

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
**ZNAČILNOSTI AVTOTROFNE MIKROBNE
ZDRUŽBE V PETOLI
(SEČOVELJSKE SOLINE)**

MAŠA ORGOLIČ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

Značilnosti avtotrofne mikrobne združbe v petoli (Sečoveljske soline)

(Characteristics of the autotrophic microbial community of *petola* (Sečovlje Salina))

Ime in priimek: Maša Orgolič

Študijski program: Biodiverziteta

Mentor: doc. dr. Patricija Mozetič

Somentor: doc. dr. Nives Kovač

Koper, avgust 2014

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Maša ORGOLIČ

Naslov zaključne naloge: Značilnosti avtotrofne mikrobne združbe v petoli (Sečoveljske soline)

Kraj: Koper

Leto: 2014

Število listov: 41

Število slik: 16

Število tabel: 3

Število referenc: 41

Mentor: doc. dr. Patricija Mozetič

Somentor: doc. dr. Nives Kovač

Ključne besede: fotoavtotrofni mikroorganizmi, cianobakterije, klorofil *a*, petola, konciranje, Sečoveljske soline

Izvleček: V Sečoveljskih solinah že stoletja poteka tradicionalna pridelava soli. Pomembno vlogo pri tem ima gojena mikrobna podlaga - petola. Ta nekaj milimetrov debela plast različnih mikroorganizmov in mineralov preprečuje mešanje soli in blata. Vsako pomlad kristalizacijske bazene premažejo s plastjo morskega blata - gnojenje petole ali *konciranje*. Namen raziskave je bil ugotoviti, kako konciranje petole vpliva na fotoavtotrofno mikrobno združbo. V kratkih časovnih intervalih smo spremljali lastnosti mikrobne združbe (biomasa, sestava) od konciranja (29. 4. 2013) do kristalizacije soli (16. 7. 2013). Ugotovili smo, da takoj po konciranju biomasa (klorofil *a*) avtotrofnih mikroorganizmov upade in ponovno naraste 18. dan po premazu z morskim blatom (37 mg Chl *a*/m²). V naslednjih 10 dneh se je površinska plast regenerirala, kar se je odrazilo v nastanku zelene plasti. Velika vsebnost soli v slanici zadnji dan raziskave (26,5 ‰) je verjetno zavrla rast mikroorganizmov, saj smo tedaj izmerili najnižjo koncentracijo Chl *a* (16 mg/m²). Opazen je bil tudi vpliv vremenskih razmer na nihanja v klorofilni biomasi. Prevladujoči mikroorganizmi v petoli so bile nitaste cianobakterije. Opazili smo tudi diatomeje, ki jih je bilo več v slanici, kjer smo našli tudi dinoflagelate. Meritve vsebnosti organskega ogljika in primerjava s koncentracijami Chl *a* v petoli so pokazali, da Chl *a* pojasni kvečjemu 20 % variabilnosti organskega ogljika, ostali delež pa prispevajo drugi dejavniki.

Key words documentation

Name and SURNAME: Maša ORGOLIČ

Title of the final project paper: Characteristics of the autotrophic microbial community of *petola* (Sečovlje Salina)

Place: Koper

Year: 2014

Number of pages: 41

Number of figures: 16

Number of tables: 3

Number of references: 41

Mentor: Assist. Prof. Patricija Mozetič, PhD

Co-Mentor: Assist. Prof. Nives Kovač, PhD

Keywords: photoautotrophic microorganism, cyanobacteria, Chlorophyll *a*, *petola*, fertilisation, Sečovlje Salina

Abstract: In Sečovlje salt works the traditional manual gathering of salt is the cultural heritage of the Mediterranean Slovenia. The main role in the salt production has the stromatolitic microbial mat named *petola*. This few millimetres thick layer of microorganisms and minerals prevents mixing of salt and mud. Every spring the crystallization pools are coated with thin layer of sea mud - fertilisation. The main goal of this research was to study the effects of fertilisation on the photoautotrophic microbial community of *petola*. We followed the characteristics of the microorganisms (biomass and taxonomic structure) in short daily intervals from the day of fertilisation (29. 4. 2013) until the salt crystallization (16. 7. 2013). We found that immediately after the fertilisation, the biomass of microorganisms declined and increased again on the 18th day after *petola* has been coated with the sea mud. In the next ten days, the surface regenerated and became green. The lowest concentration of Chl *a* (16 mg/m²) was measured on the last day of the study, which coincided with the highest salinity of the brine (26.5 ‰). The weather also affected the microbial community. Dominating microorganisms in *petola* were filamentous cyanobacteria. We also found some diatoms, which were, beside dinoflagellates, more abundant in brine. Values of total organic carbon in *petola* were compared to Chl *a* concentrations and have shown that Chl *a* explains only 20 % of the variability of organic carbon whereas the remaining portion is due to other factors.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Patriciji Mozetič, ki mi je pomagala, svetovala in mi nudila pomoč pri pisanju naloge. Zahvaljujem se ji za vso vloženo delo, trud in potrpežljivost skozi potek pisanja. Predvsem pa se ji zahvaljujem, da mi je kot mentorica, s to nalogo omogočila vpogled v čudoviti svet mikroorganizmov v petoli.

Zahvaljujem se tudi somentorici doc. dr. Nives Kovač, za pomoč pri nabiranju vzorcev v Sečoveljskih solinah, za dodatno pomoč pri pisanju zaključne naloge in prav tako za ves njen trud, ki je bil vložen.

Zahvala gre tudi raziskovalki dr. Neli Glavaš, ki mi je nudila pomoč, svetovanje in nasvete v procesu pisanja zaključne naloge.

Zahvala gre tudi podjetju SOLINE Pridelava soli, d. o. o. in Krajinskem parku Sečoveljske soline za dovoljenje pri vzorčenju petole in solinskega blata.

Zahvaljujem pa se še Morski biološki postaji Piran Nacionalnega inštituta za biologijo, za omogočeno raziskovalno in laboratorijsko delo, ki sem ga lahko izvaja.

Majhno zahvalo pa posvečam še mojim bližnjim, za njihove spodbudne besede in pomoč, saj je bilo pisanje naloge z njihovo pomočjo precej lažje.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Soline in petola	1
1.2	Avtotrofni mikroorganizmi v petoli	3
1.3	Raziskovalne hipoteze in cilji	5
2	MATERIALI IN METODE	6
2.1	Opis območja raziskave	6
2.2	Vzorčenje	7
2.2.1	Petola	9
2.2.2	Slanica	9
2.2.3	Blato	10
2.3	Metode	10
2.3.1	Splošni fizikalno-kemični parametri	10
2.3.2	Določanje vsebnosti skupnega organskega ogljika	11
2.3.3	Določanje koncentracij klorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i>) in feopigmentov	11
2.3.4	Mikroskopske analize	12
3	REZULTATI Z DISKUSIJO	14
3.1	Meteorološke razmere v času raziskave	14
3.2	Značilnosti mikrobne združbe v petoli	16
3.2.1	Biomasa fotoavtotrofnih mikroorganizmov v petoli	16
3.2.2	Sestava in številčnost fotoavtotrofnih mikroorganizmov v petoli	19
3.3	Značilnosti fotoavtotrofnih organizmov v slanici	25
3.4	Vsebnost organskega ogljika v petoli	26
4	ZAKLJUČEK	28
5	LITERATURA	30

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Terenski zapisnik vzorčenja petole, slanice in blata ter vrednosti nekaterih parametrov, izmerjenih na terenu	8
Preglednica 2: Vsebnost Chl <i>a</i> in feopigmentov v 1 g suhe teže solinskega blata	16
Preglednica 3: Koncentracije Chl <i>a</i> in feopigmentov v slanici.....	26

KAZALO SLIK

Slika 1: Sečoveljske soline, Lera in Fontanigge	1
Slika 2: Ročno pobiranje soli v kristalizacijskih bazenih v poletnih mesecih.....	2
Slika 3: Postopek konciranja, april 2013	3
Slika 4: Kristalizacijski bazen št. 10	6
Slika 5: Veliki korer z vzorcem petole za elementno analizo, v ozadju tudi majhen korer za jemanje vzorcev petole za analize Chl <i>a</i>	9
Slika 6: Vzorci slanice (a) in blata (b), april 2013	10
Slika 7: Povprečna dnevna temperatura zraka in trajanje sončnega obsevanja od 20. 4. – 20. 7. 2013	14
Slika 8: Povprečna dnevna relativna vlažnost in količina padavin	15
Slika 9: Meritve koncentracij Chl <i>a</i> v dveh podvzorcih petole, vzorčenih na isti dan.....	17
Slika 10: Povprečne koncentracije Chl <i>a</i> in razgradnih produktov ali feopigmentov v petoli	18
Slika 11: Mikroorganizmi v petoli, opazovani pod mikroskopom	21
Slika 12: Mikroskopski posnetek nitaste cianobakterije.	22
Slika 13: Ocena povprečne gostote cianobakterij	23
Slika 14: Mikroorganizmi v slanici, opazovani pod mikroskopom	24
Slika 15: Vrednosti skupnega organskega ogljika (TOC) in primerjava s koncentracijami Chl <i>a</i> v petoli	27
Slika 16: Linearna regresija med koncentracijami Chl <i>a</i> in skupnega organskega ogljika (TOC) v petoli	27

1 UVOD

V uvodu bomo opisali soline in petolo na splošno, opredelili avtotrofne mikroorganizme v petoli ter predstavili naše pričakovane cilje in zastavljene hipoteze za to nalogo.

1.1 Soline in petola

Sečoveljske soline ležijo na skrajnem jugozahodu Slovenije ob ustju reke Dragonje, na meji z republiko Hrvaško in so ostanek nekdanjih obsežnih Piranskih solin. Prve zapise o Piranskih solinah najdemo že iz leta 804 (soline.si). V kasnejših letih so bile soline v primorskih mestih ob vzhodnojadranski obali podvržene uničevanju, vendar so Piranske soline ostale nedotaknjene in tako postale največje in najpomembnejše soline v severovzhodnem Jadranu (soline.si). Svoj razcvet so doživele v času avstro-ogrske monarhije, ko je sol bila zelo dragocena surovina, predvsem zaradi svoje široke uporabnosti. V preteklosti je bilo v Tržaškem zalivu tudi več manjših solin, vendar so se do danes ohranile le Sečoveljske in Strunjanske soline. Sečoveljske soline so postale krajinski park leta 1989 in od takrat so v parku dovoljene le dejavnosti, ki ne ogrožajo naravnega ravnovesja (npr. solinarstvo) (kpss.si). Sečoveljske soline so zelo priljubljena destinacija za obiskovalce, prav tako pa so pomembne z izobraževalnega in ekološkega vidika (kpss.si; soline.si). Krajinski park Sečoveljske soline – KPSS je velik približno 750 ha, aktivni pridelavi soli pa je namenjenih približno 593 ha. Park je razdeljen na dve območji (Slika 1): Lero v severnem delu, kjer še vedno poteka aktivna pridelava soli in Fontanigge v južnem delu, kjer so pridelavo soli opustili v sredini 60. let prejšnjega stoletja. To območje je še vedno namenjeno zgoščevanju morske vode (kpss.si).



Slika 1: Sečoveljske soline, Lera in Fontanigge (vir: kpss.si).

V solinah še vedno poteka tradicionalna pridelava soli iz srednjeveških časov. Osnovni proces je naravna kristalizacija. Soline sestavljata dva sistema. Prvi sistem predstavlja niz med seboj povezanih bazenov, v katerih morska voda kroži in izhlapeva (tri različna območja izhlapevanja), se zgoščuje in nato sol kristalizira v kristalizacijskih bazenih (območje kristalizacije) (Slika 2). Drugi je biološki sistem, ki vključuje žive organizme iz vseh bazenov (Glavaš 2013). Morsko vodo speljejo do kristalizacijskih bazenov iz bazenov za zgoščevanje vode s pomočjo črpalk oziroma po sistemu prostega pada.



Slika 2: Ročno pobiranje soli v kristalizacijskih bazenih v poletnih mesecih (vir: soline.si).

V kristalizacijskih bazenih nastaja sol, ki jo pobirajo na gojeni mikrobni podlagi, imenovani petola. Ta je osnovna plast za pridelovanje soli na tradicionalen način in je najverjetneje ena od najstarejših kultiviranih mikrobnih podlag na svetu (Glavaš 2013). Zaradi slovesa pridobivanja bele soli povsod po Sredozemlju so v 14. stoletju petolo vpeljali tudi v Sečoveljske soline (Gunde-Cimerman in sod. 2005). To je nekaj milimetrov debela plast različnih mikroorganizmov in mineralov (Pahor in Poberaj 1963). Glavna naloga petole je, da preprečuje mešanje soli in blata. Deluje pa tudi kot biološki filter, saj preprečuje, da bi se vgrajevali nezaželeni ioni (npr. železovi ioni v halit) oz. prispeva k vezavi določenih ionov. Rezultat tega selektivnega delovanja je izredno čista in bela sol (Pahor in Poberaj 1963). Petola kaže slojevito strukturo, ki jo razdelimo na več plasti: rjavkasto obarvan zgornji sloj s prevladujočimi cianobakterijami, bodisi enoceličnimi bodisi nitastimi iz rodov *Entophysalis* in *Lyngbya*, sledi zeleno obarvana oksidativna plast kot glavni sloj petole, v kateri prevladuje nitasta cianobakterija *Coleofasciculus chthonoplastes*, nato sledi RDL plast (angl. *redox discontinuity layer*), v kateri so žveplo oksidirajoče fototrofne bakterije in črno anoksično blato kot najgloblja plast, ki jo naseljujejo sulfat reducirajoče bakterije (Scheinder in Herrmann 1980). Petola je sestavljena predvsem iz anorganske snovi (kremena, karbonatov, glinenih mineralov, glinenca, sadre, halita in pirita), organska frakcija pa predstavlja le manjši delež (do

6,35 %) (Glavaš in Kovač 2009).

Petolo je potrebno skozi vse leto ustrezno vzdrževati ter v času solinarske sezone primerno pripraviti, saj le nepoškodovana ter ravno prav debela omogoča pridelavo kvalitetne morske soli. Pri tem ima pomembno vlogo t. i. *konciranje* ali gnojenje petole, ki se izvaja vsako pomlad (aprila ali maja, odvisno od vremenskih razmer), ko kristalizacijske bazene premažejo s plastjo morskega blata (Slika 3). Po konciranju v bazene spustijo morskovo vodo, ki jo pogosto menjujejo, s čimer se petola regenerira. Morska voda visoke slanosti ali slanica skozi vse leto prekriva dno kristalizacijskega bazena in s tem vpliva na sestavo in procese v petoli (Glavaš in Kovač 2012). V zimskih mesecih pa slanica preprečuje, da bi petola zamrznila (Tkavc in sod. 2010). Vse to kaže, da je vzdrževanje in priprava sezonske petole zelo zahtevno delo.



Slika 3: Postopek konciranja, april 2013.

1.2 Avtotrofni mikroorganizmi v petoli

Mikroorganizmi so mikroskopsko majhni enocelični organizmi; včasih se posamične celice povezujejo v kolonije. So sposobni hitrega razmnoževanja in so izjemno prilagodljivi na spremembe v okolju. Nekateri so sposobni preživeti tudi v ekstremnih okoljih. Sodelujejo v prehranjevalnih verigah, bodisi kot proizvajalci bodisi kot razgrajevalci organske snovi. Glede na pridobivanje energije jih delimo v dve skupini: kemotrofi in fototrofi (Madigan in Martinko 2006). Kemotrofni organizmi kot vir energije uporabljajo kemično energijo ob cepitvi kemičnih vezi, medtem ko fototrofi kot vir energije uporabljajo svetlobo. Glede na vir ogljika, ki ga organizmi potrebujejo za sintezo sebi lastnih organskih spojin, pa jih delimo na avtotrofe in heterotrofe. Avtotrofni organizmi dobijo ogljik iz ogljikovega dioksida (CO_2) in se nadalje delijo na fotoavtotrofe, ki so daleč prevladujoči med avtotrofi (rastline, alge in nekatere bakterije) ter kemoavtotrofe, različne bakterije, ki naseljujejo ekstremna okolja. Heterotrofni organizmi pa dobijo ogljik iz organskih spojin kot so ogljikovi hidrati, maščobe in beljakovine (Madigan in Martinko 2006).

Glavne skupine fotoavtotrofnih mikroorganizmov v zelo slanih podlagah so cianobakterije in anaerobne žveplove bakterije (škrlatne), ki jih najdemo v globljih plasteh, kjer je še dovolj svetlobe, kisika pa ni, pa tudi diatomeje na površini sedimenta (Rontani in Volkman 2005). Mikroorganizmi so podvrženi ekstremnim in spreminjajočim se razmeram; tako se vertikalno razporejajo po mikrobni podlagi glede na prodiranje svetlobe ter koncentracije kisika in vodikovega sulfida (Des Marais 2003). Značilnost mikrobnih preprog je nastanek in povečano izločanje izvenceličnih polimernih substanc, predvsem polisaharidov (EPS, angl. *extracellular polysaccharides*) (Decho in sod. 2005). EPS mreža stabilizira podlago in varuje mikrobno preprogo pred prevelikim izsuševanjem in UV sevanjem (Wolfaardt in sod. 1994; Decho 2010; Glavaš 2013).

Obstaja veliko različnih delitev mikroorganizmov glede na njihovo sposobnost rasti pri različnih koncentracijah soli. Najbolj pogosto se uporablja Kushnerjeva (Kushner 1978), ki mikroorganizme deli glede na optimalno koncentracijo soli, potrebne za rast:

- nehalofilni organizmi (< 0,2 M NaCl)
- delno halofilni organizmi (med 0,2 in 0,5 M NaCl)
- zmerno halofilni organizmi (med 0,5 in 2,5 M NaCl)
- ekstremno halofilni organizmi (med 2,5 in 5,2 M NaCl).

V območju izhlapevanja Sečoveljskih solin slanost morske vode postopoma narašča in doseže najvišje vrednosti v kristalizacijskih bazenih. Tu je slanost slanice tudi 10- do 20-krat večja od slanosti morske vode. V petoli najdemo predvsem ekstremno halofilne organizme (Gunde-Cimerman in sod. 2005). Po prvem opisu strukture petole iz leta 1980 (Schneider in Herrmann 1980), ki je vključevala tudi mikrobiološke aspekte, so se zvrstile številne raziskave o sestavi mikrobne združbe petole (npr. Gunde-Cimerman in sod. 2000; Pašić in sod. 2005; Zajc in sod. 2012), ki pa so bile usmerjene predvsem v raziskave črnih kvasovk, skupine halofilnih gliv. Novejša študija je potrdila, da v zgornji plasti petole prevladuje nitasta cianobakterija vrste *Coleofasciculus chthonoplastes* in da so v anoksični plasti petole prisotne doslej še nekultivirane bakterijske vrste (Tkavc in sod. 2010).

Poznavanje mikrobne ekologije je zato pomembno pri pridobivanju soli z izkoriščanjem petole. Na mikrobno združbo v petoli vplivajo različni kemični in fizikalni dejavniki. Slanost, temperatura, svetloba, pH, koncentracija hranil in kisika ter vodni režim najbolj vplivajo na lastnosti in aktivnost mikrobne združbe v petoli (Sabater in sod. 2000). Na spremenjene razmere se mikroorganizmi solinskih bazenov hitro odzovejo, zato pravimo, da so te združbe dinamične (Litchfield in sod. 2009). Znano je, da visoke koncentracije soli povzročajo prenehanje rasti večine mikroorganizmov. Vendar pa so se organizmi, ki živijo v močno slanih okoljih, na tako okolje prilagodili; nekateri izmed njih za svojo uspešnost celo potrebujejo tako visoke koncentracije soli (Gunde-Cimerman in sod. 2005).

Pomembno vlogo pa igra tudi odsotnost plenilcev, saj imajo mikroorganizmi večjo

možnost preživetja in se ponavadi namnožijo do velikih gostot, ki niso značilne za sladkovodna in morska okolja. Vpliv na avtotrofno mikrobno združbo pa ima tudi sezonsko pobiranje soli, ki povzroča nihanje slanosti med žetvenimi sezonami (visoka slanost pomladi in poleti) in neaktivnimi sezonami (zima) (Gunde-Cimerman in sod. 2005). Nasprotno, kjer pridobivanje soli poteka čez celo leto, je slanost v posameznih bazenih stalna.

Svojo ekološko vlogo pri nastajanju soli pa imajo tudi mikroorganizmi v slanici. Iz dosedanjih raziskavah lahko razberemo, da višanje slanosti vode vpliva na sestavo mikrobne združbe: z naraščanjem slanosti se delež prokariotov povečuje, zmanjšuje pa se raznolikost in številčnost evkariotov (Kračun 2006). Za ekstremno halofilne organizme je značilno, da imajo visoko vsebnost karotenoidnih pigmentov, zaradi česar je voda pogosto rdeče obarvana. Obarvanje je posledica gostih združb obarvanih mikroorganizmov, kot so enocelične zelene alge vrste *Dunaliella salina* (razred Chlorophyceae) ter različne prokariotske arheje in bakterije (Gunde-Cimerman in sod. 2005). Barvila fotoavtotrofnih mikroorganizmov imajo pozitiven učinek na postopek pridobivanja soli, ker absorbirajo sončno svetlobo. S tem povzročajo večje segrevanje slanice, posledično pa tako prihaja do hitrejšega izhlapevanja in nastanka soli (Gunde-Cimerman in sod. 2005).

1.3 Raziskovalne hipoteze in cilji

Namen raziskave je bil preveriti, kako konciranje petole, spomladanski premaz z morskim blatom, vpliva na mikrobno združbo. Osredotočili smo se na fotoavtotrofne organizme – prokariotske cianobakterije in evkariotske mikroalge v najbolj zgornji plasti petole, katerih biomasa in abundanco ter taksonomsko umestitev je moč določiti z uporabo preverjenih metod. Zato smo v kratkih časovnih intervalih (vsak dan do nekaj dni) vzorčili petolo in spremljali lastnosti mikrobne združbe (biomasa, sestava) vse od konciranja do kristalizacije soli. Prav tako smo želeli ugotoviti časovno spreminjanje vsebnosti organskega ogljika v petoli v povezavi s spreminjanjem klorofilne biomase.

Zastavili smo si sledeče raziskovalne hipoteze:

- Predvidevamo, da bo konciranje petole vplivalo na porast biomase avtotrofnih mikroorganizmov.
- Predvidevamo, da zgornjo plast petole sestavljajo predvsem cianobakterije, čeprav ne izključujemo drugih mikroorganizmov (npr. evkariotskih predstavnikov).
- Predvidevamo, da bo časovno spreminjanje vsebnosti organskega ogljika sledilo spreminjanju biomase avtotrofnih mikroorganizmov, s čimer bi lahko podali oceno o deležu slednjih v organski frakciji petole.

2 MATERIALI IN METODE

V tem poglavju bomo opisali območje raziskav, natančno bomo predstavili shemo vzorčenja ter opis vzorčenja treh tipov vzorcev (petola, voda in blato) ter splošno uporabne metode, ki se uporabljajo v raziskavah morja.

2.1 Opis območja raziskave

Raziskava je potekala v aktivnem delu Sečoveljskih solin v Leri (Slika 1). Vzorčili smo v kristalizacijskem bazenu številka 10 ($45^{\circ} 29' S$, $13^{\circ} 35' J$) (Slika 4) in sicer na različnih mestih ob robu bazena. Kristalizacijska območja sestavljajo solna polja z različnim številom kristalizacijskih gred (24, 18 ali 16). Sestavni del solnega polja je tudi postrežnica kot zalogovnik nasičene slanice ter tudi kanali za transport vode, kolski tir (za odvoz soli z vozički), betonska odcedišča za sol, zapornice, pretočna korita, brvi za prehode preko kanalov, lesena oprema in solinarske lope (kpss.si).

Območje Sečoveljskih solin sodi med najtoplejše kraje v Sloveniji. Značilno je veliko število sončnih dni (povprečno 98 dni v letu) in mile zime (temperature redko padejo pod ničlo) (kpss.si). Ogrin (1995) je sečoveljske soline uvrstil v posebno klimatsko členitev, značilno za doline in podolja Slovenske Istre, za katere so značilne izrazite nočne temperaturne inverzije. Padavin je malo; višek padavin se pojavlja septembra, medtem ko poleti nastopi tudi fiziološka suša (kpss.si).



Slika 4: Kristalizacijski bazen št. 10.

2.1 Vzorčenje

Vzorčenje je potekalo od 25. 4. do 16. 7. 2013 v različnih intervalih: na začetku pogosteje (vsak dan do nekaj dni), po 18 dneh raziskave pa v večjih dnevnikih razmikih (7 dni do 3 tedne). Datum 25. 4. 2013 predstavlja čas T_{00} , to je čas pred konciranjem. Ker pa zaradi slabega vremena kasneje tega dne in tudi v naslednjih dneh konciranja niso mogli opraviti, je »pravi« čas T_0 pravzaprav 29. 4. 2013. Vzorčili smo tri tipe vzorcev: petolo, ki smo jo vzorčili vsakokrat, vodo, ki smo jo vzorčili, ko je slanica prekrivala petolo in blato iz kanala Pichetto ob času T_0 , s katerim so premazali petolo.

Zbirali smo tudi podatke o temperaturi, pH in slanosti slane, ko je ta prekrivala dno bazena.

Ob vsakokratnem vzorčenju smo zabeležili vremenske razmere oz. pojave (sončno, oblačno vreme, dež, veter itd.). Dejanske vrednosti meteoroloških parametrov (polurna povprečja) z najbližje meteorološke postaje Portorož - letališče pa smo pridobili pri Agenciji Republike Slovenije za Okolje (arso.gov.si). Zanimala nas je temperatura zraka, hitrost vetra, relativna vlaga, količina padavin in trajanje sončnega obsevanja. Polurne povprečne vrednosti smo preračunali v dnevna povprečja.

Shema vzorčenja in popis merjenih parametrov sta prikazana v Preglednici 1.

Preglednica 1: Terenski zapisnik vzorčenja petole, slanice in blata ter vrednosti nekaterih parametrov, izmerjenih na terenu.

Datum	25.4.2013	29.4.2013	30.4.2013	1.5.2013	2.5.2013	3.5.2013	5.5.2013	7.5.2013	10.5.2013	14.5.2013	17.5.2013	24.5.2013	28.5.2013	2.6.2013	11.6.2013	3.7.2013	16.7.2013
Dan	T00	T0	T1	T2	T3	T4	T6	T8	T11	T15	T18	T25	T29	T34	T43	T65	T78
Parametri																	
PETOLA																	
Chl <i>a</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Mikroalge (sestava)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TOC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SLANICA																	
pH	/	/	8,52	8,4	8,5	8,49	8,54	/	8,01	/	/	/	/	/	/	/	/
T voda(°C)	/	/	16,6	22,4	21,5	26	22,4	/	23	/	/	/	/	21	/	20	34
Slanost (°Bé)	/	/	5	5,2	4,5	4,3	4,4	/	4,2	/	/	/	/	3,4	/	12,8	26,5
Hranilne snovi	/	/	X	X	X	X	X	/	X	/	/	/	/	/	/	/	/
Chl <i>a</i>	/	/	X	X	X	X	X	/	X	/	/	/	/	/	/	/	/
Mikroalge (sestava)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	X	/	/	/
BLATO																	
Chl <i>a</i>	/	X	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
OPOMBE	pred konci-ranjem	tik pred premazom	Sončno	Sončno	Dež	delno oblačno	Sončno	sončno	oblačno	Sončno	oblačno	Oblačno	Sončno	dež	sončno	sončno	Sončno

1.1.1 Petola

V vzorcih petole smo določali biomaso, izraženo s koncentracijo glavnega fotosinteznega barvila klorofila *a* (Chl *a*), sestavo fotoavtotrofnih mikroorganizmov in vsebnost skupnega organskega ogljika (angl. *total organic carbon*, TOC).

Vzorci petole za določevanje Chl *a* in sestave mikrobne združbe smo vzorčili s pomočjo malega korerja površine $5,725 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ na različnih območjih kristalizacijskega bazena številka 10 (Slika 4). Korer smo zarili približno 2 cm v globino bazena in vzeli vzorec petole. Zgornjo, zeleno plast petole smo odrezali (približna debelina 2–4 mm) in jo dali v označeno plastično posodico. Za določevanje koncentracije Chl *a* smo vzorčili po dva naključno vzeta podvzorca, za mikroskopske preglede pa en vzorec. Vzorce za določevanje koncentracije Chl *a* smo do obdelave zamrznili.

Vzorce za mikroskopske analize smo fiksirali tako, da smo v vzorčevalno posodico predhodno nalili 20 ml filtrirane morske vode in 0,4 ml nevtraliziranega formalina; končna koncentracija raztopine je bila 2 %.

Vzorce za elementno analizo smo vzorčili s pomočjo velikega korerja z notranjim premerom 4 cm, ki se po navadi uporablja za vzorčenje sedimentov, pri čemer nas je zanimala zgornja plast v debelini do 3 mm (Slika 5).



Slika 5: Veliki korer z vzorcem petole za elementno analizo, v ozadju tudi majhen korer za jemanje vzorcev petole za analize Chl *a*.

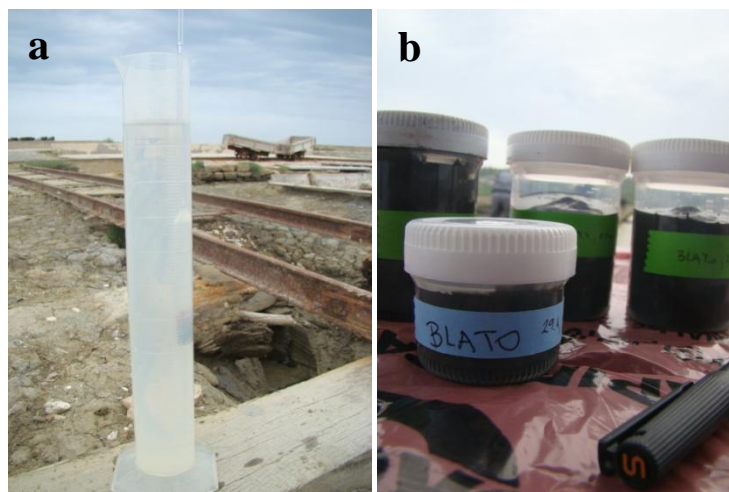
1.1.2 Slanica

Ob dnevih, ko je bila slanica v kristalizacijskem bazenu, smo vzorčili tudi vodo (glej Preglednico 1) za določanje koncentracije Chl *a* in mikroskopske analize. Slanico smo zajemali ob robu kristalizacijskega bazena s pomočjo polietilenske platenke. Vzorce vode (200 ml, dve paralelki) za določevanje koncentracije Chl *a* (Slika 6a) smo takoj

prefiltrirali skozi GF/F filter iz steklenih vlaken premera 25 mm (nominalna velikost por 0,7 μm) in zamrznili do obdelave. Vzorec vode za mikroskopske analize (100 ml) smo v laboratoriju fiksirali z nevtraliziranim formalinom 2 % končne koncentracije. Izmerili smo tudi pH, temperaturo in slanost vode.

1.1.3 Blato

Ob dnevu T_0 , 29. 4. 2013, smo vzeli tudi vzorec blata, s katerim so premazali petolo. Blato, ki je bilo uporabljeno za konciranje kristalizacijskega bazena št. 10, je bilo iz kanala Pichetto. Vzeli smo dva vzorca za analizo Chl *a*, ki smo jih shranili v plastične posodice in zamrznili do obdelave (Slika 6b).



Slika 6: Vzorci slanice (a) in blata (b), april 2013.

1.2 Metode

Za določanje vrednosti merjenih parametrov smo uporabili preverjene in splošno uporabljene metode v biološki in kemični oceanografiji in solinarstvu.

1.2.1 Splošni fizikalno-kemični parametri

Ob vsakem vzorčenju smo izmerili temperaturo, slanost in pH slanice nad petolo. Temperaturo in pH smo izmerili s prenosnim multimetrom (Eutech instruments). Zaradi ekstremno visokih poletnih vrednosti smo slanost določili z merjenjem gostote s pomočjo Beauméjevih aerometrov (enota $^{\circ}\text{Bé}$, po francoskem kemiku Beauméju), ki so široko uporabljeni v solinarstvu.

1.2.2 Določanje vsebnosti skupnega organskega ogljika

Vzorci petole za določanje skupnega organskega ogljika (angl. total organic carbon, TOC) smo najprej liofilizirali in homogenizirali. Suhe vzorce smo nakisali s 6 M HCl, da smo odstranili ves anorganski karbonatni ogljik (Olli in sod. 2002), ki ga je v solinskih vzorcih lahko zelo veliko. Pri tem smo morali biti zelo previdni, da nismo izgubili dela vzorca, saj je reakcija velikokrat burna. Pri reakciji je prišlo do tvorjenja mehurčkov, kar pomeni, da je nastajal plin ogljikov dioksid. Ko mehurčkov nismo več opazili, je pomenilo, da je bil odstranjen ves karbonatni ogljik. Vzorce smo do končne analize hranili v eksikatorju. Vsebnost skupnega organskega ogljika smo določili z uporabo elementnega analizatorja (Elemental Vario Micro Cube) pri temperaturi sežiga 1020 °C in standardom sulfanilamidom.

1.2.3 Določanje koncentracij klorofila *a* (Chl *a*) in feopigmentov

Koncentracije glavnega fotosinteznega barvila klorofila *a* in njegovih razgradnih produktov feopigmentov smo določali v vzorcih petole, slanice in blata z uporabo fluorimetrične metode, opisane za vzorce morske vode (Holm-Hansen in sod. 1965).

Petola. Za določanje Chl *a* v petoli smo sledili metodi, opisani v člankih Parsons in sod. (1984) in Pinckney in sod. (1994). Zmrznjene vzorce petole smo iz vzorčevalnih posodice dali v plastične 50 ml centrifugirke in jim dodali 20 ml 90 % acetona. Delo je potekalo v temi, da dnevna svetloba ne bi vplivala na rezultate (npr. razgradnja Chl *a*). Vzorce smo nato 50 sekund »razbijali« s pomočjo ultrazvočne palčke Vibra-CellTM (Sonics & Materials) pri frekvenci 25 KHz, jih dobro premešali in jih za 24 h pustili v hladilniku. V tem času je stekel proces ekstrakcije, tj. prenos molekul Chl *a* in feopigmentov iz trdne zmesi v tekočo fazo s pomočjo topila – acetona. Po končani ekstrakciji smo vzorce centrifugirali. Čas in hitrost centrifugiranja sta bila pri posameznih vzorcih različna: od 15 min pri 3000 rpm do 20 min pri 5000 rpm. Nekatere vzorce pa smo večkrat centrifugirali: najprej 15 min pri 3000 rpm, potem pa še 20 min pri 5000 rpm.

Koncentracije Chl *a* in feopigmentov smo izmerili s pomočjo fluorimetra Turner Trilogy. Steklene kivete z zamaškom smo napolnili s 1800 µl supernatanta in merili fluorescenco pred in po zakisanju. Vzorce smo zakisali, tako da smo dodali 100 µl HCl (razen pri vzorcu 25. 4. 2013, ko smo dodali 60 µl HCl), dobro premešali ter po 90 s ponovno izmerili fluorescenco. Z zakisanjem molekule Chl *a* razpadejo (izguba Mg atoma v tetrapirolovem obroču), novo nastale spojine feopigmenti pa fluorescirajo pri isti valovni dolžini kot Chl *a* in jih lahko izmerimo po isti metodi. Koncentracije Chl *a* in feopigmentov smo iz volumskih enot (µg l⁻¹) preračunali na površinsko enoto (mg m⁻²),

upoštevajoč velikost vzorca, tj. površino majhnega korerja ($5,725 \times 10^{-4} \text{ m}^2$). Rezultate smo zapisali v tabelo.

Slanica. Fluorescenco Chl *a* in feopigmentov smo merili tudi v vzorcih slanice. Zmrznjene filtre smo dali v epruveto, dodali pribl. 7 ml 90 % aceton in jih nato homogenizirali 1 min pri 30 rpm. Homogenizirane vzorce smo nato dali v centrifugirke, v katere smo dolili še aceton do končnega volumna 10 ml. Vzorce smo nato ekstrahirali 2 h v hladilniku. Po končani ekstrakciji smo vzorce centrifugirali 10 min pri 5000 rpm. Supernatant smo pazljivo prelili v steklene kivete z zamaškom in izmerili fluorescenco pred in po zakisanju (60 μl HCl) po enakem postopku, kot pri vzorcih petole. Rezultate, koncentracije Chl *a* in feopigmentov na volumsko enoto ($\mu\text{g l}^{-1}$), smo vpisali v tabelo.

Blato. Vsebnost Chl *a* in feopigmentov smo določali tudi v enem vzorcu blata, ki smo ga vzorčili na dan konciranja (T_0). Vzorec smo razdelili na dva podvzorca: enega za določanje vsebnosti barvil, drugega pa za določanje suhe teže blata. Vzorce smo 14 dni hranili v hladilniku do analize.

Iz prvega podvzorca smo vzeli 3 približno enake paralelke, ki smo jih stehali. Teže treh vzorcev so se razlikovale na tretjem decimalnem mestu (vzorec 1: 3,04684 g, vzorec 2: 3,01302 g, vzorec 3: 3,02839 g). Nadaljnji postopek ekstrakcije, centrifugiranja in meritve fluorescence je bil enak kot pri vzorcih petole, le da je bil volumen dodanega acetona 10 ml in da pred ekstrakcijo vzorcev nismo »razbijali« z UZ palčko. Drugi podvzorec blata smo uporabili za določanje suhe teže. Tudi tu smo vzeli tri paralelke, za katere smo predvidevali, da imajo enako oz. zelo podobno težo kot paralelke za določevanje Chl *a*. Paralelke smo stehali pred (mokra teža) in po (suha teža) sušenju na 105 °C za 24 h. Koncentracije Chl *a* in feopigmentov smo iz volumske enote ($\mu\text{g l}^{-1}$) preračunali na utežno enoto ($\mu\text{g/g}$ suhe teže).

1.2.4 Mikroskopske analize

Vse vzorce smo pregledali pod epifluorescenčnim invertnim mikroskopom (Zeiss Axio Observer Z1) z digitalno kamero (AxioCam MRc5) in programsko opremo (AxioVision). Želeli smo določiti taksonomsko sestavo avtotrofnih mikroorganizmov in podati oceno njihove gostote.

Petola. Vzorce petole smo pripravili na sledeč način: iz dobro premešanega fiksiranega vzorca petole smo na objektno steklo nakapljali 2 kapljici (približno 0,5 ml) vzorca in ga pokrili s krovnim stekelcem. Vzorce smo opazovali pod invertnim mikroskopom v fazno-contrastni in epifluorescenčni svetlobi (filter set 09: ekscitacija v modrem delu spektra

(450-490 nm), emisija v zelenem, rumenem in rdečem delu spektra (> 515 nm)). Iz vsakega vzorca smo pregledali tri paralelke. Pregledali smo celotno površino objektnega stekla in skušali taksonomsko umestiti najdene organizme. Najštevilčnejše organizme, praviloma so bile to nitaste cianobakterije, smo pri 200x povečavi tudi prešteli. Prav tako smo bili pozorni na druge organizme, zlasti diatomeje in dinoflagelate. Mikroorganizme smo tudi fotografirali. Oceno števila cianobakterij v vzorcu podajamo kot povprečno vrednost treh paralelek v 1 ml vzorca. Rezultate smo zapisali v tabelo, pod opombe pa zapisali tudi razna druga opažanja.

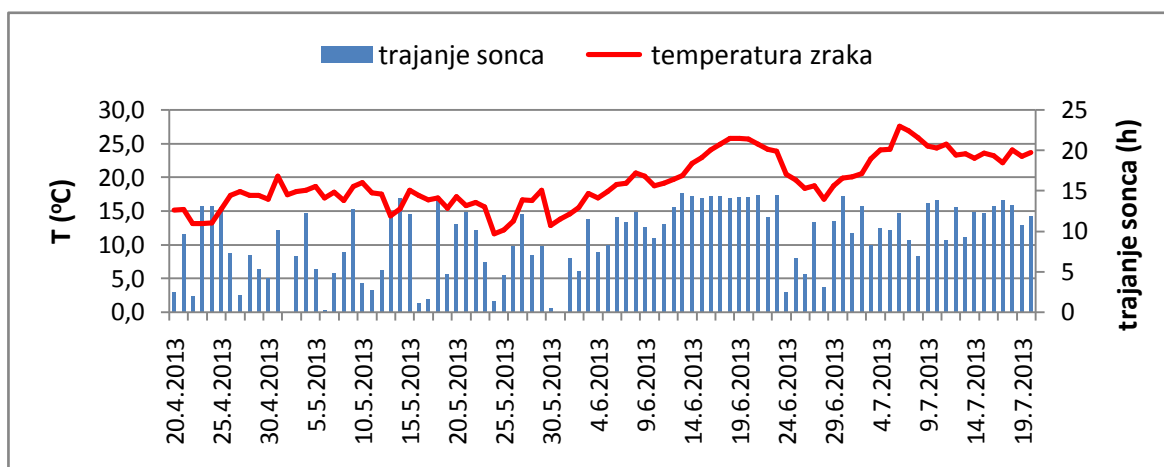
Slanica. Pod mikroskopom smo pregledali tudi vzorce slanice, zato da smo primerjali sestavo združbe mikroorganizmov v slanici in petoli. Za pripravo in pregledovanje slanice smo uporabili Utermöhlovo metodo oz. metodo usedanja delcev (Utermöhl 1958). Vzorec slanice smo dobro premešali in ga prelili v sedimentacijski valj (25 ml) s sedimentacijsko komorico. Vzorec smo morali natočiti čisto do roba valja, ki smo ga nato pazljivo pokrili s krovnim steklom. Paziti smo morali, da v valju ni bilo zračnih mehurčkov. Tako pripravljen vzorec smo pustili usedati 24 ur. Po končanem usedanju smo s pomočjo krovnega stekla kvadratne oblike umaknili valj in pokrili vzorec. Ponovno smo morali paziti, da v vzorec niso prišli zračni mehurčki. V sedimentacijski komorici smo tako dobili 2 ml koncentriranega vzorca. Vzorec smo nato pregledali pod invertnim mikroskopom in mikroorganizme tudi fotografirali.

2 REZULTATI Z DISKUSIJO

Rezultate smo razdelili na več podpoglavij, ki zajemajo meteorološke razmere v času raziskave, značilnosti mikrobne združbe v petoli, značilnosti fotoavtotrofnih mikroorganizmov v slanici ter vsebnost organskega ogljika v petoli.

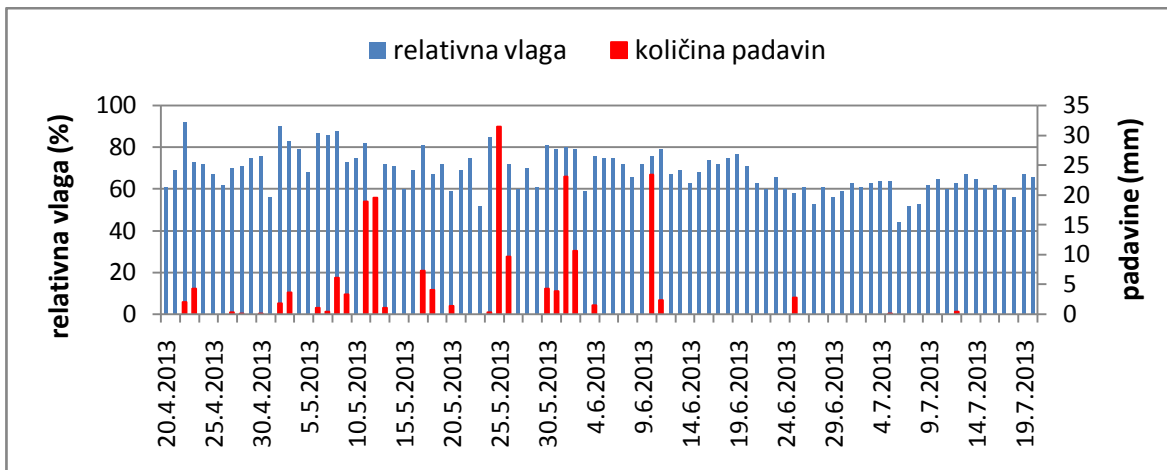
2.1 Meteorološke razmere v času raziskave

V rezultatih podajamo dnevne povprečne vrednosti temperature zraka, količine padavin, relativne vlažnosti in trajanja sončnega obsevanja. Dnevna temperatura zraka je bila do 8. 6. 2013 pod 20 °C (v povprečju 16,5 °C), po tem datumu pa je pričela naraščati. Do večjega padca temperature ponovno pride 28. 6. 2013 (iz 25,8 °C na 16,8 °C), ki po tem padcu strmo naraste in doseže najvišjo vrednost 6. 7. 2013 (27,6 °C) (Slika 7). Povprečno število ur, ko je bil dan obsijan s soncem, je bilo v obdobju raziskave 9,13. Junija je bilo trajanje sončnega obsevanja precej konstantno z najdaljšim časom obsevanja okoli 14 ur (med 13. 6. in 23. 6. 2013), medtem ko je v ostalih mesecih precej nihalo (Slika 7). To je bilo značilno zlasti za maj, ko smo zabeležili kar nekaj dni, ko je sonce sijalo manj kot 5 ur. Relativna vlažnost je bila skozi celotno obdobje precej visoka (Slika 8), saj je samo enkrat padla pod 50 % (6. 7. 2013), kar je sovpadalo z najvišjo izmerjeno temperaturo zraka. Najvišja relativna vlažnost (92 %) je bila izmerjena tik pred začetkom raziskave (22. 4. 2013), visoka nihanja vlažnosti pa smo beležili skozi ves maj (Slika 8). Padavin je bilo malo; najpogostejše in najobilnejše so bile maja (do 31,5 mm) in v začetku junija (23,4 mm). Po tem junijskem višku padavin skorajda ni bilo več (le dva deževna dneva z vrednostmi okoli 2,5 mm) in je nastopilo sušno obdobje, ki je trajalo do konca raziskave (Slika 8).



Slika 7: Povprečna dnevna temperatura zraka in trajanje sončnega obsevanja od 20. 4. – 20. 7. 2013.

Ti rezultati v splošnem kažejo razmeroma nestanovitno vreme, ki je trajalo od začetka raziskave do pribl. 10. 6. 2013, ko se je stabiliziralo. Do konca raziskave je sledilo dokaj stabilno vreme z minimalno količino padavin, velikim številom ur sončnega obsevanja in naraščajočimi temperaturami zraka. To daljše obdobje je bilo prekinjeno le s tednom hladnega in oblačnega vremena v drugi polovici junija.



Slika 8: Povprečna dnevna relativna vlažnost in količina padavin od 20. 4. – 20. 7. 2013.

2.2 Značilnosti mikrobne združbe v petoli

Pri pregledu značilnosti mikrobne združbe v petoli smo se osredotočili na biomaso fotoavtotrofnih organizmov v petoli, katere podatke smo dobili z merjenjem klorofila *a* (Chl *a*), ter na sestavo in številčnost mikrobne združbe v petoli, katero smo določili z mikroskopsko analizo.

2.2.1 Biomasa fotoavtotrofnih mikroorganizmov v petoli

Z merjenjem klorofila *a* (Chl *a*) smo določali biomaso vseh fotoavtotrofnih organizmov v petoli. Vzorčenje petole je na začetku potekalo pogosteje, ker nas je zanimal vpliv konciranja na mikrobno združbo v petoli. Pred konciranjem sta bila vzeta dva vzorca (25. 4. in 29. 4. 2013), pri čemer za čas T_0 velja 29. 4. 2013 (glej poglavje 2.2.), za čas T_1 , tj. prvi vzorec po konciranju pa 30. 5. 2103.

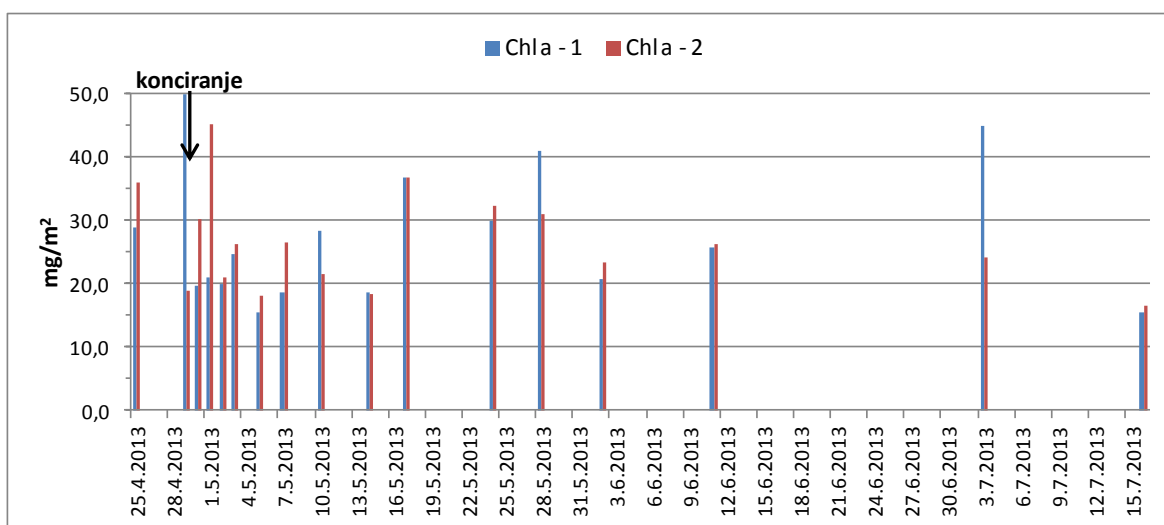
Na tem mestu podajamo tudi rezultate o koncentraciji Chl *a* v blatu v času T_0 , ki so ga uporabili za konciranje petole kristalizacijskega bazena št. 10. V preglednici 2 prikazujemo rezultate vsebnosti Chl *a* in razgradnih produktov ali feopigmentov v treh paralelkah istega vzorca blata. Iz dobljenih rezultatov lahko ugotovimo, da so tudi v blatu prisotni fotoavtotrofni mikroorganizmi, vendar zgleđa, da je bila v času T_0 ta združba že v fazi razgradnje. Koncentracije feopigmentov (1,90 $\mu\text{g/g}$ suhe teže) so bile namreč v povprečju 3,6-krat večje od koncentracij Chl *a* (0,53 $\mu\text{g/g}$ suhe teže). Odstopanja treh paralelk oz. velikost standardne deviacije (SD) kažeta na porazdelitev mikroorganizmov v blatu: SD je bila še posebej v primeru koncentracije feopigmentov majhna, kar nakazuje razmeroma enakomerno porazdelitev feopigmentov v blatu. Variiranje porazdelitve Chl *a* je bilo večje. S premazom se zagotovi, da je podlaga za pridobivanje soli enakomerna. Z morskim blatom pridejo v bazen anorganske snovi (kot so glineni delci, karbonati in kremen), naši rezultati pa kažejo, da se petola lahko obogati tudi z organsko živo komponento iz blata. Blato nato postane del petole.

Preglednica 2: Vsebnost Chl *a* in feopigmentov v 1 g suhe teže solinskega blata (za konciranje) v času T_0 (29. 4. 2013): vrednosti treh paralelk istega vzorca, srednja vrednost in standardna deviacija (SD). Prikazane so tudi suhe teže treh paralelk blata.

	Chl <i>a</i> ($\mu\text{g/g}$ suhe teže)	Feopigmenti ($\mu\text{g/g}$ suhe teže)	Suha teža vzorca (g)
Paralelka 1	0,44	1,73	1,874
Paralelka 2	0,70	2,18	1,875
Paralelka 3	0,44	1,77	1,873
Srednja vrednost	0,53	1,90	1,874
SD	0,15	0,25	0,001

Dinamika klorofilne biomase avtotrofnih mikroorganizmov v petoli je prikazana na Slikah 9 in 10. Poleg srednjih vrednosti Chl *a* in feopigmentov (Slika 10), prikazujemo tudi rezultate Chl *a* obeh podvzorcev (Slika 9). S tem smo želeli prikazati značilno porazdelitve naravnih vzorcev kot je tudi petola.

Slika 9 kaže, da je bila porazdelitev klorofilne biomase in s tem mikroorganizmov pred in nekaj dni po konciranju zelo neenakomerna; razlike v koncentracijah Chl *a* med obema podvzorcema so bile do 2,6-kratne. Od 2. 5. 2013 dalje pa smo beležili enakomerno porazdelitev biomase v naključno vzetih vzorcih z dna kristalizacijskega bazena. Izjema sta bili vzorčenji 28. 5. in 3. 7. 2013, ko je bila razlika med obema podvzorcema skoraj 2-kratna.

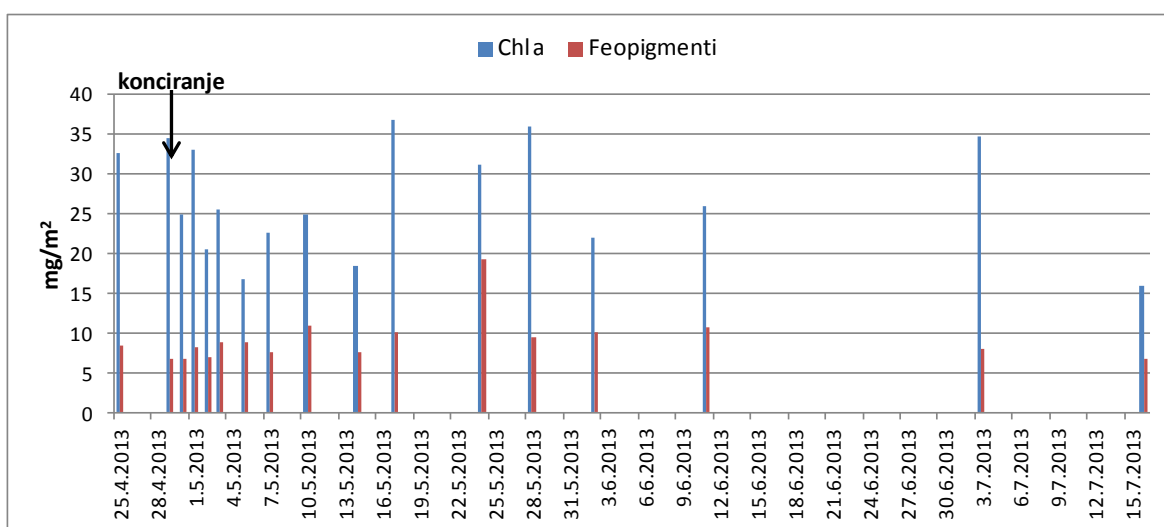


Slika 9: Meritve koncentracij Chl *a* v dveh podvzorcih petole, vzorčenih na isti dan.

Iz Slike 10 pa lahko spremljamo časovni potek povprečnih koncentracij Chl *a* in feopigmentov. Pred konciranjem (25. 4. in 29. 4. 2013) je bila povprečna biomasa dokaj visoka (32,55 in 34,40 mg/m²), takoj po konciranju pa smo nasprotno od pričakovanega beležili padec oz. velika nihanja koncentracij Chl *a* vse do 13. 5. 2013. Kot že omenjeno je konciranje postopek gnojenja petole, s katerim v to mikrobno podlago vnesejo hranila po zimskem mirovanju. Potem ko petolo premažejo s svežim morskim blatom (pribl. 2 mm debeli premaz), to verjetno povzroči nastanek drugačnih razmer (manj svetlobe, težji dostop do kisika), ki vplivajo na fiziologijo avtotrofnih organizmov in se posledično odrazijo v zmanjšanju biomase mikroorganizmov oz. znižanju koncentracij Chl *a*. O vplivu nihanja kisika in tudi sulfida na mikroorganizme v petole so poročali tudi Tkavc in sod. (2010). Po 13. 5. 2013 pa je sledil porast koncentracij, ki so dosegle najvišje vrednosti v času raziskave v 10-dnevnem obdobju od 17. 5. do 28. 5. 2013 (31,09–36,85 mg/m²). Slednje je bilo moč opaziti kot zeleno obarvanje (regeneracijo) površinske plasti kristalizacijskega bazena. To pomeni, da se morajo mikroorganizmi za preživetje

pomakniti navzgor proti površini (Glavaš 2013). Visoko koncentracijo ($> 30 \text{ mg/m}^2$) smo izmerili tudi ob predzadnjem vzorčenju (3. 7. 2013), zadnji dan raziskave pa najnižjo koncentracijo nasploh (16 mg/m^2).

Koncentracije feopigmentov v petoli so bile v nasprotju z morskim blatom vedno nižje od koncentracij Chl *a* (Slika 10). Praviloma so bile $\leq 10 \text{ mg/m}^2$, najvišjo koncentracijo ($19,20 \text{ mg/m}^2$) pa smo izmerili 24. 5. 2013. Časovni potek koncentracij feopigmentov praviloma ne sovпада z dinamiko koncentracij Chl *a*. Z izjemo viška razgradnih produktov konec maja, nihanje koncentracij feopigmentov ni bilo tako izrazito kot pri Chl *a*.



Slika 10: Povprečne koncentracije Chl *a* in razgradnih produktov ali feopigmentov v petoli.

Podobne rezultate kažeta tudi predhodni raziskavi (Glavaš 2013; Pjevović 2014), kjer sta avtorici prav tako takoj po premazu petole najprej ugotovili upad koncentracije Chl *a* in šele po mesecu in pol izmerili višje vrednosti kot pred konciranjem. Z naraščanjem slanosti je v obeh omenjenih raziskavah v naslednjih mesecih sledil znaten padec biomase.

Eno od verjetnejših razlag dinamike biomase avtotrofnih mikroorganizmov v petoli lahko poiščemo v slanici. Značilnosti slanice pomembno vplivajo na mikrobno združbo ter po drugi strani kažejo na procese, ki potekajo v omenjeni mikrobni plasti. Slanica je v kristalizacijskih bazenih praviloma prisotna ves čas. Občasno pa jo zaradi vzdrževalnih del in drugih potrebnih vodnih premikov za kratek čas preusmerijo v druge kanale in bazene. To se je tekom naše raziskave večkrat zgodilo, zato smo jo lahko le malokrat vzorčili (glej Preglednico 1). Kljub temu pa smo v času vzorčenja izmerili porast temperature in slanosti slanice. Slednja je od začetne vrednosti $5 \text{ }^{\circ}\text{Bé}$ narasla do $26,5 \text{ }^{\circ}\text{Bé}$ ob zadnji meritvi. Zaznali smo tudi nihanja vrednosti pH slanice, ki so bile v razponu od 8,01 do 8,8. V okviru daljših vzorčevalnih obdobj sta Glavaš (2013) in Pjevović (2014) zasledili širše razpone pH. Glavaš (2013) poroča o pH vrednostih od 6,02–8,04 (leto 2009) in 7,05–9,01 (leto 2010), Pjevović (2014) pa navaja vrednosti od 6,5–8,9 (leto 2012).

V juliju je prišlo do izrazitega porasta slanosti slanice, kar se je odražalo v znižanju koncentracije Chl *a*. To lahko pojasnimo s pomočjo rezultatov podobnih raziskav, ki kažejo, da višanje slanosti povzroči spremembo sestave mikrobne združbe v smislu prehoda halotolerantnih v halofilne vrste. Pri tem je opazno tudi zmanjšanje rasti mikroorganizmov (Schneider in Herrmann 1980; Faganeli in sod. 1999; Kračun 2006). Poleg slanice pa na mikrobno združbo petole vplivajo tudi vremenski dejavniki. S padavinami se zmanjšuje slanost v bazenih, saj prihaja do redčenja slanice, po drugi strani pa visoke temperature (preko intenzivnega sončnega obsevanja) povzročijo dvig slanosti zaradi večjega izhlapevanja vode in s tem višanja koncentracije soli., saj Tako smo na primer v začetku maja po deževju in hkratnem znižanju temperature tudi mi zaznali upad koncentracije Chl *a*. K temu so nedvomno prispevala tudi zelo kratka obdobja trajanja sončnega obsevanja, saj smo zabeležili tudi dneve brez sončnega obsevanja (npr. 2. 5 in 6. 5. 2013) V splošnem so višje dnevne temperature zraka in daljše sončno obsevanje prispevali k porastu koncentracije Chl *a*.

2.2.2 Sestava in številčnost fotoavtotrofnih mikroorganizmov v petoli

Mikroskopski pregledi vzorcev petole so pokazali, da so bili prevladujoči organizmi nitaste cianobakterije (razred Cyanophyceae) (Slika 11 a-i), ki so rdeče fluorescirale v epifluorescenčni svetlobi zaradi vsebnosti pomožnih fotosinteznih barvil fikobiliproteinov (Slika 11 c, e, h). Predvidevamo, da gre za vrsto *Coleofasciculus chthonoplastes*, ki jo je v svoji raziskavi določila Glavaš (2013) z uporabo vrstične elektronske mikroskopije (SEM) in ki jo navajajo tudi Gunde-Cimerman in sod. (2005), vendar s še starim rodovnim imenom *Microcoleus*. Nedavno je bil rod *Microcoleus* na novo pregledan in nekatere vrste, med njimi tudi *M. chthonoplastes*, so bile uvrščene v nov rod *Coleofasciculus* (Sigesmund in sod. 2008), za katerega je značilna zelo velika biogeografska razširjenost (slana močvirja, soline, hipersalina jezera ter obalna morja Severne Amerike, Čila, Avstralije, Sredozemskega in Severnega morja ter nekaterih predelov Baltiškega morja) in slanostni razpon uspevanja (večina sevov ima optimum rasti pri 75–90 psu). Tudi velikostni parametri naših objektov, kot je širina nitke ali trihoma (Slika 11 a), so podobni tistim, ki jih navajajo Glavaš (2013) in Sigesmund in sod. (2008) za vrsto *C. chthonoplastes* (okoli 3 μm).

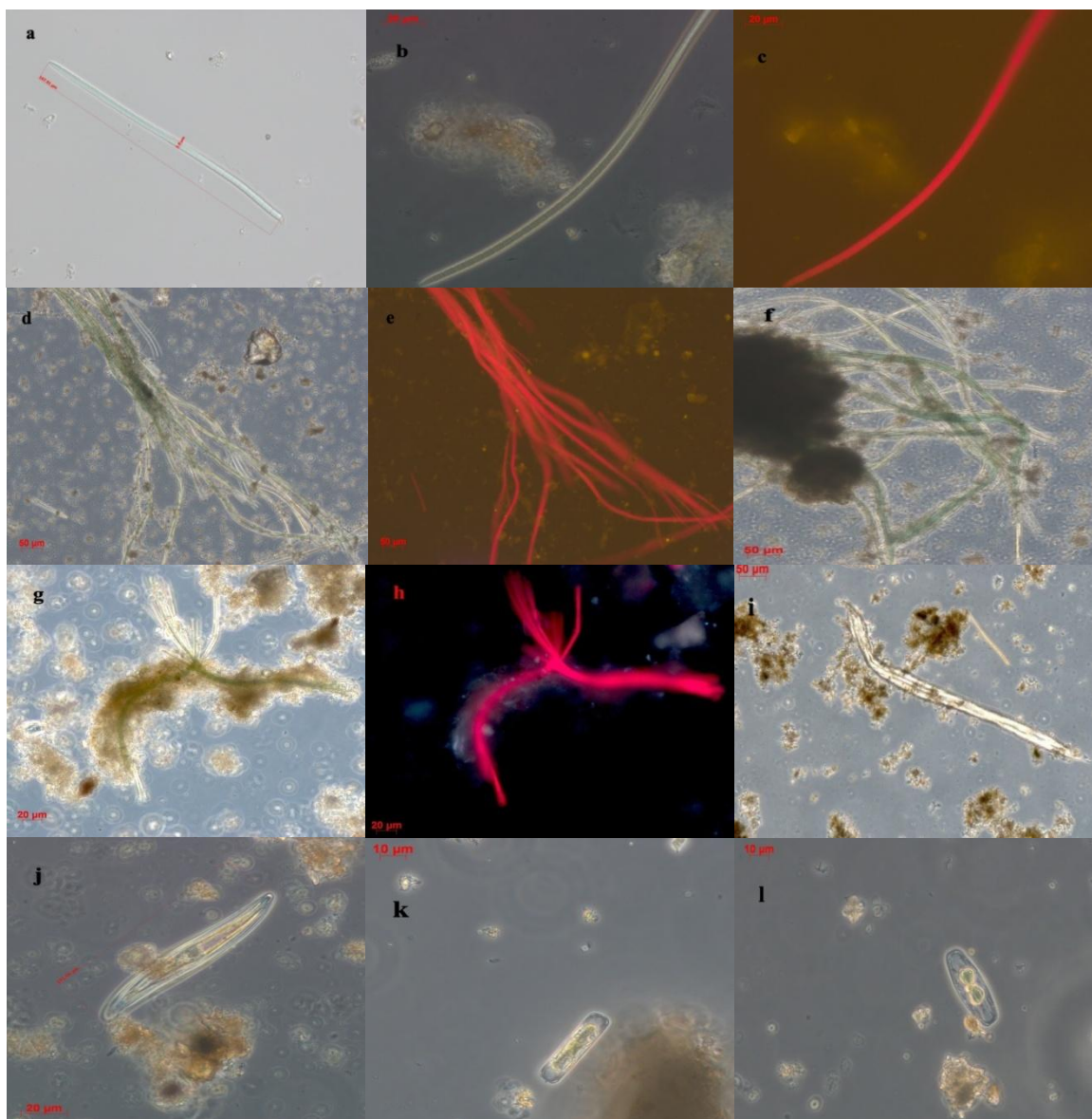
V pregledanih vzorcih smo tudi opazili, da se posamezni trihomi cianobakterij združujejo v snope, ki so obdani z ovojnico (Slika 12), ki jim omogoča omejeno drsenje po podlagi (Sigesmund in sod. 2008). Glavaš (2013) navaja, da je ta amorfná sluzasta ovojnica sestavljena iz izvenceličnih polisaharidov (EPS), ki jih izločajo same cianobakterije. Na Sliki 12 ta ovojnica obdaja bodisi posamezno nitko (Slika 12 a), bodisi snop iz več nitk (Slika 12 b); vidni so tudi različni delci (mineralni, detritni), ki se prilepijo na ovojnico. Opazili smo tudi, da so se cianobakterije pogosteje povezovale v snope na začetku oz. v

prvi polovici obdobja raziskave, proti koncu (junij, julij) pa je bilo teh snopov manj in so bile pogostejše posamezne nitke. Tudi Glavaš (2013) je v svoji raziskavi opazila, da so se z naraščanjem slanosti v poletnih mesecih trihomi znotraj ovojníc razgrajevali in da so na koncu ostale le še prazne ovojnice.

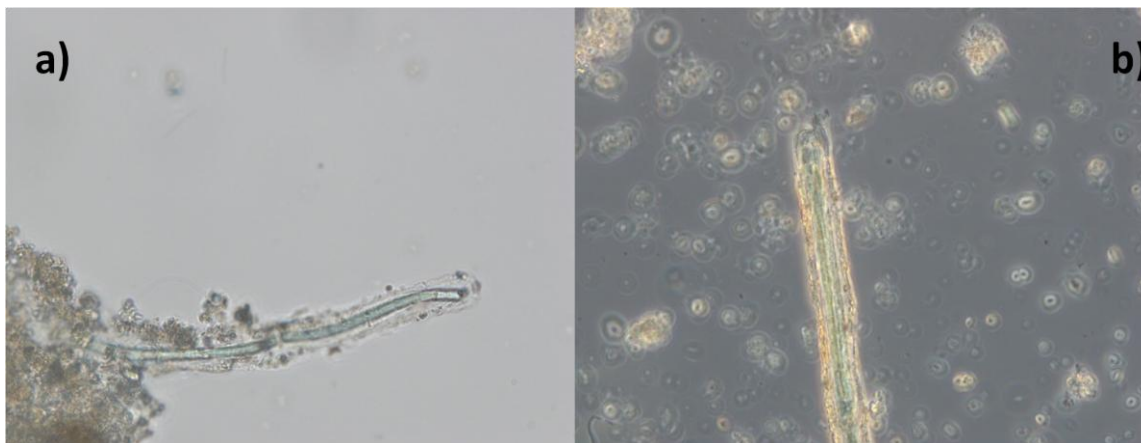
V vzorcih petole smo našli tudi evkariontske mikroorganizme in sicer diatomeje (razred Bacillariophyceae). Povečini so bile to bentoške diatomeje (npr. rodovi *Navicula*, *Amphora*, *Gyrosigma* ali *Pleurosigma*) (Slika 11 j-1). Diatomej je bilo največ 24. 5. in 28. 5., pojavile pa so se tudi 11. 6. 2013. Pri povečanem številu diatomej obstaja verjetnost, da so diatomeje prišle s slanico, ki so jo spustili v kristalizacijske bazene 24. 5. 2013. Veliko več diatomej, pa tudi dinoflagelatov (razred Dinophyceae), smo opazili v vzorcu slanice. V slanici smo prav tako našli cianobakterije, vendar ne v takem številu kot v petoli (podrobneje v poglavju 3.3.).

Same cianobakterije so vključene v oblikovanje večine hipersalinskih mikrobnih podlag. Zato je razumljivo, da najdemo več cianobakterij v podlagi, kakor v slanici. Ker smo se osredotočili samo na zgornjo, zeleno plast petole, ne moremo poročati o cianobakterijah ali drugih mikroorganizmih, ki bi lahko bili globlje v petoli.

Predhodna raziskava (Glavaš 2013) je tudi pokazala, da je mikrobna sestava petole precej drugačna od sestave morskega blata, v katerem niso našli sekvenc cianobakterij. To nakazuje, da k nastanku sezonske petole prispeva predvsem razrast cianobakterij in drugih mikroorganizmov, ki izvirajo iz prejšnje sezone oz. jih v bazen prinaša slanica, medtem ko ima blato »zgolj« nalogo gnojenja.



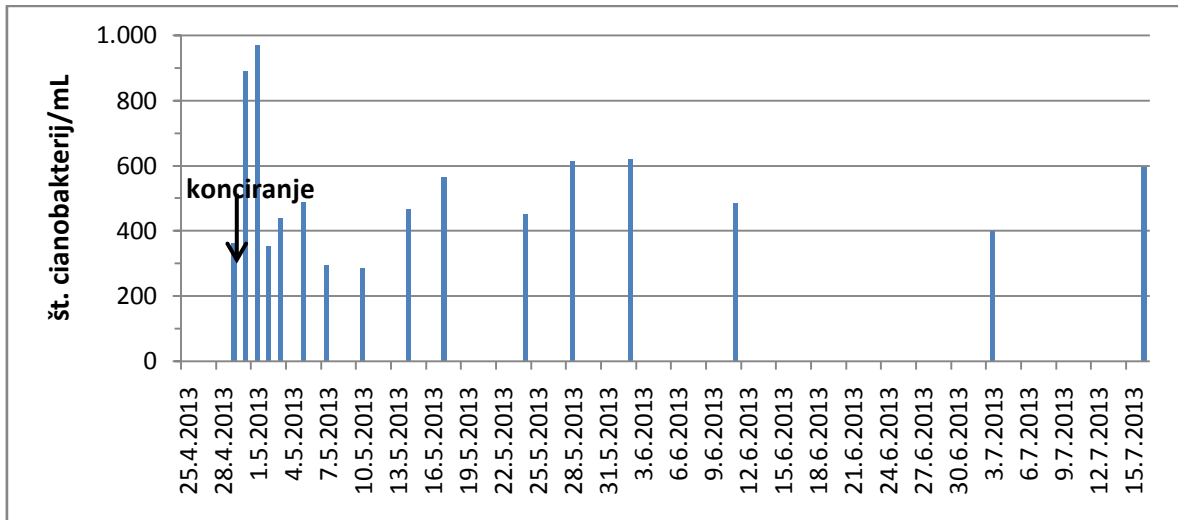
Slika 11: Mikroorganizmi v petoli, opazovani pod mikroskopom: a) nitasta cianobakterija opazovana pod 400x povečavo, vzorec 29. 4. 2013; b in c) Cianobakterija opazovana v navadni in modro-zeleni svetlobi, v vzorcu 17. 5. 2013 (400x povečava); d in e) cianobakterije v snopu, opazovane v navadni in modro-zeleni svetlobi, v vzorcu 1. 5. 2013 (100x povečava); f) cianobakterije v snopu (400x povečava); g in h) cianobakterije v snopu, opazovane v navadni in modro-zeleni svetlobi, v vzorcu 16. 7. 2013 (200x povečava); i) cianobakterija ob koncu raziskave, vzorec 16. 7. 2013 (100x povečava); j) diatomeja verjetno vrste *Pleurosigma* sp., v vzorcu 7. 5. 2013 (400x povečava); k) bentoška diatomeja v vzorcu 24. 5. 2013 (400x povečava); l) bentoška diatomeja v vzorcu 11. 6. 2013 (400x povečava).



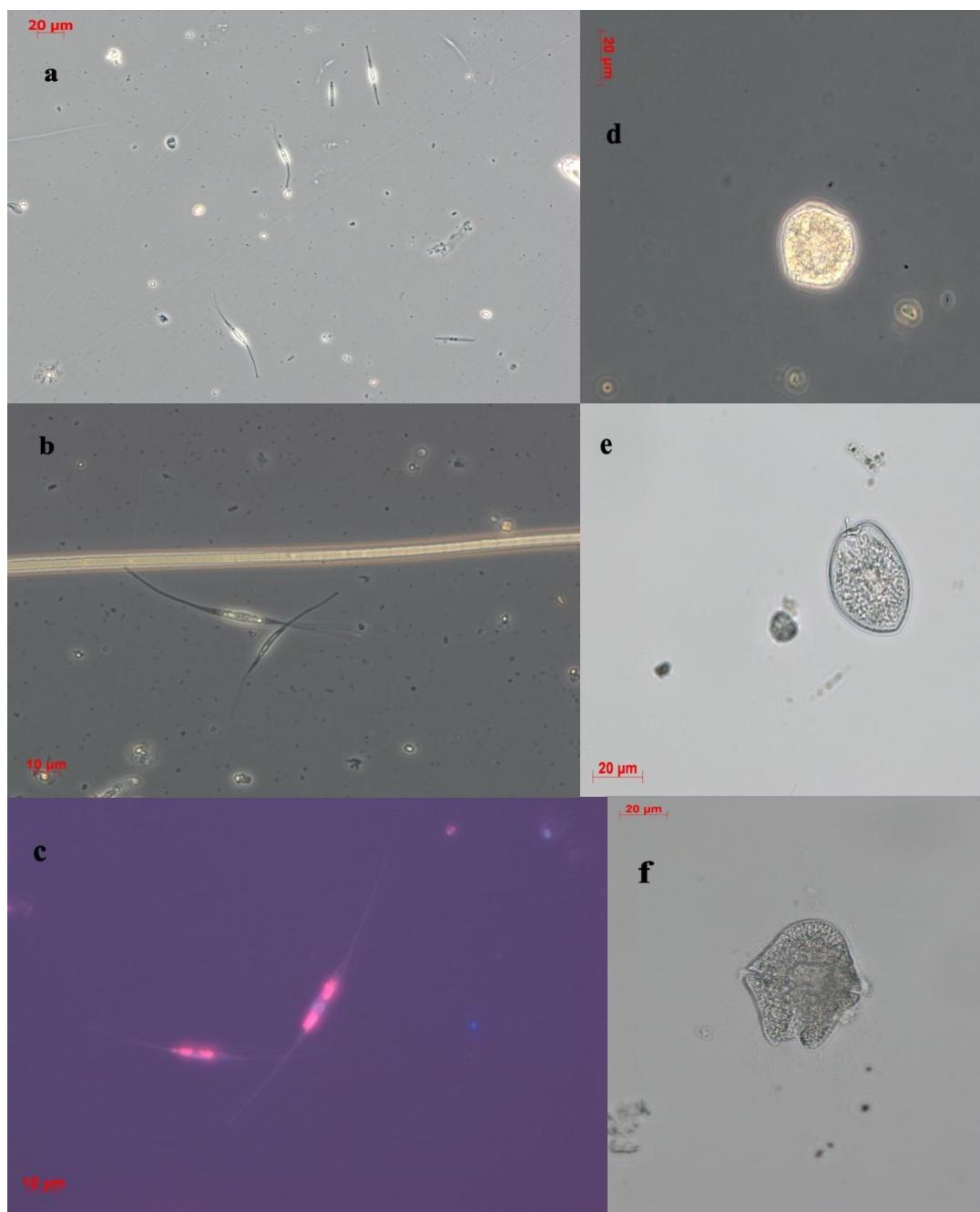
Slika 12: Mikroskopski posnetek nitaste cianobakterije z dne 29. 4. 2013 (najverjetneje vrsta *Coelofasciculus chthonoplastes*): a) en sam trihom obdan s sluzasto ovojnico, na katero se prilepijo delci (povečava 100x); b) več trihomov, povezanih v snop, ki je obdan z ovojnico (povečava 100x).

Poskušali smo tudi številčno ovrednotiti gostoto cianobakterij kot prevladujočih mikroorganizmov (Slika 13). Največje št. kolonij, enostavnih nitk cianobakterij, smo določili prva dva dni po konciranju, tj. 30. 4. (888 kolonij/ml) in 1. 5. 2013 (968 kolonij/ml). Število po 1. 5. 2013 začne upadati, kar sovpada z znižanjem koncentracije Chl *a* (Slika 10). Najnižjo gostoto smo zabeležili 7. 5. (293 kolonij/ml) in 10. 5. 2013 (283 kolonij/ml). Po tem datumu število ponovno naraste in doseže drugi višek med 17. 5. (565 kolonij/ml) in 2. 6. 2013 (617 kolonij/ml), kar se v grobem ujema z viškom Chl *a* v istem obdobju. Ob koncu vzorčenja je število trihomov ponovno naraslo (593 kolonij/ml); ta dinamika je bila v nasprotju z dinamiko Chl *a*, ko smo ob najvišji slanosti izmerili najnižjo koncentracijo Chl *a*.

Poudariti moramo, da je potrebno te vrednosti gostote jemati res le kot grobo oceno, saj so razne stopnje v pripravi vzorca (npr. nehomogen vzorec, majhen volumen podvzorca – 0,5 ml) verjetno prispevale k velikim napakam ocene. Odstopanja med številom cianobakterij in koncentracijo Chl *a* lahko pripišemo tudi temu, da h klorofilni biomasi prispevajo vsi fotoavtotrofni organizmi, ki vsebujejo Chl *a*, mi smo pa šteli le eno, četudi prevladujočo, skupino takih organizmov. Poleg tega Chl *a* ni vedno dober pokazatelj biomase, ker v določenih razmerah lahko odraža fiziološke lastnosti (npr. fotoaklimacijski procesi) oz. se njegova vsebnost na celico spreminja glede na trenutno fazo rasti celice. Je pa metoda določanja Chl *a* ena najbolj izpopolnjenih in razširjenih v ekoloških oceanografskih študijah in zato so tudi meritve klorofilne biomase primerljive širom po svetu.



Slika 13: Ocena povprečne gostote cianobakterij - kolonij enostavnih nitk ali trihomov v vzorcu (približno 1 ml).



Slika 14: Mikroorganizmi v slanici, opazovani pod mikroskopom: a) različne diatomeje pri 200x povečavi; b) nitasta cianobakterija in diatomeji vrste *Cylindrotheca closterium* (400x povečava); c) diatomeji vrste *Cylindrotheca closterium* pod UV svetlobo (400x povečava); d) dinoflagelat verjetno vrste *Alexandrium* sp. (400x povečava); e) dinoflagelat vrste *Prorocentrum scutellum* (400x povečava); f) dinoflagelat vrste *Akashiwo sanguinea* (400x povečava).

2.3 Značilnosti fotoavtotrofnih organizmov v slanici

V poglavju predstavljamo tudi rezultate meritev klorofilne biomase v slanici, ki pa so maloštevilne v primerjavi z meritvami Chl *a* v petoli (Preglednica 1). Kot že večkrat omenjeno, slanica ni vedno prekrivala dna kristalizacijskega bazena takrat, ko je potekalo naše vzorčenje.

V Preglednici 3 podajamo koncentracije Chl *a* kot pokazatelja biomase fotoavtotrofnih organizmov v slanici od 30. 4. do 10. 5. 2013. Koncentracije Chl *a* so rahlo variirale (CV = 35 %). Najvišjo koncentracijo smo izmerili 3. 5. 2013, vrednosti pa so bile nekoliko višje od povprečja še 2. 5. in 5. 5. 2013. Težko bi sklepali, da je k porastu Chl *a* prispeval padec slanosti (od 5,2 na 4,3 ‰), čeprav je znano, da višja slanost zavira rast mikroorganizmov in obratno. Razlike v slanosti so bile majhne; še najnižjo slanost smo izmerili 10. 5. 2013, vendar je bila takrat tudi koncentracija Chl *a* najnižja.

Podrobnejša razlaga spremenljivosti koncentracij Chl *a* ni možna, saj je odvisna od zapletenega vodnega režima kristalizacijskih in evaporacijskih bazenov ter s tem povezanimi premiki vode v solinarskem sistemu. Tudi zaradi tega smo po 10. 5. 2013 prenehali vzorčiti slanico za analizo Chl *a*, ker tudi ni bil glavni cilj naše raziskave. Ne glede na to, pa so koncentracije Chl *a* v slanici primerljive s koncentracijami klorofilne biomase fitoplanktona z bližnje postaje v obalnem morju, ki so bile izmerjene v okviru nacionalnega monitoringa spremljanja ekološkega stanja morja 17. 4. 2013 (0,59 µg l⁻¹) in 15. 5. 2013 (1,24, µg l⁻¹) (vir: baza podatkov NIB-MBP Piran).

Koncentracije Chl *a* v slanici so bistveno nižje od tistih v petoli. Pri računanju koncentracije Chl *a* v petoli na površinsko enoto (m²), smo le te izračunali iz koncentracij, podanih na volumsko enoto (l), ki jih izračuna fluorimeter (rezultatov ne prikazujemo). Ti vmesni rezultati kažejo, da so bile koncentracije v petoli ob istih dnevih od 400- do 1000-krat večje kot v slanici. To kaže na popolnoma drugačne razmere v mikrobni združbi v dveh različnih življenjskih okoljih – vodi in podlagi.

To so potrdili tudi mikroskopski pregledi slanice z dne 28. 5. 2013 (Slika 14). Ta dan je sicer sovpadal z visoko koncentracijo Chl *a* in visokim številom cianobakterij v petoli. Najpogostejši mikroorganizmi v slanici so bile diatomeje (Slika 14 a), med katerimi so prevladovale bentoške diatomeje in vrsta *Cylindrotheca closterium* (Slika 14 b, c), ki je zelo pogosta v planktonu, prav tako pa tudi na sedimentnem dnu (epipelična vrsta) obalnih morij. Tudi pestrost dinoflagelatov je bila dokaj velika; med njimi smo prepoznali vrste *Alexandrium* sp. (Slika 14 d), *Prorocentrum scutellum* (Slika 14 e) in *Akashiwo sanguinea* (Slika 14 f). Opazili smo tudi posamične trihome cianobakterij, vendar bistveno manj kot v petoli. Predvidevamo, da so v slanico prišle iz petole.

Ta, sicer enkratna analiza sestave združbe v slanici kaže, da je bolj podobna združbi v morju kot pa v petoli.

Preglednica 3: Koncentracije Chl *a* in feopigmentov v slanici. Na vzorcih, vzetih v obdobju od T₁ (30. 4. 2013) do T₁₁ (10. 5. 2013), je izračunana je tudi srednja vrednost in standardna deviacija (SD).

Datum	Chl <i>a</i> (µg l ⁻¹)	Feopigmenti (µg l ⁻¹)
30.4.2013	0,51	0,70
1.5.2013	0,87	0,88
2.5.2013	0,80	0,91
3.5.2013	1,80	1,57
5.5.2013	1,01	1,10
10.5.2013	0,61	0,65
Srednja vrednost	0,97	0,20
SD	0,34	0,09

2.4 Vsebnost organskega ogljika v petoli

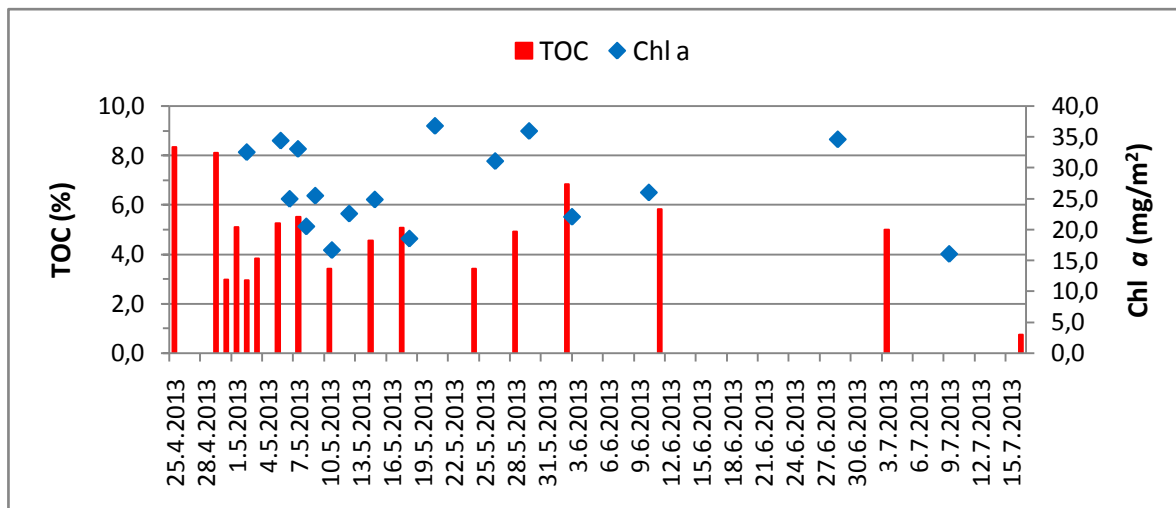
Vsebnosti skupnega organskega ogljika (TOC) so bile v razponu od 0,7–8,3 % (Slika 15), ostalo pa pripada anorganski frakciji. Ogorelec in sod. (1981), Faganelli in sod. (1999), Kovač (2009), Glavaš (2013) ter Pjevović (2014) prav tako poročajo o podobnih deležih TOC v petoli, z najvišjimi vrednostmi okoli 6 %.

V vzorcih petole pred konciranjem smo določili najvišjo vrednost organskega ogljika (8,3 %), nato pa so se koncentracije znižale. V začetku in sredi maja ter tudi v začetku junija smo ponovno določili nekoliko višje vrednosti TOC, ki pa so bile nižje od tistih pred konciranjem. Najnižjo koncentracijo TOC (0,7 %) smo določili v zadnjem vzorcu (16. 7. 2013), tako kot tudi najnižjo vsebnost Chl *a*. Za primerjavo prikazujemo na Sliki 15 tudi koncentracije Chl *a*.

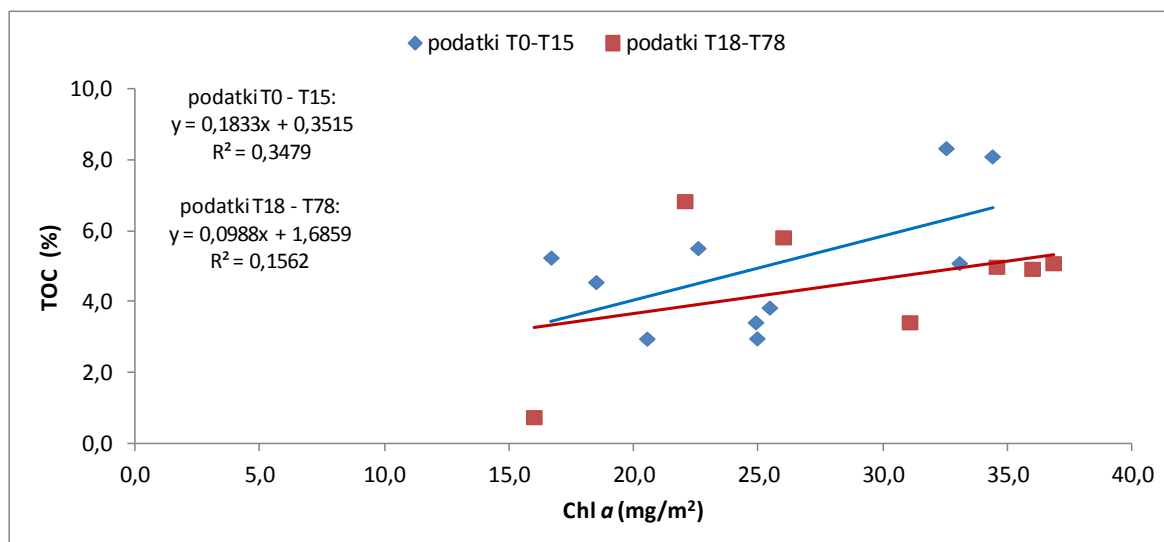
Organsko frakcijo v petoli predstavljajo predvsem cianobakterije, diatomeje in druge mikroalge (Faganelli in sod. 1999; Glavaš, 2013), k njej pa prispevajo še organske snovi, prinesene v kristalizacijske bazene s slanico in preko atmosfere. Ker se mikroorganizmi zelo hitro odzovejo na spremembe okolja (npr. slanosti slanice), lahko spremenljivost organske frakcije petole pripišemo tudi spremembam v mikrobni združbi. To potrjujejo tudi druge podobne raziskave (Faganelli in sod. 1999; Litchfield in sod. 2009; Glavaš 2013).

Izračunana linearna regresija med koncentracijami Chl *a* in TOC kaže ($\text{TOC} = 0,121 \text{ Chl } a + 1,557$; $R^2 = 0,197$), da Chl *a* pojasni kvečjemu 20 % variabilnosti TOC, ostali delež pa prispevajo drugi dejavniki. Vendar podrobnejši pogled pokaže, da je Chl *a* več (35 %) prispeval k variabilnosti TOC v prvih 15 dneh raziskave, tj. od časa T₀ pred konciranjem do 14. 5. 2013 (T₁₅) kot pa kasneje (T₁₈ – T₇₈) (Slika 16). To bi pomenilo, da je prispevek organskega ogljika avtotrofnih mikroorganizmov večji v začetni fazi raziskave, čeprav še zmeraj le dobro tretjino, medtem ko kasneje drugi viri organskega ogljika, bodisi živi organizmi bodisi detrit, prispevajo k skupnemu organskemu ogljiku.

Porast slanosti slanice vodi do postopne kristalizacije soli pri čemer se pri približno 5 ‰ najprej izločajo karbonati, pri ~13 ‰ sadra ter šele pri ~25 ‰ pride do izločanja natrijevega klorida in pri višjih slanostih še magnezijeve soli. Vse to prispeva k mineralizaciji petole oz. k povečanju anorganske frakcije v petoli pri višji slanosti (npr. v juliju v naši raziskavi).



Slika 15: Vrednosti skupnega organskega ogljika (TOC) in primerjava s koncentracijami Chl a v petoli.



Slika 16: Linearna regresija med koncentracijami Chl a in skupnega organskega ogljika (TOC) v petoli, narejena na dveh skupinah podatkov: podatki T0-T15 (25. 4. – 14. 5. 2013) in podatki T18-T78 (17. 5. – 16. 7. 2013).

3 ZAKLJUČEK

Mikrobna plast, imenovana petola, je v Sečoveljskih solinah osnovna podlaga za tradicionalno pridelavo soli. Priprava petole je zelo zahteven postopek, ki poteka čez celo leto in na kateri poteka kristalizacija soli. Petola je sestavljena iz različnih mikroorganizmov in mineralov, na katere zelo močno vplivajo kemični in fizikalni dejavniki. Mikrobne združbe solinskih bazenov zelo hitro reagirajo na kemične spremembe okolja in slanosti vode.

Z merjenjem biomase fotoavtotrofov, katere pokazatelj je koncentracija klorofila *a*, smo ugotavljali, kako proces gojenja petole (konciranje) vpliva na biomaso mikroorganizmov v najbolj zgornjem sloju petole. Ugotovili smo, da je razmeroma visoka koncentracija Chl *a*, izmerjena pred konciranjem, takoj po nanosu morskega blata, upadla in ponovno narasla 18. dan po konciranju. V naslednjih 10 dneh se je površinska plast petole popolnoma regenerirala. Upad Chl *a* takoj po premazu si razlagamo s spremembo razmer v zgornji plasti petole, ki za nekaj časa zavrejo rast mikroorganizmov, le-ti pa postanejo del spodnjih plasti petole. Koncentracije Chl *a* v petoli so bile vedno višje od koncentracij razgradnih produktov – feopigmentov, kar kaže na veliko aktivnost mikrobne združbe.

Predvidevamo, da konciranje vpliva tudi na bolj enakomerno porazdelitev mikroorganizmov, predvsem v času najbolj bujne rasti. Ugotavljamo tudi, da so na mikrobno združbo vplivala slanost in vremenski pogoji (padavine, trajanje sončnega obsevanja, temperatura), saj je ob slabem vremenu vsebnost Chl *a* upadla. Najnižjo koncentracijo Chl *a* pa smo zabeležili zadnji dan vzorčenja, kar je sovpadalo z najvišjo slanostjo slanice (26,5 °Bé). S tem smo potrdili prvo hipotezo, da bo konciranje petole vplivalo na porast biomase avtotrofnih mikroorganizmov.

Rezultati mikroskopskih analiz so pokazali, da so daleč prevladujoči organizmi nitaste cianobakterije (predvidevamo, da gre za vrsto *Coelofasciculus chthonoplastes*, značilno za hipersalina okolja), ki so se na začetku raziskave pojavljaje večinoma v snopih, obdanih s sluzasto organsko ovojnico, proti koncu pa posamično. Poleg cianobakterij smo opazili tudi različne vrste bentoških diatomej, ki pa jih je bilo veliko manj kot cianobakterij. Nasprotno je bilo diatomej več (vrstna pestrost in ocena gostote) v slanici, katere sestavo mikrobne združbe smo primerjali s sestavo združbe v petoli. V slanici smo našli tudi predstavnike dinoflagelatov, ki jih v petoli ni bilo. Značilne morske vrste diatomej in dinoflagelatov, ki smo jih našli v slanici in veliko nižje koncentracije Chl *a* v slanici kot v petoli kažejo na to, da je združba avtotrofnih organizmov v slanici bolj podobna združbam obalnega morja. Tudi druga hipoteza, da petolo sestavljajo predvsem cianobakterije, pa tudi drugi mikroorganizmi, se je izkazalo za pravilno.

Zanimala nas je tudi vsebnost organskega ogljika v petoli. Hipotezo, da bo časovno spreminjanje vsebnosti skupnega organskega ogljika sledilo spreminjanju biomase avtotrofnih mikroorganizmov, lahko delno potrdimo, saj je biomasa mikroorganizmov le v

manjši meri (pribl. 20 %) razložila spremenljivost organskega ogljika. Vendar je bil prispevek mikroorganizmov večji v začetnem obdobju raziskave.

Naša raziskava je, podobno kot tudi predhodne, pokazala, da je mikrobna združba v petoli izredno dinamična in dovzetna za številne okoljske vplive, katerih posledice je težko opredeliti. Prav te lastnosti in številna nepojasnjena vprašanja obetajo, da bo petola tudi v prihodnje zanimiv objekt raziskav.

4 LITERATURA

Agencija republike Slovenije za okolje. Republika Slovenija. Ministrstvo za kmetijstvo in okolje. Dostopno na: www.arso.gov.si/ (Datum dostopa: 3.4.2014).

Dawes J. C. 1998. *Marine Botany*. Second edition. New York, John Wiley and sons.

Decho A.W. 2010. Overview of biopolymer-induced mineralization: What goes on in biofilms? *Ecological Engineering* 36: 137-144.

Decho A.W., Visscher P.T., Reid R.P. 2005. Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. V: Noffke N. (ur). *Geobiology: Objectives, Concepts, Perspectives*. Amsterdam, Elsevier: 71-86.

Des Marais D.J. 2003. Biogeochemistry of Hypersaline Microbial Mats Illustrates the Dynamics of Modern Microbial Ecosystems and the Early Evolution of the Biosphere. *Biological Bulletin* 204: 160-167.

Faganeli J., Pezdič J., Ogorelec B., Dolenc T., Čermelj B. 1999. Salt works of Sečovelje (Gulf of Trieste, northern Adriatic) - a sedimentological and biogeochemical laboratory for evaporite environments. *RMZ - Materials and Geoenvironment* 46: 491-499.

Glavaš N. 2013. Sestava in pretvorbe petole in solinskega blata v Sečoveljskih solinah. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani.

Glavaš N., Kovač N. 2009. Kemijska sestava in pretvorbe petole (stromatolit, Sečoveljske soline). V: Slovenski kemijski dnevi 2009. Maribor, FKKT: 1-8.

Glavaš N., Kovač N. 2012. Sezonska spremenljivost koncentracij hranil slanice kristalizacijskega bazena v Sečoveljskih solinah. V: Kravanja Z., Brodnjak-Vončina D., Bogataj Miloš. (ur). Slovenski kemijski dnevi 2012. Maribor, FKKT: 1-7.

Gunde-Cimerman N., Zalar P., Hoog S., Plemenitaš A. 2000. Hypersaline waters in salterns: natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology, Ecology*

32: 235-240. Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. 2005. Mikrosafari – čudovit svet mikroorganizmov solin. Ljubljana, Državna založba Slovenije.

Herrman A. G., Knake D., Schneider J., Peters H. 1973. Geochemistry of modern seawater and brines from salt pans: main components and bromine distribution. *Contributions to Mineralogy and Petrology*, 40: 1-24.

Holm-Hansen O., Lorenz C. J., Holmes R. W., Strickland J. D. H. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.* 30: 3-15.

Kovač N. 2009. Chemical characterization of stromatolitic "petola" layer (Sečoveljske salt pans, Slovenia) using FT-IR spectroscopy. *Annales, Series Historia Naturalis* 19: 95-102.

Kračun N. 2006. Struktura in aktivnost mikrobne združbe vzdolž slanostnega gradienta v Sečoveljskih solinah. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani.

Krajinski park Sečoveljske soline. O parku. Dostopno na: www.kpss.si/si/o-parku (Datum dostopa 17.4.2014).

Krajinski park Sečoveljske soline. O parku. Podnebje in naravne danosti. Dostopno na: www.kpss.si/si/o-parku/narava/podnebje-in-naravne-danosti (Datum dostopa 1.7.2014).

Kushner D. J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. London, Academic Press.

Kushner D. J. 1985. The Halobacteriaceae. V: Woese C.R., Wolfe R.S. (ur). The bacteria. A treatise on structure and function. Vol. VIII. Archaeobacteria. Orlando, Academic Press: 171-206.

Litchfield C.D., Oren A., Irby A., Sikaroodi M., Gillevet P.M. 2009. Temporal and salinity impacts on the microbial diversity at the Eliat, Israel solar salt plant. *Global NEST Journal* 11: 86-90.

Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. Brock Biology of Microorganisms. Eleventh edition. Upper Saddle River, Pearson Prentice Hall.

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

Ogrin D. 1995. Podnebje slovenske Istre. Koper, Zgodovinsko društvo za južno Primorsko.

Olli K., Riser C.W., Wassmann P., Ratkova T., Arashkevich E. in sod. 2002. Seasonal variation in vertical flux of biogenic matter in the marginal ice zone and the central Barents Sea. *Journal of Marine Systems* 38: 189-204.

Oren A. 2006. Life at high salt concentrations. *Prokaryotes* 2: 263-282.

Pahor M., Poberaj T. 1963. Stare Piranske soline. Ljubljana, Mladinska knjiga.

Parsons M., Nelson R.G., Watkins K.P., Agabian N. 1984. Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell* 38: 309-316.

Pašić L., Bartual S.G., Ulrih N.P., Grabnar M., Velikonja B.H. 2005. Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. *FEMS Microbiology, Ecology* 54: 491-498.

Pinckney J., Papa R., Zingmark R. 1994. Comparison of high performance liquid chromatographic, spectrophotometric, and fluorometric methods for determining chlorophyll *a* concentrations in estuarine sediments. *Journal of Microbiological Methods* 19: 59-66.

Pjevović K. 2014. Kemijska karakterizacija mikrobne plasti Sečoveljskih solin. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani.

Rontani J.-F., Volkman J.K. 2005. Lipid characterization of coastal hypersaline cyanobacterial mats from the Camargue (France). *Organic Geochemistry* 36: 251-272.

Sabater S., Romani A.M., Guasch H., Munoz I. 2000. Stromatolitic communities in Mediterranean streams: adaptations to a changing environment. *Biodiversity and Conservation* 9: 379-392.

Schneider J., Herrmann A.G. 1980. Saltworks-natural laboratories for microbiological and geochemical investigations during the evaporation of seawater. V: Coogan A.H., Hauber L. (ur). 5. Symposium on Salt. Ohio, The Northern Ohio Geological Society: 371-381.

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. *Journal of Phycology* 44: 1572-1585.

Soline, pridelava soli d.o.o.. Solinarstvo. Dostopno na: www.soline.si (datum dostopa: 17.4.2014).

Tkavc R., Gostinčar C., Turk M., Visscher T.P., Oren A., Gunde-Cimerman N. 2010. Bacterial communities in the petola microbial mat from the Sečovlje salterns (Slovenia). *FEMS Microbiology, Ecology* 75: 48-62.

Turk T. 2007. Pod gladino Mediterana. Ljubljana, Modrijan založba, d.o.o.

Uthermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der Quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mit. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.* 9: 1-38.

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

Wolfaardt G. M., Lawrence J. R., Headley J. V., Robarts R. D., Caldwell D. E. 1994. Microbial exopolymers provide a mechanism for bioaccumulation of contaminants. *Microbial Ecology* 27: 279-291.

Zajc J., Zalar P., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2012. The Mycobiota of the Salterns. V: Raghukumar C. (ur). *Biology of Marine Fungi*. Heidelberg, Springer: 133-158.