

Mikroorganizmi petole in solinskega blata iz Sečoveljskih solin



Urška Jelenovec, Mojca Juteršek, Jakob Mraz, Vida Štrancar,
Martin Tomažič, Aleksandra Uzar, Lana Vogrinec,
Neli Glavaš, Katja Klun, Marko Dolinar

Ljubljana, 2022

Urednik biltena: prof. dr. Marko Dolinar

Izdala in založila Katedra za biokemijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

Ljubljana, 2022

Oblikovanje: prof. dr. Marko Dolinar

1. spletna izdaja, 2022

Dostopna na <http://web.fkkt.uni-lj.si/biokemija/petola18.pdf>

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

[COBISS.SI-ID 123457283](https://nuk.ub.uni-lj.si/COBISS.SI-ID/123457283)

ISBN 978-961-7078-32-9 (PDF)

Bilten predstavlja pregled stanja in nova spoznanja, ki so rezultat raziskovalnega projekta Mikroorganizmi petole in solinskega blata iz Sečoveljskih solin. Projekt je potekal v obdobju marec – julij 2018 in je bil financiran v okviru javnega razpisa

»Projektno delo z gospodarstvom in negospodarstvom v lokalnem in regionalnem okolju - Po kreativni poti do znanja 2017 - 2020, 1. odpiranje«. Sofinancirali sta ga Republika Slovenija in Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada.

Poleg avtorjev biltena, med katerimi so tudi trije mentorji, sta za uspeh projekta zaslužni tudi delovna mentorica dr. Tinkara Tinta z Morske biološke postaje Nacionalnega inštituta za biologijo, ki je sodelovala pri projektu prve tri mesece, in pedagoška mentorica doc. dr. Marina Klemenčič s Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Hvala vodstvu podjetja »SOLINE Pridelava soli, d.o.o.«, da nam je omogočilo delo na kristalizacijskem bazenu, ter solinarjem za posredovanje informacij o postopkih dela, ki so pomembni za ohranjanje petole. Prav tako se zahvaljujemo vsem sodelujočim organizacijam za dostop do raziskovalne opreme, še posebej Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, kjer je potekala večina eksperimentalnega dela, in Nacionalnem inštitutu za biologijo – Morski biološki postaji, kjer smo opravili več mikrobioloških, molekularnobioloških in kemijskih analiz.

Predgovor

Sečoveljske soline predstavljajo izjemen ekosistem severnega Jadrana, kjer se v velikem delu naravno mokrišče stika s področjem aktivne pridelave soli. Solinarstvo ima v Sloveniji dolgo zgodovino, v kateri se je ključni preobrat v načinu dela zgodil v 14. stoletju. Takrat so uvedli nov postopek priprave dna kristalizacijskih bazenov, pri katerem dno sestavlja mineralizirana mikrobná preproga, imenovana petola, v kateri prevladujejo nitaste cianobakterije. Petolo solinarji vsako pomlad premažejo s tanko plastjo blata iz solinskih kanalov, kar imenujejo 'konciranje'. Sprva je veljalo prepričanje, da je namen konciranja vnos hranilnih snovi, ki omogočijo, da po zimskem mirovanju cianobakterije ozelenijo in s tem okrepijo mikrobnó preprogo, druga možna razlaga pa bi bila, da z blatom v petolo pridejo žive cianobakterije, ki nadomestijo tiste, ki so čez zimo odmrle. Nedavne raziskave pa nobene od teh dveh hipotez niso potrdile.

Pomena konciranja ne razumemo dovolj dobro. Je del več kot 600-letne tradicije in velja za nujni del tradicionalne pridelave soli. Ni pa znano, ali je pomembno, iz katerih kanalov je blato za konciranje, niti to, kako blato v kristalizacijskih bazenih deluje na petolo. Kemijske analize namreč niso pokazale, da bi bilo bogato s snovmi, ki pospešujejo rast cianobakterij. Zato je bil osnovni cilj projekta natančneje spoznati sestavo petole in solinskega blata, hkrati pa ugotoviti, ali na področju solin najdemo kakšne mikroorganizme, ki bi bili zanimivi za izrabo na primer za pripravo kozmetičnih ali farmacevtskih preparatov. Nekatere pozitivne lastnosti solinskega blata so že znane, s projektom pa smo želeli preveriti še, če ima blato morda kakšne protimikrobne učinke.

Projektno skupino je sestavljalo 7 študentov in 5 mentorjev. Med študenti so prevladovali biokemiki, en študent je bil kemik, en pa mikrobiolog, kar kaže na interdisciplinarnost projekta. Tudi mentorji smo bili z različnimi strokovnimi ozadji: dve kemičarki, dve biokemičarki in en biolog. To je omogočilo timsko delo in dopolnjevanje znanj, za študente pa širitev obzorij in spoznavanje z raziskovalnim in terenskim delom, pa tudi spoznavanje s problematiko gospodarske družbe, v našem primeru podjetja Soline iz Seče pri Portorožu.

Projekt je trajal 5 mesecev, od marca do julija 2018, in je zajemal celoten proizvodni cikel v solinah, od priprave kristalizacijskih bazenov do pobiranja soli. V tem času smo izvedli 4 vzorčenja na bazenu št. 10, ki ga je vodstvo solin namenilo za raziskavo. Bazen je bil razdeljen na štiri četrtine, ki smo jih spremljali ločeno. Tri četrtine so bile premazane s tremi različnimi blati, ena četrtina pa ni bila premazana.

Bilten je sestavljen tako, da smo najprej ozadje projekta predstavili mentorji, v nadaljevanju pa je vsak od sodelujočih študentov opisal metode in rezultate lastnega raziskovalnega dela v okviru projekta. S tem smo pripravili razširjeno poročilo o izvedenem projektu, ki bo lahko v pomoč pri morebitnem nadaljevanju projekta v kakšnih drugačnih okvirih, hkrati pa bo morda služilo tudi podjetju Soline pri razmisleku o morebitnih spremembah postopkov dela in širitvah proizvodnega programa. Za hitro seznanitev s ključnimi rezultati si lahko preberete le razširjeni povzetek na naslednjih straneh, če pa vas zanimajo podrobnosti, poiščite ustrezna poglavja v kazalu.

Uradni izid biltena kasni predvsem zato, ker smo del raziskav vključili v znanstveni članek, ki je izšel šele leta 2021 v reviji *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. Ker je pogoj za objavo, da delo predhodno še ni bilo predstavljeno, smo z izidom biltena morali počakati.

Marko Dolinar

Kazalo

Razširjeni povzetek projekta (Marko Dolinar)	7
Predstavitev projektne skupine	9
Pridelava soli na področju Jadranskega morja in pomen Sečoveljskih solin (Marko Dolinar)	11
- Kratek zgodovinski oris	11
- Proizvodnja soli ob Jadranu danes	13
- Sečoveljske soline kot izjemen ekosistem severnega Jadrana	18
Vloga petole in solinskega blata v procesu tradicionalne pridelave soli (Neli Glavaš)	21
Kemijske značilnosti petole in solinskega blata (Katja Klun)	25
Elementna analiza solinskega blata in petole ter določanje slanosti (Martin Tomažič)	27
- Določanje slanosti	27
- Vzorčenje na solinah	28
- Elementna analiza	28
- FT-IR spektroskopija	29
Določanje stabilnosti eksogene DNA v solinskem blatu (Lana Vogrinec)	33
- Eksperimentalni sistem	33
- Izolacija zunajcelične DNA	34
- Rezultati	34
Določevanje mikrobne raznolikosti solinskih vzorcev z uporabe verižne reakcije s polimerazo (Vida Štrancar)	37
- Izolacija DNA iz solinskih blat in petole	37
- Pomnoževanje vrstnospecifičnega zaporedja rDNA 16 S	38
- Analiza pomnoženih fragmentov z metodo DGGE	39
- Pomnoževanje cianobakterijskih in algnih regij ITS	40
- Pomnoževanje ITS-regij mikroorganizmov iz različnih solinskih vzorcev	42
- Preverjanje čistosti kulture cianobakterije <i>Coleofasciculus chthonoplastes</i>	44
Prepoznavanje solinskih mikroorganizmov na osnovi morfoloških lastnosti in značilnih zaporedij DNA (Mojca Juteršek)	47
- Vzorec zelene makroalge z roba kristalizacijskega bazena	47
- Vzorec rožnato obarvane vode na robu kristalizacijskega bazena	48
- Vzorec rdeče obarvanih luž na strehi zalogovnika za blato pri skladišču soli	51
- Vzorci v laboratoriju gojene petole	52
Fiziološke in morfološke spremembe mikroorganizmov petole v spreminjajočih se rastnih pogojih (Jakob Mraz)	59
Rast cianobakterije <i>Coleofasciculus chthonoplastes</i> in gojenje mikroorganizmov solinskega blata (Aleksandra Uzar)	67
- Gojenje fotoavtotrofov iz solinskega blata	68
- Analiza delovanja antibiotikov na solinske mikroorganizme	71
Protimikrobni učinki solinskega blata (Urška Jelenovec)	75
Zaključek (Marko Dolinar)	83

Razširjeni povzetek projekta

Marko Dolinar

Projekt "Mikroorganizmi petole in solinskega blata iz Sečoveljskih solin" je bil petmesečni študentski projekt, ki je trajal od začetka marca do konca julija 2018. Pri izvedbi je poleg 7 študentov Univerze v Ljubljani sodelovalo 5 pedagoških in delovnih mentorjev.

V središču raziskovanje je bila petola, mineralizirana mikrobnna podlaga solinskih bazenov, v katerih poteka kristalizacija soli. Petola je debela nekaj milimetrov in je večinoma sestavljena iz nitastih cianobakterij vrste *Coleofasciculus chthonoplastes*, v tej plasti pa najdemo tudi druge mikroorganizme. V času, ko je v bazenih koncentracija soli v vodi še nizka, cianobakterije rastejo in s tem obnavljajo petolo, ko koncentracija naraste, pa se rast ustavi in površina bazenov potemni, kar pomaga pri segrevanju vode in s tem pospešuje izhlapevanje.

V okviru projekta smo izvedli mikrobiološke in molekularnobiološke analize petole, pa tudi osnovne analize solinskega blata, ki ga solinarji uporabljajo za konciranje izparevalnih bazenov. Konciranje je postopek prekrivanja dna bazenov pred začetkom solinarske sezone. Plast blata je debela od nekaj mm do približno 1 cm, pomen te plasti v celotnem procesu priprave bazenov pa ni jasen. Pred desetletji so uporabljali za konciranje blato iz bližnjih kanalov, v zadnjem času pa uporabljajo blato iz večjih kanalov, povezanih z morjem. Pri tem ni jasno, ali so za obnavljanje petole vsa blata enakovredna. Nedavne analize slovenskih in francoskih raziskovalcev so pokazale, da so si blata po kemijski sestavi med seboj podobna, da ne vsebujejo izrazitih hranil za mikroorganizme in da ne vsebujejo cianobakterij *C. chthonoplastes*.

Vzorčenja smo opravili na kristalizacijskem bazenu št. 10, ki leži v osrednjem delu področja Lera v Sečoveljskih solinah. Bazen je bil pregrajen na dve polovici na enak način kot ostali aktivni bazeni. Vsako polovico smo brez vmesne pregrade razdelili še na dve manjši polji, tako da smo dobili štiri po površini enake dele bazena, ki smo jih označili s številkami 1 do 4 (slika 1). Prva četrtnina bazena je ostala nepremazana z blatom. Ta četrtnina naj bi odgovorila na vprašanje, ali je konciranje sploh pomembno za stabilnost petole. Druga četrtnina je bila premazana z blatom iz južnega kanala Lida, tretja z blatom iz severnega kanala Lida in četrta z blatom iz kanala Pichetto, ki je neposredno povezan z morjem. Če bi med blati bile bistvene razlike, bi to opazili v strukturi petole.



Slika 1: Razdelitev solinskega bazena na četrtine in premazi blat po četrtinah.

Ob vzorčenjih blata in petole smo izvedli tudi vzorčenja v drugih delih aktivnih solin, kjer se je pojavila rast mikroorganizmov, ki bi lahko bili zanimivi za razlago procesov ali za morebitno kasnejšo izolacijo bioaktivnih spojin.

Večino raziskovalnega dela smo opravili v laboratoriju. Tam smo gojili vzorčeno petolo – prekrito ali neprekrto z blatom –, ugotavljali smo prisotnost mikroorganizmov v blatu, preverjali smo stabilnost DNA v blatu, izvedli izolacijo DNA, testirali kemijske parametre petole in blata, poskusili izolirati mikroorganizme iz okoljskih vzorcev in določiti, kateri mikroorganizmi so prisotni v okolju, oceniti, kakšna je pestrost mikroorganizmov v teh vzorcih in ali ima solinsko blato kakšne protimikrobne učinke.

Na osnovi eksperimentalnega dela smo lahko podali več ugotovitev, ki predstavljajo nov doprinos k razumevanju vloge petole v postopku pridelave soli in za katere menimo, da predstavljajo dobro izhodišče za bolj natančne analize v naslednjih letih.

Ključni rezultati projekta so:

- Mikrobna sestava petole se s časom spreminja, kar je odraz spreminjajočih se razmer v kristalizacijskih bazenih.
- Kristalizacijski bazeni in ostalo področje Sečoveljskih solin so bogato nahajališče različnih mikroorganizmov, med katerimi so pomembne cianobakterije in alge. Ti mikroorganizmi bi lahko predstavljali nov vir surovin oz. molekul z visoko dodano vrednostjo.
- Izolacija DNA iz solinskega blata in petole je možna, izolirana DNA pa predstavlja predvsem DNA iz trenutno živečih organizmov, ne pa iz odmrlih.
- Iz izolirane DNA iz solinskega blata je mogoče pomnožiti odseke, ki so pomembni za oceno heterogenosti združb in za morebitno filogenetsko klasifikacijo. To pomeni, da bi v nadaljnjih raziskavah lahko heterogenost živih populacij določili le na podlagi značilnih zaporedij DNA.
- Blato za konciranje zavira razvoj ličink dvokrilcev, ki so prisotni v solinskih bazenih pred konciranjem. To v veliki meri razloži pomen konciranja, kar doslej ni bilo ustrezno razloženo.
- Ličinke trzač se pojavljajo v nepremazani petoli v izredno visokem številu in so zaradi objedanja cianobakterij sposobne uničiti strukturo petole. Ocenjena gostota ličink je 20.000 osebkov na kvadratni meter.
- Nepremazana petola postane bistveno bolj krhka in manj primerna za proizvodnjo soli kot premazana, pri čemer v prvi sezoni vir blata za trdnost petole ni pomemben. Ta rezultat potrjuje nujnost uporabe klasičnih postopkov pri pridobivanju soli.
- Kemijska sestava solinskega blata in petole se v teku solinarske sezone spreminja in je povezana z delovanjem mikroorganizmov. Potrdili smo predhodne rezultate in pomen kemijskih analiz za celovito razumevanje postopkov v solinah.
- Solinsko blato ne zavira rasti in razmnoževanja bakterij *Escherichia coli* niti *Streptococcus epidermidis*. Čeprav so preliminarni rezultati kazali na počasnejšo rast kvasovke *Candida albicans* v prisotnosti solinskega blata, kasnejši poskusi tega niso potrdili, bi pa bilo smiselno razširiti spekter tarčnih mikroorganizmov.

PREDSTAVITEV PROJEKTNE SKUPINE

status mentorjev in študentov se nanaša na datum prijave projekta

MENTORJI

Pedagoška mentorja:

izr. prof. dr. Marko Dolinar (vodja projekta), Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

asist. dr. Marina Klemenčič, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

Delovne mentorice:

dr. Neli Glavaš, SOLINE Pridelava soli, d.o.o.

dr. Tinkara Tinta, Morska biološka postaja Nacionalnega inštituta za biologijo (do 30.5.2018)

asist. dr. Katja Klun, Morska biološka postaja Nacionalnega inštituta za biologijo (od 1.6.2018)

ŠTUDENTI

Urška Jelenovec, študentka 1. letnika magistrskega študija biokemije

Mojca Juteršek, absolventka magistrskega študija biokemije

Jakob Mraz, študent 2. letnika univerzitetnega študija mikrobiologije

Vida Štrancar, študentka 3. letnika univerzitetnega študija biokemije

Martin Tomažič, študent 2. letnika univerzitetnega študija kemije

Aleksandra Uzar, absolventka univerzitetnega študija biokemije

Lana Vogrinec, študentka 3. letnika univerzitetnega študija biokemije

PRIDELAVA SOLI NA PODROČJU JADRANSKEGA MORJA IN POMEN SEČOVELJSKIH SOLIN

dr. Marko Dolinar

Sol je ena osnovnih začimb v prehrani človeka, hkrati pa je pomembno sredstvo za konzerviranje živil. Majhne količine soli je mogoče najti pristo v naravi, ob morju predvsem v območju, kamor segajo valovi le občasno, nato pa zaradi vročine voda izhlapi. Poleg morske soli poznamo tudi kameno sol, ki predstavlja posušene ostanke morij in nekdanja slana jezera.

Kratek zgodovinski oris

Na širšem območju Sredozemlja so verjetno najstarejši materialni dokazi za pridobivanje soli v bližini Črnega morja, kjer so bolgarski arheologi odkrili ruševine mesta Solnicata, stare približno 6000 let. V njih so našli velike peči, ki naj bi služile za odparevanje vode iz slaniz izvirov v bližini (Nikolov, 2016). Nekateri viri nakazujejo, da so s soljo trgovali že Feničani, za stare Grke pa sol verjetno ni bila komercialno zanimiva, zato je antični viri ne omenjajo pogosto (Adshead, 2016). Kljub temu je znano, da so v tem času že obstajale soline na morski obali, čeprav je širše gledano v antičnem obdobju prevladovala sol, pridobljena v notranjosti dežel, bodisi iz slaniz jezer severne Afrike, slaniz močvirij ali plitvih podzemnih nahajališč. Šele od 5. stoletja dalje vodilno vlogo dobijo obmorske soline (Adshead, 2016). Že pred Rimljani so verjetno sol pridobivala plemena ob jadranski, pa tudi ob tirenski obali, in jo prodajala prebivalcem notranjosti Apeninskega polotoka. Sabinci, ki so naseljevali gorska področja v bližini kasnejšega Rima, so verjetno sprva dobivali sol s tirenske strani in jo po kasnejši Solni cesti (Via salaria) prevažali v notranjost (Platner, 1929), verjetno pa je že takrat segala na jadransko stran polotoka, kjer je zaradi plitvejšega morja bila proizvodnja soli lažja. Soline so praviloma gradili ob izlivih potokov in rek v morje. Ti so s sabo prinašali blato, ki ga je bilo mogoče uporabiti pri gradnji solinskih nasipov (Zorn, 2008).

Sol je bila v zgodovini srednjega veka pomemben vir dohodka, tako njena pridelava kot trgovina z njo. Na njen račun so vzcvetela številna obmorska mesta: na Jadranu sta značilna primera Dubrovnik s Stonskimi solinami in Benetke, ki so sprva pridobivale sol v Beneški laguni, kasneje pa v podrejenih področjih vzdolž jadranske obale, v veliki meri v piranskih in paških solinah.

Od srednjega veka dalje je iz zgodovinskih virov mogoče razbrati velika nihanja v proizvodnji soli, ki so bila pogojena s klimatskimi dejavniki, prav tako pa s političnimi nasprotji, ekonomskimi interesi, vojnami in spreminjajočim se povpraševanjem na trgu. Nekako do 15. stoletja je bilo vzdolž Jadrana več manjših, pa tudi nekaj večjih solin. Bile so običajno v bližini večjih mest, če je le bila obala dovolj položna, ali v zaščitenih zalivih. Kasneje so, predvsem zaradi odločitev beneške uprave in monopola, ostale aktivne na področju Istre Piranske soline, na območju severne Dalmacije samo Paške soline, v Južni Dalmaciji pa so delovale Stonske soline, ki so bile del Dubrovniške republike. Vse te soline so aktivne še danes.

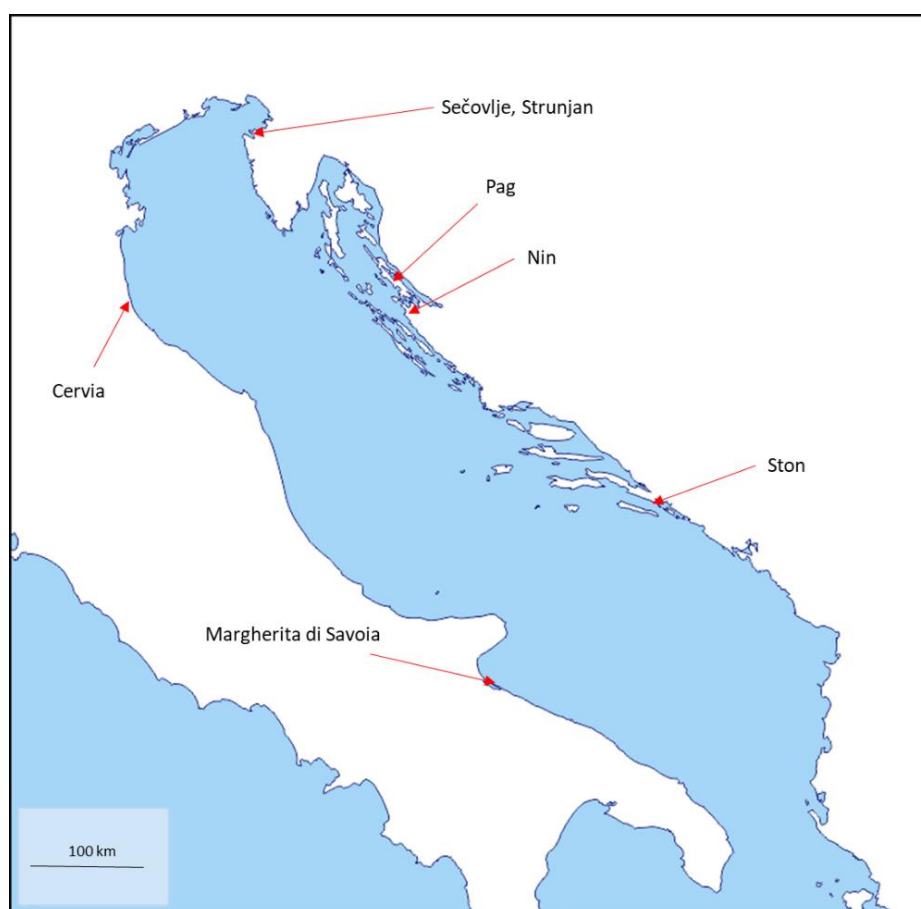
Na področju severnega Jadrana so bile ugodne možnosti za proizvodnjo predvsem v severni Istri, kjer so bile največje Piranske soline, ki so jih sestavljale soline v Sečovljah, Luciji in Strunjanu, pri čemer so bile strunjanske prvotno bistveno manjše. Soline so bile tudi v Škednju, Žavljah in Miljah pri Trstu. Opustili so jih okrog leta 1830 (Starec, 2001). Piranske soline so eksplicitno omenjene v delno ohranjenem piranskem mestnem statutu iz leta 1274 (Mihelič, 1996), nekateri viri pa navajajo, da naj bi bile posredno omenjene v zapisniku Rižanskega zbora, ki je potekal leta 804 (<https://parkstrunjan.si/presezniki/soline/>).

Benečani so za potrebe mesta Benetk in za trgovanje z zalednimi mesti sprva sol pridelovali na področju Beneške lagune. S širjenjem posesti na bližnjih in bolj oddaljenih področjih Jadrana so prvotne soline v 14. stoletju v veliki meri opustili, morda tudi zaradi zasipanja in sprememb rečnih izlivov. Kasneje so poleg soli

iz sebi podrejenih jadranskih področij kupovali tudi sol drugod po Sredozemlju, od Cipra in Libije do Španije, in z njo intenzivno trgovali (Laszlo, 2001).

Na vzhodni obali Jadranskega morja je bila proizvodnja soli najintenzivnejša v Piranu in na otoku Pagu. Tam so sol verjetno pridelovali vsaj od 9. stoletja, razlog za umestitev solin na Pag pa je bila glinena podlaga, ki je omogočila pripravo dna izparevalnih bazenov (Peričić, 2001). Po skoraj dveh stoletjih menjavanja prevlade nad otokom med Rabom, Zadrom in Benetkami je leta 1409 Pag dokončno prišel pod beneško oblast. Za Benetke so bile pomembne tudi Piranske soline, saj so si Piran podredili že leta 1283, nato pa od 1361 določali, koliko soli je tam dovoljeno proizvesti (leta 1375 okrog 3300 ton), saj je davek od soli sprva pripadel mestu Piranu. O načinu gradnje solinskih bazenov obstaja nekaj zanimivih virov iz prve polovice 14. stoletja, ko so se začeli v piranskih solinah pojavljati najemniki in delavci z otoka Paga. Prvi je v virih omenjen kot vodja dela lucijskih solin Primodrug s Paga leta 1328. Še več solinarjev s Paga je prišlo delat v Piranske soline v tridesetih letih 14. stoletja (Mihelič, 1996). O 'paškem načinu' priprave kristalizacijskih bazenov pa obstaja zanesljiv vir, da so tako prenovili 21 solnih bazenov v sečoveljskih solinah leta 1377. Znano je, da je dela izvajal »mojster Gregorius, sin pokojnega Marinija iz Senja« (F. Bonin, 2011).

S propadom Beneške republike leta 1797 so soline kot del Istrskega polotoka pripadle Avstrijskemu cesarstvu, ki je tako prišlo do vira morske soli in z uvedbo monopola na sol (1814) tudi investiralo v soline in skladišča soli na obali (<https://parkstrunjan.si/presezni/soline/>).



Slika 2: Zemljevid Jadranskega morja z bližnjimi kopnimi in z vrisanimi kraji, kjer še danes, čeprav ponekod v omejenem obsegu, poteka pridelava soli. Največje še delujoče soline so v kraju Margherita di Savoia, sledijo soline na otoku Pagu in Sečoveljske soline.

Proizvodnja soli ob Jadranu danes

Danes so področja solin ob Jadranu bistveno bolj omenjena kot so bila v srednjem veku, saj je Jadran kot sorazmerno severni del Sredozemskega morja klimatsko manj primeren za proizvodnjo soli kot južna obrobja Sredozemlja. Slika 2 prikazuje, kje ob Jadranu so danes še soline.

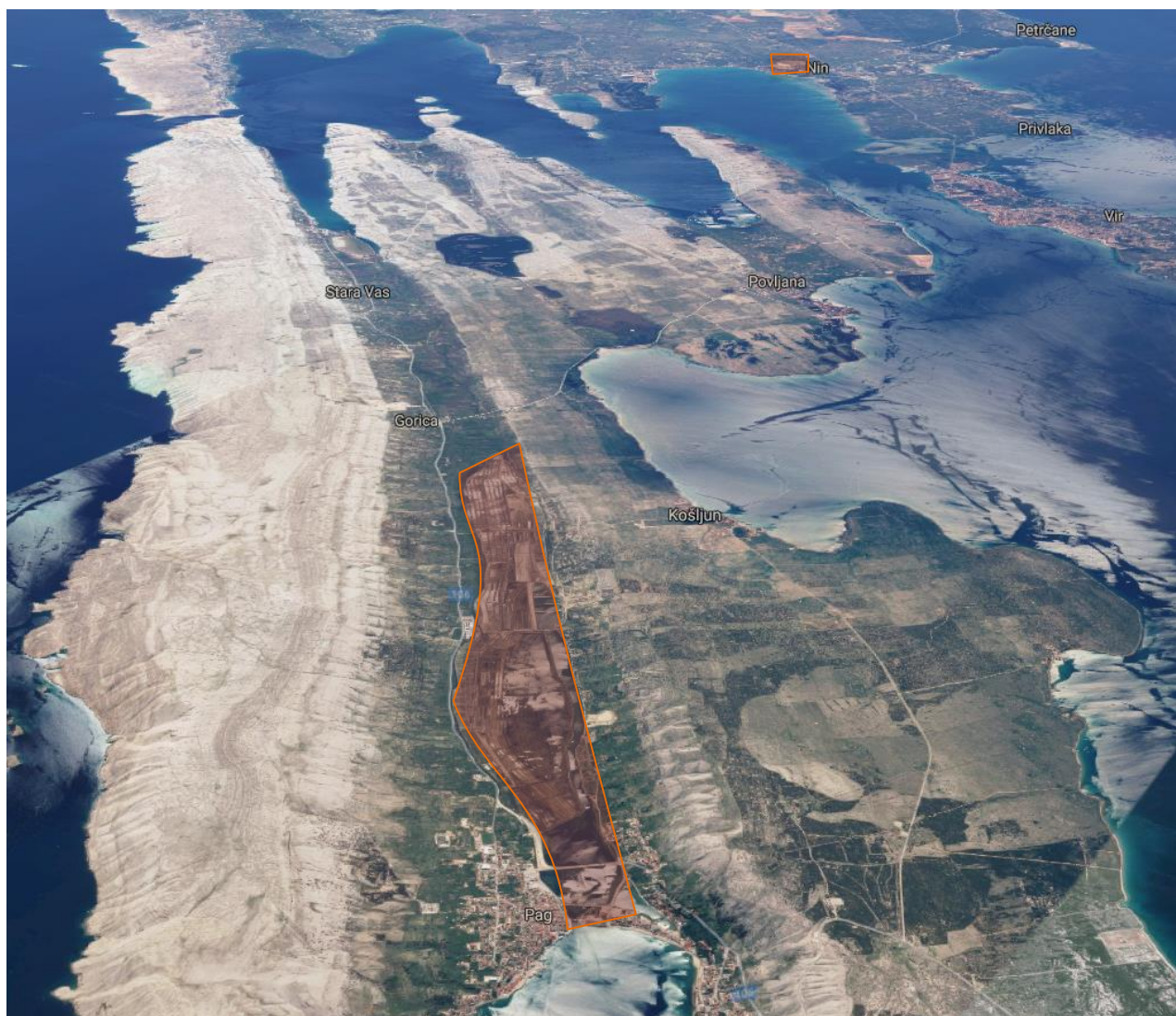
Največja zahodnojadranska tovarna soli je Margherita di Savoia v pokrajini Apuliji na južnem delu Apeninskega polotoka. Soline v tem kraju naj bi bile največje v Evropi in druge največje na svetu. Področje solinskih bazenov s površino približno 3500 ha (na območju, dolgem pribl. 20 km in širokem do 5 km) je vključeno v naravni rezervat od leta 1977, še vedno pa v teh bazenih poteka izhlapevanje vode za pripravo koncentrirane morske vode, medtem ko je nadaljnjih 500 ha namenjenih kristalizacijskim bazenom (<https://www.cuordimare.it/cataloghi/guida-del-sale-margherita-di-savoia.pdf>). Do leta 2019, ko je podjetje prevzela francoska družba Salins du Midi, je bilo tu zaposlenih 160 delavcev, ki so letno pridelali okrog 550.000 t soli. Morska voda potuje v procesu koncentriranja skozi tri evaporacijske cone, preden doseže kristalizacijsko stopnjo. Sol so pri tem sezonskem tipu pridelave od šestdesetih let prejšnjega stoletja pobirali z uporabo mehanizacije in jo skladiščili ob solinah (slika 3). Zaradi spreminjajočih se potreb po soli na trgu pa so prešli na princip večsezonske pridelave, kjer slanico uporabijo za industrijsko kristalizacijo glede na zahteve trga.



Slika 3: Odprto skladišče soli v kraju Margherita di Savoia. Fotografija: Lino Lombardi, Pixabay.

Soline v kraju Cervia nedaleč od Ravene in izliva reke Pad v Jadransko morje so bile zasnovane na klasični solarni evaporaciji. Obstajalo je 144 bazenov, ki pa so jih leta 1959, ko so prešli na industrijsko proizvodnjo, združili v večje. Solinski bazeni se raztezajo na površini 827 ha in so danes oddaljeni od obale 1600 m. V velikih bazenih je čez poletje potekalo koncentriranje morske vode šaržno, pri delu pa so si pomagali s sodobno mehanizacijo. Od nekdanjih malih bazenov so obdržali le bazen Camillone, v katerem ohranjajo demonstracijsko proizvodnjo na klasičen način, tako da letno pridelajo 5-20 ton 'sladke soli'. Sol iz Cervie velja za 'sladko', ker naj zaradi vsakodnevnega pobiranja halita (jedilne soli) ne bi prišlo do kristalizacije grenkih soli. V bazenih živi rakec *Artemia salina*, ki ga imajo za koristnega, saj se prehranjuje z algami in drugimi za sol neželenimi primesmi. S tem bistrijo vodo in pospešujejo evaporacijo, hkrati pa so pomemben člen prehranjevanje verige, predvsem kot hrana za ptice (<https://www.turismo.comunecervia.it/en/discover-the-area/nature-and-environment/parks-natural-reserves/camillone-saltpan>).

Na vzhodni jadranski obali v današnjem času največ soli proizvedejo Paške soline (Solana Pag, del koncerna Agrokor), kjer začetne stopnje izhlapevanja potekajo v treh zaporednih stopnjah v odprtih bazenih, končne pa v industrijskih izparevalnikih. Tako pridobljeno slanico (salamuro) nato v kotlih kuhajo, da preostala voda izhlapi do te mere, da sol kristalizira. Kapacitete koncentracijskih bazenov presegajo kapacitete izparevalnih kotlov, zato poleti pridobljeno slanico hranijo v globokih bazenih in jo kuhajo v sicer za odparevanje neugodnem obdobju leta, tudi pozimi (<http://pag-gradzdravlja.eu/realizirani-projekti/ljecilisni-centar-lokunja.html>).



Slika 4: Južni del otoka Paga z rdeče šrafiranim področjem, ki ga obsegajo soline. Pogled proti jugu na osnovi letalskih posnetkov. Spredaj v sredini je mesto Pag, na zgornji strani levo je ožina med celino in otokom, ki jo prečka Paški most. Lokacija bistveno manjših solin v Ninu je s šrafuro označena zgoraj desno. Posnetek je iz leta 2018 (Google Maps, CNES/Airbus Digital Globe).

Bazeni za koncentriranje morske vode na Pagu obsegajo skoraj 260 ha (<https://hr.kompass.com/c/solana-pag-d-d/hr014965/>). Čeprav gre po zasnovi za tradicionalne jadranske soline, so že v prejšnjem stoletju dna bazenov asfaltirali (Savnik, 1965) in v osemdesetih letih prejšnjega stoletja postavili tovarno soli. Kasneje se je proizvodnja v celoti ustavila, pred leti pa so jo začeli ponovno oživljati. Leta 2006 so proizvedli 18.000 t soli, medtem ko so v solinah v Ninu pri Zadru istega leta proizvedli 490 t, v Stonu v Južni Dalmaciji pa 781 t soli. Na Hrvaškem letno porabijo okrog 120.000 t soli, od tega polovico za prehrano (Ranogajec, 2007), ostalo

pa večinoma za posipanje cest. Tako torej paška sol še zdaleč ne zadošča za potrebe domačega trga, poleg tega pa je nekaj tudi izvozijo. V rekordnem letu 2011 so na Pagu pridobili 150.000 m³ salamure s slanostjo 25 B° (bauméjev; merilo slanosti), iz česar je mogoče pridobiti 30.000 t soli, kar je bilo največ od natančnega beleženja podatkov leta 1908 (Portada, 2011). V letu 2013 so zamenjali kotle na mazut s kotli na lesno biomaso, kar je pomenilo zmanjšanje stroškov energentov za trikrat (Varošaneč, 2013). Na Pagu računajo tudi na zdraviliški turizem, ki bi temeljil na uporabi zdravilnega blata, za kar nameravajo zgraditi nov zdravstveno-rekreacijski center Lokunja. Zdravili naj bi predvsem revmatska obolenja (<http://pag-gradzdravlja.eu/projekti-u-realizaciji/ljecilisni-centar-lokunja.html>).

Soline v Ninu pri Zadru naj bi obstajale že v času Rimljanov. S tem, ko so Benečani leta 1409 kupili veliko posestev v Dalmaciji, so dobili v last tudi Ninske soline, a so jih kmalu zaprli in ohranili le soline na Pagu. Danes so Ninske soline ponovno aktivne na površini 55 ha. Poleg proizvodnje soli pridobivajo tudi solinsko blato z zdravilnimi lastnostmi (www.solananin.com). Soline so v privatni lasti in so odprte za obisk. Gre za tradicionalno solarno pridelavo soli, kar pomeni, da izhlapevanje vode poteka zgolj zaradi segrevanja sonca.

Na korenu polotoka Pelješac so Stonske soline v neposredni bližini starega mesta Ston, ki je bil od leta 1333 del Dubrovniške republike. Takrat so Dubrovčani odkupili Ston od srbskih vladarjev in uredili nove soline (Peričić, 2005). Sol je predstavljala pomemben del prihodkov dubrovniškega proračuna. Proizvodnja soli na področju Stona naj bi potekala že v rimskih časih, zato soline v Stonu oglašujejo kot najstarejše in največje ohranjene zgodovinske soline v Evropi, zgodovina pridobivanja soli pa naj bi segala celo 4 tisočletja nazaj. Soline v Stonu (slika 5) sestavlja 58 bazenov, ki so razdeljeni v 5 oziroma 7 skupin glede na to, kako koncentrirana je slanica v njih. Kristalizacijskih bazenov je 9 oziroma 10, v zgodovini pa jih je bilo 11 (dva sta bila poploščena z granitom in iz njih je prihajala najbolj čista sol). Sicer so današnje soline v veliki meri ohranjene iz časa Dubrovniške republike. Površina proizvodnega dela solin obsega 43 ha (<http://www.solanaston.hr>). Stonske soline so še vedno aktivne in uporabljajo solarni tip proizvodnje, pri čemer so dna bazenov večinoma asfaltirana. Od celotne proizvodnje okrog 1500 t letno naj bi bilo 10 % jedilne soli, ostalo pa predstavlja industrijska sol. Pridelajo tudi 2,5 t solnega cveta (Večernji list, 2016). V rekordni letini 2003 so pridelali nekaj nad 3100 t soli, kar je pol manj kot na primer leta 1611 in 1637, ko naj bi pridelali po 6500 t (Tomasović, 2016). Vendar pa so te zgodovinske vrednosti vprašljive, saj viri niso zanesljivi. Bolj verjetno je, da je bila letna proizvodnja v 16. stoletju okrog 1900 t, v rekordnem letu 1577 pa približno 4000 t (Peričić, 2005).

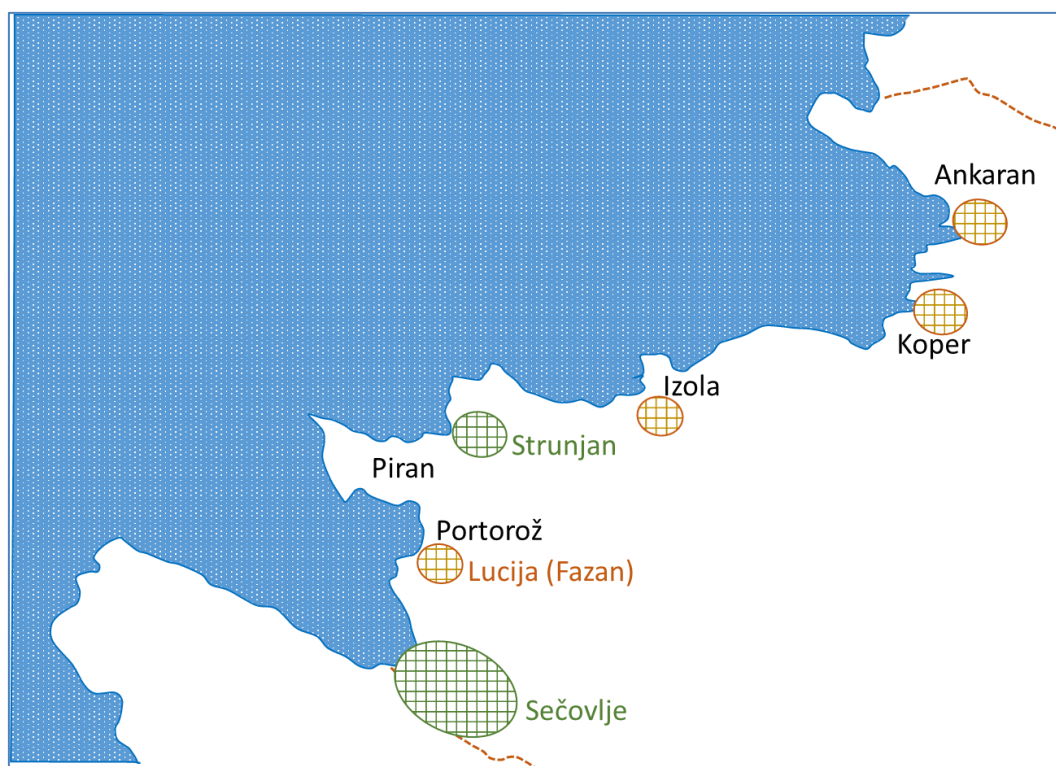


Slika 5: Stonske soline – pogled od vhoda na kristalizacijske bazene in skladišče soli (september 2017). Soline so umeščene v ozkem zalivu in se raztezajo v smeri jugovzhod – severozahod, pri čemer so kristalizacijski bazeni v neposredni bližini trdnjave Kaštio in starega mestnega jedra.

Južneje od Stonskih solin so na vzhodni jadranski obali večje soline le še v Ulcinju v Črni gori, kjer je delovalo podjetje Solana »Bajo Sekulić«. Področje solin zavzema 14,5 km². Solinske bazene so zgradili v letih 1926-1934, letna kapaciteta pa naj bi bila 30.000 t. To so bile sredi šestdesetih letih prejšnjega stoletja največje soline v takratni Jugoslaviji, pred sečoveljskimi in paškimi (Savnik, 1965). Podjetje so delno privatizirali, a je šlo leta 2005 v stečaj, čeprav je z izgubo še poslovalo. Področje so s prostorskimi načrti v prejšnjem desetletju namenili za razvoj turizma, a namero kasneje preklicali in ponovno izpodbijali (MANS). Področje je zanimivo za opazovanje ptic, med katerimi so večkrat tudi plamenci (flamingi) in pelikani. Obrat za proizvodnjo soli je v propadajočem stanju (<https://montenegrina.net/crnom-gorom-poseta-ulcinjskoj-solani/>); zadnji pridelek soli so pospravili leta 2013 (Kalač, 2016).

Za razliko od doslej omenjenih solarnih solin obstajajo ob Jadranu tudi vetrne soline v kraju Krvavica v bližini Makarske. Gre za proizvodnjo v majhnem merilu na osnovi patentiranega postopka, ki ga je razvil domačin Ivan Šimić. Z njim dosegla letno proizvodnjo 1,5 do 5 t solnega cveta pod blagovno znamko Ramova. Proizvede tudi nekaj tako imenovane 'diamantne soli', preostalo slanico pa prodaja kot 'morsko olje' (Šimundić-Bendić, 2015).

Največje soline v severnem Jadranu so Sečoveljske soline, ki skupaj s Strunjanskimi solinami predstavljajo nekdanje pomembne Piranske soline. Poleg teh so obstajale še Ankaransko-Srminske soline, Semedelske oziroma Koprške soline (delovale so do leta 1912), Izolske (te so opustili že precej pred koprskimi), večje od teh pa so bile v okolici Lucije (soline Fazan, aktivne do leta 1967, enako kot strunjanske, ki so jih oživili šele nedavno) (Traven, 2014). Slika 6 prikazuje zemljevid slovenske obale z vrisanimi pomembnejšimi kraji in mesti, kjer poteka ali je potekala tržna pridelava soli. Soline so bile tudi v okolici Trsta in v Miljah (Enciklopedija naravne in kulturne dediščine Slovenije).



Slika 6: Nekdanje in sedanje soline na slovenski obali. Z zeleno so označene še delujoče soline, z oranžno pa zgodovinsko potrjene soline, ki ne obratujejo več. Zgornja črtkana črta ponazarja mejno črto z Italijo, spodnja pa s Hrvaško.

Strunjanske soline so bistveno manjše od sečoveljskih, saj merijo okrog 30 ha, sečoveljske pa (aktivni in opuščeni del) okrog 550 ha. Za pridelavo soli v Strunjanu skrbijo solinarji podjetja Soline iz Seče. To podjetje je leta 2003 pridobilo 20-letno koncesijo za upravljanje s krajinskim parkom Sečoveljske soline, del upravljanja pa je tudi proizvodnja soli. Ta v Sečoveljskih solinah izrazito niha, kar je odraz spremenljivih klimatskih razmer v severnem Sredozemlju. V dobrih letinah, ko je poletje suho, proizvodnja dosega okrog 5000 t, v deževnih poletjih pa pridelka lahko tudi sploh ni (npr. leta 2014) (Hreščak, 2015).

Tako kot ostale soline na slovenski obali so tudi sečoveljske nastale na področju izliva kopenskih vod v morje. V primerjavi s potoki, ob katerih so zrastle koprške, strunjanske in lucijske soline, je reka Dragonja s sabo prinašala več sedimenta, ki ga je bilo mogoče uporabiti pri gradnji nasipov. Zato so se verjetno sečoveljske soline postopno uveljavile kot največje v tem delu Jadrana.

Največji obseg proizvodnje v Sečoveljskih solinah je bil najverjetneje v času, ko je Avstrija temeljito obnovila in povečala prvotne soline. Največji gradbeni poseg v soline je bil v letih 1903/1904, ko je država odkupila solinske parcele in uredila geometrijsko razporejene bazene na severnem delu solin. Zadnja prenova solinskih bazenov je iz leta 1957, ko so pridelali kar 40.000 t soli (<http://www.kpss.si/si/zgodovina>). Z opuščanjem solin na južnem delu (leta 1968) so se začeli bazeni delno zasipati in zaraščati, nasipi pa propadati. To območje, imenovano Fontanigge (slika 7), je postalo zatočišče za številne živali, ki jih prej na tem področju ni bilo, prav tako pa so se lahko razširile rastline, prilagojene na visoko slanost in nekatere druge, toploljubne rastline. Fontanigge so še vedno pregrajene v večje bazene, medtem ko je severni del, Lera, bolj geometrijsko pravilno urejen v različne tipe manjših solinskih bazenov.



Slika 7: Zemljevid Sečoveljskih solin. Rdeča črta predstavlja kopensko mejo krajinskega parka (stanje 2017). Vpisani sta dve glavni področji, Fontanigge, kjer ne poteka komercialna proizvodnja soli, in Lera, kjer so solinski bazeni delno še aktivni. Vrisani so glavni kanali in reka Dragonja. Vir: Krajinski park Sečoveljske soline (KPSS).

Komercialna dejavnost je omejena na področje Lere. Tam je poleg aktivnih solinskih bazenov obrat za zbiranje in obdelavo soli, trgovina z izdelki, ki izvirajo s področja solin in bližnje okolice, leta 2013 pa so v bližini morske obale odprli center dobrega počutja Thalasso Spa Lepa Vida, kjer ugodne učinke na zdravje dosejajo predvsem z uporabo slanice in solinskega blata.

Sečoveljske soline kot izjemen ekosistem severnega Jadrana

Z opustitvijo solinarstva v Fontaniggah (izjema je manjši predel ob solinarskem muzeju) in relativno odmaknjenostjo so to področje začeli zavzemati organizmi, ki jih tam že dolgo ni bilo več, ostajajo pa stalni prebivalci in selivci, ki jih v solinah opažajo ves čas. Postopno so se oblikovala življenjska okolja somorno močvirje, slana mlaka, slana trata, poloj in trstišče, kjer je življenjski prostor našlo 45 vrst rastlin z rdečega seznama ogroženih rastlin v Sloveniji, opazili pa so več kot 290 vrst ptic (Enciklopedija naravne in kulturne dediščine Slovenije). Da bi zaščitili življenjski prostor teh organizmov, so področje Sečoveljskih solin razglasili za krajinski park (1990), od leta 1992 pa je vpisan tudi na Ramsarski seznam mednarodno pomembnih mokrišč kot prvo izmed treh slovenskih na tem seznamu; sledile so Škocjanske jame 1999 in Cerknjsko jezero z okolico 2006 (The List of Wetlands of International Importance, 2018). Vključitev solin med območja Natura 2000 (leta 2004) dodatno zagotavlja varovan status območja in pravno osnovo za izvajanje varovalnih ukrepov.

Celovit splošen pregled Sečoveljskih solin, kjer so opisani tako postopki pridelave soli kot naravoslovni vidiki, je dostopen v knjižni obliki. Podjetje Soline je leta 2008 namreč izdalo knjigo Iztoka Škornika (soavtor Andrej Gogala) z naslovom Spoznajmo soline. Na 160 straneh je avtor zbral vse osnovne podatke o delu v solinah in opisal tiste predstavnike rastlinskega in živalskega sveta, ki so značilni za krajinski park in jih je najlažje videti s prostim očesom. Leta 2012 je isti avtor pripravil še knjigo Favnišči in ekološki pregled ptic Sečoveljskih solin (280 strani), ki podrobneje predstavlja okoljske dejavnike, predvsem pa ptice, ki so jih doslej opazili na področju krajinskega parka, kjer je avtor zaposlen kot strokovni sodelavec za naravovarstveni monitoring in naravovarstveni nadzornik.

Nekatere solinske mikroorganizme lahko spoznamo v knjigi Mikrosafari, Čudoviti svet mikroorganizmov solin, ki so jo napisali Nina Gunde – Cimerman, Aharon Oren in Ana Plemenitaš (DZS, 2005, 160 strani). Knjiga predstavlja predvsem fotografije mikroorganizmov, posnete pod mikroskopom, pri čemer se ne omejuje zgolj na Sečoveljske soline. Mikrobiološko je sicer področje Sečoveljskih solin še slabo obdelano, saj imamo na voljo le nekaj znanstvenih člankov o mikrobni pestrosti, arhejah in glivah, ki uspevajo v razmerah visoke slanosti. Vendar večino leta in večino površine ne zavzemajo bazeni z visoko koncentracijo soli, tako da je mikrobna pestrost gotovo večja kot kažejo doslej opravljene raziskave.

Viri:

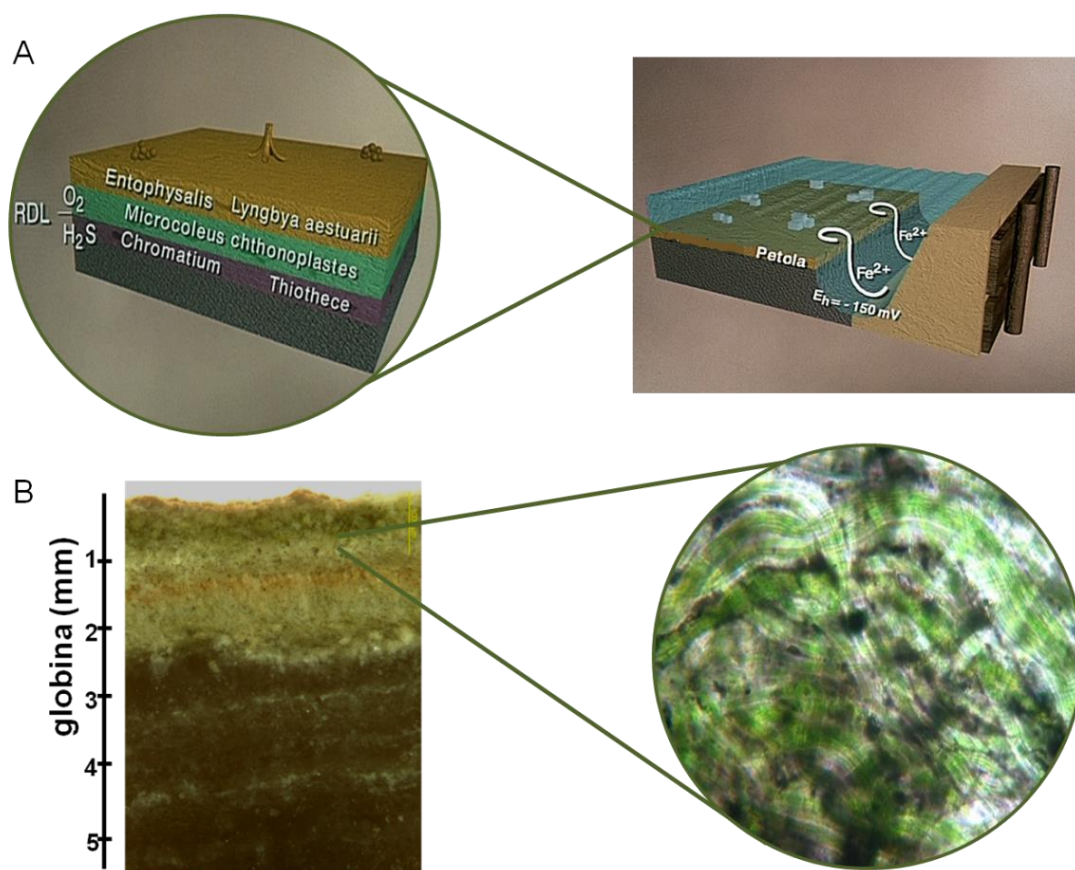
- Adshead S.A.M. (1992) Salt and Civilization. Houndmills: Palgrave.
- Bonin F. (2011) Piranske solne pogodbe (1375-1782). Ljubljana: Arhivsko društvo Slovenije.
- Enciklopedija naravne in kulturne dediščine Slovenije (DEDI): Sečoveljske soline. Dostopno na: <http://www.dedi.si/dediscina/430-secoveljske-soline> (pridobljeno 14.9.2018)
- Hreščak A. (2015) Koliko piranske soli ste kupili? Večer, 15.9.2015. Dostopno na: <https://www.vecer.com/201509156142368-6142368> (pridobljeno 14.9.2018)
- Kalač D. (2016) Ulcinjska solana: Flamingosi su danas tu, sutra – ko zna... Dostopno na: <http://www.vijesti.me/forum/ulcinjska-solana-flamingosi-su-danas-tu-sjutra-ko-zna-877808> (objavljeno 4.3.2016, pridobljeno 14.9.2018)

- Laszlo P. (2001) Salt: Grain of Life. New York: Columbia University Press.
- MANS (?) Studija slučaja: propast Solane »Bajo Sekulić« zbog interesa domaćih tajkuna. Dostopno na: www.mans.co.me/wp-content/uploads/studijeslucajeva/Solana.pdf (pridobljeno 14.9.2018)
- Mihelić D. (1996) O začetkih piranskega solarstva. Annales 8, 339-348.
- Nikolov V. (2016) The prehistoric salt-production and urban center of Provadia-Solnitsata, Northeastern Bulgaria, Mediterranean 126, 71-78. Dostopno na: <https://journals.openedition.org/mediterranee/8246>
- Peričić Š. (2001) Proizvodnja i prodaja paške soli u prošlosti, Rad. Zavoda povij. znan. HAZU Zadru, 43/2001, str. 45-83. Dostopno na: <https://hrcak.srce.hr/file/18749>
- Peričić Š. (2005) Prilog poznavanju Stonske solane. Anali Dubrovnik 43, 139-163. Dostopno na: <https://hrcak.srce.hr/file/12011>
- Platner S.B. (1929) A Topographical Dictionary of Ancient Rome (ured. T. Ashby). London: Oxford University Press, str. 657-658.
- Portada J. (2011) Rekordna proizvodnja salamure u Paškoj solani. Zadarski list 24.9.2011. Dostopno na: <https://www.zadarskilist.hr/clanci/24092011/rekordna-proizvodnja-salamure-u-paskoj-solani> (pridobljeno 25.8.2018).
- Ranogajec B. (2007) Domaće solane proizvedu 20.000 tona soli a uveze se 100 tisuća tona. Poslovni dnevnik, 7.8.2007. Dostopno na: <http://www.poslovni.hr/domace-solane-proizvedu-20000-tona-soli-a-uveze-se-100-tisuca-tona-50640> (pridobljeno 25.8.2018).
- Savnik R. (1965) Problemi Piranskih solin. Geografski zbornik 9, 61-82.
- Simunić-Bendić T. (2015) Ivan Šimić: Sam proizvedem i prodam 3 tone cvijeta soli godišnje! Slobodna Dalmacija 29.3.2015. Dostopno na: <https://slobodnadalmacija.hr/dalmacija/split-zupanija/clanak/id/268488/ivan-simic-sam-proizvedem-i-prodam-3-tone-cvijeta-soli-godisnje> (pridobljeno 2.10.2018).
- Starec R. (2001) Življenje in delo v istrskih solinah. Annales 11, 121-134.
- The List of Wetlands of International Importance (objavljeno 6. 8. 2018). Dostopno na: <https://www.ramsar.org/document/the-list-of-wetlands-of-international-importance-the-ramsar-list> (pridobljeno 14.9.2018)
- Tomasović N. (2016) 4.000 godina berbe soli u Stonu. Deutsche Welle, 21.9.2016. Dostopno na: <https://www.dw.com/hr/4000-godina-berbe-soli-u-stonu/a-19563824> (pridobljeno 26.8.2018)
- Traven (2014) Koprške soline (objavljeno 17.12.2014). Dostopno na: <http://www.etana.si/traven/index.php/istra/zgodovina/zgodovinski-kraji/koprške-soline> (pridobljeno 14.9.2018)
- Varošaneć S. (2013) Solana Pag troškove energenta srezala tri puta. Poslovni dnevnik, 20.5.2013. Dostopno na: <http://www.poslovni.hr/domace-kompanije/solana-pag-troskove-energenta-srezala-tri-puta-241357> (pridobljeno 25.8.2018)
- Večernji list (2016) Moj je cilj urediti solanu da bude kao u vrijeme Dubrovačke Republike (objavljeno 8.7.2016). Dostopno na: <https://www.vecernji.hr/premium/moj-je-cilj-urediti-solanu-da-bude-kao-u-vrijeme-dubrovacke-republike-1097727> (pridobljeno 26.8.2018)
- Zorn M. (2008) Erozijski procesi v slovenski Istri. Geografija Slovenije 18. Ljubljana: ZRC SAZU, Geografski inštitut Antona Melika.

VLOGA PETOLE IN SOLINSKEGA BLATA PRI TRADICIONALNI PRIDELAVI SOLI

dr. Neli Glavaš

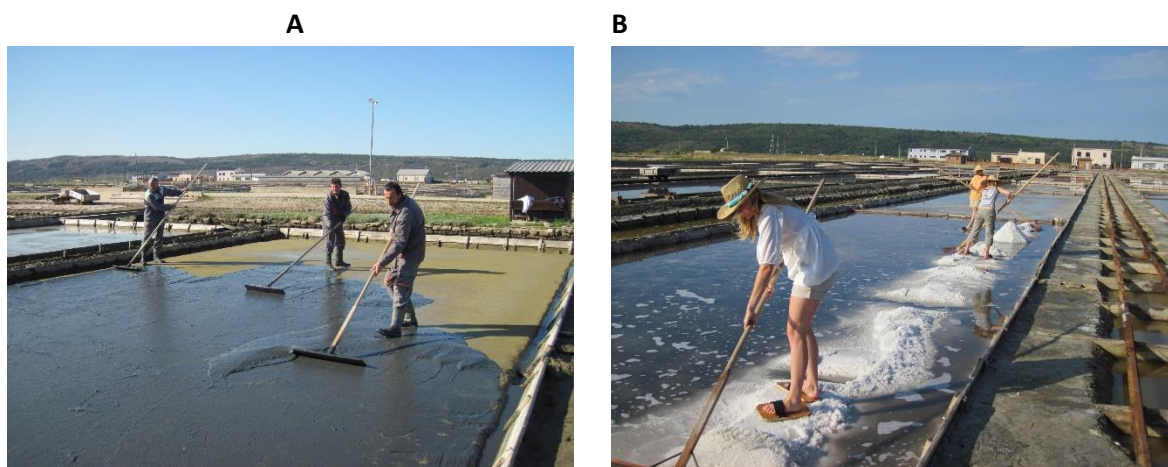
Od некоč številnih morskih solin so se na območju severnega Jadrana do danes ohranile le soline v Strunjanu in Sečovljah, kjer sol še vedno pridelujejo po več kot 700 let starih postopkih. Tradicionalna pridelava soli temelji na gojenju petole. Gre za do nekaj mm debelo mikrobno plast, ki prekriva dno kristalizacijskih bazenov in jo sestavljajo mikroorganizmi (prevladujejo nitaste cianobakterije vrste *Coleofasciculus chthonoplastes*) in minerali (slika 8). Ravno prav debela, primerno pripravljena ter nepoškodovana petola, zagotavlja zadostno čvrstost in prožnost podlage v kristalizacijskih bazenih, da je mogoče na njej pobirati sol visoke kvalitete. Priprava sezonske petole je izredno pomembno in zahtevno delo, ki poteka preko celega leta. Stari solinarski pregovor pravi »sol se dela pozimi«, saj imajo tudi v jesenskem in zimskem času solinarji veliko dela z obnavljanjem solnih polj. Pridelava soli na osnovi gojenja petole sega v 14. stoletje, ko so ta nov postopek uvedli z otoka Paga (srednji Jadran) in se nadaljuje nespremenjen vse do današnjih dni.



Slika 8: Struktura mikrobne preproge petole. A) Posamezni sloji (povzeto po Schneider in Herrmann, 1980). B) Profil petole pod lupo z nitastimi cianobakterijami vrste *Coleofasciculus chthonoplastes* (pod optičnim mikroskopom).

Začetek sezonske petole se začne po spomladanskem premazu petole z morskim oz. solinskim blatom, ki postane del nove rastoče oz. regenerirane mikrobne plasti (slika 9A). Raziskave (Glavaš et al., 2018) so pokazale, da blato ne vsebuje cianobakterijskih nukleinskih kislin, kar pomeni, da nova sezonska plast petole vsebuje cianobakterije, ki so že prisotne v mikrobni plasti. Blatni premaz služi kot substrat in prispeva k

mobilnosti cianobakterij, kar povzroča njihovo (vertikalno in horizontalno) širitev v novi mikrobnii plasti. Migracije cianobakterij so v korelaciji z dnevnimi fluktuacijami svetlobe, temperature, slanosti, pH in redoks pogoji. Številne raziskave so pokazale, da k temu pripomorejo tudi večje količine zunajceličnih polisaharidov (EPS), ki jih sproščajo cianobakterijske celice.



Slika 9: Spomladanski premaz petole z blatom (konciranje) (A) in pobiranje soli v poletnih mesecih (B).

V naravnih okoljih imajo izvencelične snovi (EPS) iz mikrobnii plasti pomembno zaščitno in strukturno vlogo. V primeru petole pa so raziskave pokazale novo t.i. inženirsko vlogo cianobakterij in njihovih izločkov. Struktura petole s svojo 3D organsko mrežo iz EPS posredno vpliva na kakovost proizvedene soli. Glineni in drugi strukturni minerali petole so tako ujeti v tej organski mreži in se posledično ne morejo pomešati s kristali halita in drugih kristalizajočih soli ter tako pripomorejo k čistosti in belini soli (slika 8B). Poleg tega ta sluzasti sloj, ki je sestavljen iz cianobakterijskih EPS, stabilizira površino kristalizacijskih bazenov in omogoča ročno pobiranje soli v poletnih mesecih. V nekaj tednih po blatnem premazu je na novo oblikovana petola precej mehka in jo lahko zlahka poškodujemo. Sčasoma pa ujeti minerali iz blata in tudi minerali, ki kristalizirajo iz slanice (karbonati, sadra) petolo utrjujejo in tako postane dovolj trdna, da po njej lahko hodimo, pri čemer pa uporabljajo solinarji posebno obutev, ki enakomerno porazdeli težo.

Pregled strukture petole z elektronskim mikroskopom pa je pokazal, da EPS ovojnice cianobakterij delujejo tudi kot vezavno mesto za Mg^{2+} ione. Le-ti namreč v soli niso zaželeni v večjih koncentracijah, saj povzročajo grenak okus. Cianobakterijske EPS pa služijo tudi kot vezavno mesto za težke kovine iz vodnih raztopin. EPS morskih bakterij so še posebej bogate z uronskimi kislinami, zaradi katerih ima EPS-sloj negativni naboj in posledično sposobnost, da veže nase številne elemente in tudi težke kovine. EPS poleg tega, da deluje kot kelator (za katione), lahko služi tudi kot mesto za nukleacijo kristalov, saj spremembe v količini ali vrsti EPS lahko vplivajo na hitrost rasti in vrsto kristala. FTIR-analiza je pokazala velike spremembe v sestavi petole v povezavi s sezonskim nihanjem slanosti v kristalizacijskih bazenih (Kovač, 2009). To je bilo razvidno tudi iz raziskave Glavaš in sod. (2015), ki je pokazala, da je elementna sestava petole povezana z vsebnostjo organske snovi in posredno s slanostjo slanice. V poletnih mesecih ob visoki slanosti, ko je bila vsebnost organske snovi najnižja, so vzorci petole vsebovali večje količine Ca, Cl, Mg in S, medtem ko so bile koncentracije elementov Si, Al, Fe, K, As, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb in Zn znatno nižje. K temu prispevajo številni dejavniki, kot so: tekmovanje kationov (kot so Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) za sorbijska mesta na EPS, nizke pH-

vrednosti petole in slanice (vplivajo na topnost kovin), razgradnja organske snovi in izrazita mineralizacija petole.

Obsežno raziskavo slanice in kristalizacijskega procesa so pred 35 leti objavili Herrmann in sod. (1973) in v njej opisali vpliv mikroorganizmov na kristalizacijo soli. Raziskava je pokazala, da v naravnih razmerah precipitacija CaCO_3 , $\text{CaSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in NaCl poteka pri 4,6-, 2- in 1,3-kratni nasičenosti raztopine (slanice) v primerjavi s topnostnim produktom pri normalnih pogojih (pri 25 °C). Mikroorganizmi v petoli pa vplivajo tudi na porazdelitev železa (slika 8A). Zaradi visoko produktivne mikrobne plasti blato v bužetu (vdolbina v vogalu kristalizacijskega bazena, kjer se plast petole prekine) ohranja železo v topni obliki (kot Fe^{2+}), kar pomeni, da pri kristalizaciji ne obarva soli (Schneider in Herrmann, 1980).

Viri:

- Glavaš N., Défarge C., Gautret P., Jouliane C., Penhoud P., Motelica M., Kovač N. 2018. The structure and role of the "petola" microbial mat in sea salt production of the Sečovelje (Slovenia). *Sci. Total Environ.* 644: 1254-1267.
- Kovač N. 2009. Chemical characterization of stromatolitic "petola" layer (Sečovelje salt-pans, Slovenia) using FT-IR spectroscopy. *Annales, Series Historia Naturalis*, 19: 95-102.
- Glavaš N., Rogan Šmuc N., Dolenc M., Kovač N. 2015. The seasonal heavy metal signature and variations in the microbial mat (petola) of the Sečovelje Salina (northern Adriatic). *J. Soils Sediments* 15: 2359-2368
- Schneider J., Herrmann A. G. 1980. Saltworks-natural laboratories for microbiological and geochemical investigations during the evaporation of seawater. V: 5. Symposium on Salt. Coogan A. H., Hauber L. (ur.). Ohio, The Northern Ohio Geological Society, str. 371-381
- Herrmann A.G., Knake D., Schneider J., Peters H. 1973. Geochemistry of modern seawater and brines from salt pans: main components and bromide distribution. *Contrib. Mineral. Petrol.* 40: 1-24

Kemijske značilnosti petole in solinskega blata

dr. Katja Klun

Petolo sestavljata živi in neživi del. Večino organske snovi (13–20 %) predstavljajo mikroorganizmi (cianobakterije, diatomeje in ostale mikroalge) skupaj z njihovimi metaboliti, medtem ko anorganski del večinoma predstavljajo minerali: kremen, karbonati (kalcit, Mg-kalcit, aragonit), glineni minerali (illit/muskovit, kaolinit, klorit), glinenec (albit), sadra, halit in pirit. Sestava petole se skozi leto spreminja in je močno odvisna od različnih parametrov: sestave sedimenta, slanostnega gradienta slanice, procesa proizvodnje soli, redoks pogojev in vsebnosti organske snovi.

Mineralna sestava petole se sezonsko ne spreminja (razen prisotnosti halita, sadre in pirita) in je od zgornjega oksičnega sloja do spodnjega anoksičnega sloja po prisotnosti mineralov enaka. Solinsko blato, s katerim premažejo kristalizacijske bazene za nastanek petole v poznem zimskem času, se po mineralni sestavi nekoliko razlikuje od petole. Minerali petole izvirajo iz premazanega solinskega blata (kremen, kalcit, glineni minerali in glinenec), ta pa ima izvor v usedlinah reke Dragonje (Ogorelec in sod., 1981). Ostali minerali so avtogenega izvora, saj nastanejo med procesom izhlapevanja slanice nad petolo in pornih vod same petole.

Organski del petole je sestavljen in izvira predvsem iz mikroorganizmov, v manjšem deležu pa prihaja preko slanice in atmosfere. Delež celokupnega organskega ogljika (TOC) in celokupnega dušika (TN) je najvišji pred in po solinarski sezoni, v povprečju 4 % (TOC) oziroma 0,5 % (TN). Z višanjem slanosti slanice v poletnih mesecih se zaradi evaporacije in mineralizacije petole delež organske snovi zniža (TOC na 0,9 % in TN na 0,1 %), kajti višja slanost močno vpliva na mikroorganizme, kar privede do sprememb v sestavi mikrobne združbe in dominance halofilnih mikroorganizmov. V poletnih mesecih je tudi razmerje TOC/TN nižje, kar nakazuje na porabo labilnega dušika (predvsem v obliki proteinov) in na zmanjšanje biomase na visoko slanost netolerantnih mikrobov. Med razgradnjo poteka proces remineralizacije dušika in fosforja, ki se odraža v njihovih povišanih koncentracijah v slanici nad petolo. Vzporedno poteka tudi remineralizacija silicija, ki se iz diatomejskih frustul raztaplja v obliki silikatov.

Ekstracelularni polisaharidi (EPS) so pokazali nekoliko drugačno sezonsko dinamiko kot TOC in TN, predvsem pa se je izkazalo, da imajo pomembno vlogo v petoli. Raziskave so pokazale, da mikroorganizmi (diatomeje, cianobakterije) izločajo želatinozni EPS pri višji slanosti, pomanjkanju hranil in v primeru suše. Tako EPS nekako ščiti mikroorganizme v petoli pred zelo variabilnimi in nepredvidljivimi okoljskimi pogoji. Matriks EPS ustvari stabilno mikrookolje za mikroorganizme, saj jih ščiti pred številnimi stresnimi situacijami kot sta suša in UV-sevanje, poleg tega pa ima še druge funkcije: adhezija na površino, stabilizacija sedimenta in resorpcija hranil in encimov iz eksogene organske snovi. Poleg tega lahko EPS s številnimi funkcionalnimi skupinami vpliva na koncentracijo kovin in polkovin ter ostalih ionov v okoljski vodi. Ravno zaradi EPS je železo vedno v topni obliki (Fe^{2+}) in se ne obarja v Fe_2O_3 , zato je sol iz Sečoveljskih solin tako bela (Glavaš, 2013; Glavaš in sod., 2018).

Solinsko blato, ki ga že stoletja uporabljajo za zdravilne namene (poleg konciranja), kopljejo iz morja pred solinami ali pa iz solinskih kanalov. Solinsko blato zorijo v bazenih in je vseskozi prekrito s slanico, da preprečuje izsuševanje. Vsebnosti TOC in TN so v primerjavi s petolo v solinskem blatu nekoliko nižje, in sicer v povprečju okrog 1,02 % TOC in 0,2 – 0,3 % TN, kar je primerljivo z vrednostmi v sedimentih Tržaškega zaliva.

Raziskave kovin in polkovin (As, Co, Cu, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn in Zn) so pokazale v povprečju primerljive koncentracije s površinskim slojem sedimentov Tržaškega zaliva. Koncentracije Cd, Ni, Pb in Zn v solinskem blatu so nekoliko višje v primerjavi s sedimenti Tržaškega in Piranskega zaliva. Edina kovina, ki presega mejne vrednosti, je Ni, vendar naj bi take vrednosti izvirale iz geološkega ozadja, torej iz ecoenskega fliša v obalnem območju (Faganeli in sod., 1991; Kovač in sod., 2018).

Viri:

- Faganeli J., Planinc R., Pezdič J., Smodiš B., Stegnar P., Ogorelec B. (1991) Marine geology of the Gulf of Trieste (northern Adriatic): geochemical aspects. *Mar. Geol.* 99: 93–108.
- Glavaš N. (2013) Sestava in pretvorbe petole in solinskega blata v Sečoveljskih solinah. Doktorska disertacija. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
- Glavaš N., Défarge C., Gautret P., Jouliau C., Penhoud P., Motelica M., Kovač N. (2018) The structure and role of the “petola” microbial mat in sea salt production of the Sečovlje (Slovenia). *Sci. Tot. Environ.* 644: 1254-1267.
- Kovač N., Glavaš N., Ramšak T., Dolenc M., Rogan Šmuc N. (2018) Metal(oid) mobility in a hypersaline salt marsh sediment (Sečovlje Salina, northern Adriatic, Slovenia). *Sci. Tot. Environ.* 644: 350-359.
- Ogorelec B., Mišič M., Šercelj A., Cimerman F., Faganeli J., Stegnar P. (1981) Sediment Sečoveljske soline. *Geologija* 24: 179–216.

Določanje slanosti ter elementna analiza solinskega blata in petole

Martin Tomažič

Določanje slanosti

Slanost kot eden izmed osnovnih parametrov slanih okolij predstavlja merilo za vsebnost soli v gramih, raztopljenih v 1 kg slanice. Na območju Sečoveljskih solin in v solinarstvu na splošno solinarji že dolgo določajo slanost z uporabo Bauméjevega gostotomera. Gre za navaden gostotomer s skalo v stopinjah Bé (Baumé). Gostotomer je v želji po čim večji natančnosti relativno velik, zato za določanje slanosti potrebujemo vsaj nekaj litrov vode. Ker smo za potrebe dela v mikrobiološkem laboratoriju želeli preprosto in hitro metodo za določitev slanosti majhnih vzorcev, ki bi dala dobro oceno, kako koncentrirana je slanica, sem razvil preprosto metodo, za katero potrebujemo predvsem zelo dobro pipeto in tehtnico. Znanemu volumnu vzorca pri sobni temperaturi z uporabo avtomatske pipete nekajkrat določimo maso. Tako določimo povprečno gostoto slane vode. Sledi zveza med relativno gostoto in stopinjami Baumé za tekočine, težje od vode: $RG = 145 / (145 - ^\circ\text{Bé})$. Zveza sicer velja pri 15,56 °C, vendar sem napako zaradi temperature za potrebe naše natančnosti zanemaril. Ko enkrat preračunamo relativno gostoto v °Bé, le-te s pomočjo preproste polinomske zveze (Ovsyanyi, 2004) pretvorimo v slanost v %:

$$S \% = -0,10537 + 1,107651(^{\circ}\text{Bé}) - 0,036102(^{\circ}\text{Bé})^2 + 0,002598(^{\circ}\text{Bé})^3 - 0,000052(^{\circ}\text{Bé})^4.$$

Tako določena slanost se je zelo dobro ujemala z rezultati, izmerjenimi z Bauméjevim gostotomerom.

Ker je metoda odvisna predvsem od tega, kako natančno pipeta odmerja volumen, se je o tem najbolje prepričati z uporabo destilirane vode. Izmerimo ji temperaturo in v literaturi poiščemo njeno gostoto pri dani temperaturi. Po zgoraj opisanem postopku določimo gostoto destilirane vode in le-to primerjamo s tabelirano. Tekom svojega dela sem imel nekaj težav s pipetami – pri eni izmed pipet sem opazil, da mi je sprva dajala ponovljive rezultate, nato pa so po več meritvah rezultati postali neponovljivi oz. je bila ponovljivost dosti slabša. Da ne bi prišlo do napak, sem izmenično meril gostoto vzorca in destilirane vode. Če je tekom meritev gostota destilirane vode ostala konstantna ter pri pravi vrednosti, sem bil lahko prepričan v pravilnost svoje določitve. Če ne uspemo zagotoviti ponovljivih pogojev (vzrok zato je najverjetneje pipeta, lahko tudi sama tehnika pipetiranja in zelo malo verjetno tehtnica), je treba uporabiti drugo metodo.

Danes se slanost meri izključno z merjenjem električne prevodnosti; sama metoda je nekaj velikostnih razredov bolj natančna od zgoraj opisanih. Ker v mikrobiološkem laboratoriju konduktometer za merjenje slanosti ni vedno dostopen, slanost pa želimo določiti toliko natančno, da lahko ocenimo, kolikokrat je voda koncentrirana, se zgoraj opisana metoda izkaže kot zelo dobra rešitev. Ker smo želeli ugotoviti, kakšen je vpliv konciranja kristalizacijskega bazena na pridelavo soli, smo bazen številka 10 razdelili na štiri dele (gl. tudi sliko 1). Prva četrtina, ki je pri solinarski hiški, je predstavljala negativno kontrolo – ta del bazena ni bil konciran z nobenim blatom. Naslednja četrtina je bila premazana z blatom iz kanala Lida – jug, še naslednja z blatom iz kanala Lida – sever, zadnja četrtina, torej tista v smeri proti zalogovniku, pa je bila premazana z blatom iz Pichetta. Imeli smo tri časovne točke vzorčenja: tik pred konciranjem (13.4.2018), po ozelenitvi petole (24.5.2018) in ob začetku kristalizacije soli (10.7.2018), kjer je bila slanica nasičena. V vsaki časovni točki smo na vsaki četrtini vzeli po en vzorec in ga zamrznjenega hranili do začetka analiz na Morski biološki postaji. Po tem ko je petola 24.5.2018 ozelenela, je zelena barva počasi zbledela in prešla v rjavo. V zadnji točki vzorčenja, ko se je pričela kristalizacija soli, smo opazili, da je nekaj petole obarvane rjavo, nekaj pa sivo-črno. V upanju, da bi ugotovili, kaj je razlika med črno in rjavo petolo, smo v tej točki na vsaki četrtini

bazena vzeli dva vzorca, in sicer enega črnega ter enega rjavega. Vzorčili smo tudi vsa blata, s katerimi smo koncirali kristalizacijski bazen. Zaradi zunanjih dejavnikov sta bili blati Lida – jug ter Lida – sever koncirani 3.5.2018, torej približno dva tedna kasneje kot blato iz Pichetta.

Vzorčenje na solinah

Ker smo želeli ugotoviti, kakšen je vpliv konciranja kristalizacijskega bazena na pridelavo soli, smo bazen številka 10 razdelili na štiri dele (slika 1). Prva četrtina, ki je pri solinarski hiški, je predstavljal negativno kontrolo – ta del bazena ni bil konciran z nobenim blatom. Naslednja četrtina je bila premazana z blatom iz kanala Lida – jug, še naslednja z blatom iz kanala Lida – sever, zadnja četrtina, torej tista v smeri proti zalogovniku, pa je bila premazana z blatom iz Pichetta. Imeli smo tri časovne točke vzorčenja: tik pred konciranjem (13.4.2018), po ozelenitvi petole (24.5.2018) in ob začetku kristalizacije soli (10.7.2018), kjer je bila slanica nasičena. V vsaki časovni točki smo na vsaki četrtini s korerjem premera 4 cm vzeli po en vzorec in ga zamrznjenega hranili do začetka analiz na Morski biološki postaji. Po tem ko je petola 24.5.2018 ozelenela, je zelena barva počasi zbledela in prešla v rjavo. V zadnji točki vzorčenja, ko se je pričela kristalizacija soli, smo opazili, da je nekaj petole obarvane rjavo, nekaj pa sivo-črno. V upanju, da bi ugotovili, kaj je razlika med črno in rjavo petolo, smo v tej točki na vsaki četrtini bazena vzeli dva vzorca, in sicer enega črnega ter enega rjavega. Vzorčili smo tudi vsa blata, s katerimi smo koncirali kristalizacijski bazen. Zaradi neugodnih vremenskih razmer v drugi polovici aprila so blati iz kanalov Lida – jug ter Lida – sever uporabili za konciranje 3.5.2018, torej približno dva tedna kasneje kot blato iz Pichetta.

Elementna analiza

Vsebnost organske snovi v petoli se zaradi sezonskega spreminjanja mikroorganizmov spreminja. Predhodno liofiliziranim in homogeniziranim vzorcem smo želeli določiti vsebnost skupnega organskega ogljika (TOC) ter skupnega dušika (TN), ki sta glavna predstavnika organske snovi v petoli in blatu. Tako bi prek količine organske snovi spremljal številčnost (abundanco) organizmov v petoli. Prvotno je bil namen vzorcem določiti tudi vsebnost žvepla, vendar zaradi težav z instrumentom tega ni bilo mogoče opraviti.

Analize TOC in TN smo opravili s pomočjo CHNS elementnega analizatorja (Vario MICRO cube, Elementar). Gre za metodo oksidacije s pomočjo sežiga vzorca pri temperaturi 1150 °C, pri čemer je helij nosilni plin, kisik pa uporabi za sežig. Vzorec se najprej oksidira v oksidacijski koloni pri tej temperaturi do plinov: NO_x, CO₂, H₂O in SO₂, nato pa v redukcijski koloni reducira dušikove okside do N₂. Vzorci so zaradi prisotnosti visokih koncentracij različnih soli higroskopični, zato je določanje vodika težavno in smo se odločili, da ga ne bomo analizirali. Plini se ločijo s pomočjo adsorpcijske kolone, kjer se najprej adsorbirajo, nato pa se s postopnim višanjem temperature vsak plin posamezno sprosti na detektor za toplotno prevodnost. Vsak dan smo pred analizami preverili delovanje inštrumenta s standardom sulfanilamida, za katerega so deleži C, N, H in S znani. Na podlagi teh rezultatov se s pomočjo programske opreme preračuna dnevni faktor, ki se ga potem uporabi tudi za izračune deležev elementov v vzorcu. Validacijo smo naredili s pomočjo referenčnega materiala, ki vsebuje certificiran delež C, N, H in S v jezerskem sedimentu. Ker nas zanima samo delež organskega ogljika, smo vzorce nakisali najprej z 1 M HCl, nato pa še s 6M HCl, da se znebimo anorganskega ogljika (predvsem karbonatov). Kisline smo dodajali dokler se ni nehala peniti, kar pomeni, da izhaja CO₂. Ker je bilo v vzorcih prisotna velika količina karbonatov, smo morali zaradi burne reakcije kisline dodati v več manjših volumnih, da ne bi prihajalo do izgub. Vzorce smo posušili v sušilniku pri temperaturi 60 °C, da smo odstranili vodo, ki bi dodatno motila pri sami analizi.

Podobno kot je ugotovila dr. Neli Glavaš v svoji doktorski disertaciji (Glavaš, 2013), smo zaznali najvišje vrednosti za TOC in TN v času pred začetkom kristalizacije soli (prvo in drugo vzorčenje, ko je bila slanost primerljiva s slanostjo morske vode), medtem ko je bila pri višji slanosti (tretje vzorčenje) vsebnost TOC in TN nižja. Pri visokih slanostih preživijo samo halofilni mikroorganizmi, ostali pa so podvrženi razgradnji.

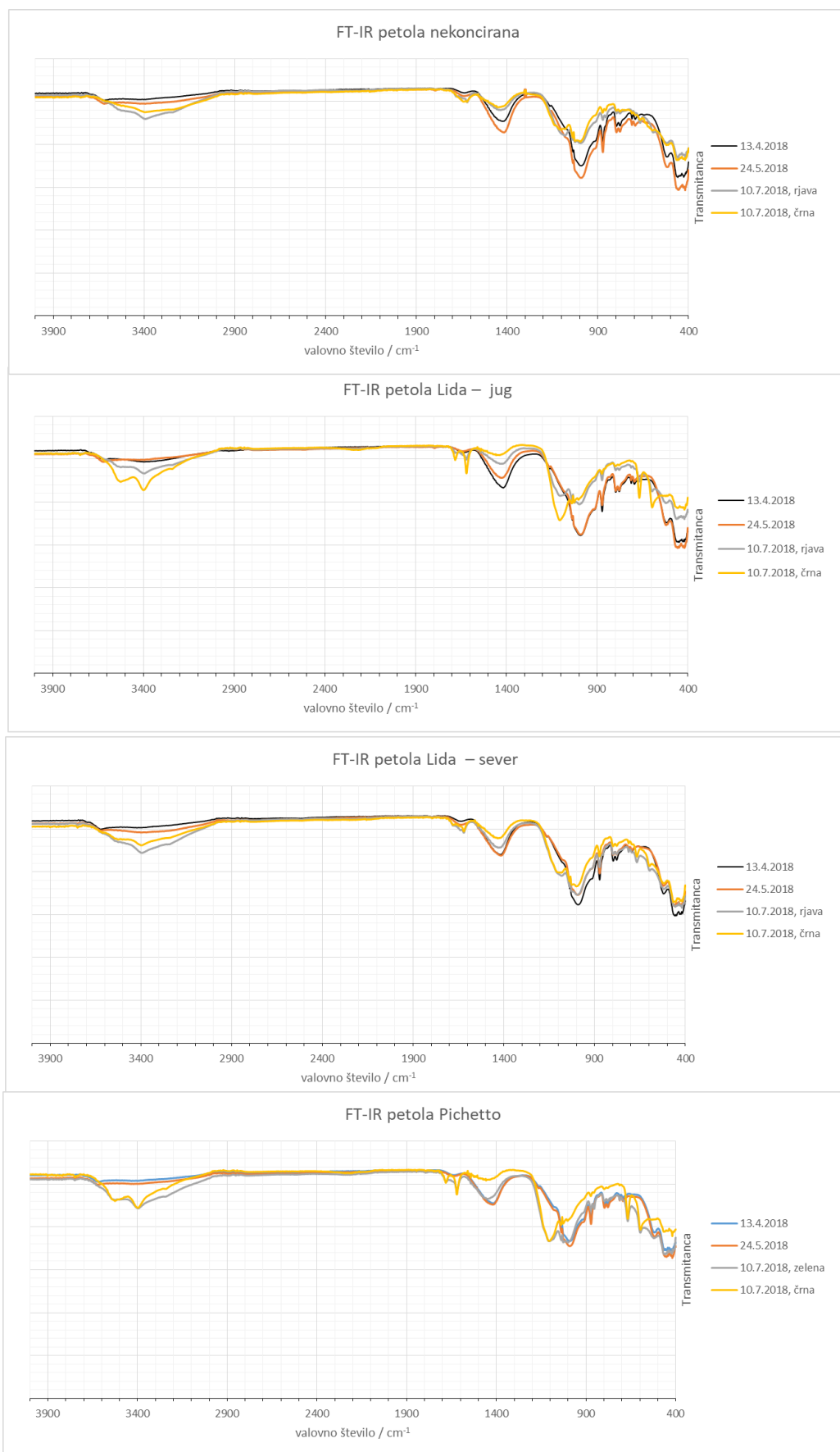
Rezultati elementne analize petole in solinskega blata so prikazani v tabeli 1. Iz rezultatov je možno sklepati, da odstopa le prva četrtina (nekoncirana), ki predstavlja negativno kontrolo. Pričakovali bi, da bi vrednosti za TOC in TN v drugi točki, ko je petola ozelenela, bile višje kot v prvi točki, ko petola še ni bila koncirana z blatom niti ni bila zelena, vendar tega ni opaziti. Vzrok za to bi lahko bil v zelo nenavadni solinarski sezoni – veliko dežja, tudi sama petola je zelo malo ozelenela, kar je v nasprotju z ostalimi leti. Po vrednostih TOC in TN lahko opazimo, da blato z različnih lokacij vsebuje manj organske snovi kot petola sama v katerikoli točki vzorčenja, kar lahko pojasni, zakaj vsebnost organske snovi po konciranju in ozelenitvi petole ni naraslo. Elementna analiza rjave in črne petole v tretji točki vzorčenja ni uspela pojasniti razlik med njima.

Tabela 1: Rezultati analize slanosti, vsebnosti celokupnega dušika (TN), celokupnega organskega ogljika (TOC) in izračunana razmerja med TN in TOC.

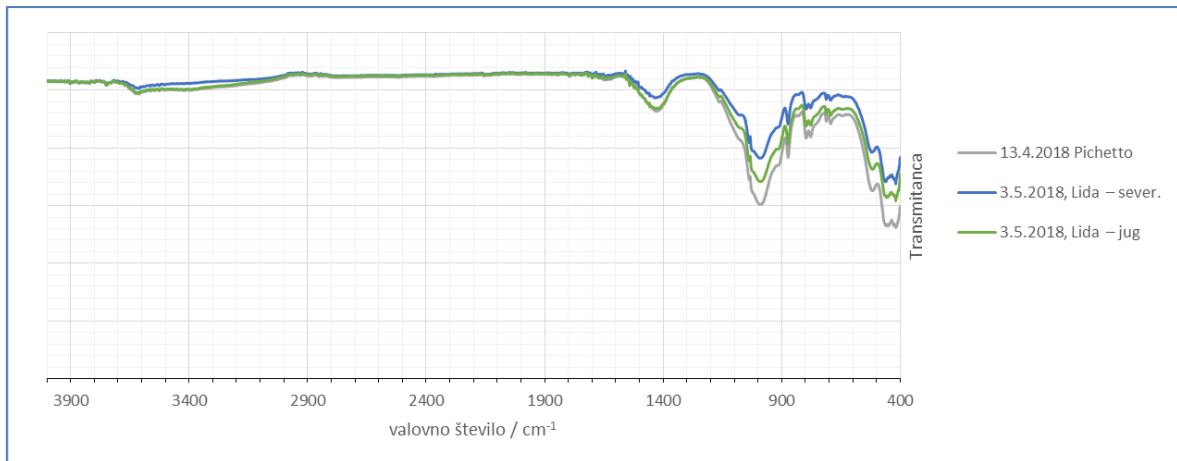
Vzorec	Datum vzorčenja	Slanost / % S	TN / %	TOC / %	TOC/TN
Petola nekoncirana	13.4.2018	3,4	0,49	3,50	8,4
Petola Lida – jug	13.4.2018	3,4	0,40	3,66	10,6
Petola Lida – sever	13.4.2018	3,4	0,45	3,57	9,3
Petola Pichetto	13.4.2018	3,4	0,41	3,30	9,4
Petola nekoncirana	24.5.2018	3,7	0,53	5,27	11,7
Petola Lida – jug	24.5.2018	3,7	0,30	2,44	9,3
Petola Lida – sever	24.5.2018	3,7	0,37	5,37	17,0
Petola Pichetto	24.5.2018	3,7	0,39	3,27	9,9
Petola nekoncirana, rjava	10.7.2018	27	0,31	2,51	9,5
Petola Lida – jug, rjava	10.7.2018	27	0,26	2,11	9,6
Petola Lida – sever, rjava	10.7.2018	27	0,24	1,79	8,5
Petola Pichetto, rjava	10.7.2018	27	0,24	1,55	7,4
Petola nekoncirana, črna	10.7.2018	27	0,55	5,88	12,5
Petola Lida – jug, črna	10.7.2018	27	0,16	1,14	8,1
Petola Lida – sever, črna	10.7.2018	27	0,33	2,67	9,5
Petola Pichetto, črna	10.7.2018	27	0,15	1,36	10,5
Blato Pichetto	13.4.2018	27	0,22	1,29	6,8
Blato Lida – sever	3.5.2018	27	0,20	1,28	7,5
Blato Lida – jug	3.5.2018	27	0,16	1,28	9,3

FT-IR spektroskopija

S FT-IR spektroskopijo smo želeli spremljati spremembo sestave organske snovi in mineralne sestave. V vseh FT-IR spektrih so prisotni glavni vrhovi pri 3000–3600, 1450 in 1150–1000 cm^{-1} , ki predstavljajo različna nihanja funkcionalnih skupin organske snovi in mineralov. Širok vrh pri 3400 cm^{-1} pripada vzdolžnemu nihanju O-H in N-H skupin, pri 3620 cm^{-1} pa bi lahko predstavljal nihanje nekaterih glinenih mineralov. Pri 1450 cm^{-1} je močan trak, ki bi lahko pripadal kalcitu kot tudi asimetričnem prečnem nihanju alifatskih skupin. Več vrhov pri 1000 – 1150 cm^{-1} pripada vibracijam C-O in Si-O v ogljikovih hidratih in silikatih. Med spektri ni bilo večjih razlik, saj se pri vseh pojavljajo vrhovi pri istem valovnem številu. Razlike so pa vidne pri intenziteti vrhov (transmitanci) (slika 10). Vzrok za to je sezonsko spreminjanje organske snovi ter predvsem mineralizacija številnih soli, ki se tekom koncentriranja slanice postopoma precipitirajo nad petolo. Eden izmed ključnih mineralov, ki ob povišani slanosti začne kristalizirati nad petolo je sadra ($\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), ki se kaže v razcepljenem vrhu pri 1119 in 1030 cm^{-1} . Le-ta bi lahko pojasnila nenadno trdnost petole, ki jo opazimo ob povišanih slanostih. Sama blata za konciranje imajo sodeč po FT-IR spektru podobno kemijsko sestavo kot vzorci petole (slika 11).



Slika 10: Časovno spreminjanje FT-IR spektrov vzorcev petole.



Slika 11: FT-IR spektri vzorcev blat za konciranje.

Zaključki

Ob pobiranju soli v bazenu št. 10 se je solinarju v četrtini, ki ni bila premazana z blatom, ugreznilo 17-krat, v ostalih četrtinah pa največ 5-krat. kaže, da konciranje petole z blatom pred začetkom solinarske sezone omogoči, da je petola ob pobiranju soli trdna. Pri pripravi vzorcev za elementno analizo smo lahko opazili, da je bila petola iz prve četrtine bazena za vsaj 30 % tanjša in dosti bolj krhka od vzorcev petole iz ostalih četrtin.

Ker smo v vsaki četrtini pri vseh vzorčenjih vzeli le en vzorec in se petola lahko tudi znotraj iste četrtine zelo spreminja, bi bilo potrebno odvzeti še večje število vzorcev, vendar tega zaradi časovnih in finančnih omejitev ni bilo mogoče izvesti. Elementna analiza blata je pokazala, da med blatom z različnih lokacij ni večjih razlik. Konciranje petole pred solinarsko sezono je izjemnega pomena, saj tako petola postane čvrstješa in hkrati bolj prožna, kar pripomore k čistejši soli bele barve, poleg tega pa omogoči tudi lažje pobiranje soli.

Vira:

- Glavaš N. (2013) Sestava in pretvorbe petole in solinskega blata v Sečoveljskih solinah. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
- Ovsyanyi E.I., Ziburdaev V.I., Romanov A.S. (2004) On the application of the units of measurement of the amount and composition of matter in oceanology. *Physical Oceanography*, 14: 243-254

Določanje stabilnosti eksogene DNA v solinskem blatu

Lana Vogrinec

Solinsko blato je kompleksen ekosistem mikrobnih združb, katerih sestava se spreminja z letnimi časi in zunanjimi pogoji. Prav tako se razlikuje mikrobnost sestava različnih blat, ki se uporabljajo za konciranje petole. V želji po določitvi mikrobne raznovrstnosti vzorcev solinskega blata smo se poslužili metode, ki temelji na izolaciji celotne genomske DNA in sekvenciranju zapisa za rRNA 16 S, ki je natančneje opisana v poglavju *Izolacija DNA iz solinskih blat in petole*. Uporabnost te metode temelji na hipotezi, da je celotna izolirana DNA v nekem trenutku odraz stanja takrat živečih mikroorganizmov. Po drugi strani izsledki predhodnih raziskav nakazujejo na to, da se lahko DNA v blatu in drugih naravnih vzorcih ohrani tudi po smrti mikroorganizmov in da je zaradi različnih vzrokov zaščitena pred razgradnjo. Namen tega sklopa projekta je bil, da določimo, kako stabilna je zunajcelična DNA v vzorcih solinskega blata za konciranje in kakšen pomen ima to za določanje mikrobne raznovrstnosti v omenjenih vzorcih.

DNA se v naravnih življenjskih okoljih prokariontov in evkariontov lahko nahaja znotraj- in zunajcelično. Vir zunajcelične DNA so predvsem mrtvi organizmi, katerih celice po smrti lizirajo. Usoda eksogene DNA v okolju je odvisna od več dejavnikov. Prihaja do mehanske fragmentacije, encimske razgradnje, privzema v celice živih organizmov in uporabe za vir energije. V kompleksnih okoljih, kakršno je solinsko blato, z različnimi fazami in deleži organske ter anorganske snovi, je možnosti še več. DNA z visoko molsko maso, ki se izloča iz živih ali mrtvih celic, se lahko adsorbira na trdne delce v blatu, ali ostane v tekoči fazi. Količina adsorbirane DNA je odvisna tako od vsebnosti mineralov in organskega ogljika v vzorcu, kot tudi od velikosti molekul DNA. V do sedaj opravljenih raziskavah na temo stabilnosti DNA v vzorcih zemlje in blata so ugotovili, da je adsorbirana DNA zaščitena pred razgradnjo in se v okolju ohranja dalj časa, medtem ko se neadsorbirana DNA razgradi zelo hitro (Nannipieri in Smalla, 2006). Zaradi raznolikosti naravnih vzorcev smo se odločili, da s poustvarjanjem opisanega procesa v laboratoriju določimo, kolikšen delež DNA se adsorbira na delce v solinskem blatu in kakšen vpliv ima to na stabilnost zunajcelične DNA.

Eksperimentalni sistem

Eksperimentalni sistem za določanje stabilnosti zunajcelične DNA v solinskem blatu je temeljil na dveh komponentah. Osnovo je predstavljalo solinsko blato iz kanala Pichetto, odvzeto pri prvem vzorčenju, v aprilu. Zaradi konsistentnosti izsledkov smo uporabljali samo ta vzorec in ne tudi preostalih solinskih blat iz drugih kanalov. Drugi del sistema je bila znana količina zunajcelične DNA, ki smo jo inokulirali v blato. Pri izboru tipa zunajcelične DNA je bilo potrebno upoštevati več dejavnikov, med drugim poznano velikost molekule, enostavnost izolacije in detekcije. Na podlagi tega smo se odločili za uporabo plazmidne DNA, pri čemer je zaradi svoje majhnosti najbolj ustrezen plazmid pUC19, ki je velik 2686 bp. Takšna poenostavitev sicer do neke mere vpliva na potek eksperimenta, saj je adsorpcija DNA na delce v blatu odvisna tudi od velikosti, kar je potrebno upoštevati pri interpretaciji.

Eksperiment je bil zastavljen tako, da smo alikvotu solinskega blata dodali določeno količino plazmida pUC19 in sistem inkubirali pri sobni temperaturi in zmerni svetlobi različna časovna obdobja. Inkubaciji je sledila izolacija zunajcelične DNA, ki je podrobneje opisana v nadaljevanju, in analiza z agarozno gelsko elektroforezo (AGE). Na podlagi primerjave količine plazmidne DNA, ki je ostala po različnih časih inkubacije, smo lahko ocenili, do kolikšne mere in kako hitro se zunajcelična DNA v solinskem blatu razgradi.

Izolacija zunajcelične DNA

Postopki za izolacijo celotne DNA iz blata ali drugih okoljskih vzorcev običajno temeljijo na metodah za lizo celic. Takšen je tudi postopek, ki smo ga uporabili za izolacijo genomske DNA z namenom določitve mikrobne raznovrstnosti blata. V primeru eksperimenta za določanje stabilnosti zunajcelične DNA v blatu pa tovrstne metode niso najprimernejše, saj DNA iz liziranih celicah predstavlja šum pri analizi z AGE. Posledično smo se odločili za uporabo protokola, ki temelji na izolaciji zunajcelične DNA brez lize celic. Pri takšnih metodah običajno z milimi pogoji elucije brez dodatnih mehanskih stresov povzročimo desorpcijo DNA z delcev, ki ostane v topni frakciji. V literaturi je navedenih več postopkov, ki so si v osnovi podobni. Razlikujejo se v sestavi pufru za elucijo, časih inkubacije in načinu pridobivanja DNA iz topne frakcije (Corinaldesi in sod., 2005). V nadaljevanju je opisan postopek, ki smo ga uporabili za izvedbo eksperimenta, hkrati pa so izpostavljene težave, s katerimi smo se srečevali tekom optimizacije omenjenega protokola.

Izbrani protokol temelji na uporabi fosfatnega pufru s pH = 6,8 za elucijo adsorbirane zunajcelične DNA. Dodatku pufru sledi rahlo stresanje na vibracijskem mešalniku in inkubacija pri 65 °C. Ob tem se DNA sprosti z delcev v tekočo fazo, ki jo po inkubaciji ločimo s centrifugiranjem. Supernatante shranimo na ledu, preostanek DNA pa reekstrahiramo iz blata z dvakratno ponovitvijo postopka. Zbrane supernatante nato očistimo proteinov z dodatkom kloroforma, s čimer olajšamo stopnjo obarjanja DNA. DNA oborimo z dodatkom izopropanola in kratkotrajno inkubacijo pri sobni temperaturi ali z dodatkom ledeno hladnega etanola in prekonočno inkubacijo pri -20 °C (Romanowski in sod., 1992). Alternativa opisanemu postopku za izolacijo DNA iz supernatantov je uporaba kompletov reagentov, ki temeljijo na silikatnih kolonah za vezavo DNA, vendar so se ti v našem primeru izkazali za neuporabne.

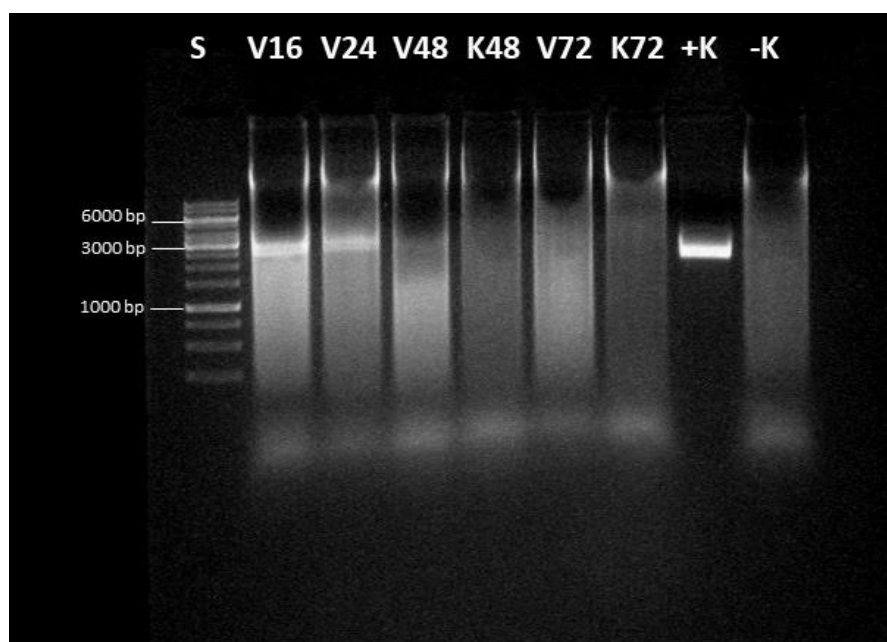
Pri izolaciji DNA iz vzorcev blata in zemlje pogosto prihaja do kontaminacije s humusnimi snovmi (različne organske snovi, prisotne predvsem v humusu), ki lahko motijo nadaljnje analize. Za preprečevanje tovrstne kontaminacije se uporabljajo različni dodatki, ki vežejo moteče komponente in olajšajo izolacijo DNA. Do zapletov pa lahko pride tudi zaradi uporabe takšnih dodatkov, ki lahko prav tako zmotijo nadaljnje korake pri izolaciji. V našem primeru smo za preprečevanje kontaminacije s humusnimi snovmi uporabljali polivinilpirolidon (PVP), ki smo ga kasneje zaradi dodatnih težav opustili. Izkazalo se je, da humusne snovi pri naši analizi ne predstavljajo velikega problema. Nasprotno se je PVP po dodatku izopropanola oboril hkrati z DNA in tako onemogočil analizo z agarozno gelsko elektroforezo.

Kljub preizkušanju različnih variacij osnovnega protokola, je trajalo precej časa, preden smo inokulirano plazmidno DNA uspešno izolirali iz vzorca blata. Zaradi prvotnih neuspehov pri izolaciji smo se odločili, da protokol preizkusimo tako, da blato zamenjamo z vodo in analiziramo vsak korak posebej. Na tak način smo želeli identificirati, katera stopnja v protokolu predstavlja težavo. Izkazalo se je, da je tekom izvedbe postopka prihajalo do razgradnje DNA z DNazami. Do te ugotovitve smo prišli po dodatku 100 mM EDTA (etilendiamintetraacetata), inhibitorja DNaz, v pufer za ekstrakcijo. Plazmidna DNA, izolirana iz vode s pufrom z dodanim EDTA, je bila po analizi z AGE vidna na gelu, medtem ko je pri vzorcih brez dodanega EDTA ni bilo. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da postopek za izolacijo zunajcelične DNA iz blata dopolnimo z dodatkom EDTA v pufer za ekstrakcijo.

Rezultati

Po uspešnem preizkusu protokola za izolacijo inokulirane plazmidne DNA iz solinskega blata smo izvedli eksperiment z različnimi časi inkubacije pri sobni temperaturi. Plazmid pUC19 smo z blatom inkubirali 16, 24, 48 in 72 ur. Ob izteku posameznih časov inkubacije smo izvedli izolacijo po zgoraj opisanem protokolu in izolate do analize shranili pri -70 °C. Ob koncu eksperimenta smo izolate odtalili in analizirali vsebnost plazmidne DNA z agarozno gelsko elektroforezo. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili enako količino čistega

plazmida pUC19, kot je bila inokulirana v blato ob začetku eksperimenta. Negativna kontrola je izolat DNA iz blata brez dodanega plazmida. Rezultati so prikazani na sliki 12.



Slika 12: Rezultat agarozne gelske elektroforeze izolatov DNA iz solinskega blata po inokulaciji in inkubaciji plazmida pUC19 (2686 bp). Legenda: S = standard (1 kb, GeneRuler), V16 = po 16 urah inkubacije, V24 = po 24 urah inkubacije, V48 = po 48 urah inkubacije, K48 = negativna kontrola po 48 urah inkubacije, V72 = po 72 urah inkubacije, K72 = negativna kontrola po 72 urah inkubacije, +K = pozitivna kontrola (čist plazmid pUC19).

Iz elektroforezne analize je razvidno, da se plazmidna DNA v solinskem blatu iz kanala Pichetto razgrajuje. Po 16 urah inkubacije je lisa pri velikosti plazmida jasno vidna in intenzivna, ob daljšanju časov inkubacije pa se intenziteta postopoma manjša. V izolatu po 72-urni inkubaciji je količina plazmidne DNA pod mejo detekcije. Na gelu je poleg plazmidne DNA vidna tudi delno razgrajena genomna DNA iz mikroorganizmov v solinskem blatu, čemur se pri izolaciji nismo mogli povsem izogniti. Kljub temu ne predstavlja večjega problema, saj je količina inokulirane plazmidne DNA dovolj velika, da se lisa jasno loči od ozadja.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da v solinskem blatu prihaja do razgradnje zunajcelične plazmidne DNA. Za natančnejšo kvantifikacijo razgradnje DNA v blatu bi bilo potrebno izvesti dodatne analize. Prav tako je potrebno upoštevati, da je stabilnost DNA v blatu odvisna od mnogih faktorjev, med drugim tudi velikosti, zato posploševanje rezultatov ni možno. Kljub temu pa nam lahko izvedeni eksperiment koristi pri interpretaciji rezultatov določanja mikrobne raznovrstnosti v solinskem blatu ob različnih časih.

Potrdimo lahko, da je naš izbor metode za določanje mikrobne skupnosti smiseln in da je izolirana DNA v nekem trenutku po vsej verjetnosti odraz takrat živečih mikroorganizmov. Možno je, da je prisotna tudi zunajcelična DNA že mrtvih mikroorganizmov, vendar je zaradi neprestane razgradnje njena količina manjša in verjetno ne vpliva na rezultate analize.

Viri:

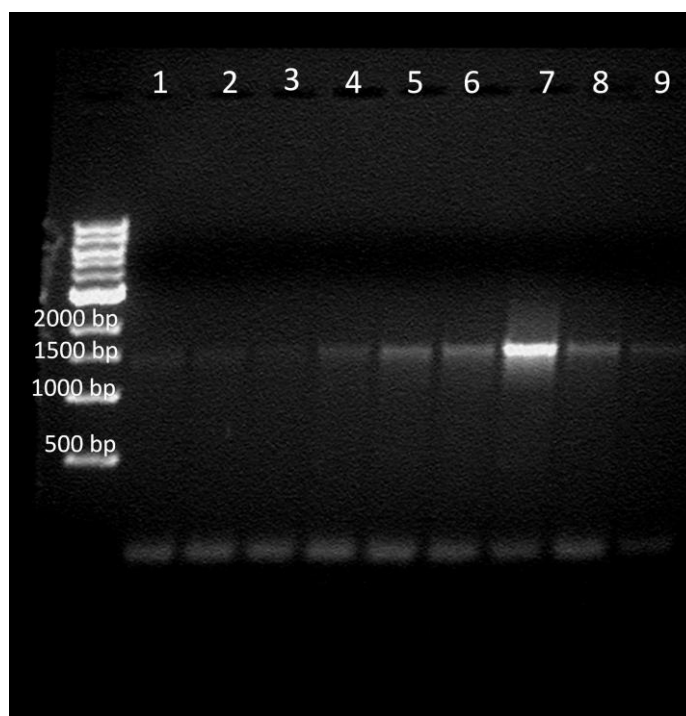
- Corinaldesi, C., Danovaro, R. in Dell'Anno A. (2005) Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(1): 46-50.
- Nannipieri, P. in Smalla, K. (2006) *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Springer. ISBN 978-3-540-29449-B.
- Romanowski, G., Lorenz, M. G., Saylor, G. in Wackernagel, W. (1992) Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(9): 3012-3019.

Določevanje mikrobne raznolikosti solinskih vzorcev z uporabo verižne reakcije s polimerazo

Vida Štrancar

Izolacija DNA iz solinskih blat in petole

Postopek izolacije DNA smo prilagodili tako, da smo dobili produkte, ki so kasneje pri pomnoževanju genomskega segmenta, ki zapisa za ribosomsko RNA 16 S (rDNA 16S), dali čim boljše rezultate. Izkazalo se je namreč, da je pomnožka rDNA 16S več v primeru, ko DNA izoliramo s postopkom grobe lize kot z uporabo postopka blage lize (Gabor in sodel., 1996). To je razvidno iz slike 13, kjer so prikazani pomnožki izolirane DNA z univerzalnimi bakterijskimi začetnimi oligonukleotidi.



Slika 13: Z univerzalnimi bakterijskimi začetnimi oligonukleotidi pomnožena DNA, izolirana iz morskega blata. Na progah 1-3 so vzorci, kjer je bila DNA izolirana po metodi blage lize, na progah 4-6 pa vzorci, kjer je bila DNA izolirana po protokolu grobe lize. Proge 7-9 predstavljajo pozitivne kontrole.

Postopek izolacije smo kasneje nadgradili z uporabo RNaze A, saj smo želeli biti prepričani, da smo izolirali le DNA in ne tudi RNA.

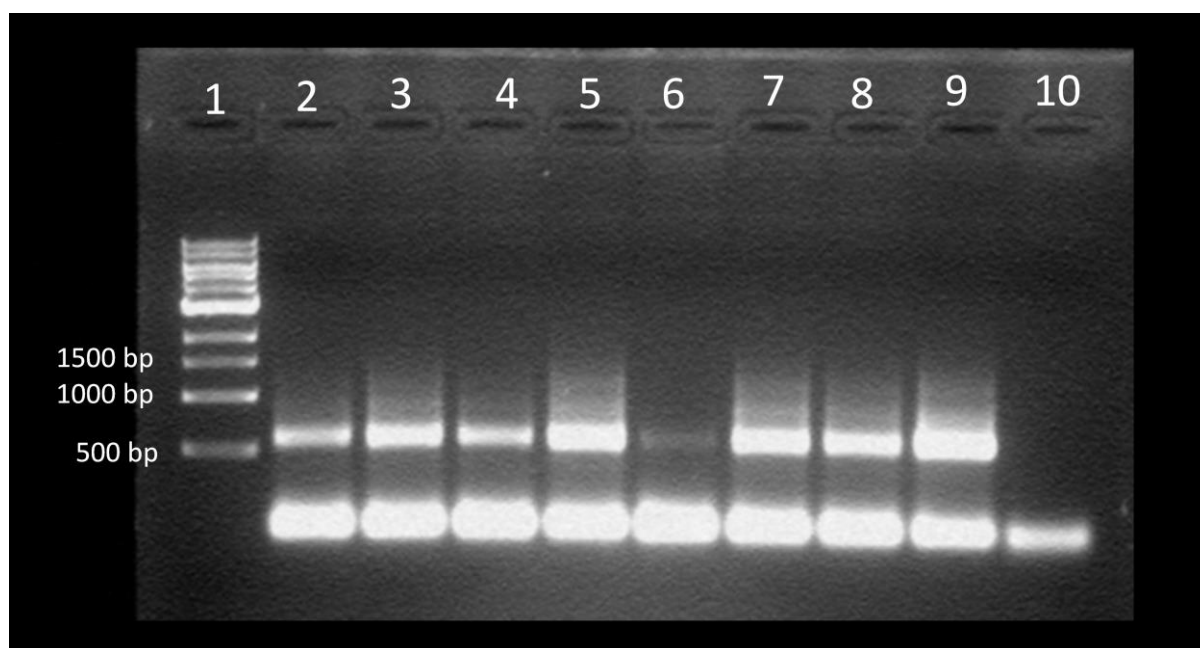
Izolacija DNA je bila predvsem težavna pri vzorcih petol. Petola je namreč precej kompaktna struktura, ki se kljub intenzivnemu mešanju s steklenimi kroglicami na vibracijskem mešalniku ni razpustila. Tako so bile izgube ogromne, saj smo uspeli reekstrahirati le manjši del DNA iz vzorca petole. V vseh primerih so bile probleme izgube na skoraj vsakem koraku. Te so bile še toliko večje, ko smo vzorce pipetirali ali jim s pipeto dodajali reagente. Blato in petola sta se namreč prijela na nastavke, ki smo jih nato zavrgli. Zaradi teh težav pri postopku izolacije se mi je kvantifikacija izolirane DNA zdela nesmiselna. Tudi če bi začetne količine vzorcev normalizirali, ne bi mogli napovedati izgub v postopku izolacije, saj so te precej naključne in ocenjujem, da so lahko ponekod presegale 10 %.

Ob delu z blatom sem opazila morfološke in organoleptične razlike med morskim blatom (Pichetto) in blatoma iz kanala Lida. Morsko blato je imelo enak, nemoteč in skoraj nezaznaven vonj ves čas, ko sem ga

uporabljala (18. 4. – 15. 5.). V tem času se je opazno spremenila le barva blata, ki je iz mat srednje svetlosive barve prešla na mat temnosivo, skoraj črno barvo. Blati iz kanala Lida sta bili že v začetku bistveno svetlejše barve kot morsko blato, vendar sta v roku enega meseca tudi ti dve blati spremenili barvo v temno sivo, skoraj črno. Njun vonj je bil še posebej na začetku zelo močan in neprijeten; smrdelo je po razgrajeni organski snovi in žveplovih spojinah. Blati sta se med seboj razlikovali po vonju, eno od blat je bistveno bolj smrdelo kot drugo. Fotografija blat po daljši hrambi pri 4 °C je na sliki 48 v poglavju, ki govori o analizi protimikrobnega delovanja solinskega blata.

Pomnoževanje vrstnospecifičnega zaporedja rDNA 16S

Izolirano DNA smo najprej pomnožili z univerzalnima bakterijskima začetnima oligonukleotidoma: 27F (5' – AGAGGTTTGATCMTGGCTCAG – 3') in 1492R (5' – TACGGYTACCTTGTTACGACTT – 3'). Program reakcije PCR smo izvedli po naslednjem postopku: 2 min začetne denaturacije pri 95 °C; 35 ciklov: 30 s denaturacije pri 95 °C, 30 s prileganja oligonukleotidov pri 55 °C, 2 min podaljševanja pri 72 °C; sledilo je končno podaljševanje 7 min pri 72 °C. Nato smo izvedli še vgnezdno reakcijo PCR, kjer smo pomnožke, pridobljene z uporabo univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov, pomnožili še z začetnima oligonukleotidoma 907R (5'–CCGTCAATTCMTTTGAGTTT–3') in 341F-GC (5'–CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCA CGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG–3'). Temperaturni program je bil v tem primeru drugačen: začetni denaturaciji pri 94 °C, 5 min je sledilo 10 ciklov, kjer smo postopoma nižali temperaturo prileganja za 1 °C v vsakem ciklu. Najprej je potekala enominutna denaturacija pri 94 °C, sledila je 1 min prileganja pri padajoči temperaturi (s 65 na 55 °C), nato pa še 3 min podaljševanja pri 72 °C. Opisanim desetim ciklom je sledilo 20 običajnih ciklov: 1 min denaturacije pri 94 °C, 1 min prileganja pri 55 °C ter 3 min podaljševanja pri 72 °C.

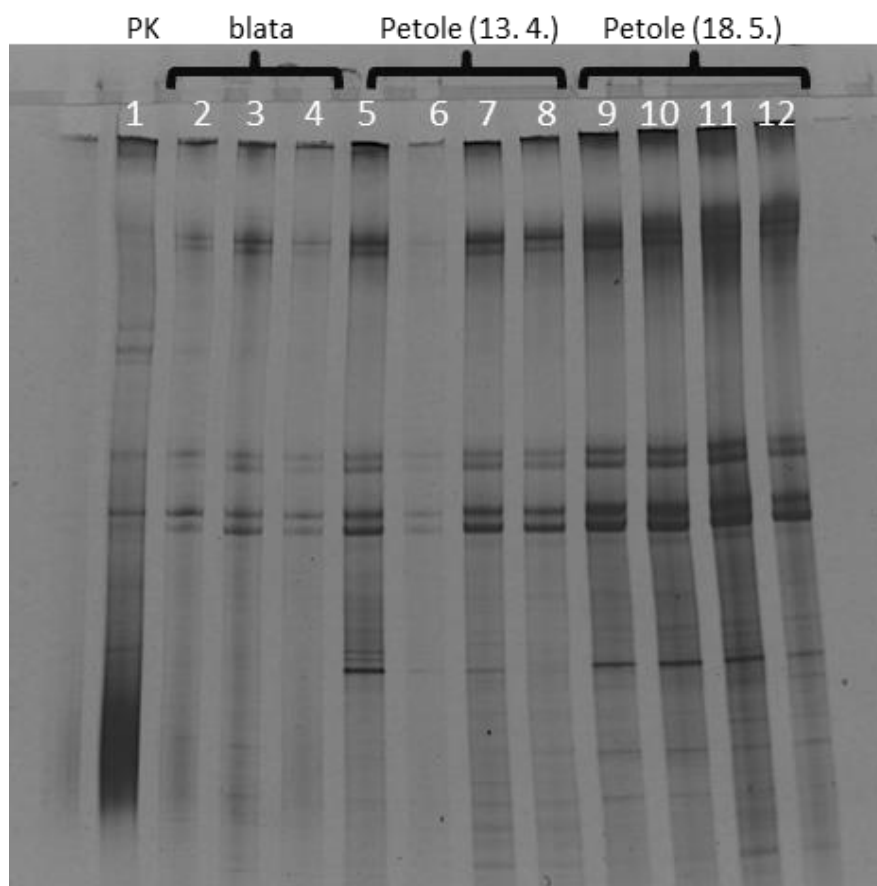


Slika 14: Produkti vgnezdenega PCR DNA, izolirane iz blat in petol z začetnimi oligonukleotidi za DGGE. Proga 1: standard 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs), 2: pomnožen vzorec DNA iz morskega blata, 3: DNA iz blata Lida-sever, 4: DNA iz blata Lida-jug, 5: DNA iz petole s polja 1, 6: DNA iz petole s polja 2, 7: DNA iz petole s polja 3, 8: DNA iz petole s polja 4, 9: pozitivna kontrola (*E. coli*), 10: negativna kontrola: dH₂O.

Reakcijo PCR smo morali precej optimizirati, saj je nekaj dejavnikov očitno preprečevalo uspešno pomnožitev. Izpostavila bom dva: DNA, ki sem jo izolirala iz blata in petole vsebuje precej nečistoč, ki se obarjajo skupaj z DNA. Te nečistoče se vežejo na DNA-polimerazo in blokirajo uspešno pomnoževanje. Ugotovili smo, da šele pri pomnoževanju 1000x redčene izolirane DNA pride do zadostne redčitve nečistoč in reakcija poteče uspešno. Drug dejavnik je bil dodatek govejega serumskega albumina (BSA) do končne koncentracije 32 µg/ml. Specifičnega učinka tega dodatka ne poznamo, vendar smo se tudi samo empirično lahko prepričali o tem, da dodatek BSA poveča učinkovitost reakcije PCR. Na sliki 14 so prikazani uspešno pomnoženi odseki DNA – lise so pri velikosti okrog 500 bp. Lise na dnu gela predstavljajo začetne oligonukleotide.

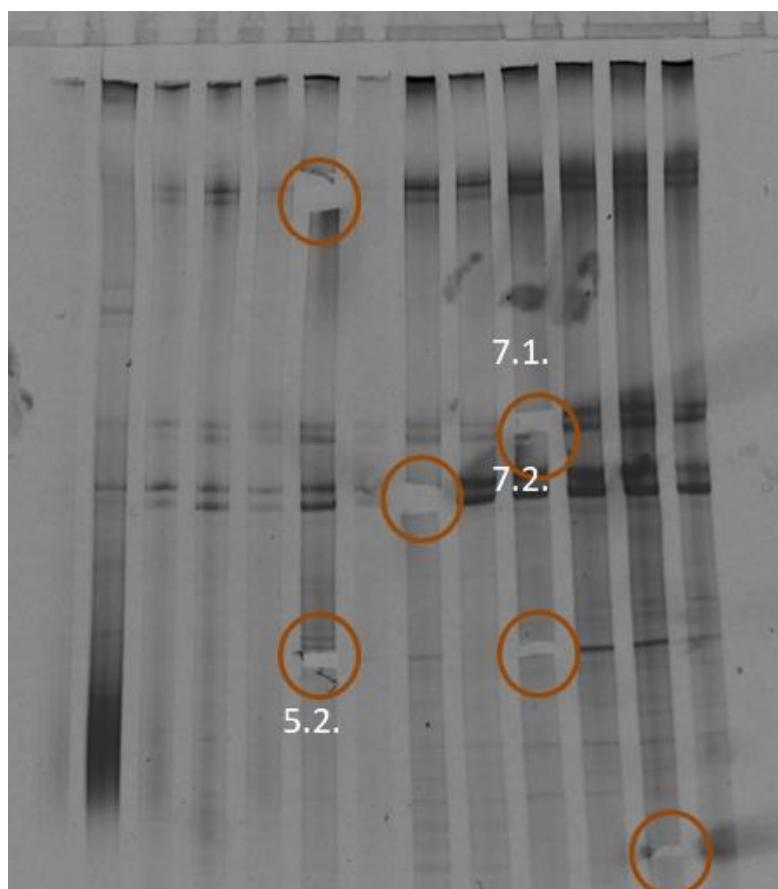
Analiza pomnoženih fragmentov z metodo DGGE

Z metodo denaturacijske gradientne gelske elektroforeze (DGGE) (Green in sodel., 2009) smo dobili kvalitativni vpogled v mikrobnost raznolikost blat in petole (slika 15). Iz gela je razvidno, da se petole po mikrobnosti raznolikosti med seboj ne razlikujejo veliko. Petole iz vzorčenja 18. maja bi lahko imele številčnejšo mikrobnost populacijo, vendar tega ne moremo z gotovostjo trditi, glede na to, da izolirane DNA nismo že v začetku kvantificirali. Blata imajo na prvi pogled bistveno manj številno mikrobnost populacijo, kljub temu se večina lis, ki so opazne pri petolah, pojavlja tudi pri blatih.



Slika 15: Denaturacijski gradientni gel, na katerega smo nanesti pomnožene odseke izolirane DNA. 1 – pozitivna kontrola, 2 – morsko blato, 3 – blato Lida-sever, 4 – blato Lida-jug, 5 – petola 1 (13. 4.), 6 – petola 2, 7 – petola 3, 8 – petola 4, 9 – nova petola 1 (18. 5.), 10 – nova petola 2, 11 – nova petola 3, 12 – nova petola 4.

Ker nas je zanimalo, kateri organizmi so prisotni v analiziranih vzorcih, smo iz gela izrezali nekaj lis (prikazano na sliki 16).



Slika 16: Denaturacijski gradientni gel, na katerem so s krogi označene izrezane lise. S številkami 5.2, 7.1 ter 7.2 so označene lise, ki smo jih poslali na določevanje nukleotidnega zaporedja.

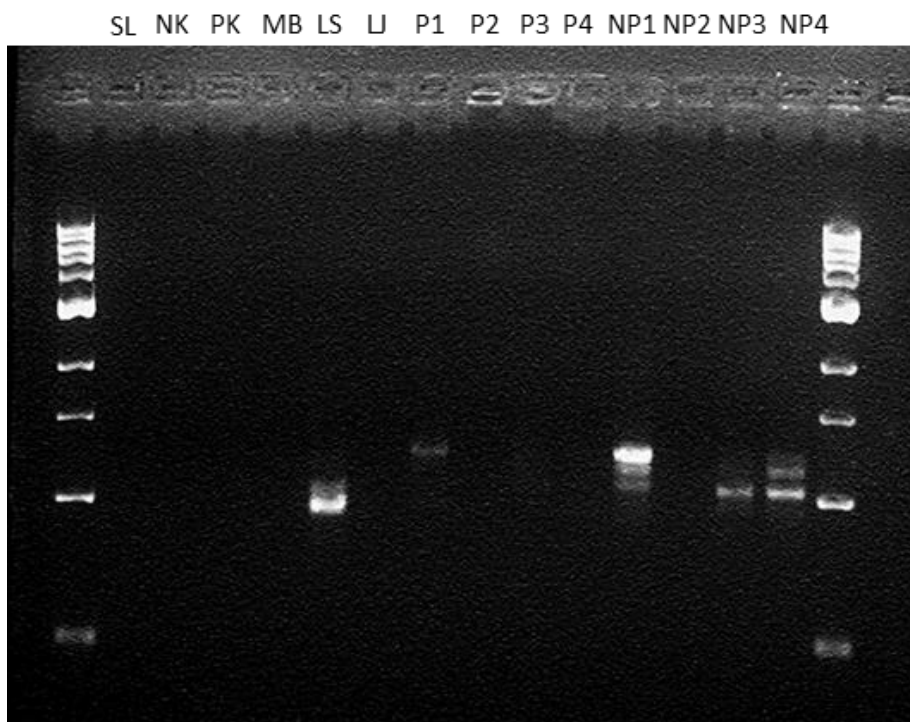
S prileganjem določenih nukleotidnih zaporedij DNA, izolirane iz lis, smo ugotovili naslednje: DNA iz lise, označene s **5.2** je **>97 % identična zaporedju rDNA 16S organizma *Coleofasciculus chthonoplastes***. Lise označene z 7.1 in 7.2 vsebujejo DNA, ki je najbolj podobna rDNA 16S predstavnikov **morskih α - ali γ -proteobakterij**. Iz pridobljenih informacij lahko sklepamo naslednje: v morskem blatu in obeh blatih iz kanala Lida je količina cianobakterije *Coleofasciculus chthonoplastes* pod mejo detekcije z metodo pomnoževanja vrstnospecifičnega zaporedja rDNA 16S s PCR. **Z veliko verjetnostjo lahko domnevamo, da omenjena cianobakterija v petolo NE pride preko konciranja z blatom, ampak je v petoli prisotna skozi celotno sezono.**

Pomnoževanje cianobakterijskih in algnih regij ITS

Pomnoževanje izolirane DNA iz vzorcev blata in petol

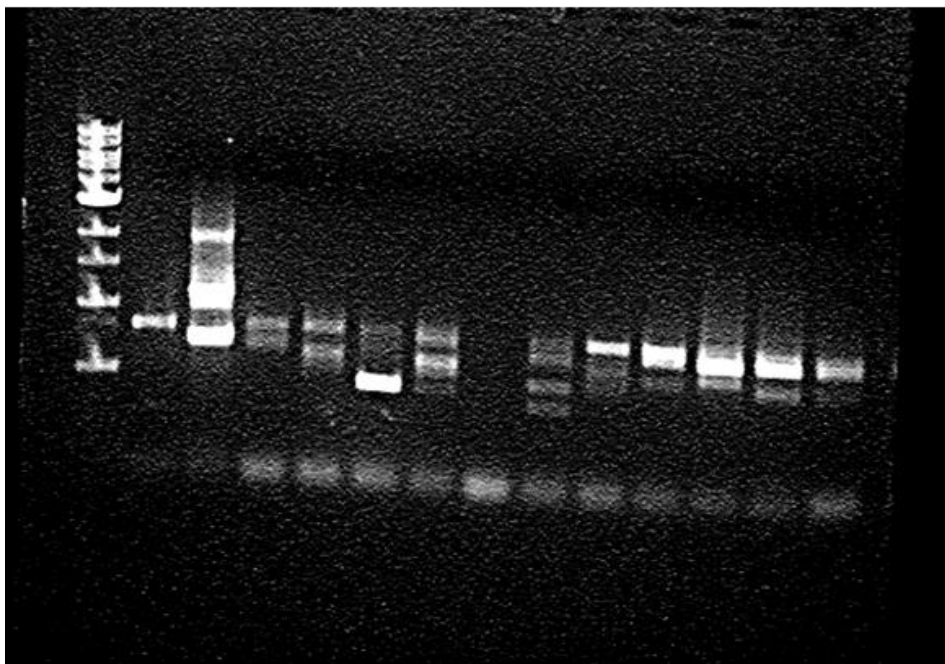
Z začetnimi oligonukleotidi, ki se prilegajo na cianobakterijsko regijo ITS in aljno regijo ITS2, smo najprej pomnožili izolirano DNA iz blat in petol. Kot za alge specifična začetna oligonukleotida smo uporabili ITS_f (5'-AGGAGAAGTCGTAACAAGGT-3') in ITS_r (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Produkta PCR smo analizirali z elektroforezo na 1 % (w/v) agaroznem gelu, rezultati pa so prikazani na slikah 17 in 18. Na osnovi slike 17 lahko sklepamo naslednje: vzorec blata iz kanala Lida-sever vsebuje določeno cianobakterijsko populacijo, prav tako so cianobakterije prisotne v vzorcih petole 1 s prvega vzorčenja ter v vzorcih petol 1, 3

in 4 z drugega vzorčenja. Slednji trije vzorci petole očitno vsebujejo več vrst cianobakterij, saj lahko pri vseh treh opazimo več kot eno liso. S slike 18 je razvidno, da vsi vzorci razen P2 vsebujejo pomnožke (razlog, zakaj v vzorcu P2 ni alg, bi bila lahko nehomogenost petole in posledična odsotnost algnih organizmov v delu petole, ki smo jo uporabili za izolacijo DNA). Ob tem naj povem, da je problematična lisa, ki jo vidimo pri negativni kontroli; ta je najverjetneje posledica kontaminacije reagentov ali opreme. Opazimo lahko tudi, da se blata med seboj precej razlikujejo po velikosti in količini pomnožkov. Očitno so blata med seboj ne le morfološko in organoleptično drugačna, ampak imajo tudi drugačno mikrobno sestavo. Na tem mestu bi bilo smiselno preveriti, katero blato najbolj ugodno vpliva na sestavo in funkcijo petole, vendar bi za to potrebovali bolj celovit in dolgoročen eksperiment. S slike 18 lahko sklepamo tudi na to, da petole drugega vzorčenja vsebujejo večjo množino algnih celic. Vendar lahko opazimo, da se v procesu zorenja petole zmanjša raznolikost algnih celic.



Slika 17: DNA, izolirana iz vzorcev blat in petol, pomnožena s cianobakterijskima začetnima oligonukleotidoma CSIF in CY23R. V žepke agaroznega gela so naneseni vzorci: SL: samo reagenti, NK: 1000x redčen vzorec kolonije *E. coli*, PK: 1000x redčen vzorec kolonije *Synechocystis* (cianobakterijski začetni oligonukleotidi), MB: morsko blato, LS: blato iz kanala Lida-sever, LJ: blato iz kanala Lida-jug, P1-P4: petole z vzorčenja 13.4. po poljih, NP1-NP4: petole z vzorčenja 18.5. po poljih.

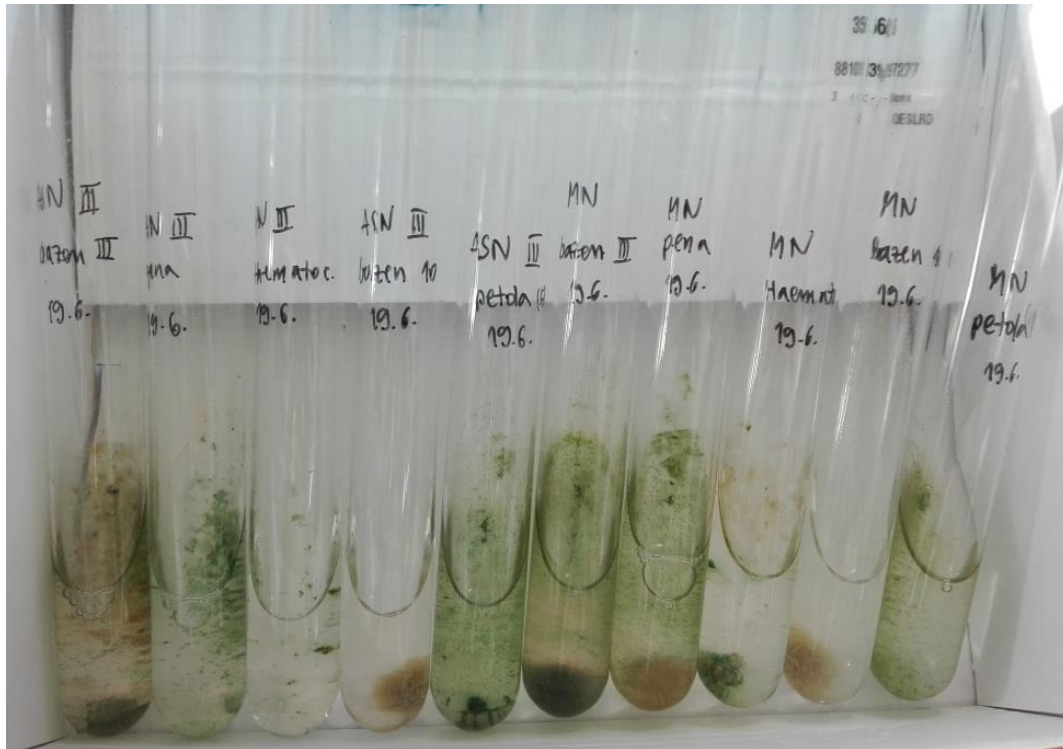
NK PK MB LS LJ P1 P2 P3 P4 NP1 NP2 NP3 NP4



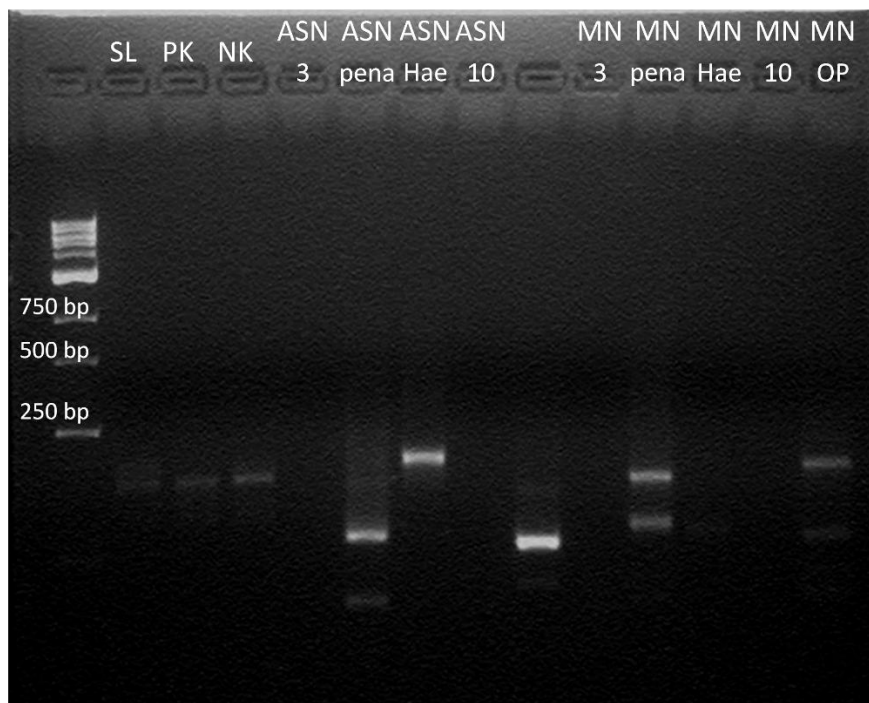
Slika 18: DNA, izolirana iz vzorcev blat in petol, pomnožena z algnima začetnima oligonukleotidoma ITS_f in ITS_r. V žepke so bili naneseni vzorci po PCR: NK: 1000x redčena kolonija *E. coli*, PK: 1000x redčena kultura alge *Dunaliella salina*, MB: morsko blato, LS: blato iz kanala Lida-sever, LJ: blato iz kanala Lida-jug, P1-P4: petole z vzorčenja 13.4. po poljih, NP1-NP4: petole z vzorčenja 18.5. po poljih.

Pomnoževanje ITS-regij mikroorganizmov iz različnih solinskih vzorcev

Različne vzorce iz solin sem precepila v tekoči gojišči ASN III in MN. Rast je prikazana na sliki 19. Omenjene vzorce sem pomnožila z začetnimi oligonukleotidi, ki se prilegajo na aljno regijo ITS. Rezultati reakcije PCR na osnovi kolonije so prikazani na 2 % (w/v) agaroznem gelu, prikazanem na sliki 20. Iz rezultatov lahko sklepamo, da je mikrobna populacija istih izvornih vzorcev v gojiščih ASN III in MN opazno drugačna. Lise se pojavljajo pri drugačnih velikostih glede na standard, poleg tega je očitno, da je v kulturah z gojiščem ASN III kvantitativno nekaj več celic. Gojišče ASN III je definirano gojišče, medtem ko je v gojišču MN filtrirana morska voda, katere podrobne sestave ne poznamo. Čeprav je gojišče ASN III s svojo točno določeno sestavo le približek morski vodi, je iz tega primera razvidno, da vzorci s strehe zalogovnika blata (vzorec Hae), pene in ozelenele petole bolje rastejo v njem kot v gojišču MN. Možna razlaga bi lahko bila, da morska voda vsebuje določene snovi, ki zavirajo rast vrst, ki zato bolje uspevajo v gojišču ASN III. Vzorec z roba bazena III je praktično gledano blato oziroma film, ki se je ustvaril na blatu, ki se nahaja ob robu bazena. V tem vzorcu in v vzorcu blata z roba bazena 10 očitno ni bilo dovolj algnih organizmov, da bi se lahko razmnožili v tekočih gojiščih. Zanimivo bi bilo oba vzorca pomnožiti s cianobakterijskimi začetnimi oligonukleotidi, da bi preverili hipotezo, da imajo cianobakterije blatno okolje raje kot alge.



Slika 19: Kulture različnih solinskih vzorcev v gojiščih ASN III in MN. Vrstni red: : bazen III - vzorec z roba bazena III, pena - vzorec pene, ki se je nabrala na vodi iz kristalizacijskega bazena, Haematoc. - vzorec luže na strehi zalogovnika blata (v vzporednem poskusu identificiran kot predstavnik rodu *Haematococcus*), bazen 10 - blato z roba bazena 10 ter petola 3 - ozelenela petola.



Slika 20: Agarozni gel z elektroforezno ločenimi produkti pomnoževanja alge regije ITS različnih solinskih vzorcev. V žepke so bili naneseni vzorci iz gojišč ASN III in MN. Okrajšave: 3 - vzorec z roba bazena III, pena - vzorec pene, ki se je nabrala na kristalizacijskem bazenu, Hae - vzorec luže na strehi zalogovnika za blato, 10 - blato z roba bazena 10, OP - ozelenela petola.

Preverjanje čistosti kulture cianobakterije *Coleofasciculus chthonoplastes*

Da bi preverila, ali smo uspešno izolirali cianobakterijo *Coleofasciculus chthonoplastes* (str. 59-60), sem s cianobakterijskima začetnima oligonukleotidoma pomnožila tudi DNA, izolirano iz kulture. Rezultati elektroforeze na 2 % (w/v) agaroznem gelu so prikazani na sliki 21. Kljub večkratni ponovitvi reakcije PCR produkta nismo dobili. Z orodjem BLAST sem primerjala zaporedja oligonukleotidov in ITS-regije cianobakterije *Coleofasciculus chthonoplastes* in ugotovila, da je prileganje skoraj popolno, z izjemo 5'-konca smernega nukleotida (prikazano na sliki 22). To pa ne bi smelo motiti pomnoževanja s polimerazo.



Slika 21: Agarozni gel elektroforezno ločenih pomnožkov reakcije s cianobakterijskima začetnima oligonukleotidoma CSIF in CY23R. Oznake: PK – pozitivna kontrola, cianobakterija *Synechocystis* PCC 6803; NK – negativna kontrola, alga *Scenedesmus*; 1 – vzorec kulture cianobakterije *Coleofasciculus chthonoplastes*.

Kaže, da razbijanje celičnih sten z vročino ni zadoščalo za sprostitvev DNA iz celic. Glede na pretekle izkušnje s cianobakterijami bi verjetno morali izvesti mehansko razbijanje z uporabo steklenih kroglic.

Smerni oligonukleotid CSIF:
5' – GTCACGCCCGAAGTCGTTAC – 3'

Microcoleus chthonoplastes PCC 7420 partial ribosomal RNA operon, strain PCC 7420
Sequence ID: [AM709630.1](#) Length: 4705 Number of Matches: 9

Range 1: 1329 to 1346 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
36.2 bits(18)	2e-05	18/18(100%)	0/18(0%)	Plus/Plus

Query 3 CACGCCCGAAGTCGTTAC 20
Sbjct 1329 CACGCCCGAAGTCGTTAC 1346

Protismerni oligonukleotid CY23R:
5' – GTGCCTGTTGAAGAATGAG – 3'

Microcoleus chthonoplastes PCC 7420 partial ribosomal RNA operon, strain PCC 7420
Sequence ID: [AM709630.1](#) Length: 4705 Number of Matches: 5

Range 1: 2542 to 2560 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
38.2 bits(19)	4e-06	19/19(100%)	0/19(0%)	Plus/Plus

Query 1 GTGCCTGTTGAAGAATGAG 19
Sbjct 2542 GTGCCTGTTGAAGAATGAG 2560

Slika 22: Prikaz prileganja oligonukleotidov CSIF in CY23R na ITS-regijo cianobakterije *Coleofasciculus chthonoplastes*.

Vira:

- Gabor E., de Vries E., Janssen D.B. (2006) Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 153-163.
- Green S.J., Leigh, M.B., Neufeld, J.D. (2009) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. V knjigi: *Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids and Derived Compounds*. Heidelberg: Springer, str. 4137-4158.

Prepoznavanje solinskih mikroorganizmov na osnovi morfoloških lastnosti in značilnih zaporedij DNA

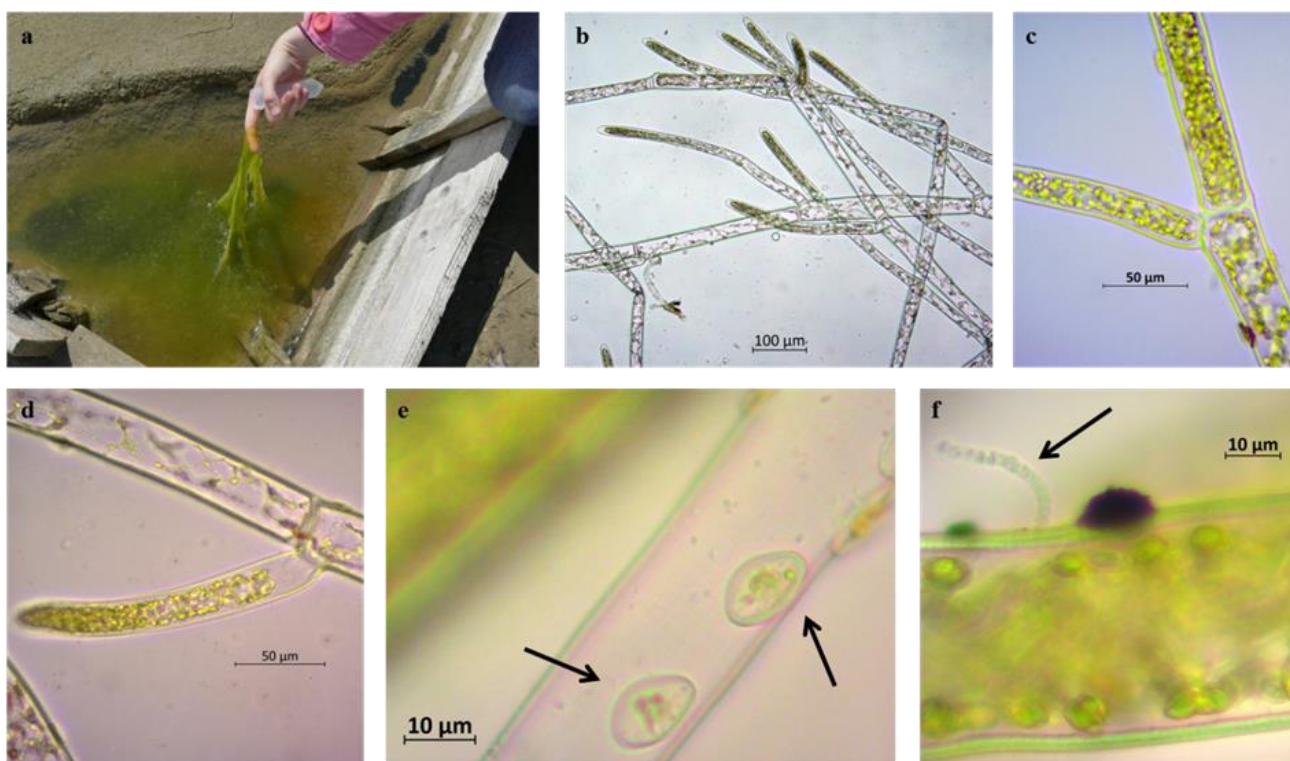
Mojca Juteršek

Pri projektu sem bila zadolžena za mikrobiološko analizo vzorcev s solin, in sicer za prepoznavanje mikroorganizmov na osnovi morfoloških značilnosti z mikroskopiranjem in za identifikacijo na podlagi nukleotidnih zaporedij vrstnospecifičnih genomskih regij. Analizirala sem zanimive vzorce s kristalizacijskih bazenov in vzorce petol:

- vzorec zelene makroalge z roba kristalizacijskega bazena
- vzorec rožnato obarvane vode na robu kristalizacijskega bazena
- vzorec rdeče obarvanih luž na strehi zalogovnika za solinsko blato pri skladišču soli
- vzorce v laboratoriju gojene petole, premazane ali nepremazane s solinskim blatom

Vzorec zelene makroalge z roba kristalizacijskega bazena

Pri prvem vzorčenju petole (13.04.2018) smo si ogledali tudi postopek konciranja na kristalizacijskem bazenu številka 13. Pri tem smo v kanalih ob robovih (predvsem v kotih) opazili gmoto zelenih alg (slika 23a). Mikroskopiranje je pokazalo, da gre za večcelično zeleno algo z nitasto (filamentozno) in razvejano steljko, z razvejitvami tik pod septumom (slike 23b, 23c in 23d). Posamezne celice so bile cilindrične oblike in daljše (približno 200 μm) kot širše (približno 30 μm) z večjim številom diskasto oblikovanih kloroplastov. Poleg tega smo opazili tudi različne epifite, na primer enocelične alge (slika 23e) in cianobakterije (slika 23f).



Slika 23: Zelena makroalga v kristalizacijskem bazenu. a – v kotu kanala ob kristalizacijskem bazenu številka 13 smo nabrali vzorec zelene alge, b – slika alge pri 400-kratni povečavi, c,d – slika alge pri 1000-kratni povečavi, e – slika epifitskih alg pri 1000-kratni povečavi, f – slika epifitskih cianobakterij pri 1000-kratni povečavi.

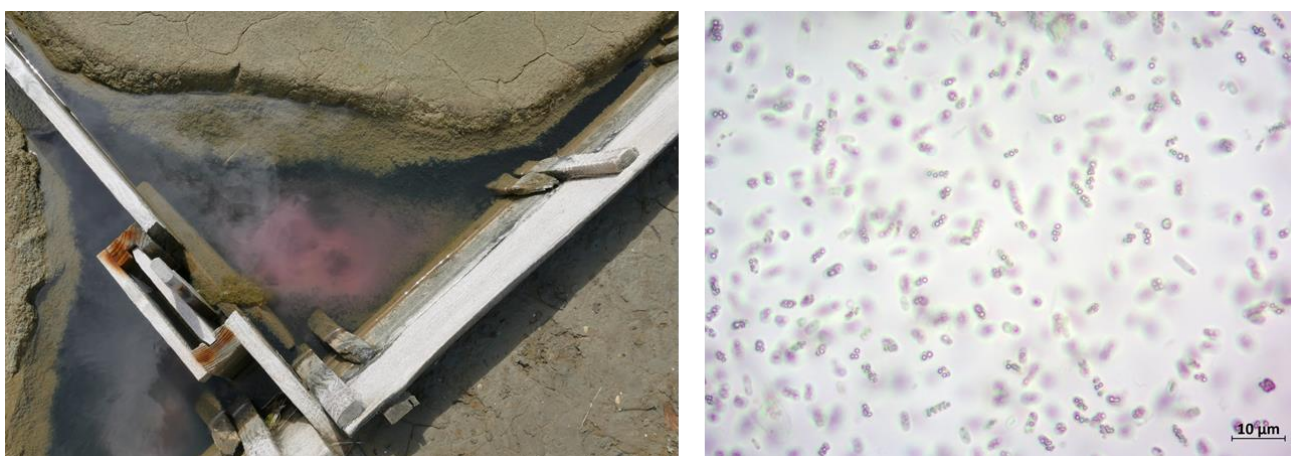
Na podlagi morfoloških značilnosti smo sklepali, da gre za vrsto, ki spada v rod *Cladophora* iz razreda zelenih alg (Ulvoophyceae). Gre za splošno razširjen rod, katerega predstavnike najdemo v sladki in slani vodi in so bili opisani tudi na slovenski obali (Battelli, 1997 in 2000). V določenih primerih lahko pride tudi do škodljivega prekomernega razraščanja alge. Kljub temu, da je bilo v Slovenskem primorju opisanih več vrst, sami nismo uspeli nabrane alge taksonomsko določiti na nivoju vrste, saj bi morali določiti še dodatne morfološke znake, na primer strukturo rizoidov, ki jih vzorci niso vključevali. Hkrati je zaradi fenotipske plastičnosti v odvisnosti od okoljskih razmer zanesljivost določevanja na osnovi morfologije nizka.

Algo smo opazili pri prvem vzorčenju, ko je bila slanost vode v kristalizacijskih bazenih nizka (primerljiva s slanostjo morske vode), medtem ko pri kasnejših vzorčenjih, ko je slanost vode narasla in je potekalo pobiranje soli, alge nismo več opazili.

Najdba bi lahko bila pomembna za podjetje SOLINE Pridelava soli d.o.o., saj bi v primeru prekomernega razraščanja *Cladophora* lahko ovirala delo na solinah. Pri tem je zanimivo, da alga in njeni epifiti lahko predstavljajo zatočišče in vir hrane za rastlinojede organizme, med drugim za ličinke žuželk (Furey in sod., 2012), ki se hkrati lahko prehranjujejo tudi z algami in cianobakterijami v petoli. Ekološki pomen teh interakcij je v solinah še neraziskan in bi lahko prispeval k ohranjanju krajinskega parka ali tradicionalnega načina pridobivanja soli.

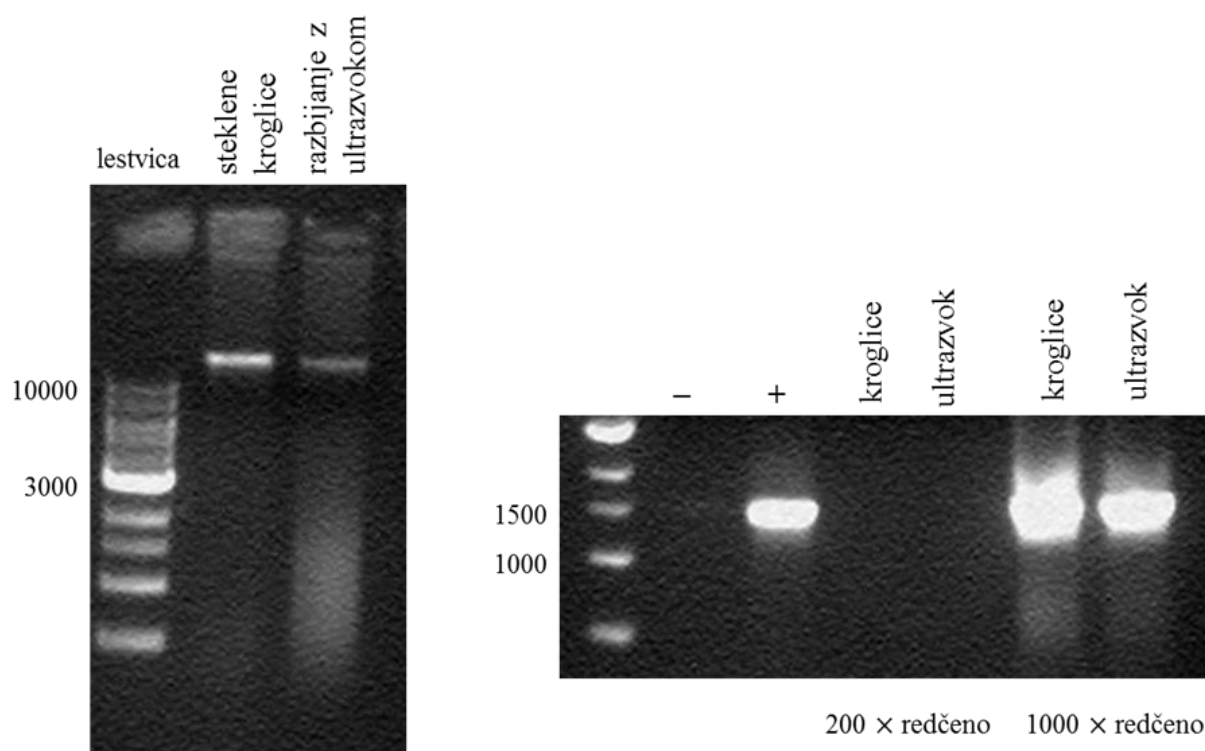
Vzorec rožnato obarvane vode na robu kristalizacijskega bazena

V kotih kristalizacijskih bazenov pred konciranjem smo opazili rožnat sediment oziroma oblak v vodi (slika 24, levo). Podobno smo opazili tudi pri naslednjem vzorčenju, pri katerem slanost vode še ni narasla. Mikroskopska analiza je pokazala, da ne gre za anorganski sediment, ampak za prokariotske organizme paličaste oblike, velike nekaj μm (slika 24, desno). V celicah so bili opazni kroglasti vključki. Glede na morfološke značilnosti smo sklepali, da gre za škrlatne žveplove bakterije iz družine Chromatiaceae, za katere so značilni znotrajcelični vključki elementarnega žvepla, produkt oksidacije sulfida. Znano je, da so škrlatne žveplove bakterije prisotne v petoli, in sicer v plasti RDL (angl. redox discontinuity layer), ki je tudi pogosto obarvana rožnato in predstavlja mejo med zgornjimi oksičnimi in spodnjimi anoksičnimi plastmi petole (Schneider in Herrmann, 1979). Najdba bakterij v vodi z nizko slanostjo se nam je zdela presenetljiva, saj nismo pričakovali, da je okolje anoksično, vendar vsebnosti kisika nismo merili.



Slika 24: Vzorec rožnato obarvane vode z roba kristalizacijskega bazena. Levo je fotografija mesta vzorčenja v kotu kristalizacijskega bazena številka 13 in desno fotografija vzorca vode pri 1000-kratni povečavi.

Da bi opažene bakterije natančneje taksonomsko identificirali, smo iz vzorca izolirali DNA s kompletom reagentov QIAamp DNA Mini. Preizkusili smo dva načina celične lize in sicer razbijanje z ultrazvokom (3×10 s, 100 W) in s steklenimi kroglicami (premer 150–212 μm , za približno tretjino volumna vzorca, stresanje na vibracijskem mešalniku 5×1 min). Po razbijanju celic smo sledili navodilom proizvajalca kompleta reagentov (Qiagen). Analiza z agarozno gelsko elektroforezo (slika 25, levo) je pokazala prisotnost DNA v vzorcih pri obeh načinih lize, pri čemer je bil pri razbijanju s steklenimi kroglicami delež visokomolekularne DNA (več kot 10.000 bp) večji kot pri razbijanju z ultrazvokom, kjer so bili na gelu vidni krajši fragmenti (manj kot 3000 bp).



Slika 25: Izolacija genske DNA iz vzorca rožnato obarvane vode in pomnoževanje regije rDNA 16 S. Levo je fotografija 0,8-odstotnega agaroznega gela po elektroforezi vzorcev izolirane genske DNA z uporabo dveh različnih načinov celične lize. Desno je fotografija 1,5-odstotnega agaroznega gela po elektroforezi produktov PCR (minus označuje negativno kontrolo – brez matrice DNA in plus pozitivno kontrolo z lizatom *Synechocystis* sp. PCC 6803). Pri pozitivni kontroli in pri 1000-krat redčenih vzorcih smo dobili pričakovan produkt dolžine približno 1400 bp.

Po izolaciji genske DNA smo s PCR pomnožili regijo rDNA 16 S, ki se uporablja za taksonomsko identifikacijo prokariotskih organizmov. Reakcijo smo izvedli z 10 μl mešanice dNTP, polimeraze *Taq* in reakcijskega pufra (PCR MM, Thermo Fisher Scientific) in 1 μl 200- ali 1000-krat redčenega vzorca genske DNA. Uporabili smo tudi po 1 μl 10 μM smernega (27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') in protismerne oligonukleotida (1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') ter dopolnili z vodo do 20 μl . Program PCR je bil: 5 min začetne denaturacije pri 95 °C in nato 30 ciklov 30 s pri 95 °C, 30 s pri 50 °C in 2 min pri 72 °C, čemur je sledilo še 7 min zaključnega podaljševanja pri 72 °C. Produkte smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo in ugotovili, da je bil PCR uspešen pri obeh načinih lize celic, ampak le pri 1000-kratni redčitvi vzorca izolirane DNA, kar je najverjetneje posledica prisotnosti inhibitornih snovi v okoljskem vzorcu, katerih koncentracija se zadostno zniža šele pri 1000-kratnem redčenju. Dobljene amplikone smo izolirali iz agaroznega gela s kompletom reagentov E.Z.N.A. Gel Extraction Kit po navodilih proizvajalca (Omega Bio-

tek) in preko topih koncev ligirali v klonirni vektor pJET1.2 (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Fisher Scientific). Z rekombinantnimi vektorji smo transformirali kompetentne celice bakterije *Escherichia coli* (sev DH5 α) in jih inkubirali na agarji plošči z dodanim antibiotikom ampicilinom preko noči pri 37 °C. Zrasle kolonije smo analizirali s PCR na osnovi kolonije in izbrali štiri, ki so kazale prisotnost ustreznih vključkov v vektorju. Kolonije smo nacepili v 10 ml tekočega gojišča LBA in inkubirali preko noči pri 37 °C. Iz prekončnih kultur smo izolirali plazmide in jih pripravili za sekvenciranje z začetnim oligonukleotidom pJETF (GATC Biotech). Nukleotidna zaporedja smo analizirali z orodjem BLAST in ugotovili, da so nukleotidna zaporedja iz baz z največjim ujemanjem enaka za vse 4 klone (slika 26). Večina zaporedij ni bila anotirana s taksonomsko oznako organizma, saj je šlo za zaporedja iz negojenih organizmov, najdenih v naravnem okolju. Tista zaporedja, ki so imela pripisano taksonomsko oznako organizma, so pripadala različnim sevom iz rodu *Halochromatium*. Zaporedja negojenih organizmov so izhajala iz analiz vzorcev Sečoveljskim solinam ekološko sorodnih okolij, na primer raziskav mikrobioloških združb v slanih jezerih in mikrobnih preprogi iz solin Guerrero Negro (Mehika). Odstotek ujemanja nukleotidnih zaporedij je precej visok in načeloma višji od meje, ki naj bi omejevala vrste istega rodu (95 %). Na podlagi nukleotidnih zaporedij bi zato lahko sklepali, da gre v Sečoveljskih solinah za vrsto iz rodu *Halochromatium*, vendar bi bila za zanesljivejšo taksonomsko določitev potrebna tudi natančnejša morfološka in fiziološka analiza. Škratne žveplove bakterije iz petole so namreč v vsej dosednji literaturi uvrščali v rod *Chromatium* (Tkavc in sod., 2011). Natančnejše analize bi morda razkrile tudi nove ekološke vloge teh bakterij v petoli.

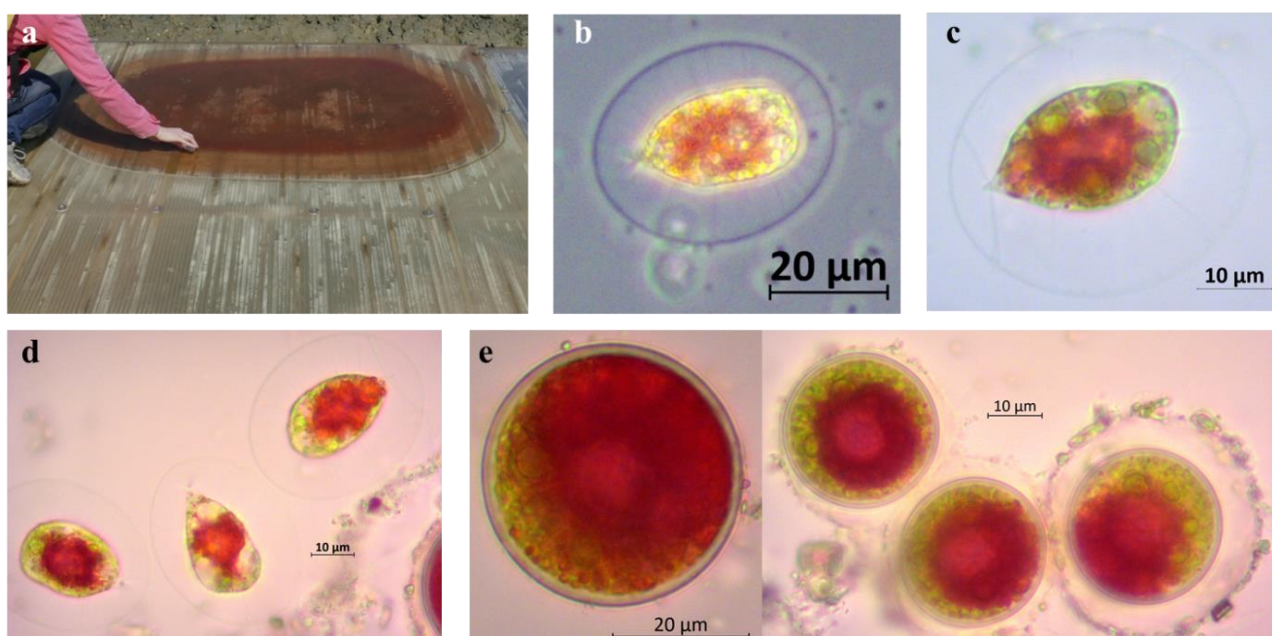
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured bacterium clone PBS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1646	1646	100%	0.0	98%	KM270490.1
Uncultured bacterium clone TV001_46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1629	1629	100%	0.0	97%	JX521705.1
Uncultured Halochromatium sp. 16S rRNA gene, isolate EG18	1624	1624	99%	0.0	97%	AM691090.1
Uncultured bacterium partial 16 rRNA gene, clone 54-OC8	1611	1611	100%	0.0	97%	HE797788.1
Halochromatium sp. MTK2IM039 partial 16S rRNA gene, strain MTK2IM039	1609	1609	97%	0.0	98%	FN293068.1
Uncultured organism clone SBYC_6090 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97%	JN448298.1
Uncultured organism clone SBYB_5764 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	98%	0.0	97%	JN442326.1
Uncultured organism clone SBYO_1678 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1605	1605	98%	0.0	97%	JN465963.1
Uncultured organism clone SBYC_5447 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1604	1604	99%	0.0	97%	JN447691.1
Uncultured organism clone SBYB_4775 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1604	1604	98%	0.0	97%	JN441470.1
Uncultured organism clone SBYN_3782 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1602	1602	98%	0.0	97%	JN463711.1
Uncultured organism clone SBYN_1733 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1602	1602	98%	0.0	97%	JN461026.1
Uncultured organism clone SBYO_5793 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1600	1600	98%	0.0	97%	JN470795.1
Uncultured organism clone SBYN_2770 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1600	1600	98%	0.0	97%	JN462494.1
Uncultured organism clone SBYH_1565 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1600	1600	98%	0.0	97%	JN454737.1
Uncultured organism clone SBYB_3486 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1600	1600	98%	0.0	97%	JN440314.1
Halochromatium sp. AR2202 partial 16S rRNA gene	1600	1600	98%	0.0	97%	AJ401219.1
Uncultured organism clone SBYN_6454 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1598	1598	98%	0.0	97%	JN464678.1
Uncultured organism clone SBYC_5472 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1598	1598	99%	0.0	97%	JN447715.1

Slika 26: Rezultati analize nukleotidnih zaporedij iz vzorca rožnato obarvane vode z orodjem BLAST. Na sliki je prvih 19 rezultatov z najboljšim ujemanjem.

Vzorec rdeče obarvanih luž na strehi zalogovnika za blato pri skladišču soli

Pri aprilskem vzorčenju smo opazili, da so luže na pleksi steklih nad zalogovnikom uležanega solinskega blata (pri odprtem skladišču soli) obarvane rdeče in predvidevali, da gre morda za algo *Dunaliella salina*, ki je sicer pogosta v zelo slanih okoljih in znana tudi iz Sečoveljskih solin. Vendar smo z mikroskopskimi analizami ugotovili, da gre najverjetneje za enocelično algo *Haematococcus pluvialis*, znano po visoki vsebnosti antioksidanta astaksantina. *H. pluvialis* je sicer sladkovodna alga in tudi naše meritve so pokazale, da luže, iz katerih smo dobili vzorec alge, niso slane.

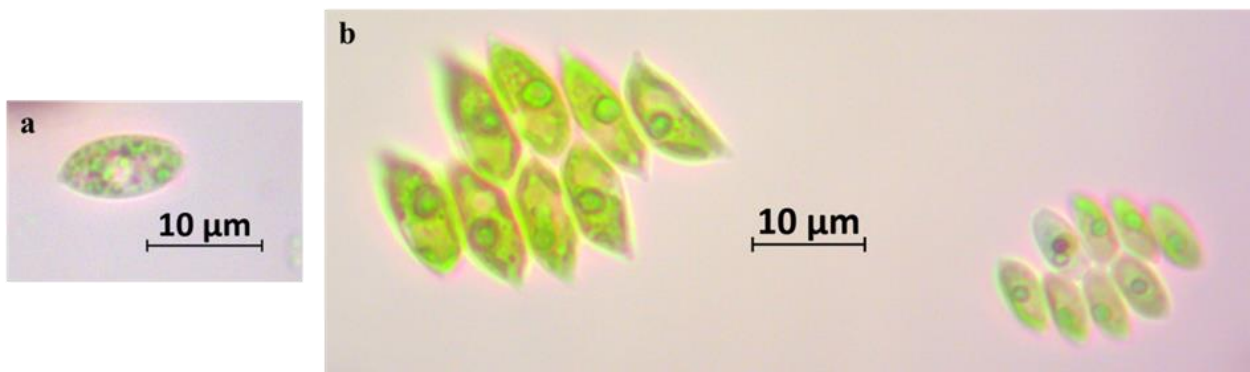
Pri mikroskopiranju (slika 27) smo opazili zelene in rdeče vegetativne celice hruškaste oblike, ki so se premikale z uporabo dveh bičkov na sprednji strani. Dobro razviden je bil tudi želatinozni zunajcelični matriks z radialnimi nizi citoplazme, ki omogočajo pritrjanje protoplasta na zunanjo plast celične stene. Poleg vegetativnih celic smo opazili tudi mirujoče aplanospore z nakopičenimi karotenoidi, zaradi katerih so bile obarvane rdeče.



Slika 27: Vzorec rdeče obarvanih luž pri skladišču soli. a – mesto vzorčenja na pleksi steklu, ki pokriva zalogovnik blata, b – celica, fotografirana pod mikroskopom s faznim kontrastom, kjer so razvidni radialni snopi citoplazme med zunajceličnim matriksom, c – fotografija celice z zunajceličnim matriksom in rdeče obarvanim protoplastom, d – fotografija celic z različnim deležem rdeče obarvanosti protoplasta, e – fotografije aplanospor z različnim deležem rdeče obarvanosti.

Haematococcus pluvialis je komercialno pomembna alga, saj je najbogatejši naravni vir antioksidanta astaksantina, ki se uporablja kot prehranski dodatek (za živali in ljudi) in v kozmetičnih izdelkih. Ker algi rastni pogoji v Sečoveljskih solinah ustrezajo in omogočajo sintezo astaksantina, bi bila lahko zanimiva za gojenje in za pridobivanje antioksidanta, uporabnega v prehranskih in kozmetičnih izdelkih podjetja Soline ali za njihov center dobrega počutja.

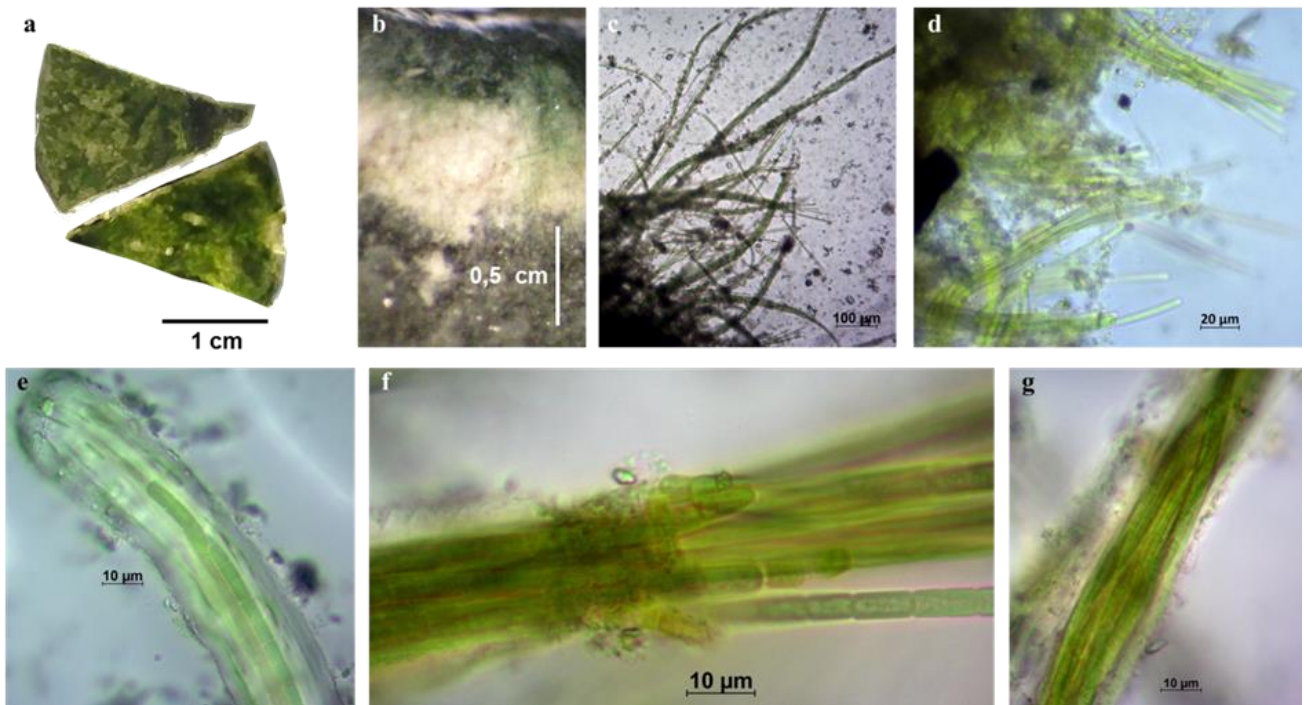
Poleg alge *Haematococcus pluvialis* smo opazili tudi manjše, vretenasto oblikovane zelene enocelične alge. Vzorec rdeče obarvane luž smo tudi nacepili v tekoče gojišče BG-11 in zrasla je kultura zelene alge, v kateri so se celice združevale v skupke, največkrat osmih celic (slika 28). Glede na morfološke značilnosti smo določili, da gre najverjetneje za algo iz rodu *Scenedesmus*.



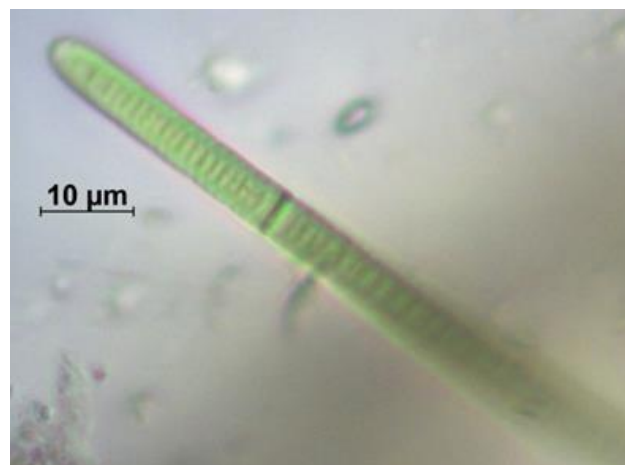
Slika 28: Zelena alga v vzorcu rdeče obarvane luže. a – fotografija enocelične zelene alge v vzorcu, nabranem v Sečovljskih solinah, b – fotografija kolonije enoceličnih alg, zraslih po precepu vzorca luže s Sečovljskih solin v gojišče BG-11.

Vzorci v laboratoriju gojene petole

Iz vzorcev petole, nabranih aprila pred konciranjem, smo izrezali alikvote in jih gojili v laboratoriju. Uporabili smo petole, nabrane na tretjem in četrtem delu kristalizacijskega bazena, pri čemer smo eno paralelko alikvotov premazali z morskim blatom, ene pa ne. V obeh primerih smo vzorce petole prelili z morsko vodo, vzorčeno v solinskem kanalu ob kristalizacijskem bazenu št. 10 in gojili pri neprekinjeni osvetlitvi približno $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in sobni temperaturi. V obeh primerih smo že po prekonočni inkubaciji opazili ozelenitev (slika 29a in b) in z mikroskopiranjem določili, da je prišlo do razrasta cianobakterije *Coleofasciculus chthonoplastes*, ki je močno prevladovala v vzorcu zelene plasti petole (slika 29c in d). Vidni so bili filamenti z več trihomi, povezanimi z neobarvano ovojnico, ki je bila lahko zaprta ali odprta, pri čemer so trihomi lahko izhajali iz ovojnice (slika 29e, f in g). Posamezne celice so bile daljše (približno 5 do 10 μm) kot širše (približno 3 do 4 μm) in rahlo zoožane na meji med celicami. Poleg trihomov *C. chthonoplastes* sem opazila tudi nekaj posameznih trihomov druge filamentozne cianobakterije (slika 30), najverjetneje iz družine Oscillatoriaceae in rodu *Phormidium* ali tudi *Lyngbya*, ki so že bile opisane v petoli (Tkavc in sod., 2011).

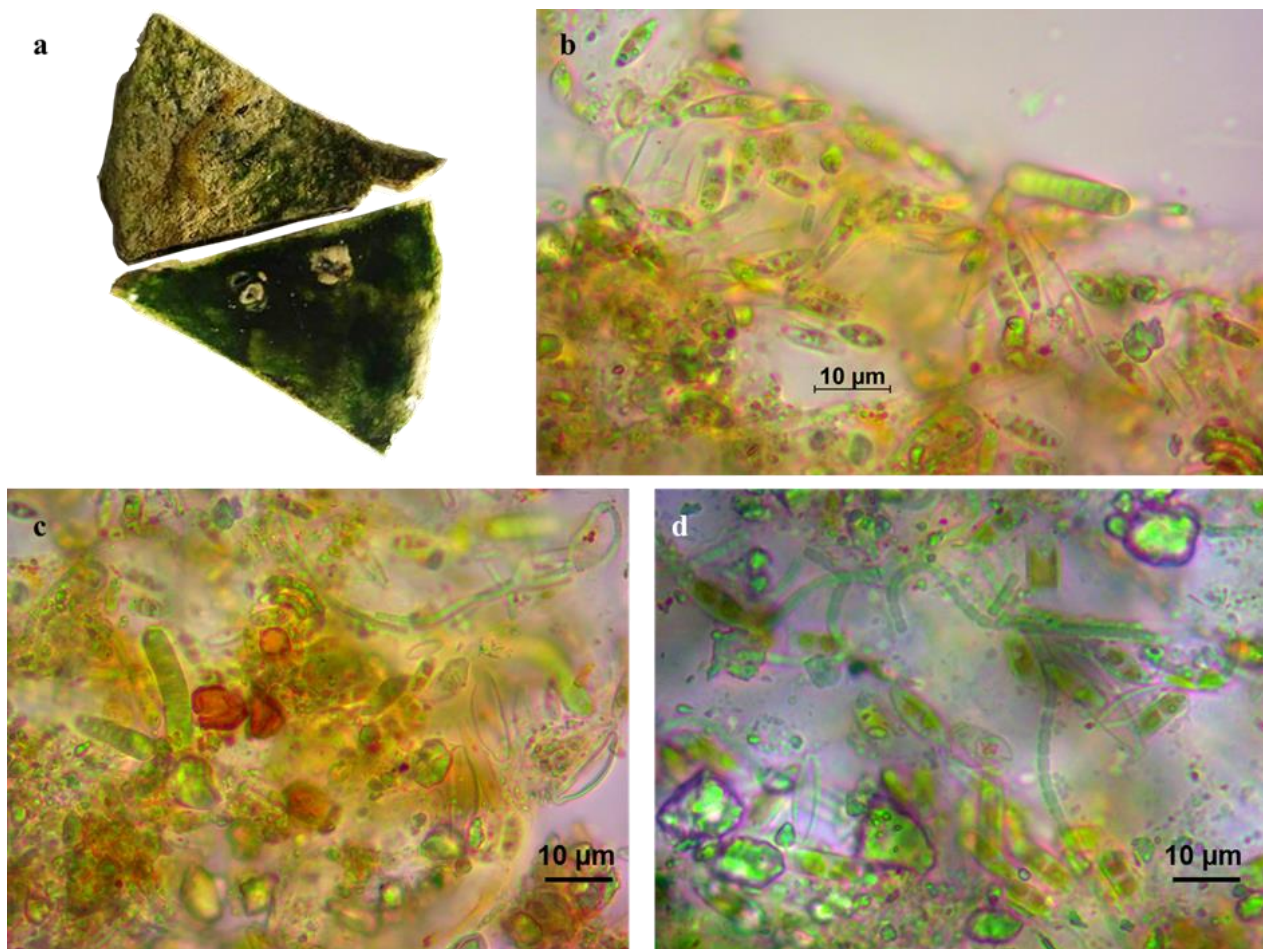


Slika 29: V laboratoriju gojeni vzorci petole. a – vzorca premazane (zgoraj) in nepremazane (spodaj) petole s četrtega dela bazena, b – prečni prerez premazane petole z ozelenelo zgornjo plastjo, c – filament cianobakterije *C. chthonoplastes* na površini petole pri 100-kratni in pri d – 400-kratni povečavi, e – filament *C. chthonoplastes* z zaprto ovojnico, f – filament *C. chthonoplastes* z odprto ovojnico, iz katere izhajajo posamezni trihomi, g – srednji del filameta *C. chthonoplastes* s tesno prepletenimi trihomi v ovojnici.



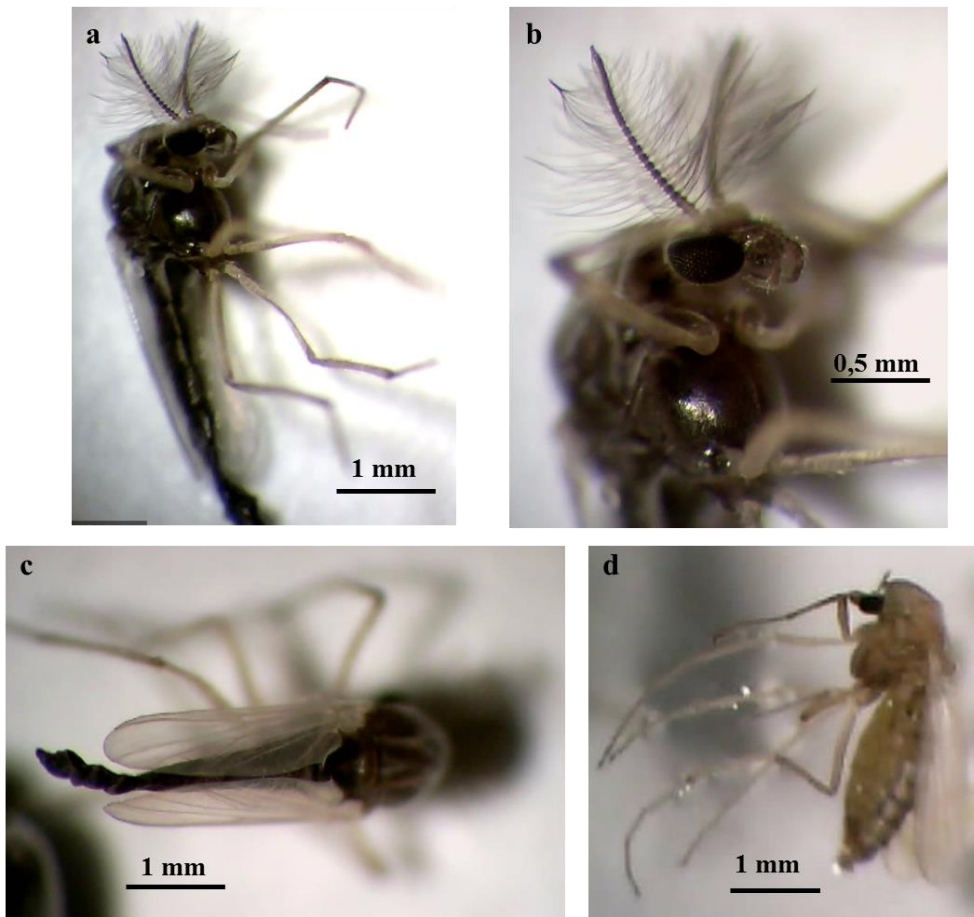
Slika 30: Nitasta cianobakterija iz družine Oscillatoriaceae.

Pri nadaljnem gojenju petole smo opazili, da se je zelena plast pri premazani petoli ohranjala, medtem ko je pri nepremazani začela razpadati (slika 31a). Hkrati so se na površini petole pojavili ovoji z ličinkami žuželk. Mikroskopiranje površine vzorcev je pokazalo, da cianobakterij *C. chthonoplastes* praktično ni več, prisotna pa je heterogena združba drugih cianobakterij in tudi alg (slika 31b, c in d).



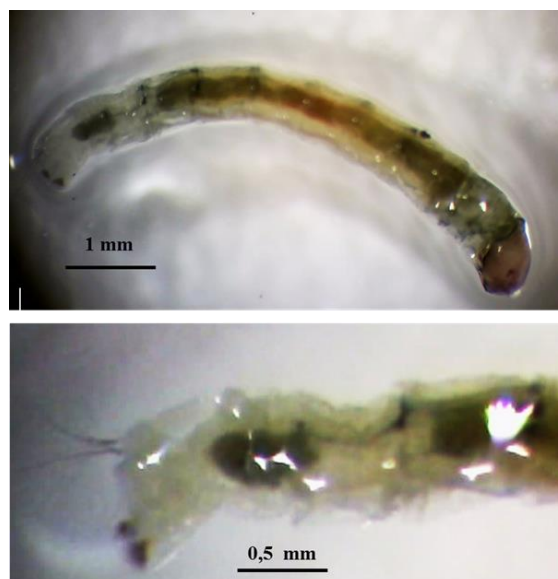
Slika 31: V laboratoriju gojeni vzorci petole po enem tednu. a – vzorca premazane (zgoraj) in nepremazane (spodaj) petole s četrtega dela bazena; na nepremazanem vzorcu petole je viden ovoj ličinke, b, c in d – fotografije heterogene združbe cianobakterij in alg na površini nepremazane petole.

Po enem tednu gojenja smo na nepremazani petoli opazali vedno več sprememb. Po pojavu ovojev z ličinkami so se na površini začeli nabirati peleti kapsulaste oblike. Ličinke so se preobrazile v odrasle žuželke, ki so bile podobne komarjem, vendar smo s stereomikroskopijo ugotovili, da nimajo rilčka. Telo je bilo podolgovato in ozko, na glavi so imele pahljačaste antene (slika 32a, b in c). Predvidevali smo, da gre za žuželke iz skupine trzač (družina Chironomidae).



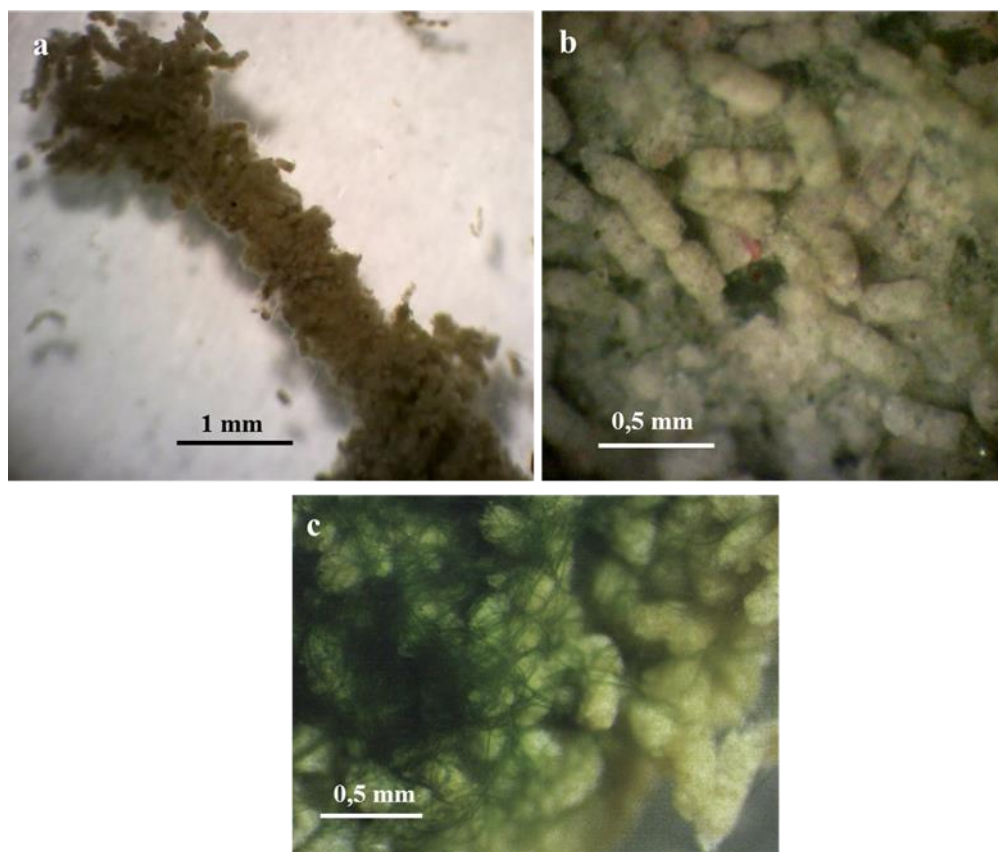
Slika 32: Odrasle žuželke, ki so se razvile iz ličink v petoli. a, b, c – fotografije odraslih žuželk z dolgim in tankim telesom, d – fotografija žuželke z debelejšim telesom in brez pahljačastih anten.

S fiksacijo smo za analizo pripravili tudi ličinke, ki smo jih skuhalih v destilirani vodi (1 min pri 100 °C) in prenesli v 70-odstotni etanol, kar je običajen postopek za fiksacijo. Ličinke so bile dolge 5 do 7 mm in so imele vidne anteriorne in posteriorne parapodije (slika 33). Večino časa so se zadrževale v ovojih.



Slika 33: Fotografiji ličink, ki so se razvile v petoli. Spodaj je povečana fotografija zadka ličinke.

Ovoji in površina petole so tekom razvoja žuželk postali prekriti s peleti v obliki kapsul dolžine 0,2 do 0,5 mm (slika 34). Predvidevali smo, da gre za fekalne pelete, značilne za trzače. Ko so se vse žuželke v vzorcu razvile in smo jih odstranili ali pa so umrle, je površino petole (prekrito s fekalnim peletom) ponovno začel preraščati *C. chthonoplastes*.



Slika 34: Fekalni peleti ličink v petoli. a – fotografija ovoja ličink, prekritega s peleti, b – fotografija peletov v času razvoja žuželk, c – fotografija peletov, ko žuželk ni bilo več v vzorcu in je prišlo do ponovnega razrasta *C. chthonoplastes*.

Poleg odraslih žuželk z morfologijo, značilno za trzače, smo opazili tudi odrasle žuželke z debelejšim telesom in brez anten (slika 32d). Da bi ugotovili, ali gre za drugo vrsto (morda znanega škodljivca s solin, muho slanarico – *Ephydra macellaria*) in da bi natančneje taksonomsko določili opažene trzače, smo se odločili iz obeh tipov žuželk, po enega primerka vsake, izolirati genomsko DNA in določiti zaporedje gena COI (zapisuje mitohondrijsko citokrom-C oksidazo I), ki se uporablja za DNA-taksonomijo živali. Izolacijo smo izvedli s kompletom reagentov QIAamp DNA Mini po navodilih proizvajalca (Qiagen). Izolirano DNA (1 μ l) smo uporabili za PCR z 10 μ l mešanice dNTP, polimeraze *Taq* in reakcijskega pufra (PCR MM, Thermo Fisher Scientific) in po 1 μ l 10 μ M smernega (LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATT-3') in protismernega oligonukleotida (HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAA-3') ter dopolnili z vodo do 20 μ l. Reakcijo smo izvedli s 5 min začetne denaturacije pri 95 °C in nato 30 ciklov 30 s pri 95 °C, 30 s pri 45 °C in 2 min pri 72 °C, čemur je sledilo še 7 min zaključnega podaljševanja pri 72 °C. Produkte smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo in za vzorca obeh odraslih žuželk dobili produkt ustrezne dolžine približno 700 bp. Amplikona obeh vzorcev smo vstavili v vektor pJET1.2 (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Fisher Scientific) in s produktom transformirali kompetentne celice *E. coli* DH5 α . Za vsak vzorec smo po prekonočni inkubaciji na

LBA-ploščah pri 37 °C izbrali dve koloniji, ki sta glede na PCR na osnovi kolonije vsebovali plazmid z ustreznim vključkom. Plazmide smo izolirali iz prekonočnih tekočih kultur in pripravili za sekvenciranje (GATC Biotech).

Analiza je pokazala, da so vsa 4 določena zaporedja enaka in zato (kljub morfološkim razlikam) odrasla primerka pripadata isti vrsti. Morfološke razlike primerkov bi zato lahko razložili kot različne faze razvoja odraslih žuželk ali, bolj verjetno, za razlike med samci (s pahljačastimi antenami) in samicami (brez).

Zaporedje smo analizirali tudi z orodjem BLAST in ugotovili, da je najbolj sorodno zaporedjem organizmov iz različnih rodov trzač in sicer *Cricotopus*, *Halocladus*, *Parakiefferiella* in *Orthocladus*. Ker je bila p-razdalja tudi pri zaporedjih z najboljšim rezultatom precej visoka (približno 11 %), smo ugotovili, da je v tem primeru identifikacija na podlagi DNA težavna in bi bile potrebne natančnejše morfološke analize. Poleg tega so baze nukleotidnih zaporedij očitno še vedno nepopolne za trzače, sorodne primerkom iz Sečoveljskih solin.

Naša opažanja nakazujejo na možnost, da konciranje in režim rednega menjavanja vode v bazenih pred začetkom postopka kristalizacije soli, ko pride do rasti cianobakterij v petoli, ključno prispevata k ohranjanju petole in posledično kakovosti soli iz Sečoveljskih solin. Pri tem ni pomemben le do sedaj poznan negativni vpliv ličink muhe slanarice, ampak tudi vpliv ličink trzač. Kljub temu, da so roji odraslih žuželk pogosti v določenih delih leta, do sedaj ni bilo raziskav o ekološkem pomenu teh žuželk v Sečoveljskih solinah. Rezultati projekta kažejo na potencialno škodljivo delovanje trzač, zato bi bilo smiselno podrobneje raziskati vpliv na pridelavo soli in po potrebi spremeniti načine ohranjanja solin in postopke pridobivanja soli.

Razširjeni rezultati zadnjega podpoglavja so bili objavljeni oktobra 2021 v znanstvenem članku M. Juteršek in M. Dolinar: *Chironomid larvae destroy cultivated microbial mat in protected Adriatic salterns*, *Aquatic Conservation – Marine and Freshwater Ecosystems* 31 (10), 2987-2994.

Viri:

- Battelli C. (1998) Prispevki k poznavanju makrobentoških alg slovenskega obalnega morja: rod *Cladophora* (Chlorophyta). *Annales* 11: 47-56.
- Battelli C. (2000) First record of three species of the genus *Cladophora* Kütz. in the coastal waters of Slovenia. *Annales* 19: 91-96.
- Furey P.C., Lowe R.L., Power M.E., Campbell-Craven A.M. (2012) Midges, *Cladophora*, and epiphytes: shifting interactions through succession. *Freshwater Sci.* 31(1): 93-107.
- Schneider J., Herrmann A.G. (1979) Saltworks – natural laboratories for microbiological and geochemical investigations during the evaporation of seawater. V: *5th Symposium on Salt* (ur. A.H. Coogan in L. Hauder). Cleveland; Northern Ohio Geological Society, 371-381.
- Tkavc R., Gostinčar C., Turk M., Visscher P. T., Oren A., Gunde-Cimerman N. (2011) Bacterial communities in the 'petola' microbial mat from the Sečovlje salterns (Slovenia). *FEMS Microbiol. Ecol.* 75(1): 48-62.

Fiziološke in morfološke spremembe mikroorganizmov petole v spreminjajočih se rastnih pogojih

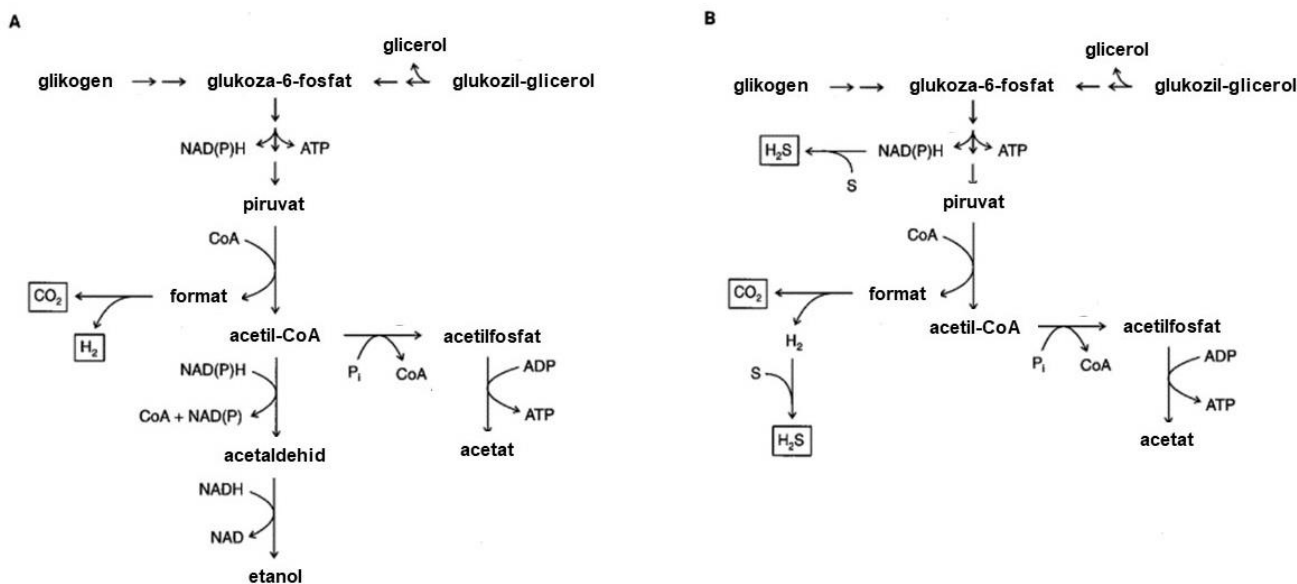
Jakob Mraz

Poglavitne naloge mojega projektnega dela so bile raziskovanje tvorjenja biofilmov in spremljanje fizioloških in morfoloških sprememb mikroorganizmov petole v spreminjajočih se rastnih pogojih. Moje delo je temeljilo na iskanju in analizi relevantne znanstvene literature in laboratorijskem delu, temelječem na pridobljenih informacijah. Ker je mikrobnna združba petole kompleksna, smo se v začetnih korakih dela s skupino odločili, da pri svojem raziskovalnem delu največ pozornosti posvetim vrsti *Coleofasciculus chthonoplastes* (nekdaj *Microcoleus chthonoplastes*), ki je glede na nam dostopne podatke iz relevantne literature eden ključnih mikroorganizmov petole. Gre za kozmopolitansko cianobakterijo, ki je najbolj številčno prisotna v petoli na globini od 0,3–1,1 mm, ki hkrati predstavlja tudi plast najbolj bujne fotosinteze. Mikrobne preproge (kakeršne opažamo tudi v Sečoveljskih solinah) so lahko tudi več centimetrov debeli nanosi plasti biofilmov. Te so raznolike združbe avto- in heterotrofnih mikroorganizmov, ki jih povezuje matriks, sestavljen iz polisaharidov, proteinov in nukleinskih kislin. Celice, ki živijo v biofilmski združbi, so bolj odporne na okoljska nihanja, dejavnike stresa in protimikrobne snovi. Za raziskovanje so biofilmi zanimivi in v našem primeru relevantni, ker je od njihove strukture odvisna stabilnost petole, od nje pa kvaliteta soli. Razumevanje tvorjenja biofilmov in ostalih sprememb mikroorganizmov petole ob različnih okoljskih dejavnikih je tako pomembno za tradicionalni način pridobivanja soli, ki ga še danes uporabljajo v Sečoveljskih solinah.

Cianobakterije v mikrobni preprogi dna solinskega bazena so tekom dnevnega cikla izpostavljene različnim koncentracijam sulfida (H_2S). Ta lahko podobno kot molekula vode pri fotosintezi služi kot donor elektronov, kar imenujemo anoksigena fotosinteza (kisik, ki pri oksigeni fotosintezi nastaja z razpadom vode, ne nastaja). Oba procesa (oksigeni in anoksigeni) učinkovito akumulirata energijo sonca, problematičen pa je preskok iz enega v drugega, saj ta lahko traja precej časa in tako cianobakteriji terja dragocen čas, v katerem ne akumulira sončne energije. H_2S hkrati deluje kot inhibitor fotosistema II, ki je pomemben pri oksigeni fotosintezi (je sposoben oksidirati molekulo vode). Ponoči proces fotosinteze v mikrobni preprogi ne teče in se zato zaradi delovanja različnih bakterijskih reducentov elementarnega žvepla, ki sodelujejo pri razgradnji organskega materiala, v preprogi nakopiči veliko H_2S . V primerih, ko je koncentracija H_2S visoka, močno prevladuje anoksigena fotosinteza (saj H_2S inhibira alternativni proces), ko pa se koncentracija H_2S zjutraj postopno zmanjša (porabi se v anoksigeni fotosintezi), začne prevladovati oksigena, ki vztraja čez dan (kisik, ki nastaja pri oksigeni fotosintezi, hkrati tudi oksidira H_2S in tako preprečuje njegovo kopičenje). Nekatere vrste lahko izrabljajo le en tip fotosinteze, *C. chthonoplastes* pa oba, kar je velika ekološka prednost, saj lahko sončno energijo akumulira tako zjutraj (ob povečani koncentraciji H_2S), kot tudi pozneje podnevi. Tovrstna učinkovitost je morda tudi vzrok za veliko razširjenost *C. chthonoplastes* v mikrobnih preprogah (Jørgensen in sodel., 1986).

V temi, ko fotosinteza ne poteka, *C. chthonoplastes* izvaja kemotrofni metabolizem, ki ga poganjajo pri fotosintezi nastali ogljikovi hidrati (na primer glikogen). V aerobnih pogojih tako poteka pot pentoze fosfata, pri kateri ATP nastaja z oksidativno fosforilacijo, v anaerobnih pogoji pa poteka mešanokislinska fermentacija (s končnimi produkti acetatom, laktatom, fumaratom, vodikom in ogljikovim dioksidom). Če ima celica na razpolago dovolj elementarnega žvepla, ta regenerira (oksidira) prenašalce elektronov (NAD(P)H se obnovi do NAD(P)⁺) in tako omogoča večji izplen ATP (metabolna shema prikazana na sliki 35).

C. chthonoplastes lahko tudi fiksira dušik. Fiksacija poteka v aerobnem okolju brez diferenciacije celic v heterociste, kar je presenetljivo, saj je nitrogenazni encimski kompleks zelo občutljiv na prisotnost kisika. Proces še ni popolnoma raziskan (Malin in Pearson, 1987; Moezelaar in sodel., 1996).



Slika 35: Metabolna shema anaerobnega pridobivanja ATP cianobakterije *C. chthonoplastes*. Levi del sheme prikazuje »navadno« fermentacijo, desni pa fermentacijo v prisotnosti elementarnega žvepla (Moezelaar in sodel., 1996).

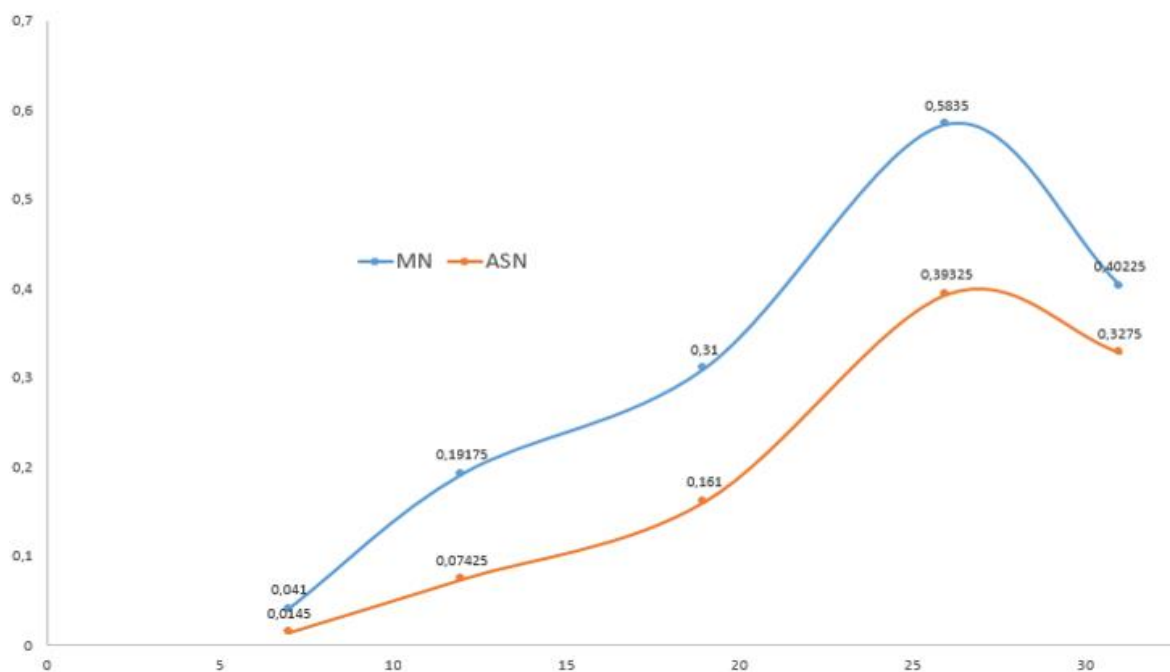
Po obravnavi osnovnih podatkov o cianobakteriji sem se moral soočiti z dvema raziskovalnima problemoma - kako iz solinskega blata ali mikrobne preproge z dna solinskega bazena izolirati čisto cianobakterijsko kulturo (zaradi natančnosti in zanesljivosti rezultatov bi potreboval kulturo, ki bi za razliko od kompleksne združbe petole vsebovala le eno cianobakterijsko vrsto, torej *C. chthonoplastes*) in v kakšnem gojišču in pri katerih pogojih *C. chthonoplastes* sploh uspeva v *in vitro* okolju (poznovanje esencialnih hranil, optimalnih fizikalnih pogojev, dejavnikov stresa, ki bi lahko imeli vpliv na nastanek biofilma in ostale fiziološko-morfološke spremembe, posledično pa na moje raziskovalne izsledke).

V znanstveni literaturi sem našel dve potencialni gojišči za morske cianobakterije - ASNIII in MN (njuna kemijska zgradba je prikazana v tabeli 2), ju pripravil iz osnovnih sestavin in primerjal njuno učinkovitost za rast različnih fototrofnih mikroorganizmov (kulture alge *Dunaliella salina*, združba petole, trihom *C. chthonoplastes*). Hitrost rasti *D. salina* sem v rednih časovnih intervalih preverjal tudi spektrofotometrično (grafična predstavitev rezultatov je na sliki 36). Končna ugotovitev tega dela poskusov je bila, da je gojišče MN primernejše za nadaljnje laboratorijsko delo, saj je bila rast cianobakterij v njem hitrejša in bujnejša.

Tabela 2: Kemijska sestava gojišč MN in ASNIII. Povzeto po članku Rippka in sodel., 1979.

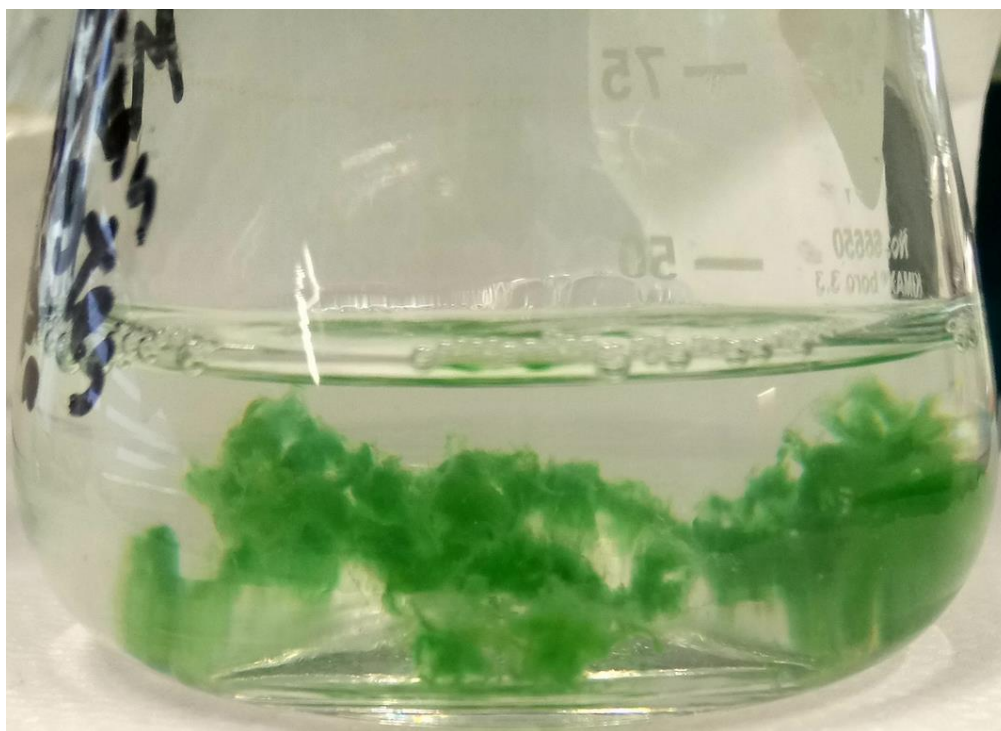
Sestavina	gojišče MN [g/l]	gojišče ASNIII [g/l]
NaCl	/	25
MgCl ₂ ×6H ₂ O	/	2
KCl	/	0,5
NaNO ₃	0,75	0,75
K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	0,02	0,02
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,038	3,5
CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,018	0,5
citronska kislina	0,003	0,003
železov amonijev citrat	0,003	0,003
EDTA	0,0005	0,0005
Na ₂ CO ₃	0,02	0,02
mešanica kovin v sledovih*	1 ml	1 ml
morska voda	750 ml	1000 ml
deionizirana voda	250 ml	/

*Mešanica kovin v sledovih vsebuje (g/l): H₃BO₃ – 2,86; MnCl₂.× 4H₂O – 1,81; ZnSO₄ × 7H₂O – 0,222; Na₂MoO₄ × 2H₂O – 0,390; CuSO₄ × 5H₂O – 0,079; Co(NO₃)₂ × 6H₂O - 0,00494.

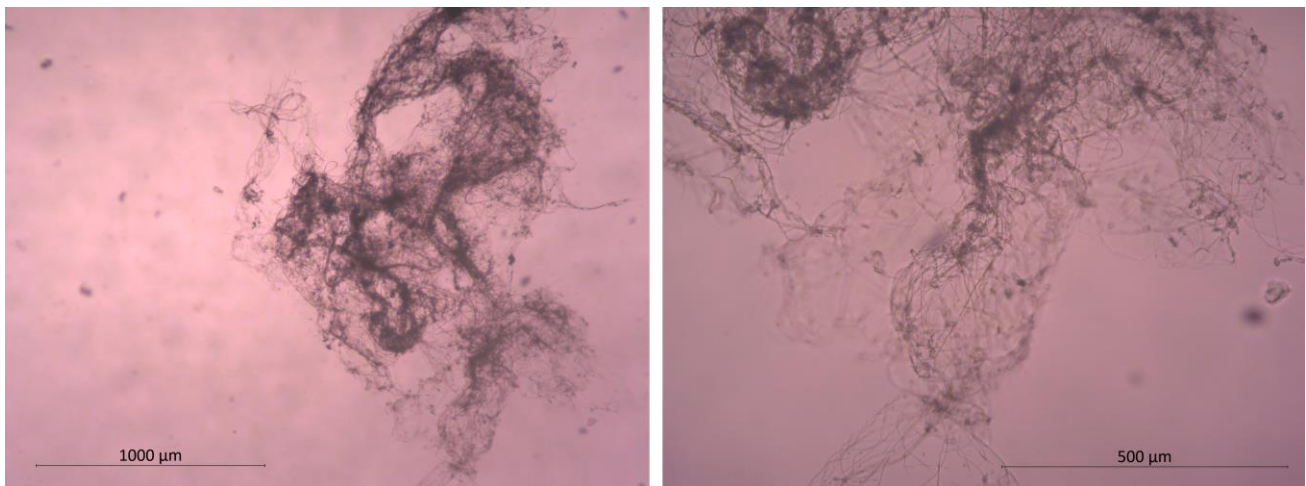


Slika 36: Spektrofotometrična analiza rasti kulture alge *Dunaliella salina* v gojiščih MN in ASNIII. Prikazano je povprečje absorbanc več ponovitev poskusa. Iz grafa je razvidno, da je rast vrste *D. salina* v gojišču MN bujnejša.

Izbira primerne gojišča mi je omogočila izvajanje nadaljnjih postopkov izolacije čiste cianobakterijske kulture *C. chthonoplastes* iz petole. V znanstveni literaturi sem našel različne načine za izolacijo cianobakterij iz okoljskih vzorcev. Poskusil sem z resuspendiranjem petole v gojišču MN in nadaljnjim redčenjem do posamičnih celic (kar se je izkazalo za neuspešno), segregacijo posameznega trihoma iz homogenata petole s pomočjo pincet, pipetnih nastavkov in igle (tudi ta poskus ni bil uspešen) in z razmazom homogenata petole na trdno gojišče BG-11. S slednjim postopkom mi je uspelo izolirati kulturo cianobakterije (slika 37), ki je pod prostim očesom (monokromnost, enoličnost makro struktur, rast v skupkih) in po pregledu pod mikroskopom (značilne trihomske strukture – slika 38) kazala lastnosti čiste kulture in je ustrezala morfološkim lastnostim vrste *C. chthonoplastes*. Čistost kulture smo poskusili dokazati tudi z molekularno-diagnostično metodo PCR. Postopek smo ponovili z cianobakterijskimi in algnimi začetnimi oligonukleotidi, da bi videli, če nam dajo prvi pozitivni, drugi pa negativno pomnožek. Tako bi ugotovili, da v kulturi ni algnih vrst, prisotne pa so cianobakterijske. Pomnožek bi lahko kasneje poslali na določanje nukleotidnega zaporedja in s tem dobili natančno identifikacijo kulture, vendar pa nam to zaradi težav pri izvedbi PCR žal ni uspelo. Ti poskusi so opisani v poglavju Določevanje mikrobne raznolikosti solinskih vzorcev z uporabo verižne reakcije s polimerazo na strani 42.

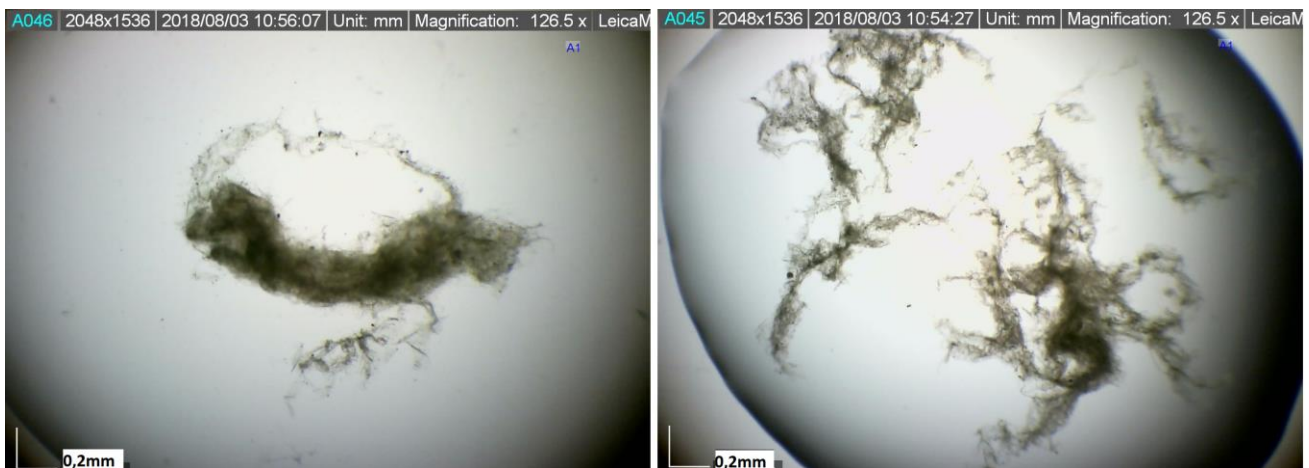


Slika 37: Laboratorijska kultura, ki sem jo izoliral iz homogenata petole po v tekstu opisanem postopku z razmazom homogenata. Iz slike je razvidna za vrsto *C. chthonoplastes* značilna rast v skupkih.



Slika 38: Mikroskopski posnetek nitaste cianobakterije, izolirane iz petole in gojene v laboratoriju. Dve povečavi istega vzorca. Iz fotografij je razvidno, da skupke gradijo mikrobní laski/trihomi – makromorfološka struktura, značilna za *C. chthonoplastes*.

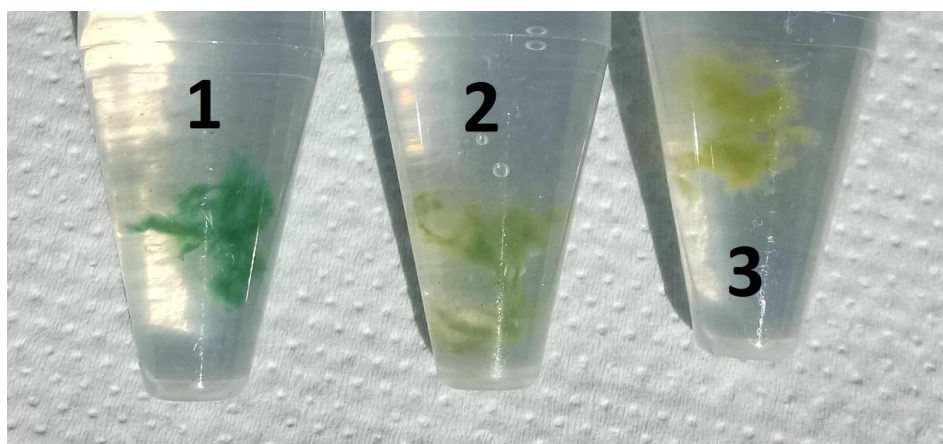
Po vzgoji potencialno čiste kulture sem se lotil preučevanja nastajanja biofilmov, fizioloških in morfoloških sprememb *C. chthonoplastes* v različnih okoljskih pogojih. V literaturi sem zasledil, da železov amonijev citrat vpliva na homogenost rasti cianobakterije. Izvedel sem poskus in ugotovil, da povečanje koncentracije te snovi do $46 \mu\text{M}$ v gojišču MN do neke mera vpliva na združevanje cianobakterij v skupke – makro strukture značilne za vrsto *C. chthonoplastes*. Kultura z dodanim železovim amonijevim citratom v gojišče je v primerjavi s kontrolo (z manjšo koncentracijo dodatka) rasla v manjših in bolj razpršenih skupkih (slika 39).



Slika 39: Kultura *C. chthonoplastes*, ki je teden dni rasla v gojišču MN brez dodanega železovega amonijevega citrata (levo) in z dodatkom do koncentracije $46 \mu\text{M}$ (desno). Ob povečani koncentraciji citrata je rast kulture bolj razpršena, skupki pa so manjši.

Raziskoval sem tudi vpliv slanosti na rast in morfologijo *C. chthonoplastes*. Pripravil sem posebno gojišče MN s povečano koncentracijo NaCl. V gojišče MN sem do koncentracije 300 g/l (kar je blizu točke slanostnega zasičenja) zatehtal solni cvet, ki smo ga od solinarja prejeli na vzorčenju ob obisku solin. Pripravil sem tri epruvete z gojišči, ki so se med seboj razlikovala po slanosti. V eno sem nalil standardno gojišče MN, v naslednjo mešanico standardnega MN in s soljo zasičenega gojišča v razmerju 1:1, v zadnjo pa gojišče MN,

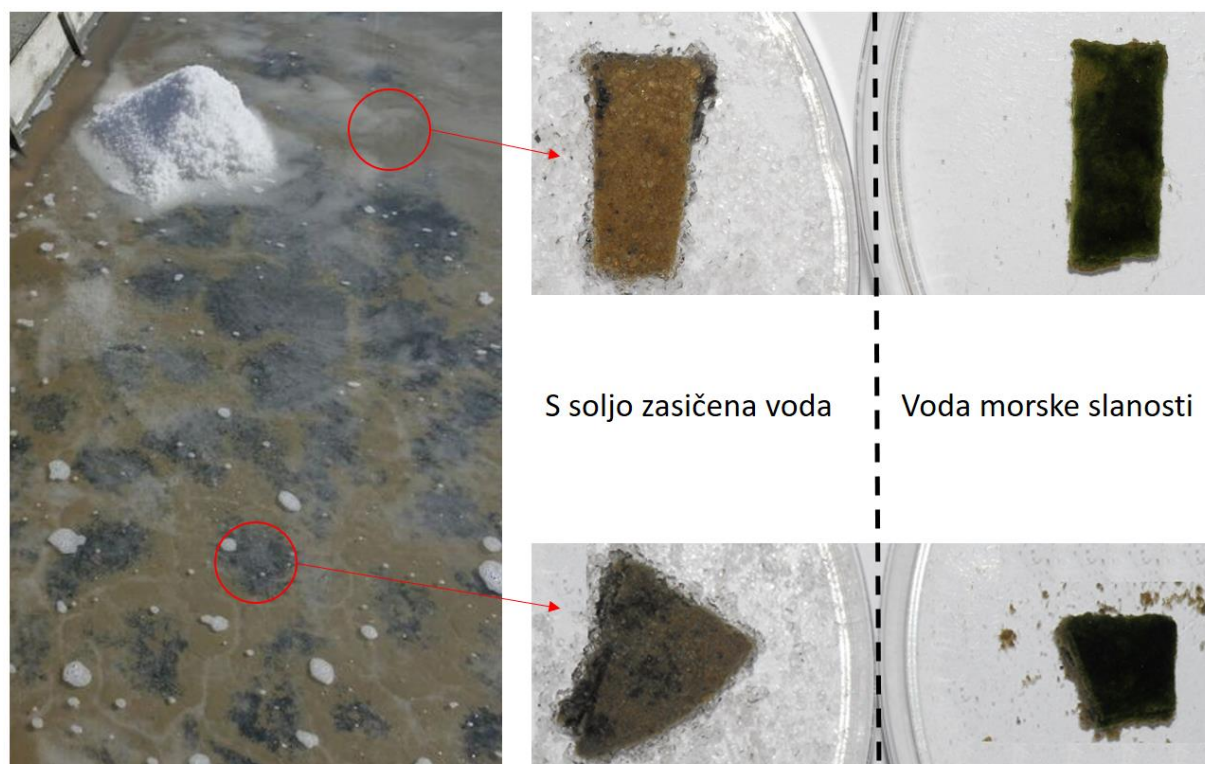
zasičeno s soljo. Tako sem ustvaril slanostni gradient. Po tednu dni inkubacije pri sobni temperaturi in stalni osvetlitvi je bilo mogoče med kulturami opaziti razlike (slika 40). Rast cianobakterij je bila v vseh treh vzorcih precej podobna, so se pa paralelke med seboj razlikovale v obarvanosti skupkov celic. Najbolj intenzivne in »klorofilsko« zelene barve je bila kultura v najbolj slani raztopini, najbolj blede obarvana pa tista v najmanj slani raztopini. Sklepam, da je povečana obarvanost v zasičeni kulturi posledica povečanega osmotskega stresa, ki od celic za preživetje terja večjo proizvodnjo energije. Poudarjen zelenkast pigment tako lahko nakazuje na večjo fotosintetsko aktivnost teh celic. Druga možna razlaga pa je, da ne gre za celice *C. chthonoplastes*, pač pa za neko halofitno vrsto, ki bolje uspeva v pogojih visoke slanosti. Za *C. chthonoplastes* namreč velja, da uspeva v kristalizacijskih bazenih v začetnih fazah izparevanja, ko se slanica približuje kristalizaciji, pa ta cianobakterija preneha rasti (Glavaš in sodel., 2018).



Slika 40: Primerjava obarvanosti celičnih kultur *C. chthonoplastes*, ki so bile inkubirane pri različnih slanostih. 1 – najvišja koncentracija soli (blizu zasičenosti), 2 – srednja koncentracija soli, 3 – najmanjša koncentracija soli (običajna vsebnost v gojišču MN – prim. tabelo 2).

Izvedel sem tudi poskus in vitro ozelenitve vzorcev petole z zadnjega vzorčenja (dne 10.7). Petola je bila ob tem obisku razdeljena na nepravilne lise temne in svetle barve (slika 41 levo). Poskus sem zastavil tako, da sem vzorce svetle in temne petole razrezal na majhne kose, jih postavil v petrijevke in pretil z morsko vodo navadne (solinski kanal) in povečane slanosti (solinski bazen). Vzorce sem čez noč inkubiral na svetlobi in pri temperaturi 25 °C ter že zjutraj odkril popolnoma ozelenele površine petole pri vseh vzorcih temnih in svetlih petol, prelitih z morsko vodo navadne slanosti. Pri vzorcih, prekritih s koncentrirano morsko vodo, do ozelenitve ni prišlo (slika 41 desno). Poskusil sem še s premazom črne petole z blatom za konciranje in prelitvanje z obema vodama – do ozelenitve je ponovno prišlo le pri prelitju z vodo navadne slanosti. Poskuse sem ponovil še s tremi različnimi filtriranimi morskimi vodami – eno iz solinskega kanala ob prvem vzorčenju aprila (slanost praktično enaka slanosti morja), drugo iz solinskega kanala (vzeto 10.7.) in tretjo iz morja pri Piranu (vzeto 20.7.). Rezultati so bili pri vseh treh paralelkah praktično enaki kot predhodni – vse petole so ozelenele. Iz teh poskusov je razvidno, da mikroorganizmi (sklepamo, da gre predvsem za *C. chthonoplastes*) ob povečani slanosti (solni bazen 10.7.) ne odmrejo popolnoma in se lahko ob primernih slanostih hitro (v nekaj urah) reaktivirajo in postanejo fotosintetsko aktivni (sklepam da zelena obarvanost pomeni izgradnjo klorofila v celicah, kar pomeni, da so celice metabolno aktivne). Podoben fenomen opisujejo tudi solinarji po prelitvanju kristalizacijskega bazena z vodo morske slanosti po končanem obdobju pobiranja soli.

Morske mikrobne preproge se soočajo z različnimi nihanji okoljskih dejavnikov kot so slanost, temperatura, UV-sevanje. *C. chthonoplastes* optimalno uspeva pri slanosti 60–80 ‰. Ob odstopajočih slanostih mikroorganizmi prehajajo v neaktivne oblike ali pa odmrejo. To potrjuje tudi moj poskus. Ko je slanost visoka (blizu zasičenja), avtotrofni mikroorganizmi (*C. chthonoplastes*) niso aktivni, kar pa še ne pomeni, da so »mrtvi«, saj lahko ob ugodnih pogojih kaj hitro ponovno oživijo.



*prikaz mesta vzorčenja je simboličen

Slika 41: Izseki petole v času kristalizacije. Slika prikazuje na levi strani fotografijo solinskega bazena dne 10.7. in temne/svetle lise na petoli. Po odvzemu vzorcev in izvedbi opisanega poskusa sem dobil na desni strani prikazane rezultate.

Viri:

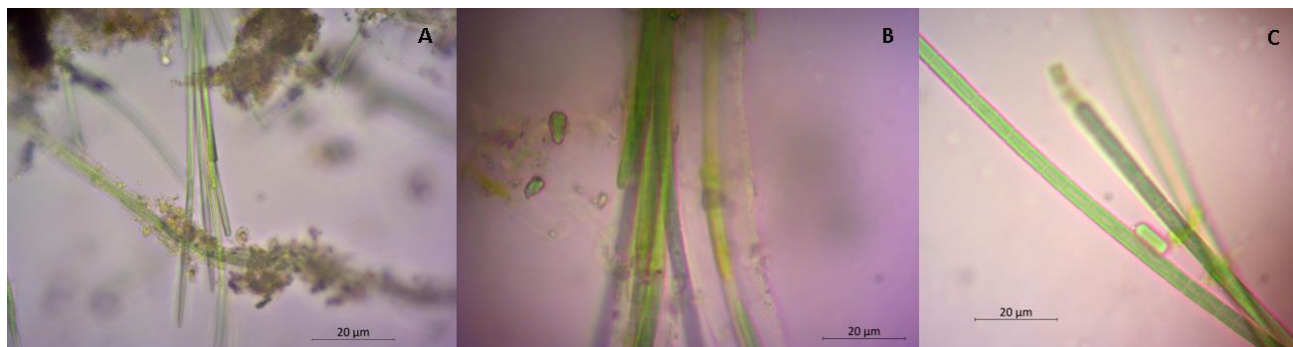
- Glavaš N., Défarge C., Gautret P., Joulane C., Penhoud P., Motelica M., Kovač N. 2018. The structure and role of the “petola” microbial mat in sea salt production of the Sečovlje (Slovenia). *Sci. Total Environ.* 644: 1254-1267.
- Jørgensen B.B., Cohen Y., Revsbech N.P. 1986. Transition from anoxygenic to oxygenic photosynthesis in a *Microcoleus chthonoplastes* cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(2): 408-417.
- Malin G., Pearson H.W. 1987. Aerobic nitrogen fixation in aggregate-forming cultures of the nonheterocystous cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1755-1763.
- Moezelaar R., Bijvank S.M., Stal L.J. 1996. Fermentation and sulfur reduction in the mat-building cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5): 1752–1758.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology* 111: 1-61.

Rast cianobakterije *Coleofasciculus chthonoplastes* in gojenje mikroorganizmov solinskega blata

Aleksandra Uzar

Tekom raziskovalnega dela smo veliko pozornosti usmerili v mikrobiološko delo z nitasto cianobakterijo *Coleofasciculus chthonoplastes*. Že pred začetkom projekta smo na podlagi obstoječe literature vedeli, da je omenjena cianobakterija prisotna v vrhnjih plasteh petole (Tkavc in sodel., 2010). Petolo bi lahko opisali kot mikrobnno preprogo, saj gre za nanose mikrobnih biofilmov. Sestava petole je načeloma znana (Schneider in Herrmann, 1980), zato vemo, da je cianobakterija *Coleofasciculus chthonoplastes* večinsko prisotna v petoli na globini 0,3–1,1 mm. Rast te cianobakterije na solinskem polju lahko dokaj preprosto opazimo, saj se kaže v 'ozelenitvi' petole. V kristalizacijskih bazenih poteka na začetku solinarske sezone postopek konciranja. Solinarji preko petole premažejo tanko plast solinskega blata iz bližnjih solinskih kanalov (v zadnjem času iz kanala Pichetto), pustijo da se to posuši ter kristalizacijski bazen napolnijo z morskovo vodo. Vodo menjavajo vsakih nekaj dni in kmalu je vidna ozelenitev petole. Z drugimi besedami, cianobakterija preraste blato, premazano preko petole. Na podlagi tega smo postavili hipotezo, da je cianobakterija *Coleofasciculus chthonoplastes*, zaradi katere petola ozeleni, prisotna v solinskem blatu. Na podlagi te predpostavke sem želela iz solinskega blata osamiti to cianobakterijo. Dodatno je bil namen tudi preveriti odpornost cianobakterije na antibiotike.

Med prve korake raziskovalnega dela je spadalo mikroskopiranje petole (večinsko zgornje plasti). Za mikroskopiranje s svetlobnim mikroskopom sem pripravila sveže kratkotrajne preparate zgornje plasti petole. Rezultati mikroskopiranja so prikazani na sliki 42. Glede na podatke iz literature (Siegesmund in sodel., 2008) ter rezultate mikroskopiranja lahko z gotovostjo trdimo, da je v vrhnji plasti petole nitasta cianobakterija *Coleofasciculus chthonoplastes*. Jasno so vidni posamezni trihomi (med seboj povezane celice, ki oblikujejo nitasto strukturo), končni deli trihomov pa se polkrožno zaključijo, kar ustreza opisom iz literature.



Slika 42: Mikroskopiranje zgornje plasti petole. A) Najbolj gosto so vidni nitasti mikroorganizmi, organizirani v snope. Okoli njih se ovija rjavkasta plast, kar bi lahko kazalo na druge vrste mikroorganizmov. B) Povečava snopa; pri posameznih nitih vidimo razdelke med celicami. Konec posamezne nitke je značilno zaobljen. C) Prikaz cianobakterije. Debelina je glede na merilo približno 2 µm in je z dolžino posamezne celice v razmerju 1:2.

Po potrditvi, da petola vsebuje cianobakterijo *C. chthonoplastes*, sem en del odvzete petole na tanko premazala s solinskim blatom iz kanala Pichetto, drug del pa je ostal nepremazan. S tem sem želela posnemati postopek konciranja v solinah. Oba vzorca sem prečila z morskovo vodo iz bližnjega solinskega kanala. Po preteku enega tedna sta imela oba vzorca znake ozelenitve, vendar je bila ta pri koncirani petoli intenzivnejša. Dejstvo, da je petola kljub odsotnosti blata ozelenela, kaže na to, da je cianobakterija v

mirujoči obliki prisotna v petoli. To je bil prvi pokazatelj, da cianobakterija, ki povzroči ozelenitev, v petolo ne pride (le) z blatom. Vsaj majhen del aktivne kulture je neprestano prisoten v petoli.

Gojenje fotoavtotrofov iz solinskega blata

Da bi preverili, ali morda solinsko blato vsebuje cianobakterije *C. chthonoplastes* ali kakšne druge fotosintezno aktivne organizme, smo alikvot solinskega blata gojili v laboratoriju. Solinsko blato iz kanala Pichetto sem temeljito premešala ter s tem zagotovila čim večjo homogenost vzorca. Manjšo količino blata (5 ml) sem v erlenmajericah prelila z morskovo vodo (do 50 ml) iz solinskega kanala, ki smo jo odvzeli aprila hkrati s solinskim blatom in petolo. Vzorci so bili izpostavljeni svetlobi ter sobni temperaturi; s tem sem zagotovila pogoje, podobne tistim v solinah. Pri vzorcih smo pričakovali rast cianobakterij, zato sem v poskus vključila še vzorec, pri katerem sem blatu dodala široko uporabno cianobakterijsko gojišče BG-11. Sestava tega gojišča je: 17,65 mM NaNO₃; 0,18 mM K₂HPO₄; 0,3 mM MgSO₄; 0,25 mM CaCl₂; 0,19 mM Na₂CO₃; 0,003 mM Na₂EDTA; 0,029 mM citronska kislina; 0,03 mM amonijev železov (III) citrat; 1 ml/l mešanice elementov v sledih (Rippka, 1988).

Vse mešanice blato-gojišče sem 14 dni stresala ter s tem preprečila zastajanje morebitnih prisotnih mikroorganizmov na dnu erlenmajerice. V tem času ni bilo pri nobenem vzorcu zaznane rasti mikroorganizmov, zato sem prenehala s stresanjem. Prvi znaki rasti na blatu so bili vidni po približno 45 dneh inkubacije, torej en mesec po prenehanju stresanja. Do rasti mikroorganizmov je prišlo samo pri blatu z gojiščem BG-11, ki je bilo v nadaljnjih 20 dneh popolnoma preraščeno/ozelenelo. Preko blata se je tvoril zelo raznolik biofilm, s površine so vidno rasli mikroorganizmi v obliki tankih nitk, prav tako je bila vidna plast mikroorganizmov, ki se je tvorila na gladini gojišča BG-11. Preraščenost blata z mikroorganizmi je vidna na sliki 43.

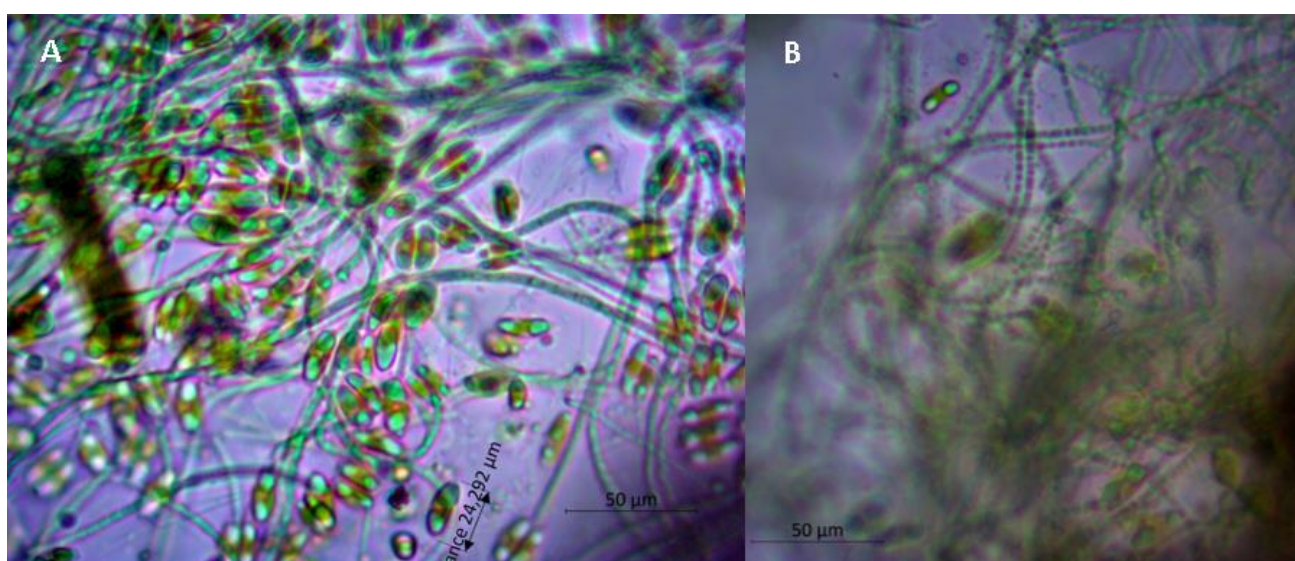


Slika 43: Rast fotosinteznih mikroorganizmov iz solinskega blata v laboratoriju. Erlenmajerica je bila na dnu pokrita z blatom iz kanala Pichetto (vzorčenje 13. april 2018), nanj pa nalito gojišče BG-11. Jasno je vidno, da je blato v celoti preraščeno, kar kaže na prisotnost mikroorganizmov v blatu.

Pri preverjanju prisotnosti mikroorganizmov v blatu iz kanala Pichetto sem prišla do dveh glavnih zaključkov. Lahko trdim, da so v blatu prisotni mikroorganizmi, kar je vidno na sliki 43 in dodatno sem ugotovila, da rast

pogojuje izbira gojišča. Preverila sem razlike v rasti mikroorganizmov iz blata v dveh gojiščih – v filtrirani morski vodi iz solinskega kanala oziroma v gojišču BG-11. Po treh mesecih in pol gojenja v laboratoriju je bilo blato z gojiščem BG-11 popolnoma preraščeno, vidne so bile razlike v barvi ter načinu rasti mikroorganizmov, kar kaže na raznolikost znotraj vzorca blata. Nasprotno je bilo enako blato, prelito s filtrirano morskovo vodo, v istem času še vedno enako, brez znakov rasti mikroorganizmov. Jasno je, da je gojišče BG-11 ugodnejše za rast nekaterih mikroorganizmov. To gojišče je široko uporabno in dokaj univerzalno predvsem za gojenje ter vzdrževanje kultur cianobakterij. Poleg tega ne vsebuje NaCl, kar bi na primer omogočilo rast sladkovodnim mikroorganizmom, ne pa nujno tudi morskim.

Po tem ko je bila prisotnost mikroorganizmov v blatu potrjena, sem manjše alikvote celotnega vzorca precepila v sveže gojišče BG-11 ter spremljala nadaljnjo rast mikroorganizmov. S pripravljenimi svežimi preparati sem izvedla mikroskopiranje. Vidna je bila večinska prisotnost alg in/ali cianobakterij (slika 44).



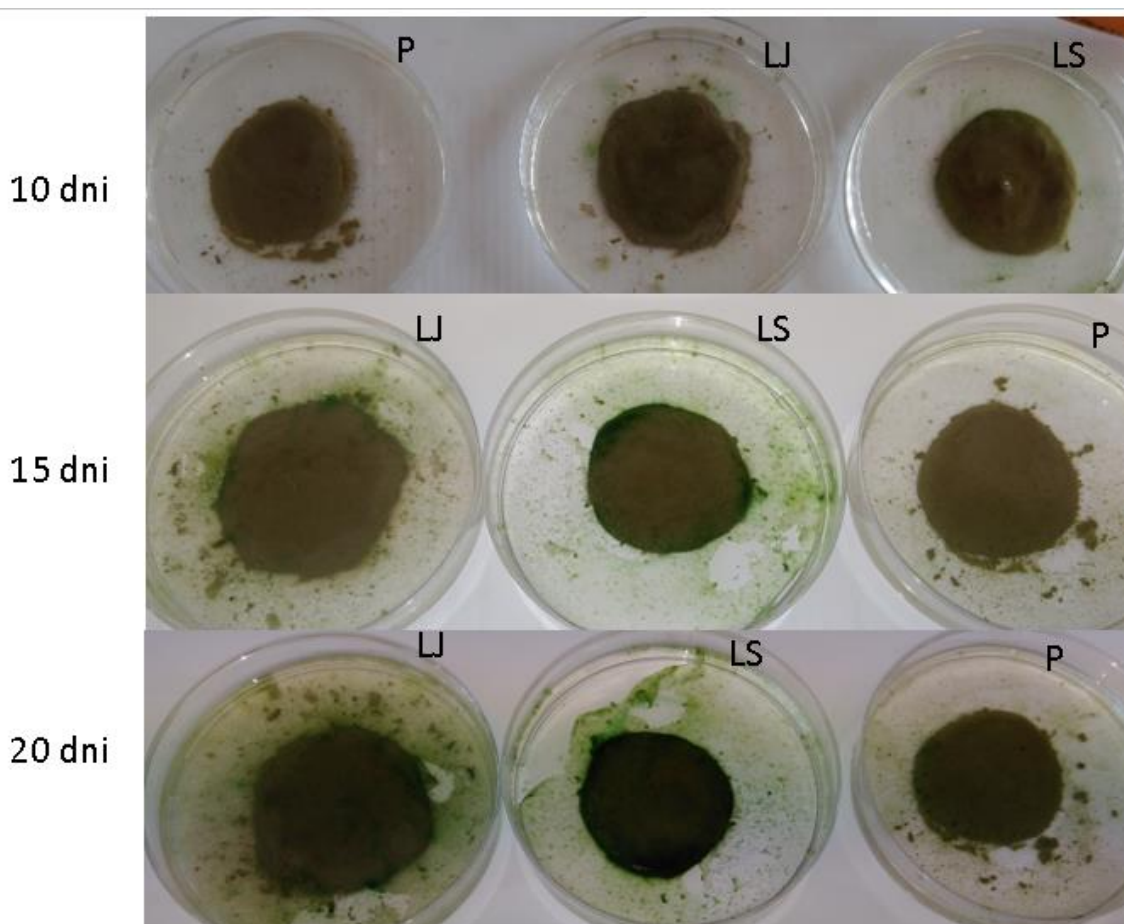
Slika 44: Analiza mikroorganizmov solinskega blata pod optičnim mikroskopom. A) Slika prikazuje mikroorganizme, zrasle na blatu v gojišču BG-11. Vse kaže na prisotnost fotoavtotrofnih organizmov – verjetno alg ali/in cianobakterij. B) Nitasti mikroorganizmi nimajo lastnosti cianobakterije *C. chthonoplastes*, tipična struktura s predelki ni vidna. Mikroorganizmi na sliki imajo strukturo niti drugačno in bolj gosto razčlenjeno.

Izkazalo se je, da cianobakterija *Coleofasciculus chthonoplastes* najverjetneje ni prisotna v blatu, saj bi jo sicer v poskusu gojenja morali opaziti v preparatih. Vseeno sem se odločila, da gojenje in analizo nadaljujem, delno v sodelovanju s sodelavci na projektu. Izvedli smo preverjanje prisotnosti alg oziroma cianobakterij v kulturah z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), pri čemer smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so specifični za cianobakterije oziroma alge. Za izolacijo matrične DNA smo uporabili mikroorganizme, ki so rasli na gladini gojišča BG-11 (plavajoča mrežna struktura). Rezultati so pokazali, da je kultura pozitivna za cianobakterije kot tudi za alge, kar kaže na precejšno raznolikost mikroorganizmov v solinskem blatu. Potrebno je poudariti, da smo s to metodo preverjali le prisotnost alg in cianobakterij, zato podatkov o morebitnih drugih vrstah mikroorganizmov nismo pridobili. Rezultati PCR so opisani v poglavju Pomnoževanje cianobakterijskih in algnih regij ITS (str. 38).

Blato, ki sem ga uporabila za analizo, ni edino, ki ga uporabljajo v solinah. Solinarji so v prejšnjih letih uporabljali blata iz različnih kanalov – Pichetto, Lida jug in Lida sever. Razlike med njimi najbolj poznajo

solinarji, ki iz prve roke vidijo učinek posameznega blata na petolo ter posledično čistost soli. Postopek konciranja je, tako kot tudi izbira blata, pri tem ključnega pomena. Zanimalo me je, kakšna je razlika med njimi z vidika mikroorganizmov.

Primerjala sem vsa tri blata in sicer rast mikroorganizmov v filtrirani morski vodi ter v gojišču BG-11. Zaradi dolgotrajnosti prejšnjega poskusa sem tokrat v precej manjših količinah blato nanesla v petrijevko ter prelila s filtrirano morskovo vodo oziroma gojiščem BG-11. Po 10 dneh sem opazila ozelenitev na vzorcih blata Lida jug (LJ) in Lida sever (LS) v gojišču BG-11 (slika 45 – zgornja vrsta), pri ostalih pa ni vidnih znakov rasti. Po 15 dneh je ozelenitev intenzivnejša pri vzorcih Lida-jug in Lida-sever v gojišču BG-11, pojavila pa se je tudi rast pri vzorcu blata Pichetto v gojišču BG-11 (slika 45 – srednja vrsta). Po 20. dneh (slika 45 – spodnja vrsta) je ozelenelo celotno dno petrijevke pri obeh vzorcih blata iz kanala Lida v gojišču BG-11, pri vzorcu iz kanala Pichetto pa je bila rast še vedno šibka in omejena na manjše predele. Mikroskopiranje teh treh vzorcev ni pokazalo očitnejših razlik v naboru mikroorganizmov, vendar je potrebno poudariti, da mikroskopiranje prikaže le del mikroorganizmov in je nemogoče sistematično pregledati celotno mrežo mikroorganizmov.



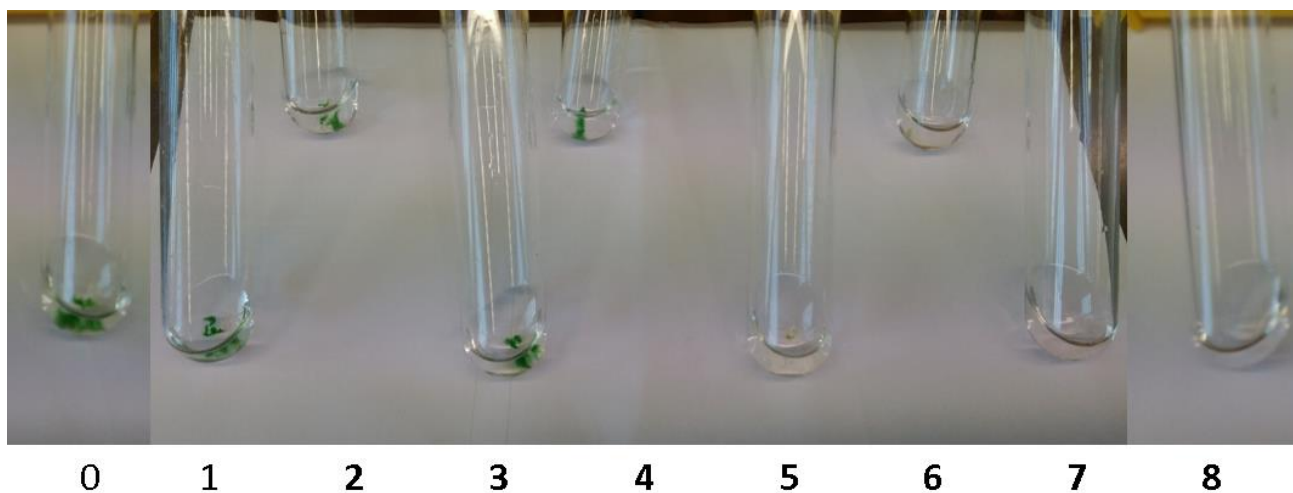
Slika 45: Vzorci blata v gojišču BG-11. Zgornja vrsta: Inkubacija 10 dni na svetlobi pri sobni temperaturi, rahla ozelenitev vzorcev Lida – jug (LJ) in Lida – sever (LS). Srednja vrsta: Inkubacija 15 dni na svetlobi pri sobni temperaturi. Intenzivna rast je vidna pri vzorcih LJ in LS, rahla rast pri vzorcu P. Spodnja vrsta: Inkubacija 20 dni na svetlobi pri sobni temperaturi. Preraščeno dno petrijevke LJ in LS, zaznana rast na nekaterih predelih P.

Rezultati kažejo, da razlike med blati so. Zanimivo je, da mikroorganizmi rastejo le v gojišču BG-11, ne pa tudi v morski vodi. Glede na to, da je mikroskopska slika primerljiva, je možno, da je kvantitativno v blatu iz kanala Pichetto manj mikroorganizmov, zato do eksponentne faze rasti in intenzivne ozelenitve traja dalj časa.

Analiza delovanja antibiotikov na solinske mikroorganizme

Zanimalo me je, kako izbrani antibiotiki delujejo na cianobakterijo *C. chthonoplastes* oziroma natančneje na neželene mikroorganizme, prisotne v izhodiščnih vzorcih. Z uporabo antibiotikov, na katere *C. chthonoplastes* ne bi bil občutljiv, neželeni mikroorganizmi pa, bi lahko pospešili postopek priprave čiste kulture izbrane nitaste cianobakterije za nadaljnje raziskave. Nitke cianobakterije *C. chthonoplastes* se obdajo z ovojnico in skupaj tvorijo filamente, na katere se pogosto pritrjujejo tudi drugi mikroorganizmi. Z rednim precepljanjem se jih običajno lahko znebimo, vendar pa je delo težavno, ker je rast cianobakterije zelo počasna. Zadala sem si, da testiram v laboratoriju najpogosteje uporabljane antibiotike ter spremljam odziv mikroorganizmov. Izbrala sem 4 antibiotike v dveh različnih koncentracijah ter jih testirala na kulturi *C. chthonoplastes* z redkimi neželenimi mikroorganizmi v gojišču MN (gre za kulturo, opisano v poglavju Fiziološke in morfološke spremembe mikroorganizmov petole v spreminjajočih se rastnih pogojih, gl. stran 59).

Uporabila sem antibiotike ampicilin, kloramfenikol, kanamicin ter streptomycin. Antibiotiki delujejo po različnih mehanizmih in cilj je bil testirati, če kateri povzroči inhibicijo rasti neželenih mikroorganizmov.



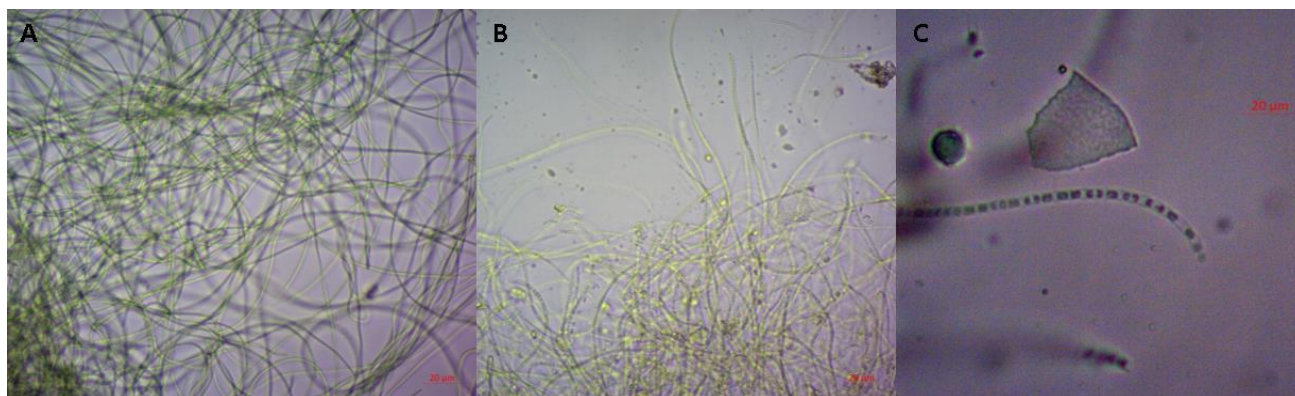
Slika 46: Epruvete s kulturo cianobakterije *Coleofasciculus chthonoplastes* ter antibiotiki. Epruvete vsebujejo 1 ml kulture cianobakterije ter antibiotik z določeno koncentracijo; od leve proti desni: (0) negativna kontrola – brez antibiotika; (1) streptomycin, 30 µg/ml; (2) streptomycin, 50 µg/ml; (3) kanamicin, 50 µg/ml; (4) kanamicin, 70 µg/ml; (5) kloramfenikol, 35 µg/ml; (6) kloramfenikol, 20 µg/ml; (7) ampicilin, 30 µg/ml; (8) ampicilin, 50 µg/ml.

Kultura je bila za testiranje zelo nepraktična, ker gre za nitaste bakterije je homogenizacija skoraj nemogoča, s tem pa je merjenje absorbance, na podlagi katere bi lahko ocenili delovanje antibiotika, nesmiselno. Vzorce sem dnevno pregledovala ter spremljala spreminjanje barve ter teksture kulture (slika 46). Po enem tednu inkubacije sem vzorce mikroskopirala ter nato ocenila delovanje antibiotika.

Ugotovila sem, da streptomycin (30 $\mu\text{g/ml}$ in 50 $\mu\text{g/ml}$) in kanamicin (50 $\mu\text{g/ml}$ in 70 $\mu\text{g/ml}$) ne delujeta niti na cianobakterijo niti na neželene mikroorganizme – rast je nespremenjena. Oba antibiotika vplivata na sintezo proteinov - streptomycin se veže na rRNA 16 S, ki je del ribosomske podenote 30 S, kanamicin pa deluje na podenoto 30 S. Oba v zadostni koncentraciji zaradi inhibicije sinteze proteinov povzročita celično smrt. Glede na to, da v izbranih koncentracijah ne vplivata na rast cianobakterije, bi inhibicijo sinteze proteinov morda dosegli s povečanjem koncentracij antibiotikov. Razlog za preživetje celic je lahko tudi odpornost na antibiotika, saj bakterije lahko vsebujejo plazmide z geni za odpornost, a tega z izbranim testom nismo preverjali.

Tretji antibiotik je bil ampicilin (50 $\mu\text{g/ml}$ in 30 $\mu\text{g/ml}$). Ta zaustavi rast bakterij, saj se ireverzibilno veže na encim transpeptidazo, ki je ključen za pravilno izgradnjo celične stene; posledica nepravilnosti v celični steni je lahko celična smrt, ki je vidna tudi pri analiziranih vzorcih. To dodatno potrjuje, da gre za izolirano cianobakterijo, ne morda algo, saj na alge, ki so evkarionti, ampicilin ne more delovati.

Kot četrti antibiotik sem uporabila kloramfenikol (20 $\mu\text{g/ml}$ in 35 $\mu\text{g/ml}$), ki v začetnih dneh ni vidno učinkoval; šele po enem tednu so bili vidni znaki odmiranja celic – zelena barva kulture je zbledela. Ta antibiotik učinkuje proti gramnegativnim in grampozitivnim bakterijam ter anaerobom. V splošnem povzroči bakteriostatičen učinek (celična smrt ni nujna) in zaradi inhibicije peptidiltransferaze preprečuje podaljševanje polipeptidne verige. Primer viabilnih ter odmirajočih celic je prikazan na sliki 47.



Slika 47: Mikroskopiranje vzorcev izolirane cianobakterije po rasti v gojišču s prisotnimi antibiotiki. (A) Kultura cianobakterije v gojišču MN s kanamicinom (50 $\mu\text{g/ml}$): celice so vidno aktivne, ni vidnih fragmentacij in natrganosti posameznih nitk. Vzorec je močne zelene barve. (B) Enaka kultura cianobakterije v gojišču MN s 30 $\mu\text{g/ml}$ ampicilina. Vidno je lomljenje nitk, fragmentacija ter bledenje tipične zelene obarvanosti. Kazali so se znaki agregacije. (C) Pri večji povečavi so vidne vrzeli znotraj ovoja s trihomi. To kaže na počasno odmiranje cianobakterije ter razpadanje trihomov.

V povzetku lahko povem, da sem v prvem delu projekta potrdila, da je cianobakterija *Coleofasciculus chthonoplastes* prisotna v vrhnji plati petole in je odgovorna za 'ozelenitev' petole v kristalizacijskih bazenih solin. Do ozelenitve običajno pride po postopku konciranja, torej po premazu petole s tankim slojem solinskega blata. Na podlagi opisov del v solinah smo pred začetkom projekta predvidevali, da aktivna cianobakterija v petolo pride z blatom. Že v prvih korakih laboratorijskega dela pa sem ugotovila, da do ozelenitve petole pride tudi brez konciranja, je pa preraščenost petole intenzivnejša in hitrejša pri premazu s solinskim blatom. V primeru inkubacije samega blata z morskovo vodo nisem zaznala znakov rasti mikroorganizmov. Nasprotno pa je do rasti prišlo, ko sem blatu dodala cianobakterijsko gojišče BG-11.

Mikroskopiranje je pokazalo prisotnost nitastih mikroorganizmov, ki niso imeli lastnosti cianobakterije *C. chthonoplastes*. Kasneje smo po metodi PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za cianobakterije oziroma alge, ugotovili, da so v blatu iz kanala Pichetto prisotne tako alge kot cianobakterije.

Meseca maja smo iz Solin dobili dva nova vzorca blata, in sicer iz kanalov Lida jug in Lida sever. Vse tri vrste blata sem v manjših količinah inkubirala z gojiščem BG-11 pri sobni temperaturi in na svetlobi. Pri vzorcih blata iz kanala Lida je bila rast mikroorganizmov precej hitrejša kot pri vzorcu iz Pichetta, vendar pa je mikroskopska slika pokazala veliko podobnost prisotnih mikroorganizmov. Iz tega sem sklepala, da do razlik v hitrosti rasti pride zaradi razlik v številu mikroorganizmov v posameznih vzorcih. Morda ta razlika vpliva na spremembe v teksturi in trdnosti petole po konciranju z določenim blatom.

Cianobakterijsko kulturo *C. chthonoplastes* sem uporabila za testiranje odpornosti proti antibiotikom. Kultura cianobakterije je le redko popolnoma čista, zato sem preverila, če kateri izmed laboratorijskih antibiotikov vpliva na rast neželenih mikroorganizmov, ne pa tudi na rast cianobakterije. Kanamicin in streptomycin nista imela posledic za rast mikroorganizmov v vzorcu, medtem ko sta ampicilin in kloramfenikol posredno ali neposredno povzročila celično smrt. Rezultate lahko pripišemo premajhni oziroma preveliki koncentraciji antibiotika, možno razlaga pa je tudi ta, da imajo nekateri mikroorganizmi morda prisotne plazmide z geni za odpornost proti antibiotikom. Potrebno bi bilo nadaljnje delo.

Viri:

- Rippka R. (1988) Isolation and purification of cyanobacteria, *Methods Enzymol.* 167:3-27.
- Schneider J., Herrmann A. G. 1980. Saltworks-natural laboratories for microbiological and geochemical investigations during the evaporation of seawater. V: 5. Symposium on Salt. Coogan A. H., Hauber L. (ur.). Ohio, The Northern Ohio Geological Society, str. 371-381
- Tkavec R., Gostinčar R., Turk M., Visscher P. T., Oren A. in Gunde-Cimerman N. (2010) Bacterial communities in the 'petola' microbial mat from Sečovlje salterns (Slovenia) *FEMES Microbiol. Ecol.*, 75:48-62
- Siegesmund M.A., Johansen J.R., Karsten U., Friedl T. (2008) *Coleofasciculus* gen. nov. (cyanobacteria): Morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont, *J. Phycol.* 44, 1572-1585.

Protimikrobni učinki solinskega blata

Urška Jelenovec

Zdravilne učinke solinskega blata izkoriščamo že stoletja, njegova trenutna raba pa še vedno temelji predvsem na izkušnjah in dolgoletni tradiciji. V okviru raziskovanja naravnih danosti Sečoveljskih solin smo želeli ugotoviti, ali ima solinsko blato morebiti še kakšne učinke, ki doslej še niso bili poznani. Glede morebitnega protimikrobnega delovanja nismo našli nobenih podatkov, zato smo se odločili, da to preverimo v laboratoriju.

Podjetje Soline upravlja s termalnim centrom na prostem »Thalasso Spa Lepa Vida«, kjer izvajajo terapevtske in talasoterapevtske postopke za potrebe medicinske rehabilitacije in zdravljenja ter velnes programe za izboljšanje zdravja in počutja. Pri tem je pomembna tudi uporaba solinskega blata, ki ga je Ministrstvo za zdravje 10. maja 2013 razglasilo kot naravno zdravilno sredstvo za naslednje indikacije: revmatske bolezni vnetega in degenerativnega značaja, progresivne internistične bolezni revmatskega značaja, kožne bolezni, ginekološke bolezni in kronične urološke bolezni (povzeto v Glavaš, 2013).

V Sečoveljskih solinah izvorno morsko blato strojno izkopljejo na izbranih lokacijah v morju pred solinami ali iz kanalov znotraj območja solin. Najprej ga grobo in nato še fino gnetejo. Po finem gnetenju tekoče blato pretočijo skozi vibracijsko sito s prostim padom v betonski zalogovnik, od koder ga odpeljejo na zorenje (Glavaš, 2013).

Za raziskovanje smo uporabljali solinska blata iz kanalov Pichetto, Lida sever in Lida jug, ki so prikazana na sliki 48. V obdobju trajanja projekta je morsko blato Pichetto spremenilo barvo in konsistenco, zato obstaja možnost, da se je spremenila tudi sestava blata in mikrobna združba v njem.



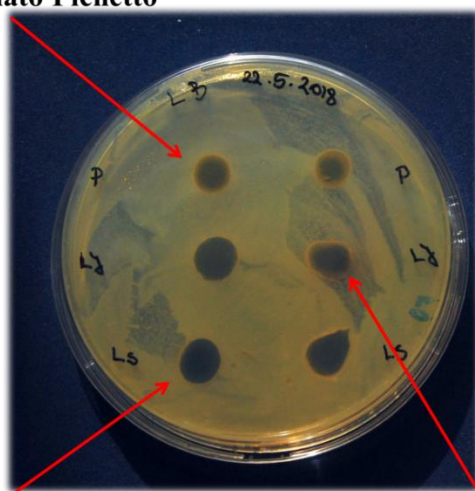
Slika 48: Solinska blata, ki smo jih uporabili za testiranje protimikrobnih učinkov. Od leve proti desni: Pichetto, Lida sever, Lida jug.

Kot tarčne mikroorganizme smo izbrali laboratorijsko bakterijo *Escherichia coli* (sev DH5 α), kožno bakterijo *Staphylococcus epidermidis* in kvasovko, ki prav tako poseljuje človeško kožo, *Candida albicans*. Namenili smo se izvesti kvalitativne in kvantitativne analize bakteriostatičnosti oz. baktericidnosti. Naš namen je bil tudi spremljati viabilnost in število mikroorganizmov posameznih tipov v prisotnosti različnih vzorcev solinskih blat in v različnih inkubacijskih pogojih (čas in temperatura).

Poskus za preverjanje protimikrobnih učinkov solinskega blata je bil preprost. Pripravili smo prekonočne kulture *E. coli* DH5 α , *Candida albicans* oz. *Staphylococcus epidermidis*. Te kulture smo resuspendirali v 0,25 M fosfatnem pufru s pH 7 in nanесли na trdno gojišče LB. Kulture smo inkubirali 3 h pri 37 °C. Nato smo termično obdelana blata (68 °C, 1 h) in kontrole nanесли na plošče s kulturami. Sledila je inkubacija 36 h pri 37 °C, nato pa smo izmerili cone inhibicije. Podoben postopek je opisan v literaturi (Ma'or in sodel., 2006).

Viabilnost in število mikroorganizmov smo spremljali na trdnem gojišču LB (za rast bakterij in kvasovk) in na gojišču BG-11 (za alge in cianobakterije). Na ploščo z gojiščem smo nanесли 0,1 mL solinskega blata in ga na tanko razmazali po gojišču. Plošče s solinskim blatom smo nato inkubirali pri sobni temperaturi in 37 °C 14 dni. Opazovali smo, ali pri teh pogojih zrastejo kakšni mikroorganizmi. Sledila je analiza kolonij in primerjava le-teh med različnimi blati in inkubacijskimi pogoji. Opazovali smo barvo, velikost, obliko, pogostost in raznolikost.

Solinsko blato Pichetto

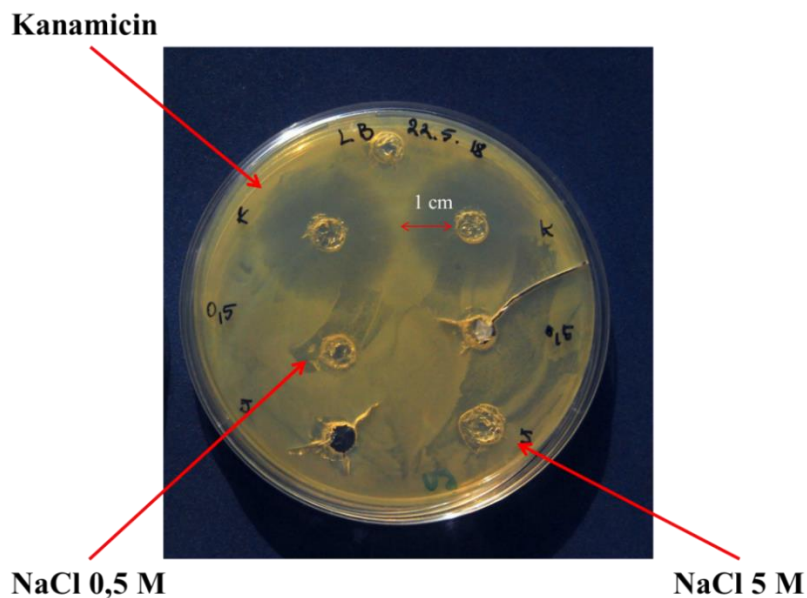


Solinsko blato Lida S

Solinsko blato Lida J

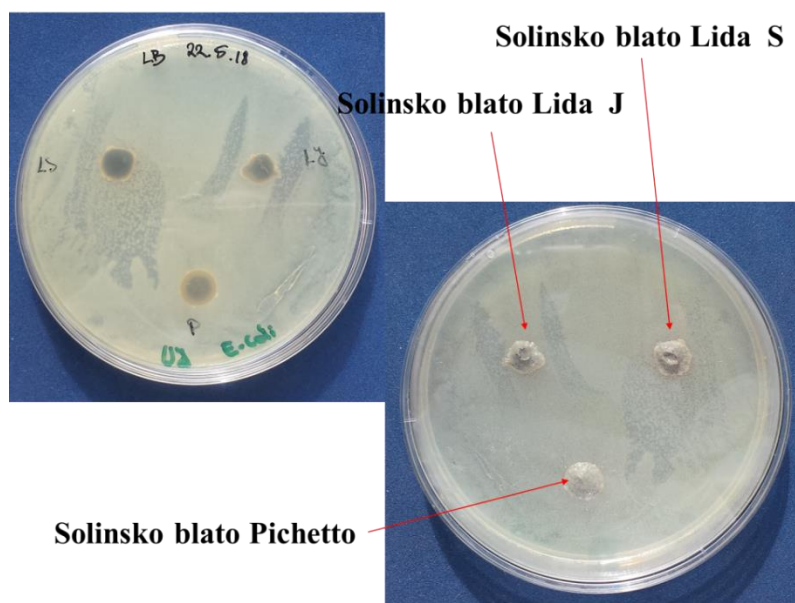
Slika 49: Rezultati protimikrobnega delovanja solinskih blat na *E. coli*.

Na sliki 49 vidimo po gojišču razraščeno *E. coli* in v obliki kapljic nanescena tri različna blata (Pichetto, Lida sever in Lida jug). Nanesli smo po dve paralelki vsakega blata. Pri nobenem od blat nismo opazili zaviralnega učinka na rast gramnegativne bakterije *E. coli*, saj nismo opazili cone inhibicije. Iz tega smo sklepali, da blata nimajo bakteriostatičnega učinka na to bakterijo. Cone inhibicije je kolobar okrog kapljice oz. mesta nanosa neke protimikrobne snovi, kjer mikroorganizem ne raste. Opazili smo jo v kontrolnem poskusu (slika 50), kjer smo uporabili antibiotik kanamicin, ki zavira rast bakterije *E. coli*. Za kontroli smo uporabili tudi 0,5 in 5 M raztopino NaCl. S tem smo preverili, ali bi morebitni protimikrobni učinek lahko pripisali soli, prisotni v solinskem blat. Pri nobeni raztopini nismo zaznali protimikrobnega delovanja, čeprav bi ga pri 5 M raztopini pričakovali. Verjetno je prišlo do difuzije NaCl po agaroznem gelu in zato koncentracija dejansko ni bila več 5 M. Blata na *E. coli* ne delujejo bakteriostatično in ne baktericidno.



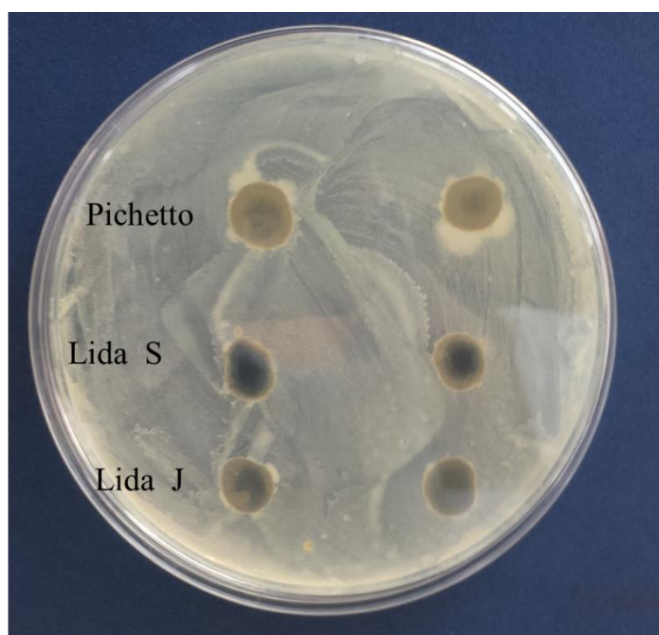
Slika 50: Kontrolni poskus za dokaz cone inhibicije in za preverjanje morebitnega protimikrobnega delovanja soli (NaCl) na bakterijo *Escherichia coli*.

Baktericidno delovanje blat smo preizkušali protokolu, prirejenem na osnovi objavljenega (Ma'or in sodel., 2006). Po nanosu kulture *E. coli* na gojišče LB smo ploščo inkubirali pri 37 °C preko noči, da so se bakterije razrasle po celotnem gojišču, in šele nato nanесли toplotno obdelana blata ter inkubirali 36 h pri 37 °C. Na sliki 51 so rezultati poskusa, kjer smo želeli preveriti, ali mikroorganizmi iz blata zavirajo rast in razmnoževanje *E. coli*. To smo preverili po enakem postopku kot bakteriostatičnost, le da smo nanесли termično neobdelana blata. Tudi tukaj nismo zaznali protimikrobnega učinka. Noben mikroorganizem iz termično neobdelanega blata, ki uspeva pri teh pogojih, ni zaviral rasti bakterije.



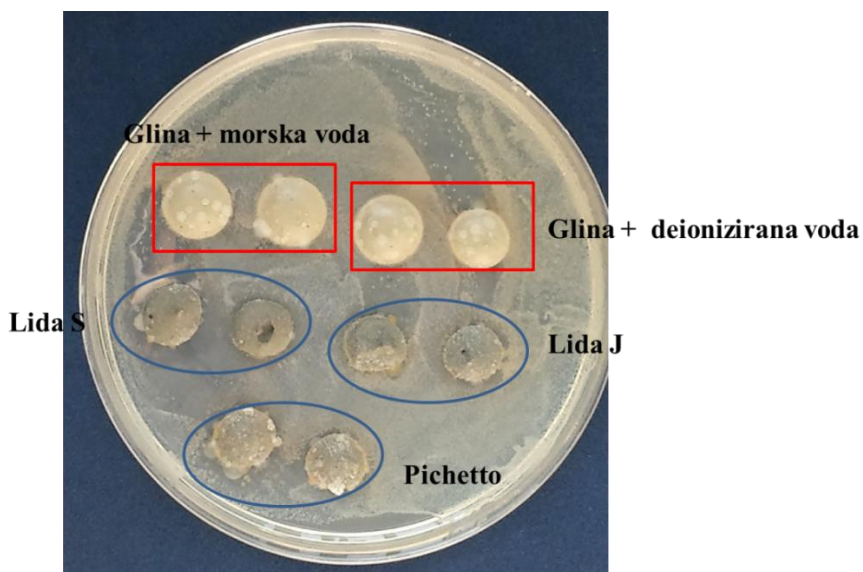
Slika 51: Preverjanje baktericidnega delovanja solinskega blata na bakterije *E. coli*. Levo: petrijevka s slojem bakterijskih kolonij od spodaj; desno: petrijevka od zgoraj, z označenimi mesti nanosa preizkušanih blat.

Na sliki 52 so prikazani rezultati poskusa, kjer smo preverjali bakteriostatične učinke solinskih blat na bakterijo *Staphylococcus epidermidis*. Kot je razvidno iz slike, nismo pri nobenem blatu opazili cone inhibicije, kar pomeni, da blata niso imela bakteriostatičnega učinka na *S. epidermidis*.



Slika 52: Preverjanje morebitnega bakteriostatičnega učinka solinskih blat na bakterijo *Staphylococcus epidermidis*. Cone inhibicije nismo zaznali v nobenem primeru.

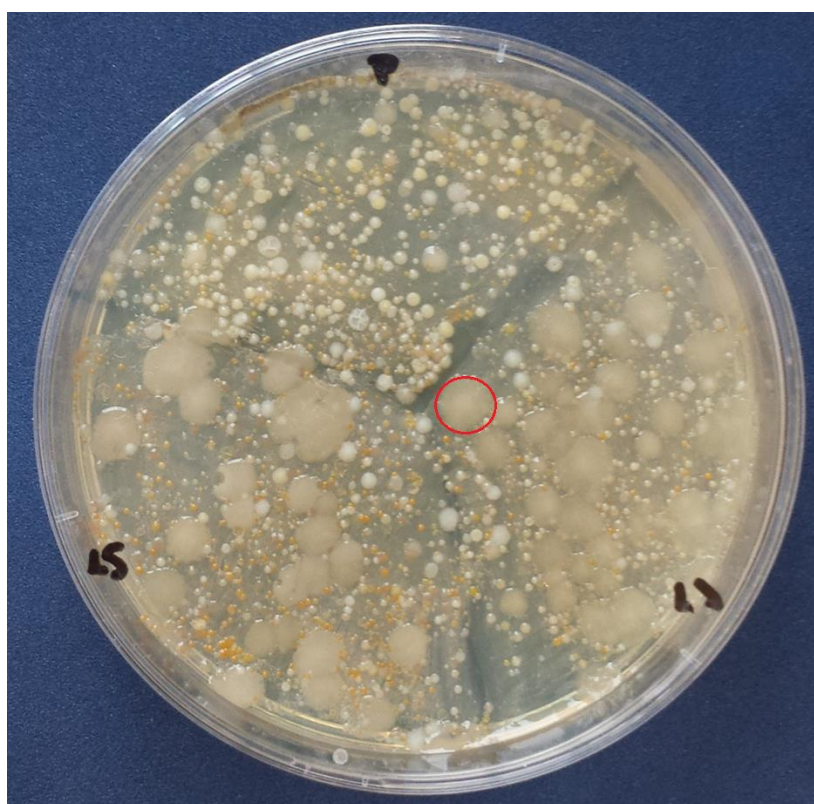
Slika 53 prikazuje rezultate poskusa protimikrobnega delovanja solinskih blat na kvasovko *Candida albicans*. Nismo opazili bakteriostatičnega delovanja blat na ta mikroorganizem. Glina, zmešana z morskovo vodo in glina, zmešana z deionizirano vodo sta nam služili kot kontrole, v primeru, da bi že samo sol iz morske vode ali glina (solinski sedimenti so bogati z glino) zavirali rast *C. albicans*.



Slika 53: Protimikrobno delovanje morskih blat na kvasovko *Candida albicans* in kontrole, ki smo jih pri tem uporabili.

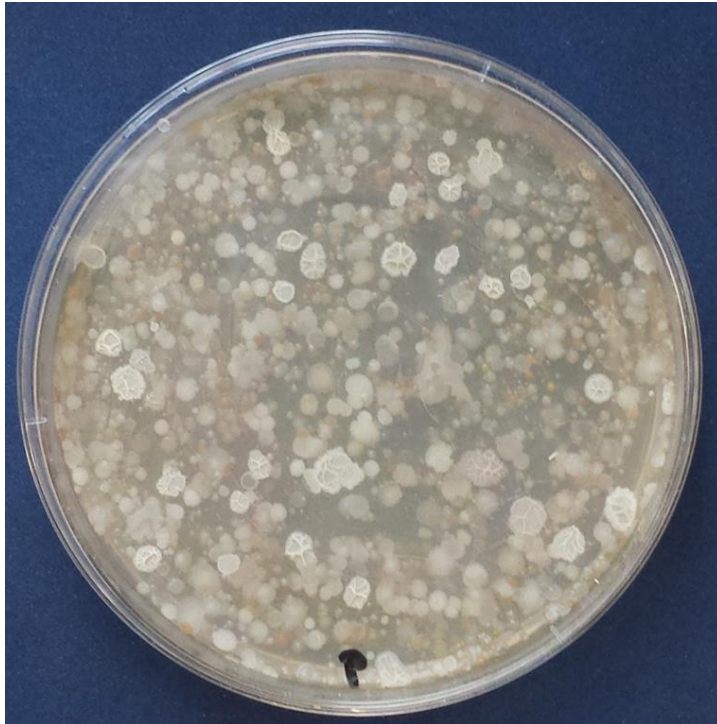
Viabilnost in število mikroorganizmov se je med blati razlikovalo, opazne pa so bile tudi določene razlike med blati, ki smo jih inkubirali pri različnih temperaturah. Čas inkubacije ni znatno vplival na mikroorganizme. Na gojišču LB pri 37 °C smo mikroorganizme videli že naslednji dan, pri sobni temperaturi pa so rasli počasneje, saj smo po 24 h videli manj mikroorganizmov. Mikroorganizmi, ki so rasli na gojišču BG-11, so rasli počasneje kot na gojišču LB.

Na sliki 54 so prikazane razlike med kolonijami mikroorganizmov blat Pichetto in Lida sever oz. jug. Na gojišču LB, na katerega smo razmazali blato iz kanala Lida jug oz. sever, so zrasle večje kolonije kot pri blatu iz kanala Pichetto. V zgornji tretjini, kjer smo razmazali morsko blato Pichetto, smo opazili tudi kolonije, ki imajo nagubano površino in so bele barve; teh pri vzorcih iz kanala Lida sever in jug ni bilo. Videli smo kolonije mikroorganizmov različnih barv (bele, rumene, opečnato oranžne). Profili kolonij so bili po večini dvignjeni in konveksni, oblika pa okrogla.



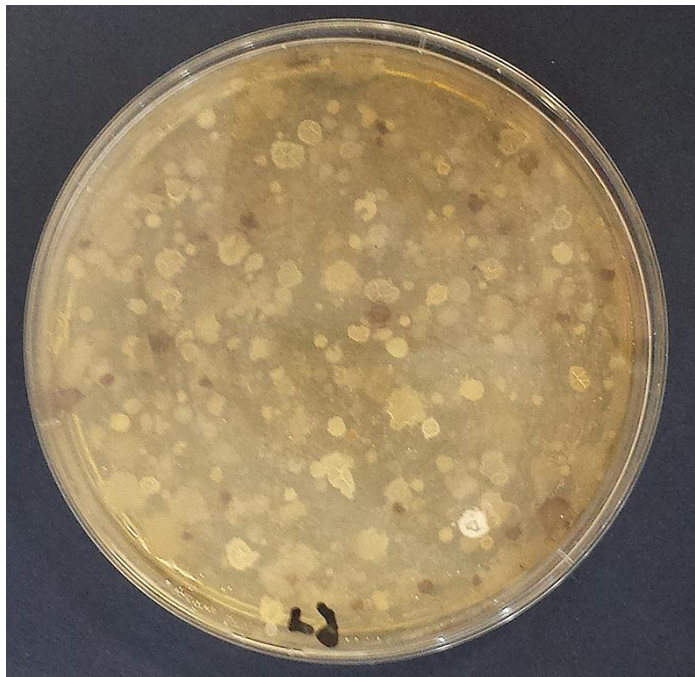
Slika 54: Mikroorganizmi, ki uspevajo na gojišču LB pri sobni temperaturi in izvirajo iz različnih blat. Na zgornji tretjini (P) je razmazano blato iz kanala Pichetto, na levi iz kanala Lida sever (LS), na desni pa iz kanala Lida jug (LJ). Obkrožena je bela kolonija, ki smo jo opazili samo pri sobni temperaturi, ne pa tudi pri 37 °C (prim. sl. 56).

Na sliki 55 vidimo različne mikroorganizme, ki so uspevali na gojišču LB pri 37 °C in so izvirali iz blata Pichetto. Po značilnostih, ki jih opazimo s prostim očesom, so bili podobni tistim, ki so zrasli na gojišču LB pri sobni temperaturi iz enakega blata. Na plošči, inkubirani pri 37 °C, smo opazili več belih kolonij z nagubano površino, kolonije so bile tudi nekoliko večje kot pri inkubaciji pri sobni temperaturi. Sicer je to pričakovano, lahko pa bi se zgodilo, da bi bili v blatu prisotni mikroorganizmi z nižjo optimalno temperaturo rasti.



Slika 55: Mikroorganizmi iz blata Pichetto, ki uspevajo na gojišču LB pri 37 °C.

Mikroorganizmi, ki so izvirali iz blata Lida jug (slika 56) in so rasli pri 37 °C, so bili s prostim očesom manj podobni tistim, ki so uspevali pri sobni temperaturi. Nismo opazili kolonij, kakršna je na sliki 54 obkrožena z rdečo. Videli pa smo kolonije mikroorganizmov, ki jih pri sobni temperaturi nismo. To so bile bordo rdeče kolonije, ki so se pojavile šele po enem tednu inkubacije. Zrasle so tudi bele kolonije z nagubano površino.



Slika 56: Mikroorganizmi iz blata Lida jug, ki uspevajo na gojišču LB pri 37 °C.

Dodatno smo želeli preveriti, ali se mikrobna slika kaj spremeni, če namesto bogatega gojišča LB, ki smo ga uporabljali dotlej, uporabimo minimalno gojišče BG-11, ki ga sicer uporabljamo za rast fotoavtotrofov, kot so cianobakterije in alge. Drugih pogojev (temperatura, odsotnost svetlobe) nismo spreminjali. Ugotovili smo, da na gojišču BG-11 (slika 57) pri enaki temperaturi uspeva manj različnih mikroorganizmov kot na gojišču LB. Kolonije so tudi manjše. S prostim očesom nismo zaznali razlike med kolonijami, ki so izvirale iz različnih blat; vse so bile vse drobne, bele in ploske. Pri sobni temperaturi so na gojišču BG-11 mikroorganizmi rasli počasneje kot pri 37 °C, saj po 36 h še nismo opazili nobene kolonije (ni prikazano).



Slika 57: Mikroorganizmi, ki uspevajo na gojišču BG-11 pri 37 °C in izvirajo iz različnih blat. Na zgornji tretjini je razmazano blato iz kanala Pichetto (P), na levi iz kanala Lida jug (LJ), na desni pa iz kanala Lida sever (LS).

Vira:

1. Glavaš N. (2013) Sestava in pretvorbe petole in solinskega blata v Sečoveljskih solinah. Doktorska disertacija. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
2. Ma'or Z., Henis Y., Alon Y., Orlov E., Sørensen K.B., Oren A. (2006) Antimicrobial properties of Dead Sea black mineral mud. *Int. J. Dermatol.* 45, 504 –511.

Zaključek

Marko Dolinar

S projektom, katerega ocenjena vrednost v času prijave je bila 16.865 EUR, smo uspeli priti do številnih preliminarnih ugotovitev, ki omogočajo boljši vpogled v pomen petole in solinskega blata za proizvodni proces v solinah. Hkrati spoznanja predstavljajo dobro osnovo za nadaljnje raziskovalno in razvojno delo, povezano s solinami, od temeljnih mikrobioloških in molekularnobioloških raziskav do aplikativnih, na primer pri iskanju novih naravnih virov, uporabnih v kozmetiki, živilstvu, farmaceutiki in drugod. Pokazalo se je, da so naša znanja o solinskih mikroorganizmih zelo skromna in da je bilo okolje Sečoveljskih solin doslej z raziskovalnega in aplikativnega stališča premalo obdelano.

Rezultati projekta so zanimivi tako za raziskovalce kot za sodelujočo gospodarsko družbo. Raziskovalci smo dobili vpogled v mikrobno pestrost posebnega ekosistema, kakršne so soline, in v dogajanje v naravi, ki je preplet procesov, v katerem sodelujejo mikroorganizmi, živali in človek. Za podjetje Soline se kaže neposredna uporabnost v spoznanju, da je verjetno poglavitna vloga konciranja v preprečevanju razvoja ličink trzač, žuželk, ki bi sicer razgradile mikrobno podlago, ki predstavlja dno kristalizacijskih bazenov. To je posebnost tradicionalnega načina pridelave soli, ki se ohranja samo še v Piranskih solinah in predstavlja tako naravoslovni kot dediščinski fenomen, ki ne bi smel izginiti na račun morebitnega zgolj ekonomskega gledanja na proces pridobivanja soli.

Poleg dela, opisanega v tem biltenu, smo izvedli še več prenosov znanja: dve predavanji pedagoških mentorjev smo izvedli v sodelujočih organizacijah (na Morski biološki postaji Nacionalnega inštituta za biologijo in v podjetju Soline), eno predavanje delovne mentorice z Morske biološke postaje pa na fakulteti (na seminarju pri predmetu Molekularna biologija za študente biokemije). S tem se krepijo zavedanja o tem, da je za celovito poznavanje procesov potrebno interdisciplinarno delo in da obstajajo rešitve, ki niso nujno visokotehnološke in drage.