v bazenu B (slanost 120 ‰) in je približno 100x višje kot v bazenu E (slanost 300 ‰) pri istem vzorčenju.



Slika 10: Vrednosti prokariontske produkcije (število novih celic/ml/h) v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005.



Slika 11: Razmerje med številom novo nastalih celic in številom prokariontskih celic v solinskih bazenih Sečoveljskih solin v času različnih vzorčenj v letu 2005.

4.7 KORELACIJE MED PARAMETRI

Preglednica 3 prikazuje korelacije med posameznimi parametri znotraj posameznega vzorčenja in za vsa vzorčenja skupaj. Če se omejimo samo na skupno korelacijo za vsa vzorčenja, potem dobimo dobro skupno korelacijo med slanostjo in pH ($r^2 = -0,77$). S povišanjem slanosti se zniža vrednost pH. Močna pozitivna skupna korelacija je tudi med klorofilom *a* in številom prokariontskih celic/ml ($r^2 = 0,86$). Ob zvišanju števila primarnih producentov se število heterotrofov poveča. Pri vseh drugih primerjavah so skupne korelacije pod 50 %. Kljub nizkim korelacijskim vrednostim lahko ugotovimo, da so korelacije med abiotskimi dejavniki (temperaturo, pH in slanostjo) višje, kot korelacije med abiotskimi in biotskimi dejavniki. Vrednosti korelacijskega koeficienta po posameznih vzorčenjih se ponekod zelo razlikujejo od vrednosti korelacijskega koeficienta izračunanega za vsa vzorčenja skupaj. To npr. pomeni, da dva parametra lahko pri enem vzorčenju med seboj npr. močno pozitivno korelirata, pri drugem vzorčenju pa slabše korelirata. To nakazuje, da se med vzorčenji spreminja vpliv okolja na izbrana parametra in zato prihaja do nihanj korelacijskih vrednosti med posameznimi vzorčenji. V diplomski nalogi nismo naredili multiple regresije.

Preglednica 3: Koeficient korelacije med merjenimi parametri glede na posamezno vzorčenje in za vsa vzorčenja skupaj.

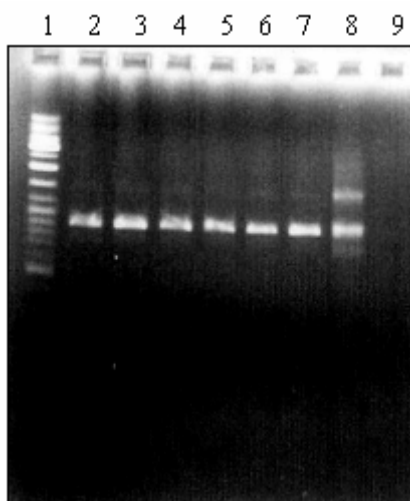
VZORČENJE	T : slan.	T : pH	T : klor.	T : PP	T : št. cel.	Slan. : pH	Slan. : klor.	Slan. : PP	Slan. : št. cel.	pH : št. cel.	Klor. : PP	Klor. : št. cel.	PP : št. cel.	T : tenot	Slan. : tenot	pH : tenot	Klor. : tenot	PP : tenot	Št.cel. : tenot	
14.06. 2005	0,05	0,64	0	-0,52	-0,06	0,53	0,72	-0,65	-0,01	0,13	-0,82	-0,15	-0,41	0	-0,19	-0,73	-0,48	-0,76	0,85	-0,04
28.06. 2005	0,98	-0,93	0	/	-0,89	-0,97	0,02	/	-0,95	0,97	/	-0,03	/	-0,02	-0,07	0,17	-0,96	/	/	0,12
07.07. 2005	0,69	-0,61	/	-0,38	-0,91	-0,94	/	-0,22	-0,66	0,10	0,62	/	/	0,13	0,27	-0,09	/	-0,29	/	-0,07
08.09. 2005	0,72	-0,86	0,20	-0,97	0,09	-0,94	0,66	-0,74	0,55	-0,41	-0,31	0,72	-0,11	-0,87	-0,95	0,97	-0,54	0,91	-0,35	
Skupna korelacija	0,40	-0,23	-0,13	-0,02	-0,01	-0,77	0,03	-0,16	0	0,02	0,04	0,86	0,24	0,01	-0,13	0,08	-0,42	-0,01	-0,19	

OPOMBE: slan. - slanost; klor. - količina klorofila a; PP - prokariotska produkcija; št. cel. - število prokariotskih celic/ml; t. enot - povprečno število taksonomskih enot

4.8 STRUKTURA PROKARIONTSKE ZDRUŽBE

4.8.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za določitev strukture prokariotske združbe smo morali najprej uspešno izolirati in pomnožiti DNA celotnega vzorca, kar je lahko pri vzorcih s povišano slanostjo problematično. Pomnoževali smo del DNA, ki nosi zapis za ribosomske gene. Kot je razvidno iz slike 12 je bilo pomnoževanje z uporabljenimi začetnimi oligonukleotidi in izbrano polimerazo uspešno. Z agarozno gelsko elektroforezo smo potrdili nastanek pričakovanega pomnožka dolžine 900 bp.



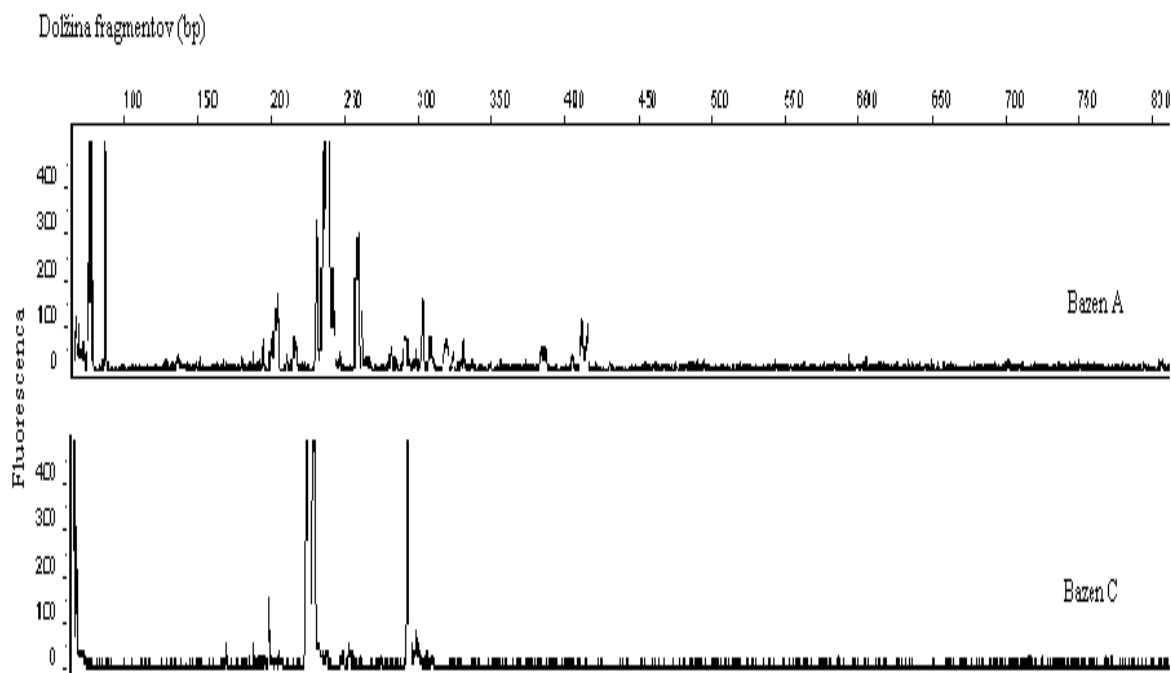
Slika 12: Primer elektroforeznega gela PCR pomnožkov (1- marker SMO#333; 2 do 7 - pomnožena DNA solinskih vzorcev; 8 – pozitivna kontrola; 9 – negativna kontrola).

4.8.2 Analiza T-RFLP fragmentov

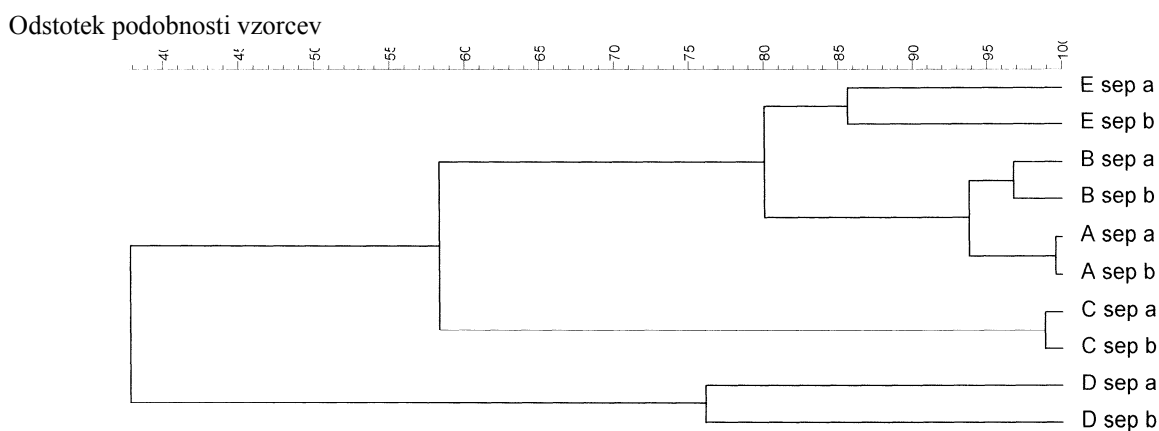
S tehniko T-RFLP smo pridobili profile terminalnih fragmentov gena za 16S rRNA in na osnovi le-teh proučevali strukturo prokariotske združbe vzorcev vseh štirih vzorčenj. PCR pomnožke smo rezali z endonukleazo *HaeIII* in jih ločili s kapilarno elektroforezo.

Na sliki 13 sta prikazana elektroferograma za bazena A (slanost 100 %) in C (slanost 170 %) vzorčena 08.09.2005. Iz slike lahko vidimo, da se profil prokariotske združbe spremeni. Profila bazenov A in C sta različna tako po številu kot po dolžini fragmentov. V bazenu A je večje število različno dolgih fragmentov. Razlika med vzorcema je tudi v višini posameznih vrhov. Elektroferogrami za ostale vzorce so prikazani v prilogi 5. Na podlagi dobljenih elektroferogramov smo s programom BioNumerics 3.0 primerjali profile prokariotskih združb.

Na sliki 14 je prikazan dendrogram za vzorce odvzete 08.09.2005. S pomočjo dendrograma lahko potrdimo, da se struktura prokariotske združbe med posameznimi bazeni razlikuje. Za vsak vzorec smo naredili po dve ponovitvi restrikcije (a, b). Nekatere ponovitve se med seboj zelo razlikujejo (npr. v D bazenu za približno 25 %). Dendrogrami za ostale vzorce so v prilogi 2.



Slika 13: Elektroferograma vzorcev vzorčenja 08.09.2005.

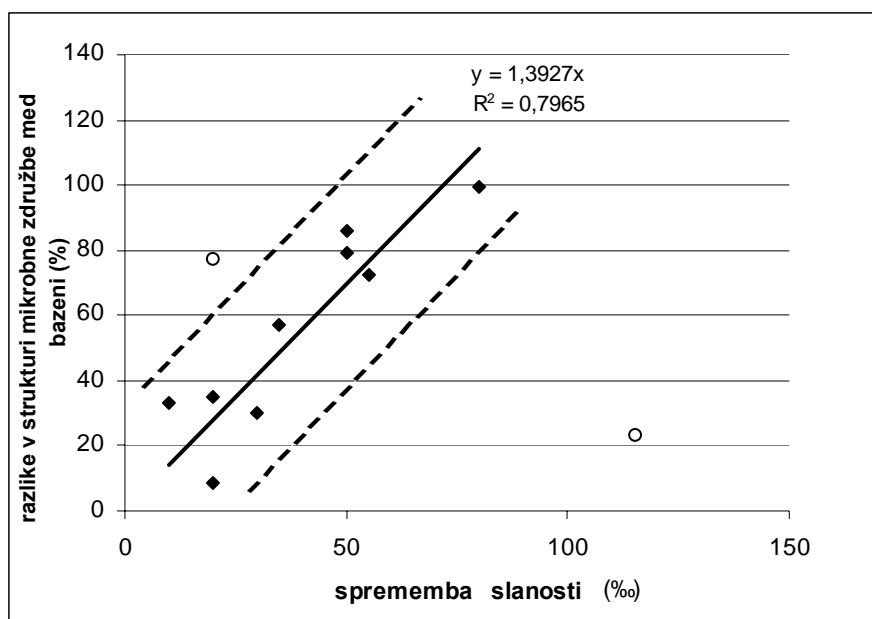


Slika 14: Dendrogram vzorčenja 08.09.2005 (a, b so ponovitve restrikcije posameznega vzorca).

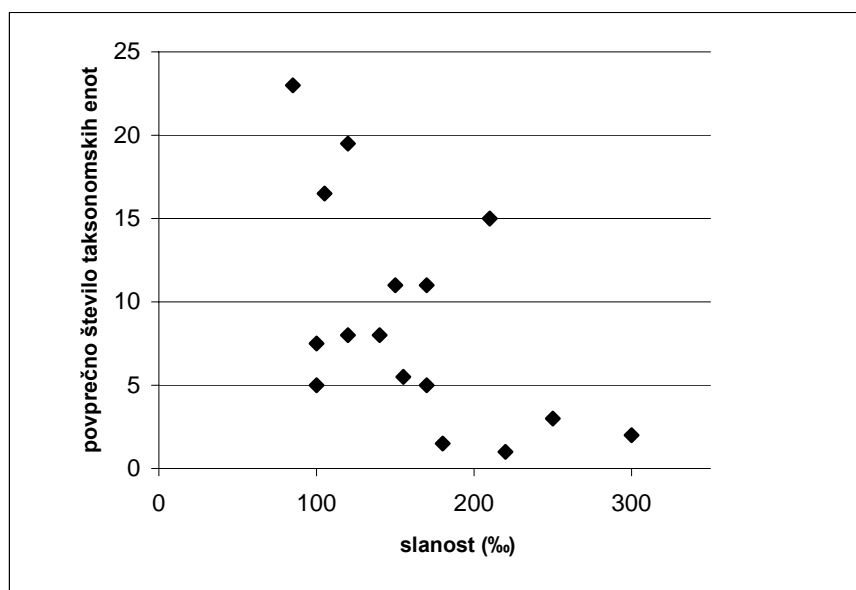
Kot je razvidno iz slike 14 se je struktura prokariotske združbe pri toku slanice od bazena A (slanost 100‰) do končnega bazena E (slanost 300 ‰) spreminjala. Sprememba strukture združbe je bila predvsem posledica spremembe slanosti. Na sliki 15 je prikazan graf, ki prikazuje podobnost strukture združb med sosednjima solinskima bazenoma v odvisnosti od spremembe slanosti. Premica linearne regresije nam kaže povečevanje razlik v strukturi prokariotske združbe med bazeni ob povečevanju spremembe slanosti. Iz slike je razvidno, da lahko 79,7 % razlik v strukturi prokariotske združbe med bazeni pojasnimo s spremembo slanosti, ostalih približno 20 % variabilnosti pa ostane s tem modelom nepojasnjene. Črtkani črti predstavljata 95 % interval zaupanja. Dve točki sta izdvojeni iz linearne regresije. Prva točka predstavlja razdaljo med bazenoma D (slanost 150 ‰) in E (slanost 170 ‰), vzorčenima 14.06.2005. Druga točka predstavlja razdaljo med bazenoma A (slanost 105 ‰) in B (slanost 220 ‰), ki smo ju vzorčili 28.06.2005.

Slika 16 prikazuje spreminjanje povprečnega števila taksonomskih enot v odvisnosti od slanosti. Povprečno število je izračunano na podlagi dveh ponovitev istega vzorca (izjema je bazen E vzorčen 28.06.2005, za katerega imamo podatke samo za eno ponovitev). Upoštevali smo le fragmente, katerih fluorescenca je presegla 50 enot (arbitrarne enote). Največje povprečno število različno dolgih fragmentov je bilo 23 v bazenu A (14.06.2005). Slanost 85 ‰, ki je bila izmerjena v bazenu A pri tem vzorčenju je bila najnižja izmed

vseh slanosti. Bazen B vzorčen 28.06.2005, s slanostjo 220 ‰, je imel samo eno dolžino fragmenta. S slike lahko razberemo trend upadanja števila taksonomskih enot v odvisnosti od slanosti. Število taksonomskih enot se do slanosti okoli 200 ‰ hitro zniža, potem pa počasi upada oziroma ostaja enako.



Slika 15: Razlike v strukturi prokariontske združbe med sosednjima solinskima bazenoma v odvisnosti od spremembe slanosti.



Slika 16: Povprečno število taksonomskih enot v odvisnosti od slanosti.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Solinarstvo je dejavnost, ki je odvisna od vremena, saj vse faze pridobivanja soli potekajo na prostem. Osnovni proces pri pridobivanju soli je postopno izparevanje morske vode, dokler voda ni dovolj gosta, da nastopi proces kristalizacije. Ključna ideja, ki nas je vodila skozi celotno raziskovanje, je bila sledenje prokariontski aktivnosti in strukturi prokariontske združbe vzdolž slanostnega gradienta.

Med pridobivanjem soli voda potuje od bazena A do bazena E. Iz rezultatov je razvidno, da se pri tem slanost povečuje. Povečanje slanosti je tudi povezano s temperaturo slanice. Ob povišanju temperature slanice se je slanost povišala. Najvišje vrednosti za slanost in temperaturo slanice smo zasledili pri vzorčenju 28.06.2005. Slanostni gradient je bil visok tudi pri vzorčenju 08.09.2005. Pred obema vzorčenji je bilo daljše obdobje sončnega vremena brez obilnejših padavin.

pH je vzdolž slanostnega gradienta padal. V solinah so vrednosti pH običajno med 7,5 in 8,5 (Javor, 1989), kar je skladno z našimi rezultati. Izjema je vzorčenje 14.06.2005, ko vrednosti pH ostajajo nespremenjene oziroma celo nekoliko narastejo. Pri vzorčenju 14.06.2005 je bil slanostni gradient najmanjši, kar verjetno razloži odsotnost zniževanja pH vzdolž slanostnega gradienta pri tem vzorčenju. Generalno gledano pade vrednosti pH vzdolž slanostnega gradienta kaže velika skupna negativna korelacija pH s slanostjo ($r^2 = -0,77$). Znižanje pH vzdolž slanostnega gradienta je pričakovan rezultat, saj se s povečanjem slanosti obarja CaCO_3 .

Količina klorofila *a* se je v splošnem zviševala s poviševanjem slanosti. Najvišje vrednosti smo zabeležili pri vzorčenju 08.09.2005 v bazenu E (slanost 300 ‰). Povečanje količine klorofila *a* kaže na razrast avtotrofne združbe. Skupna korelacija med količino klorofila *a* in številom prokariontskih celic je zelo visoka ($r^2 = 0,86$), kljub temu da ta korelacija pri nekaterih vzorčenjih ni bila izrazito visoka. To je verjetno posledica visokih vrednosti za klorofil *a* in skupno število prokariontskih celic pri vzorčenju 08.09.2005. Visoka skupna

korelacija bi lahko kazala na to, da je organska snov, ki jo proizvede fitoplankton, pomemben vir hranil za bakterijsko rast (Cole in sod., 1988).

Poudariti moramo, da so razmere v prvih dveh bazenih drugačne, kot v zadnjih treh vzorčevalnih bazenih. V bazenih A in B, ki sta prva in najmanj slana med vzorčevalnimi bazeni, se voda zadržuje dlje časa. Ko se zaloge vode izpraznijo, dolijejo v te bazene novo, manj slano vodo. Ker solinske vode v te bazene ne dolivajo dnevno, je prokariontskim celicam omogočena boljša prilagoditev na tamkajšnje razmere. V kristalizacijskih bazenih C, D in E menjujejo slanico ob ugodnih vremenskih razmerah dnevno in organizmi imajo manj časa za prilagoditev. Kljub temu je zanimivo, da se pri prvih treh vzorčenjih skupno število prokariontskih celic ni spreminjalo vzdolž slanostnega gradienta. Izjemo predstavlja vzorčenje 08.09.2005, ko se je število prokariontskih celic signifikantno povečalo. Podobno velja tudi za klorofil *a*.

Še bolj signifikanten je podatek o prokariontski aktivnosti. Prokariontsko produkcijo smo merili s pomočjo vgradnje radioaktivno označenega timidina (^3H -timidin). Opozoriti velja, da smo s to metodo določali aktivnost celotne prokariontske združbe, torej eubakterij in arhebakterij skupaj. Če bi hoteli določiti aktivnost samo enega dela prokariontske združbe, bi morali rast drugega dela zavreti (Oren, 1990). Aktivnost prokariontske združbe je z naraščanjem slanosti padala. Število prokariontskih celic se običajno ujema z prokariontsko produkcijo, saj je prokariontska produkcija produkt mikrobne biomase in hitrosti rasti. (Kirchman, 1990). Iz naših rezultatov je razvidno, da kljub temu, da je število prokariontskih celic naraščalo oziroma ostalo nespremenjeno je aktivnost prokariontske združbe padala. Najvišjo aktivnost prokariontske združbe smo pri vseh vzorčenjih zasledili v bazenu B. Ta bazen predstavlja zalogo slanice za kristalizacijske bazene in slanica se v njem zadržuje daljši čas. Mikroorganizmi imajo tako več časa za prilagoditev na stresne razmere. Delež aktivnih prokariontskih celic v primerjavi s skupnim številom prokariontskih celic se je vzdolž slanostnega gradienta nižal. To kaže, da se s prenosom mikrobne populacije iz enega slanostnega bazena v drugega število prokariontskih celic ohranja enako oziroma se celo povečuje, vendar pa aktivnost teh celic močno pada in je pri najvišjih slanostih lahko za 100 in večkrat manjša. Ob tem, da smo pokazali, da se število in aktivnost prokariontske združbe spreminjata vzdolž slanostnega gradienta, je bil naš

namen tudi ugotoviti spreminjanje strukture prokariontske združbe. Ker gre za zelo slana okolja, se običajni postopki izolacije DNA niso najbolje obnesli. Zato smo postopek izolacije optimizirali. Pri tem smo si pomagali s temperaturnim šokom in izolacijskim kitom. Kombinacija obeh postopkov se je izkazala za zelo uspešno, saj ob uporabi samo enega postopka nismo dobili dovolj PCR pomnožka, ki bi ga lahko zaznali na agarozni elektroforezi. Kljub hkratni uporabi obeh izolacijskih postopkov je bila količina izolirane DNA še vedno relativno majhna, zato nismo posebej preverjali uspešnost izolacije DNA.

Iz elektroferogramov in dendrogramov narejenih po posameznih vzorčenjih lahko ugotovimo, da razlike med bazeni v strukturi prokariontske združbe obstajajo. Profili mikrobnih združb, ki so vidni iz elektroferogramov, variirajo. Razlikujejo se po številu in dolžini fragmentov ter intenziteti posameznih vrhov oziroma fluorescenci. Dendrogrami nam kažejo, da ponovitve istega vzorca niso vedno primerljive in da je lahko razlika med njimi tudi do 25 %. Do teh razlik je najverjetneje prišlo zaradi različnega rezanja PCR pomnožkov, posledično so nastali različno dolgi fragmenti. To kaže na relativno nizko specifičnost restriksijskega encima *HaeIII* za naše vzorce.

Najpomembnejši rezultat te naloge je nedvomno ugotovitev, da obstaja korelacija med spremembo slanosti in spremembo strukture združbe. V veliki večini primerov se razlika v strukturi prokariontske združbe med sosednjima bazenoma povečuje ob povečanju spremembe slanosti. Trend ujemanja parametrov je mogoče razložiti z modelom linearne regresije. Korelacija med spremembo slanosti in spremembo prokariontskih združb je visoka ($r^2 = 0,80$). Dve točki padeta iz tega modela. Prva je primerjava bazenov D (slanost 150 ‰) in E (slanost 170 ‰) pri vzorčenju 14.06.2005. Pri njej je posebnost ta, da se pri zelo majhni spremembi slanosti razlika v strukturi prokariontskih združb med bazenoma poveča relativno veliko. Predvidevamo, da je na to spremembo v strukturi združbe moral vplivati kateri drug dejavnik okolja in ne slanost. Druga točka je primerjava bazenov A (slanost 105 ‰) in B (slanost 220 ‰), vzorčenja 28.06.2005. Pri tej primerjavi je sprememba slanosti zelo visoka, razlika v strukturi prokariontskih združb med bazenoma je nizka. Domnevamo lahko, da zaradi nenadnega skoka v slanosti še ni prišlo do prilagoditve v strukturi združbe.

5.2 SKLEPI

- Struktura in aktivnost prokariontske združbe se signifikantno spreminjata vzdolž slanostnega gradienta v Sečoveljskih solinah.
- Večja kot je sprememba slanosti, večja je sprememba v strukturi združbe ($r^2 = 0,80$).
- Aktivnost prokariontske združbe v slanostnem gradientu pada.
- Skupno število prokariontskih celic in klorofil *a* povprečno za vsa vzorčenja visoko pozitivno korelirata ($r^2 = 0,86$).
- Skupna korelacija med slanostjo in pH je povprečno za vsa vzorčenja visoka ($r^2 = 0,77$).

6 POVZETEK

V Sečoveljskih solinah so že bile narejene in še vedno potekajo raziskave na področju raziskovanja arhej in gliv. Rezultati te naloge so pomembno prispevali k boljšemu poznavanju mikrobne populacije prisotne v Sečoveljskih solinah. Predmet našega raziskovanja je bila solinska voda – slanica v Sečoveljskih solinah, kjer smo sledili naraščajočemu gradientu soli na severnem območju imenovanem Lera, kjer še vedno pridobivajo sol.

Vzorčili smo štirikrat, leta 2005, v času pobiranja soli. Vsakič smo vzorčili istih pet solinskih bazenov. V prvem vzorčevalnem bazenu je bila slanica po slanosti najbolj podobna morski vodi, naslednji bazen je bil založni bazen za tri kristalizacijske bazene. Zanimalo nas je ali se sestava prokariontske združbe vzdolž slanostnega gradienta spreminja. S pomočjo metode T-RFLP, ki temelji na direktni izolaciji DNA iz vzorca in pomnoževanju gena za 16S rRNA, smo dobili profil združbe v posameznem bazenu, v času posameznega vzorčenja. Analizo smo naredili s programom BioNumerics 3.0. Merili smo aktivnost prokariontske združbe z metodo vgradnje ^3H -timidina. Skupno število prokariontskih celic smo določali s pomočjo epifluorescentnega mikroskopa in barvila DAPI. S pomočjo merjenja prisotnosti klorofila *a* smo ocenili sposobnost za avtotrofijo vzorčne združbe. Določali smo tudi osnovne fizikalne dejavnike okolja (slanost, temperatura, pH) ter ugotavljali njihovo korelacijo z ostalimi parametri.

Skupno število prokariontskih celic z naraščanjem slanosti ostaja nespremenjeno ali celo narašča. Rezultati kažejo na dobro korelacijo števila prokariontskih celic z izmerjeno količino klorofila *a* povprečeno za vsa vzorčenja.

Število prokariontskih celic, ki so v eni uri vgradile radioaktivno označen ^3H -timidina, se je ob povišanju slanosti znižalo. Rezultati potrjujejo našo hipotezo, ki pravi, da se z zviševanjem slanosti aktivnost prokariontske združbe znižuje.

Višja kot je sprememba slanosti med dvema sosednjima bazenoma, večja je razlika v strukturi prokariontske združbe med bazenoma. Trend naraščanja je mogoče razložiti z modelom linearne regresije. Iz rezultatov izhaja, da je sprememba slanosti najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na spreminjanje strukture prokariontske združbe vzdolž slanostnega gradienta.

Proučevani abiotski dejavniki vzdolž slanostnega gradienta med seboj slabo korelirajo. Še slabše korelacije zasledimo med abiotskimi in biotskimi dejavniki. Slabe korelacije potrjujejo, da so soline, kljub navidezni preprostosti, kompleksen ekosistem, ki odpira še mnogo možnosti za nadaljnja raziskovanja.

7 VIRI

Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, 59: 143-169

Anton J., Rossello-Mora R., Rodriguez-Valera F., Amann R. 2000. Extremely halophilic *Bacteria* in crystallizer ponds from solar salterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 7: 3052-3057

Anton J., Oren A., Benlloch S., Rodriguez-Valera F., Amann R., Rossello-Mora R. 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the *Bacteria* from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 485-491

Atlas R.M., Bartha R. 1997. *Microbial ecology - fundamentals and applications*. 4th ed. Redwood City, The Benjamin/ Cummings Publishing co.: 218-280

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 1999. *Current protocols in molecular biology*. New York, John Willey&Sons. Inc: 202-202

Avčin A. 1987. Vodno življenje in njegov pomen. Sečoveljske soline včeraj – danes – jutri, Katalog k razstavi. Piran, Pomorski muzej »Sergej Mašera« Piran: 27-29

Chin-Leo G., Kirchman D.L. 1988. Estimating bacterial production in marine waters from the simultaneous incorporation of thymidine and leucine. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 8: 1934-1939

Cole J.J., Findlay S., Pace M.L. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Marine Ecology Progress Series*, 43: 1-10

Črnigoj M. 2003. Osamitev in filogenetska analiza halofilnih arhej iz Sečoveljskih solin. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 145 str.

Das Sarma S., Arora P. 2001. Halophiles. Encyclopedia of life science. Massachusetts, Nature Publishing Group. (2001)

<http://www.els.net> (31.03.2005): 9 str.

Davis J.S. 2000. Structure, function, and management of the biological system for seasonal solar saltworks. *Global Nest: the International Journal*, 2, 3: 217-226

Dunbar J., Ticknor L. O., Kuske C. R. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1: 190-197

Fuhrman J.A., Azam F. 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 6: 1085-1095

Fuhrman J.A., Azam F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Marine Biology*, 66: 109-120

Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. 2005. Mikrosafari. Čudoviti svet mikroorganizmov solin. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 160 str.

Holm-Hansen O., Lorenzen C.J., Holmes R.W., Strickland J.D.H. 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *Journal du Conseil Permanent pour International l'Exploration de la Mer*, 30: 3-15

Javor B. 1989. Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry. Berlin, Springer: 328 str.

Jerman I., Štern A. 1999. Molekulska evolucija. Ljubljana, Knjižna zbirka Scripta, Študentska založba: 129 str.

Kirchman D., K'Neas E., Hodson R. 1985. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 3: 599-607

Kirchman D.L. 1990. Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter in the subarctic Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 62: 47-54

Liu W.-T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L. J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63,11: 4516-4522

Likar M. Leksikoni Cankarjeve založbe. Mikrobiologija. Ljubljana, Cankarjeva založba: 379-379

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9th ed. New Jersey, Prentice-Hall: 156-157

Ogorelec B., Mišič M., Šercelj A., Cimerman F., Faganeli J., Stegnar P. 1981. Sediment sečoveljske soline. *Geologija – razprave in poročila*, 24, 2: 179-216

Ogorelec B. 1985. Sečoveljske soline v očeh geologa. *Proteus*, 48: 93-98

Osborn A. M., Moore E. R. B., Timmis K. N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2, 1: 39-50

Oren A. 1990. Thymidine incorporation in saltern ponds of different salinities: estimation of in situ growth rates of halophilic archaeobacteria and eubacteria. *Microbial Ecology*, 19:43-51

Oren A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63,2: 334-348

Oren A., Rodriguez-Valera F. 2001. The contribution of halophilic bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiology Ecology*, 36: 123-130

Oren A. 2002. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 39: 1-7

Oren A., Mana L. 2003. Sugar metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiology Letters*, 223: 83-87

Pedros-Alio C., Calderon-Paz J.I., MacLean M.H., Medina G., Marrase C., Gasol J.M., Guixa-Boixereu N. 2000. The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 143-155

Porter K.G., Feig Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting the aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*. 25, 943-948.

Rodriguez-Valera F., Ruiz-Berraquero F., Ramos-Cormenzana A. 1981. Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microbial Ecology*, 7:235-243

Rodriguez-Valera F., Ventosa A., Juez G., Imhoff J.F. 1985. Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microbial Ecology*, 11:107-115

Schneider J., Herrmann A.G. 1979. Saltworks – natural laboratories for microbiological and geochemical investigations during the evaporation of seawater. V: Fifth International Symposium on Salt, May 29 – June 1, 1979, Hamburg, Germany. Coogan A.H., Hauder L.(eds.). Cleveland, Northern Ohio Geological Society: 371-381

Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 2:504-544

Zalar P. 1999. Halofilne črne kvasovke v vodah solin. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 96 str.

Žagar Z. 1985. Solinarstvo v Sloveniji. *Proteus*, 48: 90-92

ZAHVALA

Hvala mentorju prof. dr. Davidu Stoparju za koristne nasvete in vso pomoč pri nastajanju naloge.

Hvala somentorici doc. dr. Valentini Turk za pripravljenost sodelovati pri nastajanju naloge in za vso pomoč, še posebej za opravljene meritve prokariontske aktivnosti.

Hvala prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za pregled diplomske naloge.

Hvala dr. Blažu Stresu za njegove ideje in pomoč pri določanju strukture prokariontske združbe.

Hvala podjetju Pridelava soli, d.o.o, da mi je omogočilo vzorčenje na solinskih bazenih, še posebej hvala g. Damirju Čendaku za koristne informacije.

Hvala g. Andreju Razpetu za izvedbo kapilarne elektroforeze.

Hvala vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo, ki so mi pomagali, da sem se znašla v laboratoriju in da je čas hitreje minil. Še posebej hvala Barbari Kraigher za vztrajno brskanje po zamrzovalniku in Simoni Leskovec za njene zlate rezerve.

Hvala vsem zaposlenim na Morski biološki postaji v Piranu. Še posebej gospema Silvi Maslo in Almi Hvala.

Hvala vsem mojim domačim za pomoč in vzpodbudo skozi celoten študij.

Hvala mojemu Petru!

PRILOGE

Priloga A: Vremenske razmere in podatki o dolivanju vode v solinske bazene za obdobje od 1.6.2005 do 08.09.2005 (Vir: Meteorološka postaja Letališče Portorož v Sečovljah in Soline, Pridelava soli d.o.o).

Dan	Opis vremena	Padavine (mm)	Max T zraka (°C)	Sončno obsevanje (h)	Nalivanje vode v bazene*
01.06.2005	zvečer rosa	1,1	28,7	13,0	/
02.06.2005	zjutraj rosa	0	29,1	13,2	/
03.06.2005	sončno	0	28,5	13,8	/
04.06.2005	zvečer ploha	0	27,0	10,1	/
05.06.2005	plohe, dež, nevihte	16,2	27,0	0	/
06.06.2005	zjutraj nekaj dežja, zvečer rosa	0,3	25,1	6,7	/
07.06.2005	zjutraj rosa, zvečer nekaj dežja	0,4	25,5	8,4	/
08.06.2005	sončno	0	26,2	12,1	/
09.06.2005	sončno	0	25,0	9,0	A, C-E
10.06.2005	sončno	0	24,8	13,5	A, C-E
11.06.2005	sončno	0	26,2	7,4	A, C-E
12.06.2005	sončno	0	25,5	7,2	A, B, C-E
13.06.2005	zjutraj krat.ploha	0,1	25,3	11,5	A, B, C-E
14.06.2005	zjutraj rosa, pop. ploha, dež	1,7	27,2	3,3	A, B, C-E
15.06.2005	zjutraj nekaj dežja, zvečer rosa	0	25,8	12,4	A, B, C-E
16.06.2005	zjut. rosa, pop. nevihte, plohe, toča	20,0	26,0	7,8	A, C-E
17.06.2005	zjutraj rosa	0	26,3	13,5	B, C-E
18.06.2005	zjutraj rosa	0	18,5	6,5	C-E
19.06.2005	zvečer rosa	0	20,6	13,7	A, C-E
20.06.2005	zjutraj rosa	0	19,5	14,1	A, C-E
21.06.2005	sončno	0	20,9	13,8	A, C-E
22.06.2005	sončno	0	22,3	10,5	A, C-E
23.06.2005	sončno	0	24,2	13,9	A, C-E
24.06.2005	zjutraj rosa	0	22,6	12,2	B, C-E
25.06.2005	zvečer krat.ploha	0	22,6	12,3	A, C-E
26.06.2005	zjutraj krat.nevihta	0,2	23,6	13,4	B, C-E
27.06.2005	sončno	0	23,6	12,7	B, C-E
28.06.2005	sončno	0	22,3	12,3	C-E
29.06.2005	zvečer nevihte,ploha	16	22,2	8,8	A, C-E
30.06.2005	sončno	0	20,6	13,3	C-E
01.07.2005	dež,nevihte	9,9	26,2	3,3	B, C-E
02.07.2005	sončno	0	27,0	14,0	B
03.07.2005	sončno	0	28,5	14,4	B
04.07.2005	sončno	0	28,5	11,6	A
05.07.2005	močne plohe, nevihte	34,1	26,0	2,7	/
06.07.2005	sončno	0	25,3	14,7	C-E
07.07.2005	zjutraj rosa, zvečer nevihta	0	26,2	3,8	C-E

nadaljevanje priloga A: Vremenske razmere in podatki o dolivanju vode v solinske bazene za obdobje od 1.6.2005 do 08.09.2005 (Vir: Meteorološka postaja Letališče Portorož v Sečovljah in Soline, Pridelava soli d.o.o).

Dan	Opis vremena	Padavine (mm)	Max T zraka (°C)	Sončno obsevanje (h)	Nalivanje vode v bazene*
08.07.2005	plohe, dež, nevihte	10,8	24,6	9,6	C-E
09.07.2005	plohe, dež, nevihte	2,9	24,7	6,8	B, C-E
10.07.2005	zjutraj rosa, zvečer nevihta	0	26,1	9,7	C-E
11.07.2005	zjut. krat. ploha, zvečer rosa	0	27,1	6,6	C-E
12.07.2005	kratkotrajne plohe	0	24,5	0,2	A, C-E
13.07.2005	zvečer nevihta	0	27,6	11,9	C-E
14.07.2005	sončno	1,6	28,3	12,9	C-E
15.07.2005	sončno	0	31,0	12,9	C-E
16.07.2005	zjutraj rosa	0	30,8	11,2	C-E
17.07.2005	zjutraj rosa	0	29,4	12,1	C-E
18.07.2005	zjutraj rosa, zvečer nevihta	0	32,0	11,5	C-E
19.07.2005	zjut. nevihta, ploha	3,2	28,3	10,7	C-E
20.07.2005	zjutraj rosa	0	29,2	11,1	C-E
21.07.2005	sončno	0	30,0	10,2	C-E
22.07.2005	zvečer krat. dež	0	29,1	12,0	C-E
23.07.2005	dop. dež, plohe, nevihte	0,1	27,5	10,1	C-E
24.07.2005	zjut. in zvečer rosa	0	27,2	12,7	C-E
25.07.2005	zjut. in zvečer rosa	0	28,6	12,9	C-E
26.07.2005	zjut. in zvečer rosa	0	31,4	11,4	C-E
27.07.2005	zjutraj rosa	0	32,1	13,5	C-E
28.07.2005	sončno	0	32,0	13,2	C-E
29.07.2005	sončno	0	33,1	12,0	C-E
30.07.2005	sončno	0	34,6	12,5	C-E
31.07.2005	sončno	0	32,6	13,5	C-E
01.08.2005	sončno	0	31,9	13,7	C-E
02.08.2005	pop. krat. nevihta	0,3	32,9	7,9	C-E
03.08.2005	dež, nevihte	6,7	24,5	0,8	C-E
04.08.2005	plohe in nevihte	15,6	26,6	4,9	C-E
05.08.2005	sončno, zjut. rosa	0,4	26,5	13,5	C-E
06.08.2005	zjutraj rosa	0	26,1	9,1	C-E
07.08.2005	plohe in nevihte	17,5	20,5	1,3	C-E
08.08.2005	zjutraj rosa	0	23,4	13,7	C-E
09.08.2005	zjutraj rosa	0	24,6	12,7	C-E
10.08.2005	zjutraj rosa	0	26,9	6,1	C-E
11.08.2005	nevihte, plohe	0,3	27,1	3,5	C-E
12.08.2005	nevihte, plohe	7,7	25,6	5,4	C-E
13.08.2005	zjut. in zvečer rosa	0	27,2	12,3	C-E
14.08.2005	nevihte, dež	0,7	26,7	9,0	C-E
15.08.2005	dež, plohe	19,9	20,9	0,3	C-E
16.08.2005	zjut. nekaj dežja, zvečer rosa	2,2	22,5	6,2	C-E

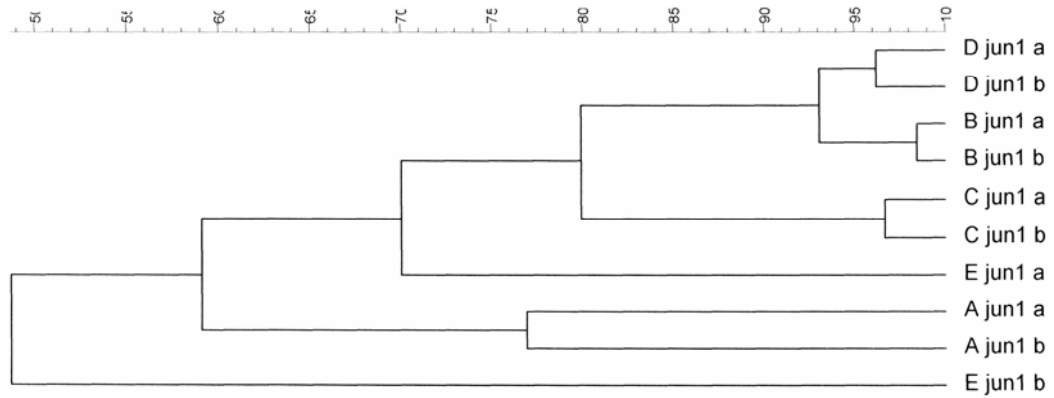
nadaljevanje priloga A: Vremenske razmere in podatki o dolivanju vode v solinske bazene za obdobje od 1.6.2005 do 08.09.2005 (Vir: Meteorološka postaja Letališče Portorož v Sečovljah in Soline, Pridelava soli d.o.o).

Dan	Opis vremena	Padavine (mm)	Max T zraka (°C)	Sončno obsevanje (h)	Nalivanje vode v bazene*
17.08.2005	zjut. in zveč. rosa	0	25,6	8,8	C-E
18.08.2005	zjut. in zveč. rosa	0	26,1	11,3	C-E
19.08.2005	zjut. in zveč. rosa	0	27,0	12,7	C-E
20.08.2005	pop. nevihte, plohe	0	27,6	6,2	C-E
21.08.2005	dež, plohe, nevihte	42,6	22,7	0,6	C-E
22.08.2005	zjut. dež, pop. krat. plohe	3,8	21,7	0,7	C-E
23.08.2005	zjut. nekaj dežja, zveč. rosa	1,6	23,0	8,2	C-E
24.08.2005	zjut. nekaj dežja, zveč. rosa	0	26,1	10,7	C-E
25.08.2005	zjut. in zveč. rosa	0	26,5	10,3	C-E
26.08.2005	zjut. in zveč. rosa	0	26,6	7,7	C-E
27.08.2005	zjut. in zveč. rosa, vmes nekaj dežja	0	26,0	3,7	C-E
28.08.2005	plohe, nevihte	32,7	24,5	1,5	C-E
29.08.2005	zvečer rosa	0	28,6	12,3	C-E
30.08.2005	zjutraj in zvečer rosa	0	30,0	12,4	C-E
31.08.2005	zjutraj in zvečer rosa	0	30,1	10,8	C-E
01.09.2005	zjutraj in zvečer rosa	0	28,7	11,2	C-E
02.09.2005	zjutraj in zvečer rosa	0	29,1	9,9	C-E
03.09.2005	zjut. in zvečer rosa, pop. krat. ploha	0	28,5	3,8	C-E
04.09.2005	zjutraj in zvečer rosa	0	27,0	9,1	C-E
05.09.2005	zjutraj in zvečer rosa	0	27,0	11,3	C-E
06.09.2005	zjutraj in zvečer rosa	0	25,1	11,5	C-E
07.09.2005	zjut. in zvečer rosa, pop. krat. ploha	0	25,5	5,8	C-E
08.09.2005	zjut. in zvečer rosa, pop. krat. ploha	0	26,2	7,1	C-E

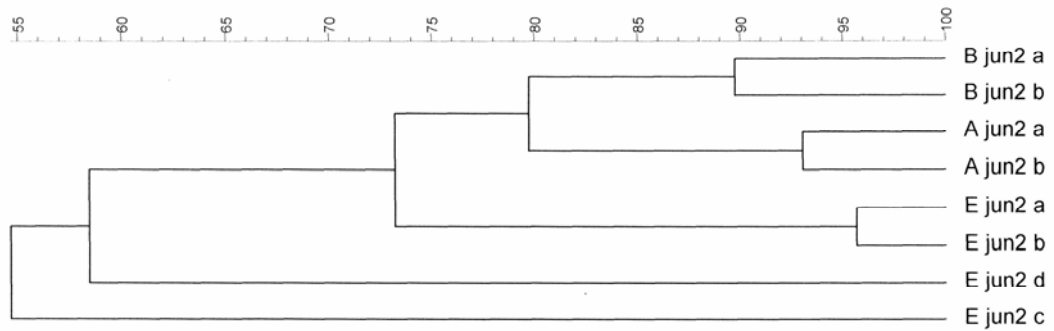
* A – dolivanje v bazen A; B – dolivanje v bazen B; C-E – dolivanje v kristalizacijske bazene.

Priloga B: Dendrogrami po posameznih vzorčenjih.

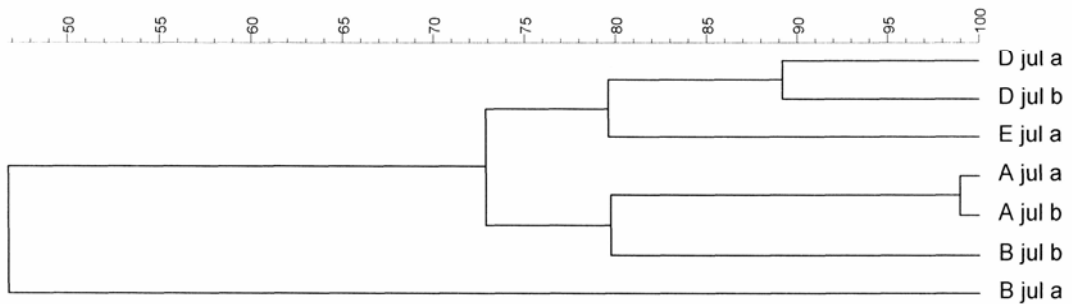
Odstotek podobnosti med bazeni, vzorčenje 14.06.2005



Odstotek podobnosti med bazeni, vzorčenje 28.06.2005

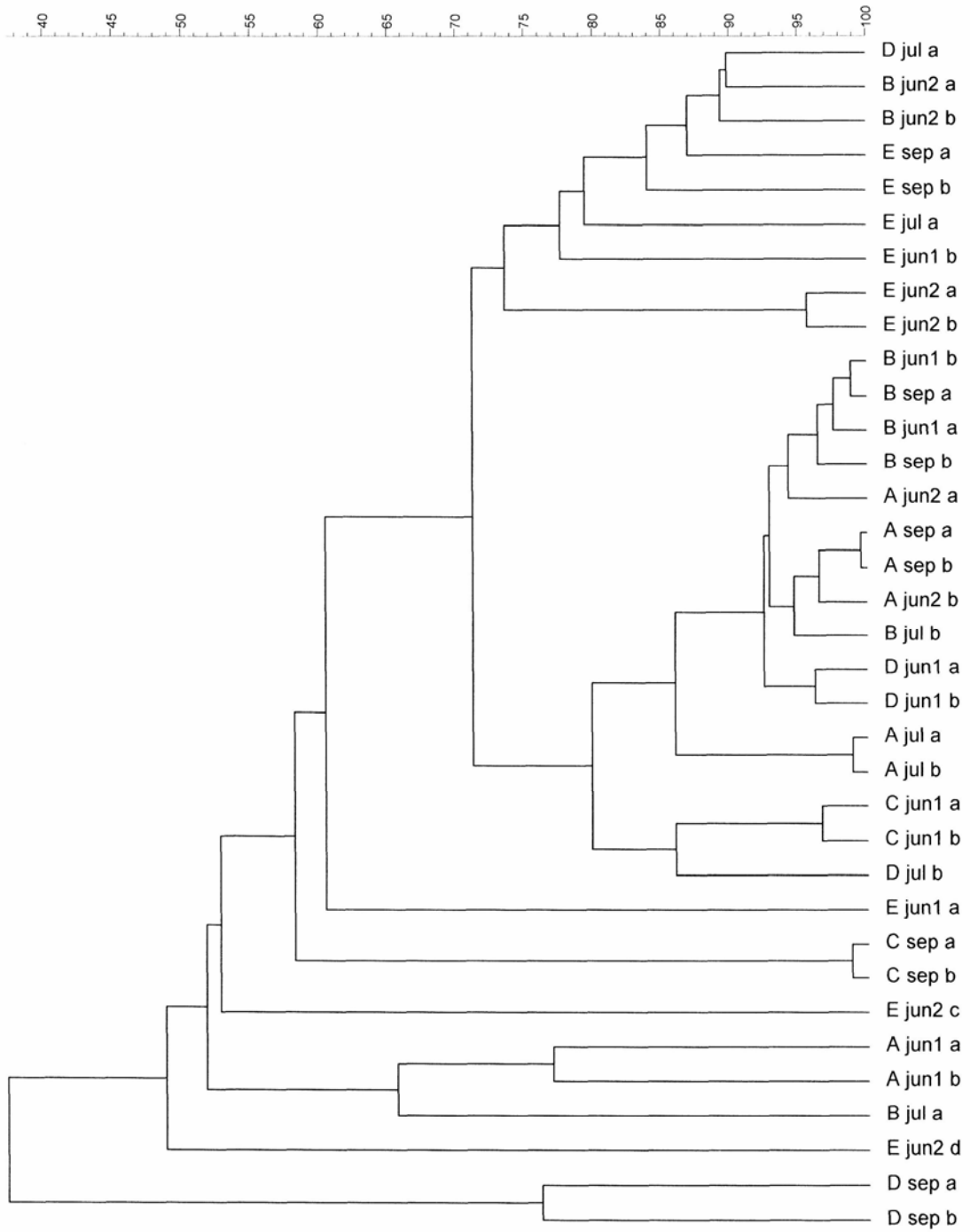


Odstotek podobnosti med bazeni, vzorčenje 07.07.2005



Priloga C: Dendrogram vseh vzorčenj skupaj.

Odstotek podobnosti med bazeni vseh vzorčenj

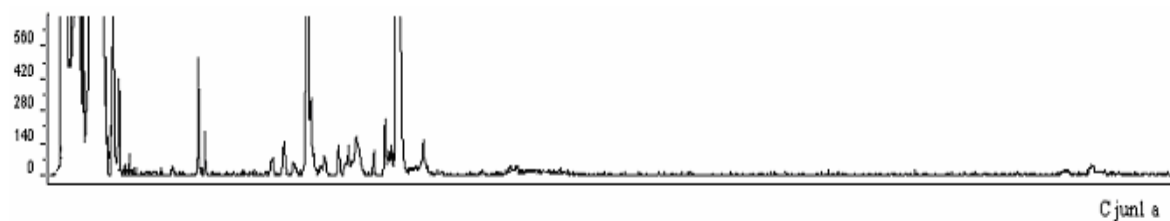
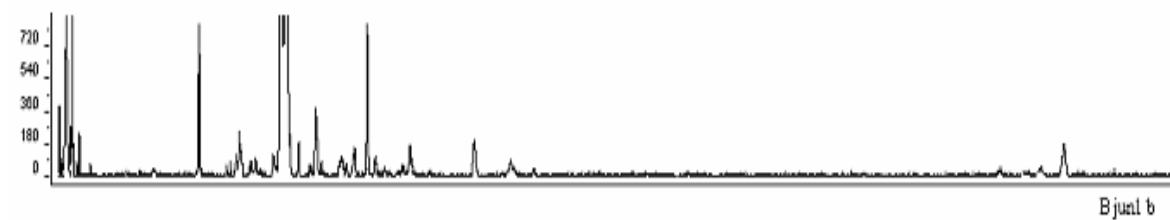
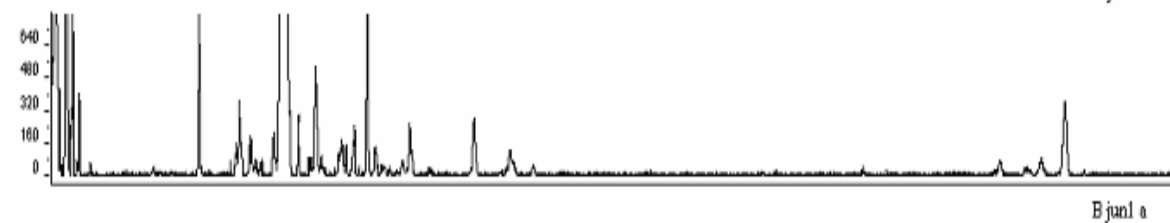
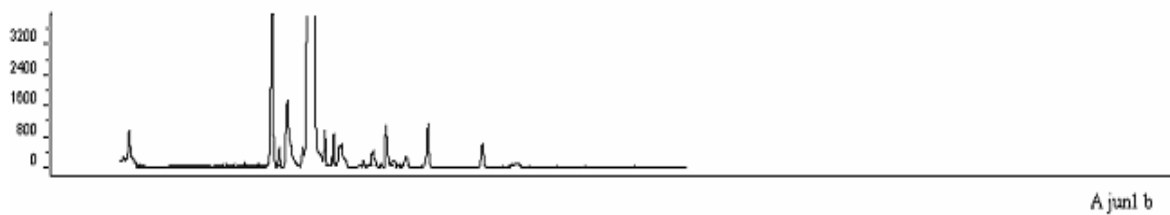
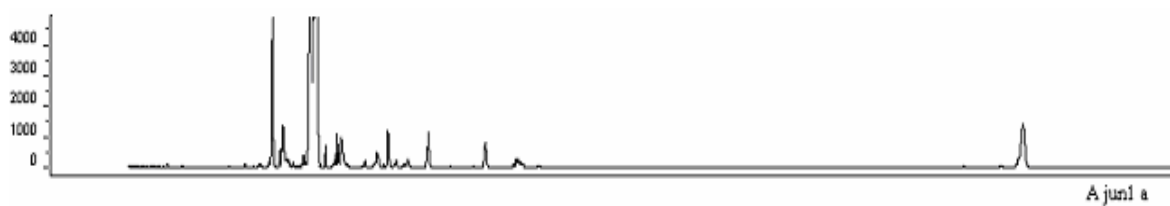


Priloga D: Zbirka vseh meritev po vzorčenjih in bazenih.

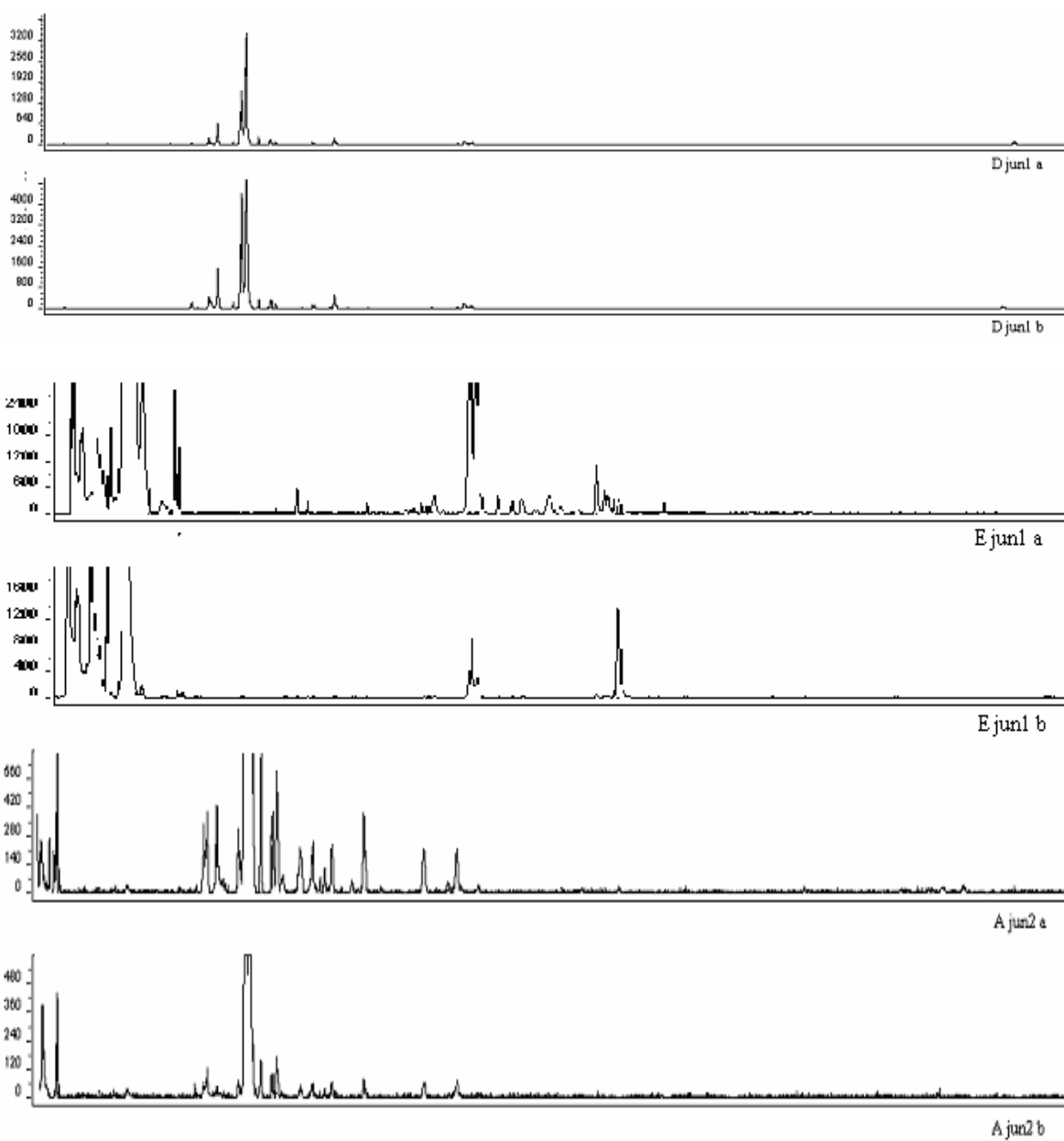
Datum vzorčenja	Bazen	Temp. (° C)	Slanost (‰)	Vrednost pH	Klorofil (µg/l)	Prokariontska produkcija (št.celic/ml h)	Št. prok.celic/ml	Povp. št.taks.enot
14.06.2005	A	27	85	8,39	4,36	1,22E+05	1,20E+07	23
	B	26,5	120	8,28	14,82	1,44E+05	1,45E+07	19,5
	C	27	140	8,45	18,58	3,74E+04	1,76E+07	8
	D	27	150	8,51	17,39	4,54E+04	9,67E+06	11
	E	27	170	8,57	16,35	3,43E+04	1,19E+07	11
28.06.2005	A	33	105	8,45	8,5	/	2,72E+07	16,5
	B	34	220	7,68	44,85	/	1,87E+07	1
	C	34,5	250	7,57	11,55	/	1,53E+07	/
	D	36	350	7,13	10,68	/	1,30E+07	/
	E	36	370	7,12	27,25	/	1,08E+07	8
07.07.2005	A	22	100	8,61	/	1,23E+05	1,92E+07	5
	B	22	155	7,87	/	1,86E+05	1,75E+07	5,5
	C	24	180	7,73	/	1,46E+05	9,53E+06	/
	D	24	180	7,6	/	9,42E+04	1,20E+07	1,5
	E	24	210	7,54	/	4,87E+04	1,24E+07	15*
08.09.2005	A	26	100	8,62	92,34	1,01E+06	6,10E+07	7,5
	B	24,5	120	8,93	165,34	1,53E+06	7,01E+07	8
	C	27	170	8,31	187,64	3,42E+05	6,03E+07	5
	D	28,5	250	7,7	161,6	2,63E+04	6,84E+07	3
	E	28	300	7,35	313,61	1,71E+04	8,35E+07	2

* vrednost ene meritve, ni povprečje

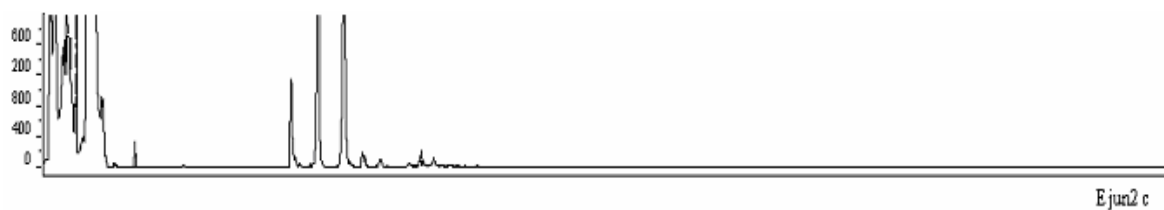
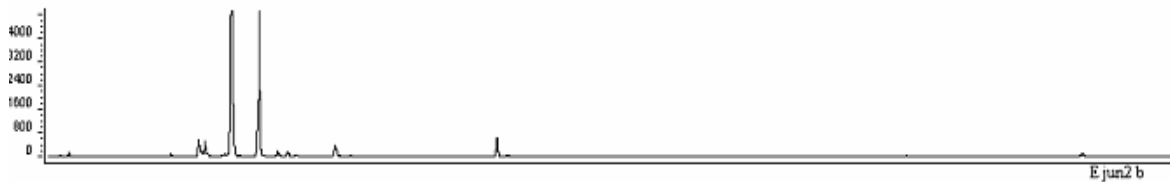
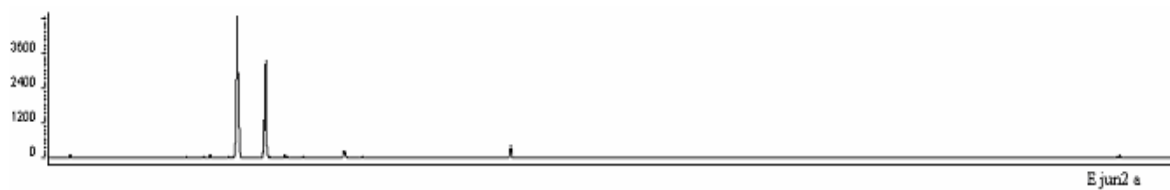
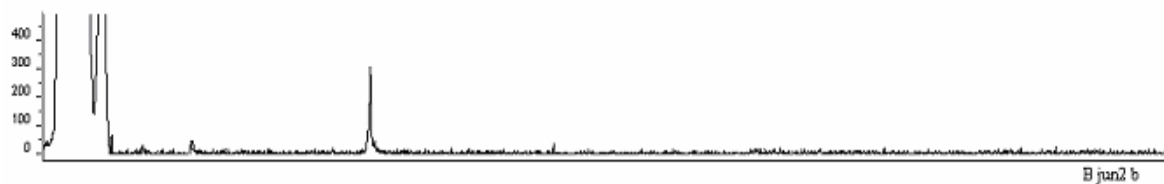
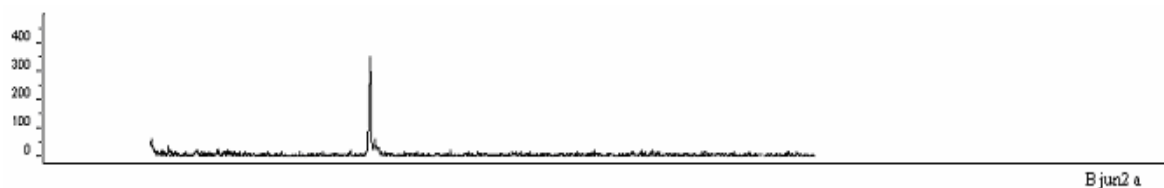
Priloga E: Elektroferogrami vseh vzorčenj skupaj.



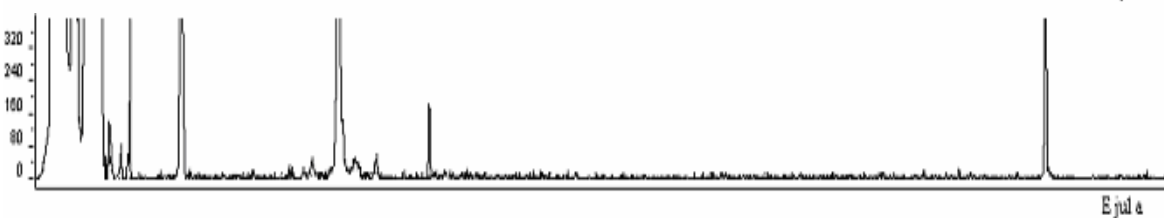
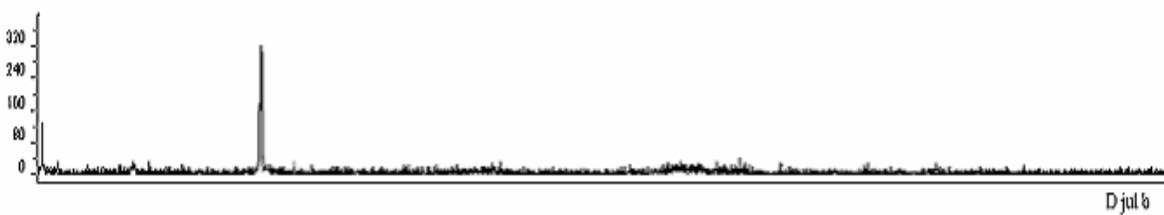
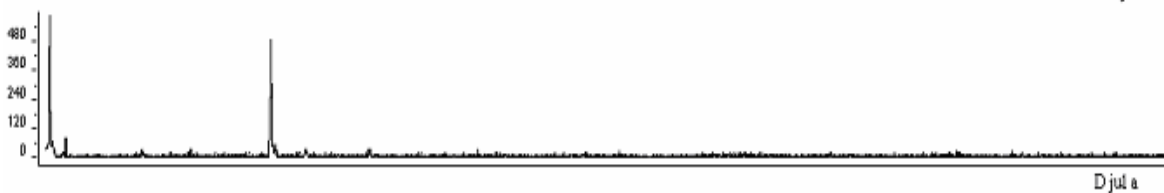
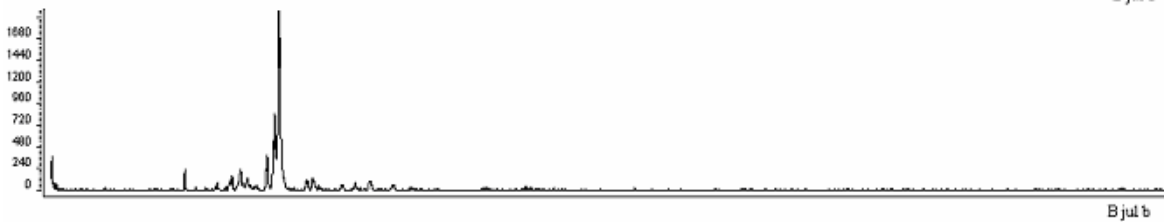
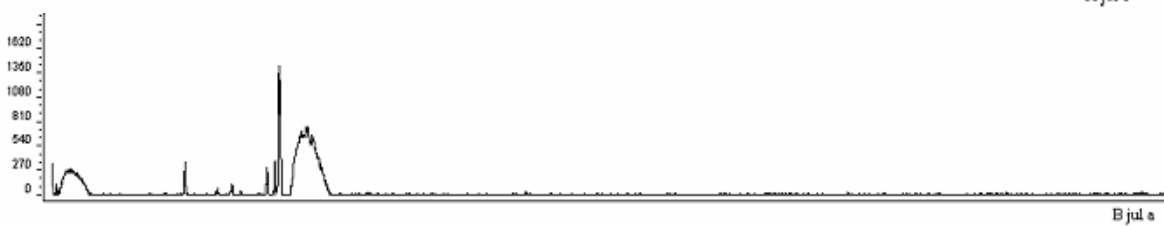
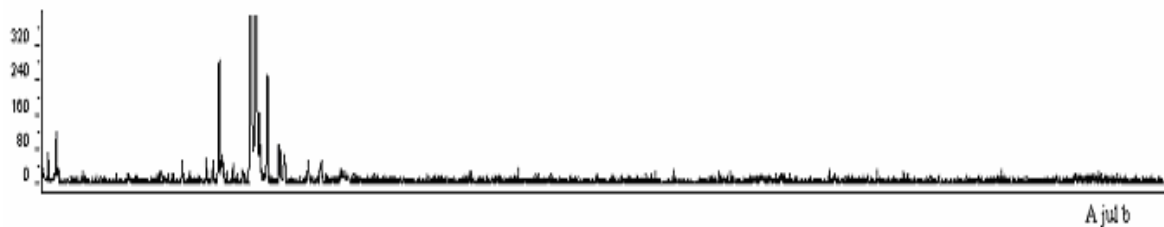
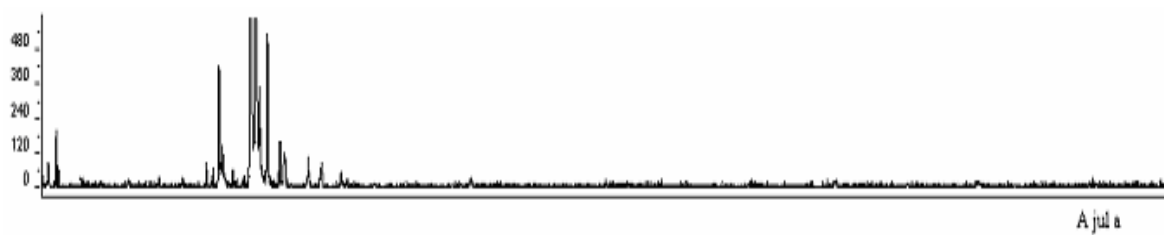
nadaljevanje priloga E: Elektroferogrami vseh vzorčenj skupaj.



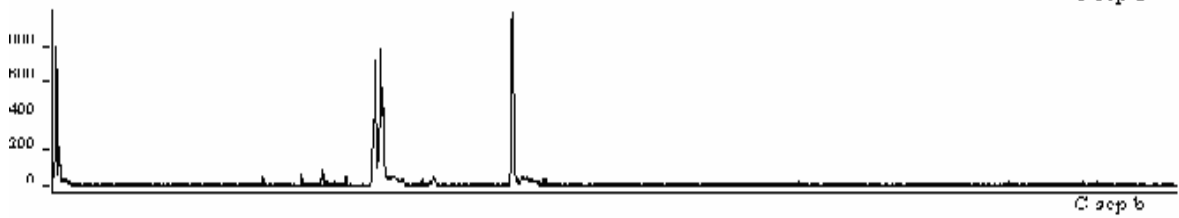
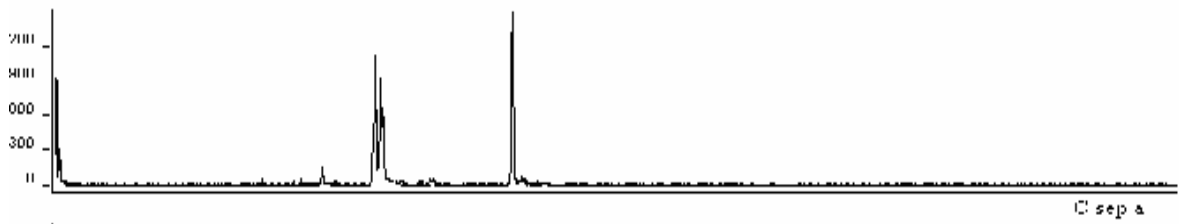
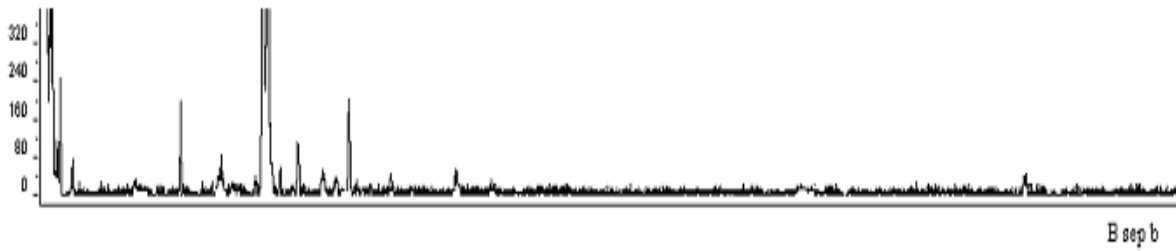
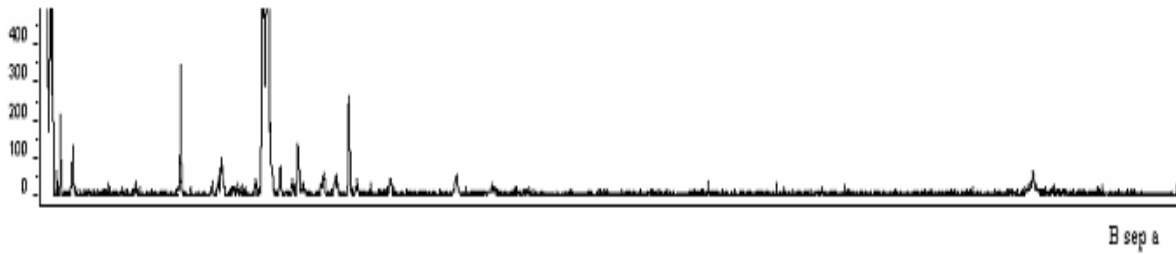
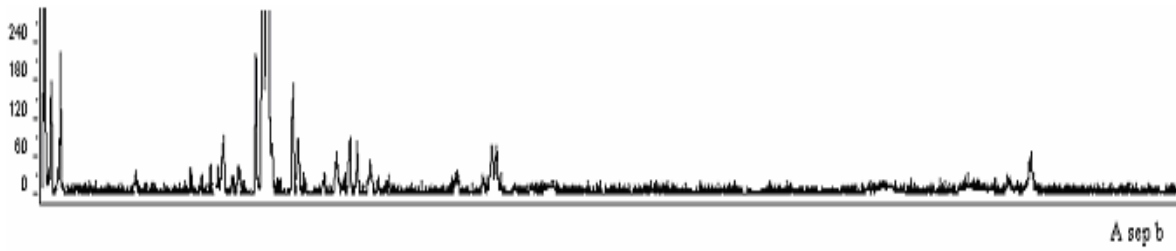
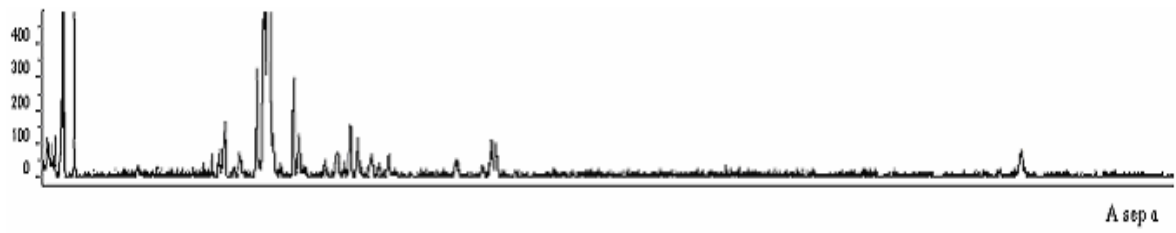
nadaljevanje priloga E: Elektroferogrami vseh vzorčenj skupaj.



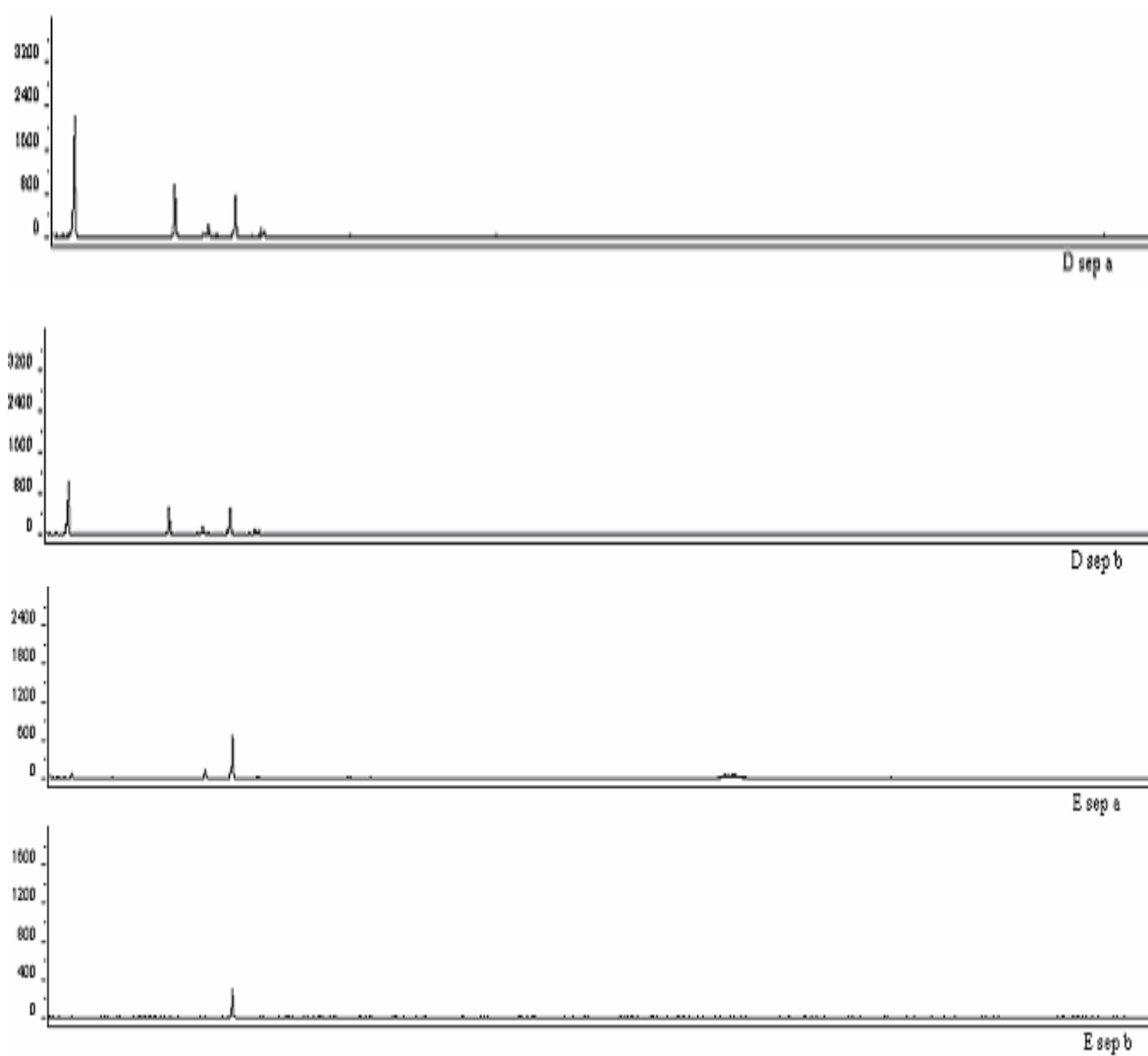
nadaljevanje priloga E: Elektroferogrami vseh vzorčenj skupaj.



nadaljevanje priloga E: Elektroferogrami vseh vzorčenj skupaj.



nadaljevanje priloga E: Elektroferogrami vseh vzorčenj skupaj.



Priloga F: Spremembe slanosti in razlika v strukturi med bazenoma.

Vzorčenje		Sprememba	Razlika v strukturi
-----------	--	-----------	---------------------

	Bazeni	slanosti (‰)	prokariontske združbe med bazenoma (%)
14.06. 2005	A:B	35	57,23
	B:C	20	35,25
	C:D	10	33
	D:E	20	77,47
28.06. 2005	A:B	115	23,34
07.07. 2005	A:B	55	72,48
	D:E	30	29,97
08.09.2005	A:B	20	8,78
	B:C	50	79
	C:D	80	99,34
	D:E	50	86,14