

BAKTERIJSKA ZDRUŽBA V USTEKLENIČENI VODI – UPORABA MOLEKULARNIH METOD ZA MIKROBIOLOŠKO ANALIZO USTEKLENIČENE VODE Z NEPRIJETNIM VONJEM

BACTERIAL ASSOCIATION IN BOTTLED WATER – USE OF MOLECULAR METHODS FOR MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF BOTTLED WATER WITH UNPLEASANT SMELL

Short scientific article

Povzetek V okviru projektov TP-MIR in CRP-MIR smo pripravili postopke za zaznavanje bakterij in bakterijskih združb v pitni vodi z molekularnimi metodami. Pitna voda je lahko vir mnogih hudih okužb s patogenimi mikroorganizmi¹. Pravočasno in pravilno zaznavanje bioloških nevarnosti je zato bistveno za podporo in zaščito bojvnika ali civilnega prebivalstva ob delovanju sovražnih sil, epidemije, nesreče ali terorističnega dejanja. Pripravljene postopke smo preizkusili na dejanskem primeru iskanja izvora neprijetnega vonja v ustekleničeni vodi. Primerjali smo koncentracijo DNK in sestavo bakterijske združbe v plastenkah. Plastenke z vodo smo dodatno za dva meseca izpostavili različnim atmosferam, da smo lahko ocenili procese in problematiko ustekleničenja. Ugotovili smo razlike med vodo v plastenkah z neprijetnim vonjem in brez njega ter med vodo po inkubaciji v različnih atmosferah. V pitni vodi nismo zaznali patogenih bakterij, so pa razviti postopki primerni tako za zaznavanje naravne populacije mikroorganizmov v vodi kot za zaznavanje nevarnih patogenih mikroorganizmov, ki jih samo z gojenjem ne bi mogli najti.

Ključne besede *Molekularne metode detekcije, biotehnologija, bakterije, patogeni, pitna voda.*

Abstract As part of the TP-MIR and CRP-MIR projects, procedures were developed for detecting bacteria and bacterial associations in drinking water by means of molecular detection methods. Drinking water can be a source of numerous severe infections with pathogenic microorganisms². Hence timely and proper detection of biological hazards is essential for providing support and protection to the warrior or civil population during hostilities, epidemics, disasters or terrorist acts. The established procedures were tested by identifying the source of unpleasant smell in bottled water. The concentration of the DNA and the structure of bacterial associations in plastic bottles

¹ *Mikroorganizmi, ki povzročajo bolezni pri ljudeh, živalih ali rastlinah.*

² *Microorganisms that cause diseases in humans, animals and plants.*

were also compared. Plastic bottles filled with water were additionally exposed to various atmospheres for two months, which allowed the monitoring of the processes taking place in the bottles. Differences between the water in plastic bottles with unpleasant smell and without the smell, and between the water after incubation in different atmospheres had been established. Although no pathogenic bacteria were detected in drinking water, the processes developed are appropriate for both the detection of the natural population of microorganisms in water and the detection of dangerous pathogenic microorganisms that could not be detected by culturing only.

Key words *Molecular detection methods, biotechnology, bacteria, pathogens, drinking water.*

Uvod V današnjem času potreba po hitrih, zanesljivih in občutljivih testih za detekcijo nevarnih agensov v hrani in vodi zelo narašča (Lazcka in sod., 2007; Rasooly in Herold, 2006; Tauxe, 2002). Zavedanje ljudi o škodljivih učinkih prisotnosti nevarnih agensov, silovit napredek biotehnologije, zakonodaja in vzpon bioterorizma pospešujejo razvoj na tem področju. Pravočasno in pravilno zaznavanje bioloških nevarnosti – patogenih mikroorganizmov, je eden prvih korakov za podporo in zaščito bojevnika ali civilnega prebivalstva ob delovanju sovražnih sil, epidemije, nesreče ali terorističnega dejanja.

Pravilno ukrepanje je mogoče le s pomočjo kakovostnega načina spremljanja različnih pokazateljev nevarnosti v kompleksnih vzorcih (voda, hrana, tkivni in okoljski vzorci) in s posebnim zaznavanjem patogenih mikroorganizmov. Doseganje teh ciljev je bil eden od namenov, ki jih je v projektih Biocrypt (Razvoj hitrih metod in miniaturiziranih naprav za detekcijo patogenov in toksinov v gensko spremenjenih organizmih, prikritih živalskih in rastlinskih patogenov ter razvoj novih metod in naprav za zaznavanje RKB-agensov v okolju z minimalno ali brez priprave vzorca) in Biopax (Razvoj multifunkcionalnih, prenosnih, integriranih bioanalitskih sistemov in metod za hitro detekcijo nevarnih agensov v vodi in hrani) v okviru programov TP-MIR in CRP-MIR pod vodstvom Inštituta za fizikalno biologijo opravljala skupina slovenskih podjetij: Omega, Optotek, HarphaSea in Ames ter raziskovalnih skupin veterinarske, medicinske in biotehniške fakultete, Fakultete za strojništvo Univerze v Ljubljani ter Inštituta za varovanje zdravja Ljubljana in Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor.

Detekcija nevarnih agensov v vodi in hrani, ki preprečujejo okužbe vojakov, je pomembna, ker so vojaška posredovanja v svetu danes precej pogost pojav. Že samo sprememba sestave in prisotnosti drugačnih mikroorganizmov v pitni vodi in hrani že lahko povzroči diarejo. Takšni primeri so opisani pri posredovanju ameriških enot v Iraku in Afganistanu (Putnam et al., 2006). Vojaki pogosto zaužijejo hrano in vodo v prehranjevalnih objektih, v katerih se pripravlja večja količina hrane. V takšnih primerih lahko pride do epidemičnih izbruhov obolenj zaradi patogenih mikroorganizmov, ki se prenesejo s človeka prenašalca v vodo ali hrano in potem naprej do drugih ljudi (Taylor et al., 2005). Vir okužb ali tako imenovane vroče točke so

lahko vodni viri, hrana ali ljudje. Okužb in morebitnih epidemij ne moremo preprečiti preprosto z zdravljenjem obolelih, temveč moramo poiskati vir in tam odstraniti okužbo. Da pa vir okužb sploh najdemo, moramo med drugim imeti primerne pripomočke.

V zakonodaji je preverjanje kakovosti pitne vode omejeno na gojitvene metode³ (Pravilnik o pitni vodi, Ur. l. RS 19/2004), vendar je uporaba samo teh metod pomanjkljiva, saj večinoma na gojiščih raste manj kot odstotek vseh mikroorganizmov, ki so prisotni v naravnem ekosistemu. Da lahko najdemo tudi preostale mikroorganizme, moramo uporabiti molekularne metode⁴, saj sicer veliko patogenih mikroorganizmov lahko prezremo.

Z razvojem molekularnih in tudi gojitvenih metod šele v zadnjem desetletju odkrivamo veliko številčnost in pestrost mikroorganizmov, ki živijo v podzemnih vodah, ki jih uporabljamo za pitje. Tudi človek s svojo dejavnostjo vpliva na njihovo sestavo. Tako fekalne odplake, ki jih pogosto spiramo v vode, omogočajo razrast bakterij, ki jim to okolje ustreza. Od bakterij fekalnega izvora so najpogostejši predstavniki rodov *Shigella* spp., *Salmonella* spp. in enterohemoragični sevi *E. coli* (Leclerc, 2003). Nekatere skupine patogenih bakterij, kot so *Legionella* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas aeruginosa* in *Mycobacterium avium* kompleks pa pridejo v pitno vodo iz naravnih rezervoarjev.

Bakterije v pitni vodi so lahko vir hudih bolezni, kot so kolera (*Vibrio cholerae*), griža (*Shigella*), tifus in gastroenteritis (*Salmonella*), pljučnica (*Klebsiella*) ter kuga (*Yersinia*). *Helicobacter pylori* je bakterija, ki jo prav tako najdemo v pitni vodi in lahko povzroča rane na želodcu. V Sloveniji je prekuženost ljudi, starejših od 60 let, več kot 50-odstotna, zato je zaznavanje njene prisotnosti v pitni vodi zelo pomembna (Cover et al., 1996, Dunn et al., 1997, Gubina et al., 2006). Zaznava nekaterih patogenih bakterij ni preprosta, saj so lahko v okolju prikrite. Ker ima pitna voda malo hranilnih snovi, lahko bakterije, ki sicer rastejo na gojiščih, preidejo v stanje, ko jih ne moremo gojiti. Pod določenimi pogoji pa lahko spet preidejo nazaj v stanje, ko so sposobne rasti na gojiščih (Colwell et al., 2000, Leclerc, 2003). Torej tudi bakterije, ki jih načelno lahko zaznamo z rastjo na gojiščih, v takih primerih ne moremo zaznati, v telesu pa se vseeno namnožijo in povzročijo bolezni. Z uporabo molekularnih metod lahko zaznamo tudi te prikrite, a potencialno patogene bakterije. Pri tem je najboljši pristop funkcionalne metagenomike z uporabo sekvenatorjev druge generacije. Na Inštitutu za fizikalno biologijo jih nimamo, vendar smo s pomočjo tujih ponudnikov že razvili metode direktne molekularne zaznave in tipizacije brez koraka bogatitve, in sicer za štiri patogene mikroorganizme (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. in *Campylobacter* sp.) (Lapanje et al., 2010). Ta vrhunska tehnologija omogoča prestop na popolnoma novo raven razvoja.

³ Metode, pri katerih gojimo mikroorganizme v tekočih ali na trdnih hranilnih medijih (t. i. gojiščih).

⁴ Metode, ki temeljijo na analizi biomolekul (npr. nukleinskih kislin – DNK, RNK; beljakovin).

1 OPIS PROBLEMA

V tem članku predstavljamo naše delo, povezano s problematiko mikrobiološkega onesnaženja pitnih vod. Raziskali smo problem neprijetnega vonja ustekleničene vode v polnilnici vod. Ker so bili vsi z zakonom določeni parametri testirani v vodi in skladni z zakonsko veljavnimi vrednostmi, voda ni bila neoporečna. Toda za podjetje so neustrezne organoleptične lastnosti vode precejšen problem, predvsem če obstaja poleg subjektivno neustrezne kakovosti vode tudi možnost razvoja patogenih mikroorganizmov ali mikroorganizmov, ki izločajo toksične snovi, vendar jih z zakonom določenimi gojitvenimi metodami ne zaznamo.

Postavili smo si naslednja vprašanja:

1. Ali je neprijeten vonj ustekleničene vode povezan z morebitno čezmerno namnožitvijo bakterij v plastenkah?
2. Ali lahko določimo razlike v bakterijski združbi med vodo z neprijetnim vonjem in vodo brez njega?
3. Kakšni bi bili ustrezni pogoji v plastenki, ki bi zmanjšali rast bakterij med skladiščenjem?

Za preverjanje zgoraj naštetih vprašanj smo si zastavili dva poskusa. V prvem poskusu (Bakterije v vodi iz plastenk z vonjem in brez vonja) smo določili in primerjali bakterijsko združbo v vodi brez neprijetnega vonja in v vodi z njim. V drugem poskusu (Inkubacija plastenk v različnih atmosferah) smo izpostavili plastenke z vodo različnim atmosferam.

2 METODE

2.1 Bakterije v vodi iz plastenk z vonjem in brez vonja

Za določitev bakterijskih predstavnikov v vodi iz plastenk smo iz vod izolirali DNK⁵, izmerili koncentracijo DNK ter analizirali nukleotidno zaporedje dela gena za bakterijsko 16S-ribosomalno podenoto s pomočjo klonskih knjižnic⁶.

Poleg DNK-analize smo izvedli še gojenje bakterij na različnih gojiščih (bogatih s hranili in revnih s hranili). Na podlagi nukleotidnega zaporedja gena za bakterijsko 16S-ribosomalno podenoto smo zrasle bakterijske kolonije umestili v taksonomski sistem.

2.2 Inkubacija plastenk v različnih atmosferah (zrak, CO₂, N₂)

Da bi preverili morebiten vpliv atmosfere na razvoj neustreznega vonja v plastenkah, smo za dva meseca izpostavili različnim atmosferam (zrak, N₂, CO₂) tri tipe plastenk: plastenke z vonjem (polnjenje oktober 2007), plastenke brez vonja (enako

⁵ Deoksiribonukleinska kislina.

⁶ Molekularna metoda analize bakterijske združbe na podlagi ločevanja genov za 16S-ribosomalno podenoto, vnosa teh genov v posebej prilagojene bakterije in analize zraslih klonov.

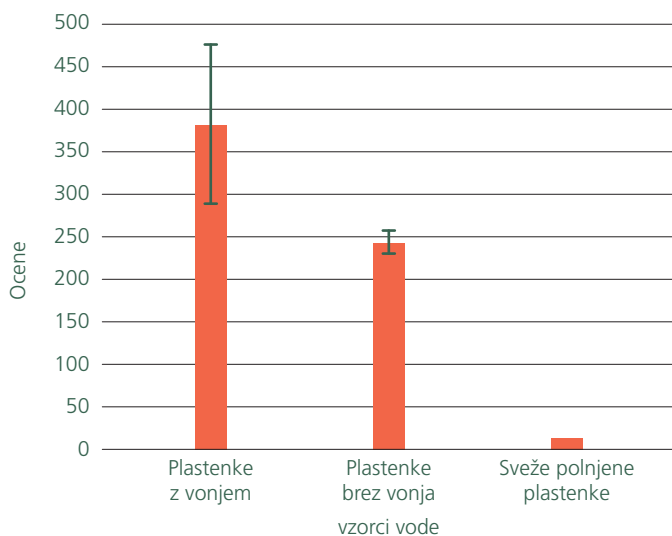
polnjenje kot pri plastenkah z vonjem) in sveže polnjene plastenke, inokulirane z vodo z vonjem (polnjenje junij 2008). Atmosfere so bile izbrane na podlagi pogosto uporabljenih plinov za ustekleničenje vode. Polnilnica, iz katere smo pridobili vzorce plastenk, uporablja pri polnjenju plastenk z vodo N₂. Shema poskusa je predstavljena na sliki 3. Iz vode smo izolirali DNK in izmerili koncentracijo DNK ter analizirali nukleotidno zaporedje dela gena za bakterijsko 16S-ribosomalno podenoto s pomočjo TGGE⁷ (Nubel et al., 1999).

3 REZULTATI

3.1 Bakterije v vodi plastenk z vonjem in brez vonja

Rezultati meritve mase izolirane DNK iz vode so pokazali 1,6-krat večjo vrednost DNK v vodi z vonjem v primerjavi z vodo brez vonja in 33-krat večjo vrednost v primerjavi s sveže polnjeno vodo (slika 1).

Slika 1: Graf izmerjene izolirane DNK na 1 liter izvorne vode, polnjene v plastenkah z vonjem (polnjenje oktober 2007) in brez vonja (polnjenje enako kot pri plastenkah z vonjem) ter sveže polnjenih plastenk (polnjenje junij 2008). Prikazani so tudi standardni odkloni, razen pri sveže polnjenih plastenkah



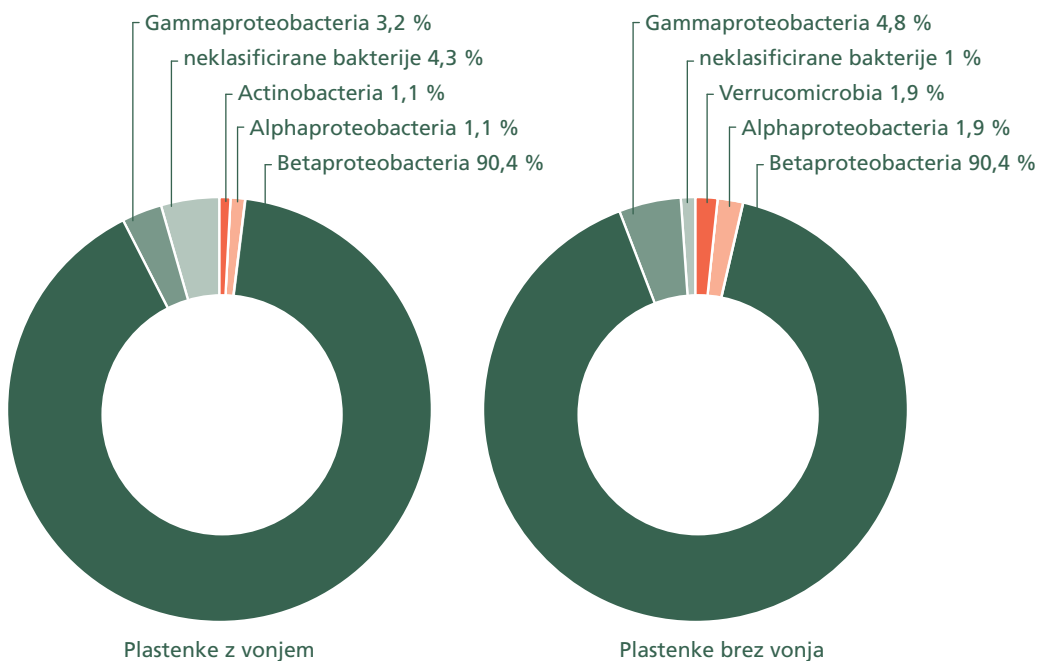
Tako v vodi z vonjem kot v vodi brez vonja so prevladoval bakterije iz debla *Proteobacteria* (razred *Alpha-*, *Beta-* in *Gammaproteobacteria*). Znotraj razreda (*Alphaproteobacteria*) smo v plastenkah z vonjem zaznali bakterije, ki so sposobne fiksacije dušika (*Rhizobium*), medtem ko v plastenkah brez vonja teh bakterij ni bilo. Pri plastenkah brez vonja smo zaznali še prisotnost bakterij iz debla *Actinobacteria*, pri plastenkah z vonjem pa *Verrucomicrobia*. Preostale sekvence nismo mogli umestiti v taksonomske skupine na podlagi delnega nukleotidnega zaporedja in smo jih označili kot neklasificirane bakterije (tabela 1, slika 2).

⁷ Molekularna metoda analize bakterijske združbe na podlagi ločevanja genov za 16S-ribosomalno podenoto s pomočjo gradientnega gela, ki omogoča različno potovanje DNK glede na sestavo nukleotidov.

Tabela 1:

Deblo/Razred	Rod	Klonska knjižnica		
		Plastenke z vonjem	Plastenke brez vonja	Gojenje
Proteobacteria/ Betaproteobacteria	Curvibacter	+	+	
	Pelomonas			+
	Acidovorax			+
	Polaromonas		+	
	Methylibium		+	+
Proteobacteria/ Alphaproteobacteria	Brevundimonas			+
	Rhizobium	+		+
	neklasificirane Alphaproteobacteria		+	
Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	Perluuidibaca	+		
	neklasificirane Gammaproteobacteria	+		
Actinobacteria	Microbacterium			+
	neklasificirane Actinomycetales		+	
	Rhodococcus			+
Verrucomicrobia	Opitutus	+		

Slika 2:
Zastopanost posameznih bakterijskih predstavnikov v vodi z vonjem in brez vonja (polnjenje oktober 2007)

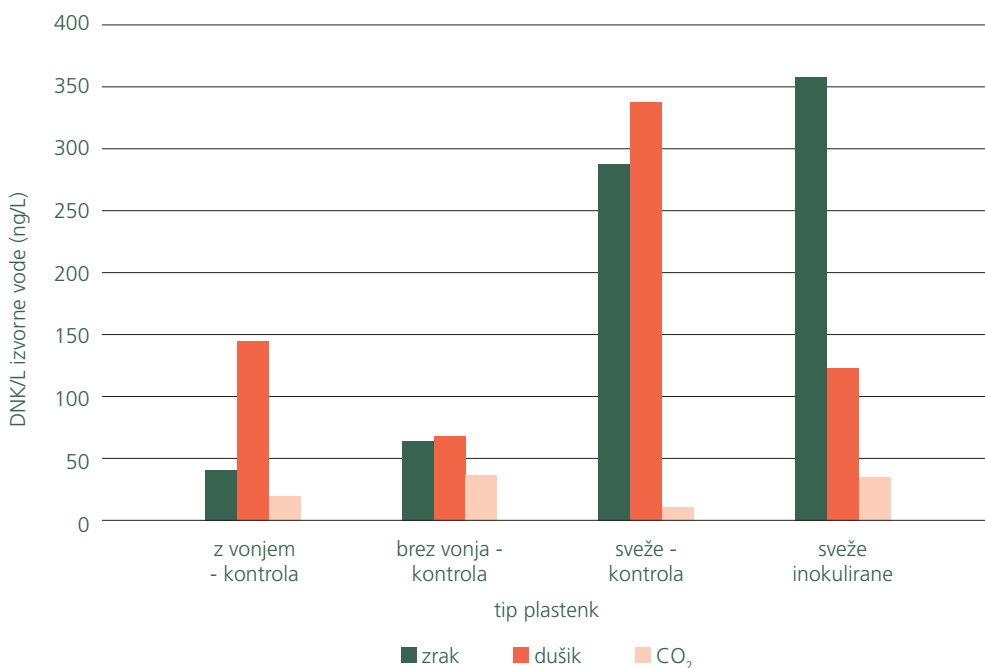


Z gojitvenimi metodami smo določili predstavnike v razredu *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* in debela *Actinobacteria* (tabela 1, slika 2).

3.2 Inkubacija plastenek v različnih atmosferah (zrak, CO₂, N₂)

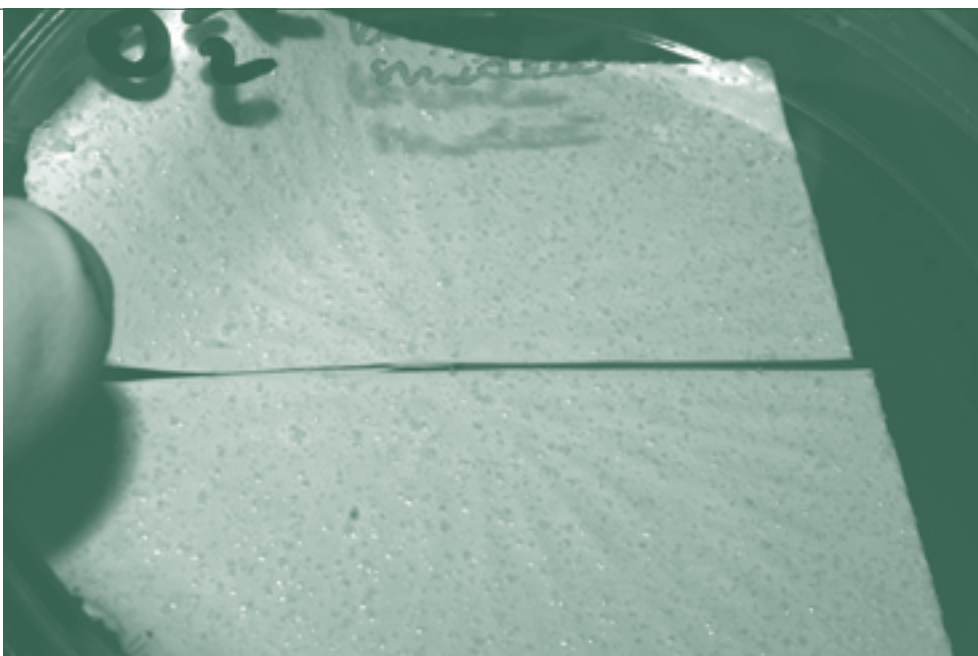
Vodi z vonjem, inkubirani na zraku in atmosferi N₂, sta imeli 2,4-krat in 8,6-krat večjo količino DNK v primerjavi z vodo pri atmosferi CO₂. Pri vodi brez vonja sta imeli vodi, inkubirani na zraku in pri atmosferi N₂, skoraj dvakrat večjo količino DNK v primerjavi z vodo pri atmosferi CO₂. Sveže polnjena voda je imela pri zraku 34-krat in pri N₂ 40-krat večjo vrednost kakor pri atmosferi CO₂. Pri inokuliranih plastenkah smo zaznali 10-krat večjo vrednost količine DNK pri plastenkah, inkubiranih na zraku, in 3,6-krat večjo vrednost pri plastenkah, inkubiranih pri N₂, v primerjavi z atmosfero CO₂ (slika 3).

Slika 3: Graf izmerjene izolirane DNK na 1 liter izvorne vode, polnjene v plastenkah po dvomesečni inkubaciji v različnih atmosferah. Plastenke z vonjem (polnjenje oktober 2007) in brez vonja (polnjenje enako kot pri plastenkah z vonjem), sveže polnjene platenke brez inokulacije (polnjenje junij 2008) in sveže polnjene platenke, inokulirane z vodo z vonjem

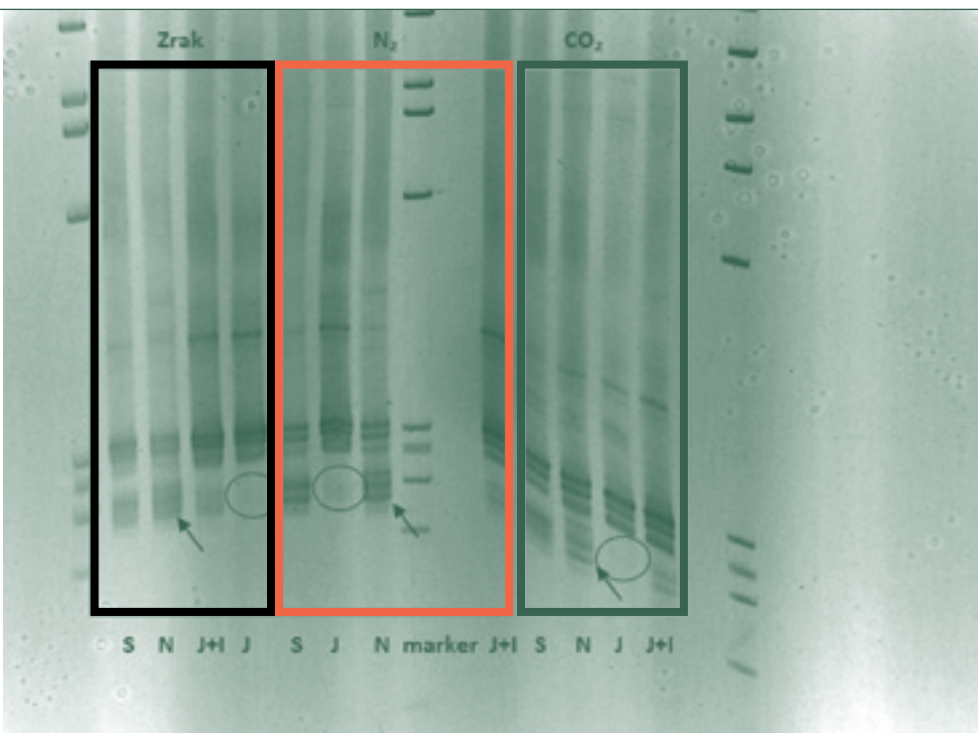


Vse platenke, inkubirane na zraku in v atmosferi N₂, so imele po koncu inkubacije viden bel precipitat (slika 4). Platenke, inkubirane na CO₂, so bile brez vidnega precipitata. Pri nekaterih sveže poljenih plastenkah z dodanim inokulumom se je razvil značilen vonj po dveh mesecih inkubacije le pri N₂-atmosferi. Pri vseh drugih inokuliranih plastenkah, inkubiranih na zraku ali CO₂, se značilen vonj ni pojavil. Poleg tega je voda, ki je imela že pred inkubacijo značilen vonj, na zraku in atmosferi N₂ vonj ohranila, pri atmosferi CO₂ pa se je vonj porazgubil in bil po dvomesečni inkubaciji komaj zaznaven.

Slika 4: Bel precipitat, ki je nastal po dvomesečni inkubaciji na zraku ali v atmosferi N₂, skoncentriran na filtru po filtraciji vode iz plastenke



Slika 5: Primerjava TGGE-profila bakterijskega gena za 16S ribosomalno podenoto med posameznimi vodami, inkubiranimi na različnih atmosferah (oznake na gelu: S – platenke z vonjem (polnjenje oktober 2007)), N – platenke brez vonja (enako polnjenje kot pri platenkah z vonjem), J – sveža – polnjene platenke (polnjenje junij 2008) brez inokuluma, J + I – sveže polnjene platenke, inokulirane z vodo z vonjem



Medsebojna primerjava bakterijske združbe z metodo TGGE je pokazala, da so nekatere bakterijske skupine prisotne v vseh vodah (slika 5). Nekatere skupine pa so bile prisotne samo pri plastenkah z vonjem in brez vonja ter pri inokuliranih plastenkah. Pri sveže polnjenih plastenkah teh predstavnikov ni bilo (na sliki 5 označeno s črnim krogom). Tako so sveže polnjene inokulirane plastenke med dvomesečno inkubacijo pridobile predstavnike, ki smo jih našli tudi pri plastenkah z vonjem in brez vonja. Pri plastenkah brez vonja smo opazili dodaten fragment (na sliki 5 označen s puščico), ki ga pri drugih plastenkah nismo zaznali.

4 RAZPRAVA

Pravilnik o naravni mineralni vodi (Ur. l. RS 50/2004) določa, da sveže polnjena voda (analizirana v dvanajstih urah po polnjenju) ne sme vsebovati več kot 100 CFU⁸/ml pri temperaturi inkubacije 20° C na hranljivem agarju (gojišče). Izjemoma dopušča tudi večje število mikroorganizmov, če je to posledica običajnega povečanja števila mikroorganizmov, ki jih je naravna mineralna voda imela na izviru in pod pogojem, da je voda organoleptično ustrezna. Številne tuje študije so na podlagi gojenja bakterij pokazale, da je rast bakterij v vodi po polnjenju v plastenke običajen pojav, kljub omejenosti količine nutrientov (Loy in sod., 2005). Število bakterij se lahko v prvih nekaj dneh po polnjenju poveča tudi od 104 do 105 CFU/ml vode (Leclerc in Costa, 1998), v naslednjih tednih in mesecih pa se število bakterij zmanjšuje ali ostaja nespremenjeno. Bischofberger in sodelavci (1999) so pokazali, da tudi dve leti po polnjenju v vodi še vedno lahko zaznamo žive bakterije. Težave nastanejo, kadar rast bakterij in njihov metabolizem vplivata na spremembo organoleptičnih lastnosti vode še pred iztekom roka trajanja. V takem primeru je treba ugotoviti mogoče povzročitelje spremembe, odkriti morebitni vir kontaminacije in ugotoviti načine zmanjšanja njihovega števila.

Primerjava količine DNK v vodi med sveže polnjeno vodo (polnjenje junij 2008) in vodo z vonjem in brez njega (polnjenje oktober 2007) je pokazala večjo količino DNK v slednji, kar potrjuje domnevo o razmnoževanju bakterij v vodi med skladiščenjem plastenk. Zaznali smo tudi povečano količino DNK v vodi z vonjem v primerjavi z vodo brez vonja, polnjeno na isti dan. Primerjava bakterijske združbe v vodi z vonjem in brez vonja ni pokazala bistvenih razlik v sestavi. Rezultati se precej pokrivajo tudi z raziskavami tujih avtorjev, ki opisujejo našete bakterije kot del bakterijske združbe v vodi v plastenkah ali pitni vodi (Bischofberger in sod., 1999; Eichler in sod., 2005; Loy in sod., 2005). Znotraj združbe smo zaznali nekaj predstavnikov, ki so sposobni fiksacije dušika (oblika N₂), na primer *Alphaproteobacteria* (red *Rhizobiales*). Detekcija bakterij, sposobnih fiksacije dušika, je zelo pomembna informacija, saj način polnjenja plastenk (tik pred zapiranjem plastenke po polnjenju se doda kapljica tekočega dušika za trdnost plastenke) omogoča ustrezne razmere za preživetje in razvoj teh bakterij. Zaznali smo tudi povečanje količine DNK v vodi z vonjem v primerjavi z vodo brez vonja, kar kaže na to, da je količina bakterij in njihova metabolna aktivnost tista, ki vpliva na nastanek neprijetnega vonja, ne pa sprememba vrstne sestave.

⁸ Kratica iz angl. za »Colony forming unit«. Število kolonij, ki so zrasle na gojišču.

Da bi preverili, ali je dušikova atmosfera ustrezen način polnjenja plastenk, smo izvedli poskus inkubacije plastenk pri treh različnih atmosferah (zrak, N_2 , CO_2). Glede na to, da vsebuje zrak 78 odstotkov dušika, smo predvidevali bolj podoben razvoj bakterijske združbe pri inkubaciji na N_2 ali zraku v primerjavi z atmosfero CO_2 . Atmosfera CO_2 je bila izbrana na podlagi podatka, da številne polnilnice pijač uporabljajo CO_2 za vzdrževanje trdnosti plastenke po polnjenju. Dejstvo, da smo po inokulaciji svežih plastenk zaznali vonj le pri plastenkah, inkubiranih pri atmosferi N_2 , potrjuje domnevo, da je prisotnost dušika tista, ki ugodno vpliva na rast bakterij, verjetno zlasti tistih, ki so sposobne fiksacije dušika in njegove akumulacije. Poleg tega je voda, ki je imela že pred inkubacijo značilen vonj, na zraku in atmosferi N_2 vonj ohranila, pri atmosferi CO_2 pa se je vonj porazgubil in je bil po dvomesečni inkubaciji komaj zaznaven.

Primerjava bakterijske združbe z metodo TGGE je pokazala, da so nekatere skupine prisotne pri vseh inkubiranih vodah. Ti predstavniki so verjetno združba polnjene vode, ki je prisotna že ob polnjenju vode v plastenke. Zanimivo je, da smo pri sveže polnjenih inokuliranih vodah zaznali nekatere predstavnike skupaj z vodo, polnjeno oktobra 2007. Glede na to, da pri sveže polnjenih plastenkah teh predstavnikov ni bilo, lahko sklepamo, da so se ti ob vnosu inokuluma v dveh mesecih namnožili ali pa je bila količina teh predstavnikov v sveže polnjenih plastenkah premajhna, da bi v dveh mesecih prekoračili spodnjo mejo detekcije z izbrano metodo analize.

Na podlagi vseh pridobljenih rezultatov sklepamo, da bi sprememba načina polnjenja plastenk (iz dodajanja N_2 v CO_2) podaljšala rok trajanja plastenk, saj bi upočasnila razvoj tistih bakterij, ki so sposobne fiksacije dušika, in se v okolju, v katerem je dušik dostopen, bolj uspešno in hitreje množijo. V naši raziskavi patogenih bakterij nismo zaznali, smo pa postavili metodo, s katero bi jih lahko našli tudi v neaktivni obliki in pri nižjih koncentracijah kakor z gojitvenimi metodami. S pristopom funkcionalne metagenomike z uporabo sekvenatorjev druge generacije bi lahko razvili še bistveno zanesljivejše teste, ki bi nam omogočili hitro in pravilno ukrepanje ob nesrečah in bioterorističnih napadih.

POMEN RAZISKAV ZA SLOVENSKO VOJSKO

V Resoluciji o dolgoročnem programu razvoja in opremljanja Slovenske vojske do leta 2015 (ReDPROSV, Ur. l. RS 89/2004) je med razvojnimi cilji Slovenske vojske poudarjeno vključevanje sodobnih znanstvenih spoznanj in uvajanje lastnih elementov sistema zgodnjega odkrivanja in opozarjanja. Predvideni so sistema za biološko in kemično detekcijo, sistem za nadzor vode ter biološki in kemični laboratorij. Srednjeročni obrambni program 2005–2010 (SOPr, 2005) je predvideval preusmeritev težišča nalog civilne obrambe k obvladovanju kriz in integriranja v celovit sistem kriznega upravljanja ter civilnokriznega načrtovanja, ki bo lahko odgovoril na izzive prihodnosti⁹.

⁹ MORS, TIA, ARRS in Slovenski vojski se zahvaljujemo za pomoč. Dr. Matildi Korman Frangeš in dr. Igorju Mileku za zelo konstruktiven nadzor izvajanja projektov, posebej se zahvaljujem tudi Fani Oven in Moniki Koprivnikar, ki sta pomagali pri delu v laboratoriju.

Literatura

1. Bischofberger, T., Cha, S.K., Schmitt, R., Koenig, B., Schmidt-Lorenz, W., 1990. *The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from the springs to reservoir and glass and plastic bottles. International Journal of Food Microbiology*. 11, str. 51–72.
2. Colwell, R.R., Grimes, D.J., 2000. *Nonculturable Microorganisms in the Environment. New Ed edition USA: ASM Press.*
3. Dunn, B.E., Cohen, H., Blaser, M.J., 1997. *Helicobacter pylori. Clinical microbiology reviews*. 10, str. 720–741.
4. Eichler, S., Christen, R., Holtje, C., Westphal, P., Botel, J., Brettar, I., Mehling, A., Hofle, M.G., 2006. *Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology*. 72-3, str. 1858–1872.
5. Gubina, M., Tepeš, B., Vidmar, G., Ihan, A., Logar, J., Wraber, B., Poljanec, J., Bricelj, I., Domanović, D., Levičnik Stezinar, S., Jevecica, S., Kotnik, V., 2006. *Prevalenca protiteles proti bakteriji Helicobacter pylori v Sloveniji v letu 2005. Zdravstveni vestnik* 75, str. 169–173.
6. Lapanje, A., Zrimec, A., Berden Zrimec, M., Razingar, J., Kopinč, R., Kovač, M., 2010. *Razvoj metod za sledenje virom kontaminacije kmetijskih in živilskih proizvodov. Fazna poročila CRP »Konkurenčnost Slovenije 2006-2013«.* Ljubljana: Inštitut za fizikalno biologijo.
7. Lazcka, O., Del Campo, F.J., Munoz, F.X., 2007. *Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. Biosens Bioelectron*. 22, str. 1205–1217.
8. Leclerc, H., da Costa, M.S., 1998. *The microbiology of natural mineral waters. V D.A.G. Senior, ur., P. Ashurst, ur. Technology of Bottled Water. Sheffield: Sheffield Academic Press, pp. 223–274.*
9. Leclerc, H., 2003. *Relationships between common water bacteria and pathogens in drinking water; heterotrophic plate counts and drinking-water safety. V J. Bartram, ur., J. Cotruvo, ur., M. Exner, ur., C. Fricker, ur., A. Glasmacher, ur. Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: The significance of HPCs for water quality and the human health. London, UK: IWA Publishing, str. 80–118.*
10. Loy, A., Beisker, W., Meier, H., 2005. *Diversity of bacteria growing in natural mineral water after bottling. Applied and Environmental Microbiology*. 71-7, str. 3624–3632.
11. Putnam S.D., Sanders, J.W., Frenck, R.W., Monteville, M., Riddle, M.S., Rockabrand, D.M. Sharp, T.W., Frankart, C., Tribble, D.R., 2006. *Self-reported description of diarrhea among military populations in operations Iraqi freedom and Enduring freedom. Journal of Travel Medicine*. 13, str. 92–99.
12. Rasooly, A., Herold, K.E., 2006. *Biosensors for the analysis of food- and waterborne pathogens and their toxins. J AOAC Int*. 89, str. 873–883.
13. Tauxe, R.V., 2002. *Emerging foodborne pathogens. International journal of food microbiology*. 78, str. 31–41.
14. Taylor, D.N., Ludwig, S.L., Md, Binn, L.N., Fleckenstein, J., Sanchez, J.L., Petri, W.A., Joanna M. Schaenman, J.M., Hoge, C.W., Cross, J.H., Carney, W.P., Aronson, N.E., Hospenthal, D.R., Lee, M.-A., Yap, E.P.H., 2005. *Military preventive medicine: Mobilization and deployment, Volume 2. United States of America: Office of the Surgeon General Department of the Army.*