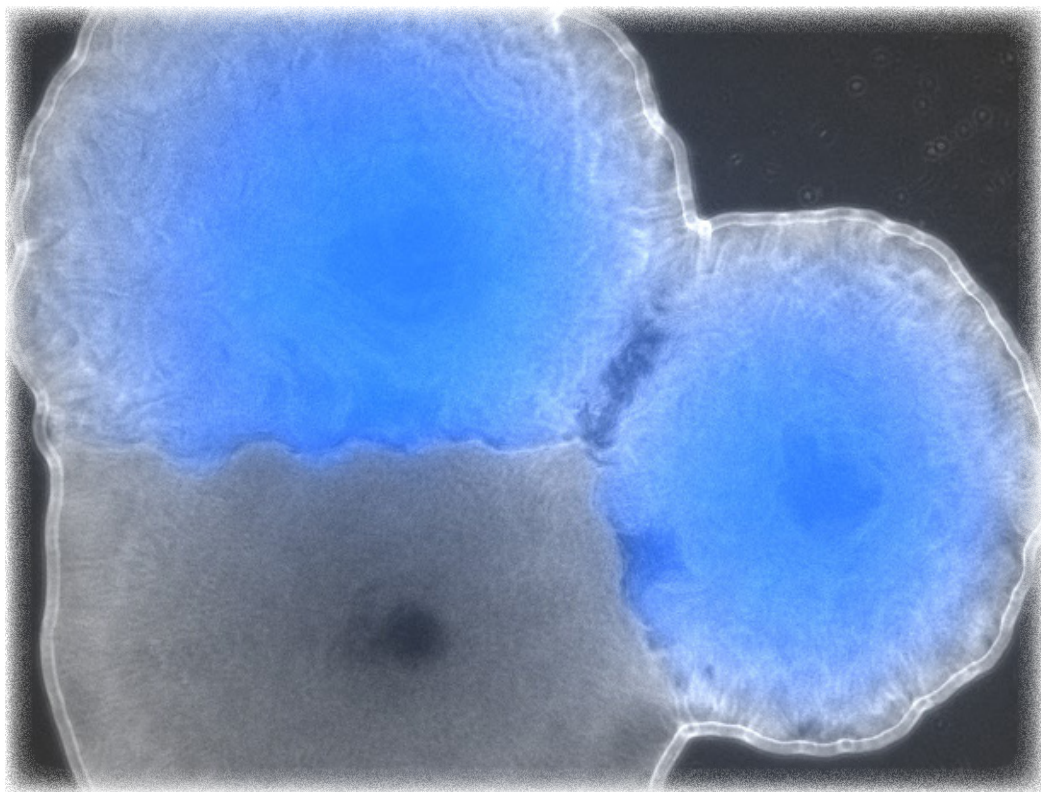




MIKROBIOLOG.SI

Letnik 1, številka 1
April 2021



Naslovnica

Kolonije bakterije *Escherichia coli* DH5α na agarju LB+Amp po transformaciji plazmida pKM8 (p43-CFP). Celice modro obarvane kolonije izražajo CFP, starševska celica sive kolonije plazmida med transformacijo ni sprejela. Fluorescentni mikroskop ZEISS, premer slike je 3 mm.
Avtor: Polonca Štefanič.

V tej številki preberite:

Novice iz sveta mikrobiologije

Omejitve pri hidrodinamskem odstranjevanju biofilmov iz vodovodnih sistemov
David Stopar

Raziskave v svetu mikrobiologije

Projekt C-26/792 "Razvoj novih metod protimikrobne zaščite na perutninskih farmah z namenom nadzora nad razširjanjem bakterijskih črevesnih okužb"
Marina V. Kuznecova in Marjanca Starčič Erjavec

Ljudje v svetu mikrobiologije

Inštitut za raziskovanje krasa, ZRC SAZU
Janez Mulec

Mikrobiološki intervju

zaslužni prof. dr. Peter Raspor
Intervjuvala: Polonca Štefanič

Strokovni članki iz sveta mikrobiologije

Higiensko stanje vrtcev v oddelkih prvega starostnega obdobja
Maša Štular, Urška Jamnikar Ciglencečki, Stanka Vadnjal, Majda Biasizzo, Urška Henigman, Mojca Jevšnik

Sumljive pošiljke z belim prahom v Sloveniji – sum na bioterorizem

Jana Avberšek, Miša Korva, Bojan Papić, Miroslav Petrovec, Tatjana Avšič Županc, Tina Pirš, Matjaž Očepek, člani intervencijske skupine IMP – VF in IMI – MF

Mikrobiologija v gospodarstvu

Mikrobiologija skozi oči raziskovalne skupine podjetja Omega
Simon Koren in Nataša Toplak

Iskrice v svetu mikrobiologije

Mikrobiologija v sliki

Mikronostagija
Franc Viktor Nekrep

Mikropesem
Peter Raspor

Mikrovici in zabava

Mikrokrižanka

Pred vami je prva številka glasila Slovenskega mikrobiološkega društva – Mikrobiolog.SI – glasila, ki ima namen, da nas drug drugemu nekoliko približa v teh časih, ko je priporočenih vsaj 1,5 metra razdalje. Namen glasila je tudi, da si povemo, kaj je novega v svetu mikrobiologije, katere raziskave smo uspešno zaključili in katere članke smo objavili, da si drug drugemu predstavimo svoje delo in delo raziskovalnih skupin, da obudimo nekaj spominov na pretekle čase in se tudi malo pozabavamo.

V tej številki glasila smo za vas tako zbrali prispevke iz raziskovalne, strokovne in gospodarske sfere, ki vas bodo popeljali od predstavitve članka o hidrodinamskem odstranjevanju biofilmov iz vodovodnih sistemov in predstavitve rusko-slovenskega bilateralnega projekta preko predstavitve raziskovalne skupine, ki mikrobiološko raziskuje kras, intervjuja z zaslužnim profesorjem dr. Petrom Rasporjem do predstavitve raziskovalnega dela podjetja Omega, d. o. o., in dveh strokovnih člankov, ki povzemata delo intervencijskih skupin za bioterorizem in raziskavo higienskega stanja v oddelkih prvega starostnega obdobja v vrtcih. V mikronostalgiji lahko s prof. dr. Francem V. Nekrepom obudite spomine na pretekle dni, preberete še mikropesem ter spočijete oči na lepotah mikrobnih kolonij. Poskrbeli pa smo tudi za zabavni kotiček, kjer si lahko »pretegnete« možgane ob smehu in križanki.

V upanju, da si boste z veseljem ogledali to številko, ob branju njenih prispevkov začutili ponos in zanos, da smo mikrobiologi, in boste tudi prispevali svoje prispevke za naslednjo številko, vas prav lepo pozdravljam.

Marjanca Starčič Erjavec

Novice iz sveta mikrobiologije

Omejitve pri hidrodinamskem odstranjevanju biofilmov iz vodovodnih sistemov

David Stopar

Projektna skupina pod vodstvom dr. Davida Stoparja, profesorja mikrobiologije na ljubljanski Biotehniški fakulteti, ki se ukvarja s proučevanjem strukture in funkcije biofilmov, je pred kratkim objavila pomemben prispevek v prestižni reviji *Water research*.

Vir: Simunič U. Pipp P., Dular M., Stopar D. The limitations of hydrodynamic removal of biofilms from the dead-ends in a model drinking water distribution system. *Water research*. 2020, vol. 178, str. 1–13, DOI: [10.1016/j.watres.2020.115838](https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115838).

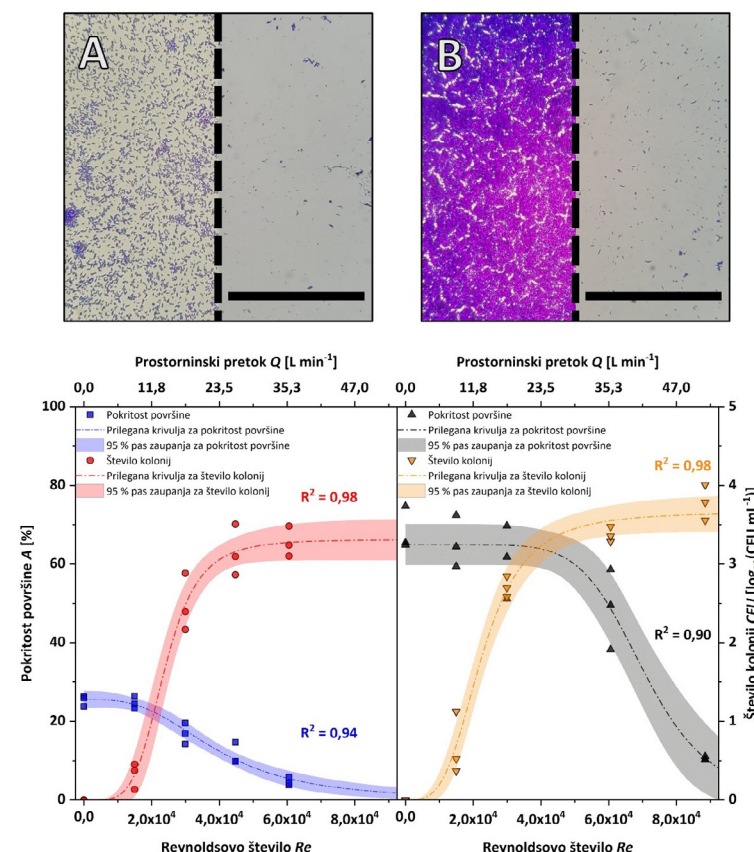
Biofilmi so prožne strukture, ki mikroorganizmom omogočajo zoperstavljanje stresnim dejavnikom okolja. V biofilmih so mikroorganizmi bolj odporni proti delovanju antibiotikov in drugih protimikrobnih snovi ter bolje prenašajo mehanske sile. Na Katedri za mikrobiologijo UL BF proučujemo vpliv hidrodinamskega izpiranja in hidrodinamsko inducirane kavitacije na odstranjevanje biofilmov in bakterij iz vodovodnih distribucijskih sistemov. Kljub velikemu pomenu za zagotavljanje kvalitetne pitne vode je nastajanje in odstranjevanje biofilmov iz vodovodnih sistemov slabo raziskano področje. To prav posebej velja za mrtve kanale, ki lahko pred-

stavljajo do 25 % celotnega vodovodnega distribucijskega sistema. V naših raziskavah smo postavili modelne vodovodne sisteme z materiali in dimenzijami, ki se uporabljajo v standardnih vodovodnih sistemih. Izdelali smo merilno celico, ki omogoča proučevanje vpliva različnih hidrodinamskih tokov na biofilme (stagnantnih, laminarnih, turbulentnih in intenzivno turbulentnih). Biofilme *E. coli* smo gojili *in situ* v modelnem vodovodnem sistemu, ali pa smo jih gojili *ex situ* in nato izpirali v modelnem vodovodnem sistemu. Pokazali smo, da rasti biofilmov v glavni cevi vodovodnega sistema ni bilo mogoče preprečiti pri stalnem volumetrič-

nem pretoku do 9,4 L/min oziroma hitrosti pretoka 2 m/s, kar je običajen pretok skozi vodovodne sisteme, ki morajo zagotavljati pretoke med 0,5 in 2 m/s. Zrelih biofilmov, ki so zrastle v glavni cevi, nismo uspeli v celoti odstraniti niti pri volumetričnem pretoku 52 L/min. V primerjavi z zreli biofilmi je bilo odstranjevanje nezrelih biofilmov bolj uspešno. Biofilmi, ki so rasli pri konstantnem strigu, so prenesli znatno višje strižne sile, kot so jim bili izpostavljeni med rastjo. Biofilmi v mrtvem kanalu so v primerjavi s stagnirajočimi razmerami rasli dvakrat hitreje, ko je bil pretok v glavni cevi turbulenten. Na biofilme v mrtvem kanalu pogoji izpiranja v glavni cevi niso vplivali. Računska simulacija dinamike tekočin je pokazala, da biofilmov iz mrtvega

kanala ni bilo mogoče hidrodinamsko odstraniti v globinah, ki so bile večje od premera cevi. Biofilmi, ki rastejo globlje, predstavljajo potencialni vir za reinokulacijo in rekolonizacijo preostalega vodovodnega sistema. Rezultati kažejo, da je običajno izpiranje omejeno uspešno pri odstranjevanju biofilmov v glavni cevi in neučinkovito pri odstranjevanju biofilmov v mrtvih kanalih.

▼ Odstranjevanje nezrelih biofilmov (A) in zrelih biofilmov (B) iz modelnega vodovodnega sistema, pri različnih hidrodinamskih režimih.



Raziskave v svetu mikrobiologije

Projekt C-26/792 "Razvoj novih metod protimikrobne zaščite na perutninskih farmah z namenom nadzora nad razširjanjem bakterijskih črevesnih okužb"

Marina V. Kuznecova

Marjanca Starčič Erjavec

Razširjanje patogenih in oportunističnih bakterij, odpornih proti antibiotikom, zahteva na perutninskih farmah razvoj sodobnih metod za zagotavljanje zdravja perutnine v industrijski proizvodnji. Obetavna možnost za izboljšanje ukrepov za preprečevanje in omejevanje razširjanja patogenih mikrobov, odpornih proti protimikrobnim sredstvom, je uporaba probiotičnih pripravkov.

Projekt C-26/792 je izvajala mednarodna skupina raziskovalcev v okviru programa vlade Permskega kraja za internacionalizacijo njihovih državnih visokošolskih izobraževalnih ustanov in raziskovalnih organizacij v obdobju 2018–2020. Raziskovalno skupino so tako tvorili Marina V. Kuznecova (vodja z ruske strani), Marjanca Starčič Erjavec (vodja s slovenske strani), Irina L. Maslennikova, Ekaterina G. Orlova, Larisa Yu. Nesterova, Julia S. Gizatullina

in Luka Predojevič. Delo in raziskave v okviru tega projekta so potekale na različnih ustanovah.

Analizirali smo vzorce iz piščancev Ross 308 (*Gallus gallus*) velikega perutninskega kompleksa (JSC PRODO Perm, Rusija): 995 vzorcev iz obdobja 2004–2009 in 991 vzorcev iz obdobja 2010–2017. Ugotovili smo, da so v vzorcih močno prevladoval bakterije družine *Enterobacteriaceae*, ki so bile znatno pogostejše od po Gramu pozitivnih mikroorganizmov. Med bakterijami je tako močno prevladovala *Escherichia coli*, sledil ji je *Proteus mirabilis*. V pojavu odpornosti proti antibiotikom, ki smo jo zaznali med izoliranimi sevi, se je zrcalila uporaba antibiotikov na farmi. Tako se je med sevi *E. coli* delež proti ciprofloksacinu odpornih sevov med obema obdobjema povečal, in sicer s 47,4 % na 75,9 %, delež proti amikacinu odpornih sevov pa se je zmanjšal, in sicer z 32,8 %

na 16,4 %.

Seve *E. coli*, izolirane iz primerov kolibaciloze, smo analizirali za prisotnost izbranih genov, povezanih z virulenco in rezistenco, za občutljivost za glavne antibiotike in bakteriochine. Z uporabo za gene specifičnih začetnih oligonukleotidov smo s PCR ugotovili, da imajo

z DNazno in RNazno aktivnostjo. Vsi proučevani sevi so bili neobčutljivi vsaj za dva izmed testiranih mikrocinov. Za vse seve smo določili s PCR tudi njihove filogenetske skupine in analizirali morebitne korelacije z odpornostjo proti antibiotikom in neobčutljivostjo za bakteriochine. Takšnih korelacij nis-

Cilji raziskovalnega projekta

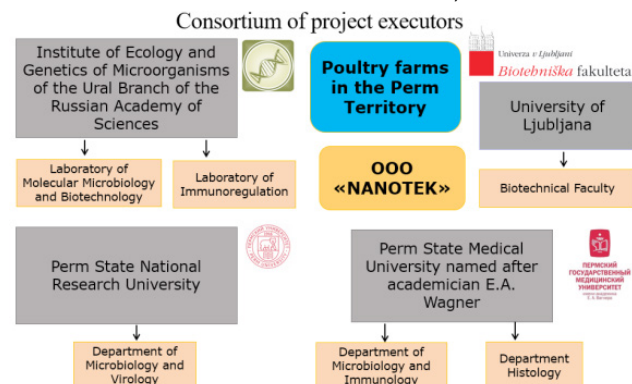
- ▶ slediti najpogostejšim bakterijskim enteropatogenom
- ▶ proučevati biološke lastnosti najpogostejših bakterijskih enteropatogenov
- ▶ proučevanje učinkovitosti novega probiotičnega pripravka, temelječega na novem mehanizmu delovanja bakteriocina na osnovi konjugacijskega prenosa, v *in vitro* in *in vivo* poskusih za preverjanje potenciala za profilaktično in/ali terapevtsko sredstvo.

izolirani sevi precejšen potencial za virulenco in da imajo lastnosti ptičjih patogenih *E. coli* (APEC): gen *ompT* smo našli v 71,4 %, gen *iroN* v 67,8 %, gen *iss* v 57,1 %, gen *iutA* v 35,7 % sevov. Med geni, povezanimi z adhezijo bakterij, je bil najpogostejši gen *fimH*, ki smo ga odkrili pri 92,9 % sevov. Med zelo pogostimi geni je bil tudi gen *hlyF*, ki smo ga našli pri 82,1 % sevov. Občutljivost za 9 antibiotikov smo ugotavljali s difuzijskim testom in preverili prisotnost genov *bla*_{TEM} in *bla*_{CTX-M} ter integrona razreda 1 s PCR. Med proučevanimi sevi jih je bilo 85,7 % odpornih proti vsaj trem antibiotikom, 53,6 % proti vsaj petim in 10,7 % proti osmim antibiotikom. S PCR smo ugotovili, da je bil gen *bla*_{TEM} prisoten pri 71,4 % sevov in gen *bla*_{CTX-M} pri 53,6 % sevov. Integron razreda 1 smo našli v 28,6 % sevov. Občutljivost za 20 bakteriocinov smo ugotavljali s testom preliivanja preko bakteriocinogenih kolonij. Ugotovili smo, da so bili vsi preučevani sevi neobčutljivi za vsaj 10 bakteriocinov. Več kot 90 % sevov je bilo neobčutljivih za kolicine skupine A in B, ki tvorijo pore v membrani, 60,7 % sevov je bilo neobčutljivih za kolicine

mo našli.

Učinkovitost N4i pOX38a, na konjugaciji temelječega protimikrobnega dejavnika "kill" – "anti-kill" na osnovi bakteriocina, kolicina ColE7 smo preverjali s PCR v realnem času, pretočno citometrijo in z bioluminescenco. Na ColE7 osnovan protimikrobni sistem se sestoji iz genetsko modificiranega seva Nissle 1917 bakterije *E. coli*, ki vsebuje konjugativen plazmid pOX38a (derivat plazmida F) z zapisom za gen "kill" (gen za sintezo ColE7, ki je DNaza) in ima v kromosomu dodan gen "anti-kill" (gen za imunost proti ColE7). Deluje tako, da se s konjugacijo zapis za gen "kill" iz donorske celice prenese v recipientsko celico, kjer se sintetizira in vodi v propad recipientske celice. S PCR v realnem času smo analizirani izražanje na plazmidu pOX38a zapisa nega gena *traJ*, ki ima informacijo za glavni pozitivni regulator konjugacije. Protein TraJ namreč s svojo vezavo na promotor *P_{traYZ}* sproži konjugacijo pOX38a. Rezultati PCR v realnem času so pokazali, da je izražanje gena *traJ* večje v logaritemski fazi (4-urna inkubacija) kot v stacionarni fazi rasti (24-urna inkubacija), kar se ujema z zna-

▼ Ustanove, ki so bile povezane v izvedbi projekta C-26/792.



▼ Frekvence konjugacije v poskusih konjugacije v planktonski rasti in v biofilmu ter biomasa biofilma. Frekvenca konjugacije v zgornji vrsti je povprečje ± SD iz poskusov v planktonski rasti, v spodnji vrsti pa v biofilmu.

nim dejstvom, da konjugacija poteka v logaritemski fazi rasti. S pretočno citometrijo smo posredno ocenili DNazno aktivnost na konjugaciji temelječega protimikrobnega sistema, saj DNazna aktivnost vodi do lize recipientskih tarčnih celic v konjugacijski zmesi, zaradi česar pride do zmanjšanja fluorescence v primerjavi s kontrolnim poskusom. S testi *lux* z bioluminescentnim sevom *E. coli* TG1 (pXen *lux*+ Ap^r) smo pokazali, da tarčne celice propadejo že po dveh urah izpostavitve donorskim celicam plazmida pOX38a. S poskusi s tarčnimi celicami seva *E. coli* C600, ki postanejo bioluminescentne po sprožitvi odziva SOS in količina bioluminescence sovpadajo z jakostjo odziva SOS, smo potrdili, da po konjugaciji pOX38a v te celice sicer pride do hitrega odziva SOS, ki pa se nato že po 6 h zaradi propada tarčnih celic bistveno zmanjšuje.

V poskusih *in vitro* smo učinkovitost na konjugaciji temelječega protimikrobnega dejavnika na osnovi *ColE7* preverili z dvema različnima plazmidoma z dodanim genom *colE7a* za DNazno ak-

tivnost *ColE7* – s plazmidom pOX38a, ki ima ozko gostiteljsko območje, in R6Ka, ki ima široko gostiteljsko območje. Osnovna plazmida, pOX38 in R6K, brez zapisa za DNazno aktivnost *ColE7* pa sta služila v kontrolnih poskusih, v katerih smo določili frekvenco konjugacije. Kot recipiente v konjugaciji smo uporabili različne naravne bakterijske seve *E. coli*, za poskuse s plazmidom širokega gostiteljskega območja pa tudi sev bakterije *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, sev *Pseudomonas aeruginosa* in sev *Pseudomonas sp.* Poskuse smo izvedli tako v planktonski rasti bakterij kot v biofilmu. Vsi rezultati so povzeti v tabeli spodaj. Izvedeni poskusi so pokazali, da je tak način prenosa gena *colE7a* učinkovit in da vodi v propad tarčnih celic. Na podlagi dobljenih rezultatov tako lahko predvidevamo, da imajo na konjugaciji temelječi protimikrobni dejavniki potencial za uporabo v novi generaciji probiotičnih pripravkov in kot alternativa antibiotikom.

Protimikrobni učinek N4i pOX38a smo proučevali tudi v laboratorijskih po-

skusih *in vivo* na piščancih (*Coturnix coturnix*). Po dodatku N4i pOX38a v pitno vodo piščancev smo preverjali obstojnost seva N4i pOX38a v črevesni mikrobioti piščancev in učinek seva N4i pOX38a na sestavo črevesne mikrobiote piščancev. Pokazali smo, da je sev N4i pOX38a prisoten v črevesni mikrobioti piščancev starih 6–24 dni. V kontrolni skupini (skupina brez dodanega seva N4i pOX38a v pitni vodi) smo v črevesni mikrobioti zaznali bakterije debel Firmicutes, Proteobacteria (*E. coli*), Actinobacteria (*Eubacterium spp.*) in v manjši meri Bacteroidetes. V skupinah piščancev, ki so prejemale sev N4i pOX38a v pitni vodi, se je v primerjavi s kontrolno skupino delež bakterij rodov *Lactobacillus*, *Bacillus* in *Clostridium* iz debela Firmicutes povečal. Protimikrobni učinek N4i pOX38a smo proučevali tudi v laboratorijskih poskusih *in vivo* na podganah (linija Wistar line). Pokazali smo, da sev N4i pOX38a lahko kolonizira črevesje podgan, in da je v njem



sposoben kolonizirati črevesje živali (piščancev in podgan) in da ima v črevesju protimikrobni učinek, tako da ta sev izkazuje potencial za uporabo kot probiotični pripravek nove generacije. Rezultati projekta so bili objavljeni v več člankih in predstavljeni na več konferencah. Vodili pa so tudi do patentne prijave. Kolaž objavljenih prispevkov, nastalih na podlagi rezultatov tega projekta, je na sliki zgoraj. Projekt C-26/792 pa je ob raziskoval-

▲ Slika naslovnih strani objavljenih prispevkov z rezultati projekta C-26/792.

»Sev N4i pOX38a ima v črevesju živali protimikrobni učinek in izkazuje potencial za uporabo kot probiotični pripravek.«

prisoten vsaj 1 mesec, ter da prispeva k povečanemu številu komenzalnih bakterij in zmanjšanemu številu patogenih bakterij v črevesju in pri tem ne deluje na mlečnokislinske bakterije. V obeh živalskih vrstah smo preverjali tudi konjugacijski prenos plazmida pOX38 in pOX38a. Opazili smo, da se je konjugacija plazmida pOX38 v črevesju obeh vrst živali dogajala s frekvenco okoli 10E-2. Po konjugacijskem prenosu plazmida pOX38a pa v nobenem primeru nismo zasledili transkonjugant, kar je potrdilo uspešno delovanje seva N4i pOX38a.

V okviru projekta pridobljeni rezultati tako potrjujejo, da je sev N4i pOX38a

nem delu vključeval tudi pedagoški del. Prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec je tako za ruske kolege in študente izvedla kar nekaj predavanj, bodisi v živo ali pa v času epidemije COVID-19 preko videokonferenčne povezave.



◀ Predavanje M. Starčič Erjavec na Državni medicinski fakulteti v Permu.

Recipientski sev	Frekvence konjugacije		Biomasa biofilma, OD ₅₇₀
	N4i pOX38 w.t.	N4i pOX38a	
Hemolitičen sev <i>E. coli</i> (n=5)	4.74E-01±4.23E-01	0.00E+00	0.173±0.017
	3.32E-01±4.49E-01	0.00E+00	
	7.78E+00±1.35E+01	0.00E+00	0.140±0.023
	2.05E-02±1.47E-02	0.00E+00	
	1.26E+00±2.05E-01	0.00E+00	0.181±0.040
	7.98E-01±1.57E-01	0.00E+00	
	2.67E-04±4.00E-04	0.00E+00	0.810±0.052
	6.03E-05±1.74E-05	0.00E+00	
	1.09E-01±9.84E-02	0.00E+00	0.126±0.015
	5.36E-01±3.33E-01	0.00E+00	
APEC (n=5)	5.39E-06±7.62E-06	0.00E+00	0.143±0.016
	1.92E-04±2.72E-04	0.00E+00	
	5.33E-06±7.54E-06	0.00E+00	0.114±0.014
	1.08E-02±1.52E-02	0.00E+00	
	3.27E-05±4.36E-05	0.00E+00	0.305±0.041
	4.01E-03±5.65E-03	0.00E+00	
	7.17E-05±7.91E-05	0.00E+00	0.382±0.023
	3.73E-04±3.73E-04	0.00E+00	
	1.64E-05±2.33E-05	0.00E+00	0.373±0.017
	6.36E-02±9.00E-02	0.00E+00	
Recipientski sev	Frekvence konjugacije		Biomasa biofilma, OD ₅₇₀
	N4i R6K w.t.	N4i R6Ka	
Hemolitičen sev <i>E. coli</i> (n=1)	0.00E+00	/	/
<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis (n=1)	8.5E-05±6.08E-05	7.5E-06±6.28E-06	0.110±0.024
	5.00E-05±2.05E-05	5.10E-07±4.15E-07	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=1)	2.98E-01±3.41E-01	3.48E-07±2.41E-07	0.109±0.010
	2.17E-02±1.15E-01	1.18E-07±1.03E-07	
<i>Pseudomonas sp.</i> (n=1)	2.26E-01±3.19E-01	4.32E-08±3.35E-07	0.109±0.052
	1.48E-01±1.12E-01	4.48E-08±5.52E-07	
APEC (n=2)	0.00E+00	/	0.243±0.098
	0.00E+00	/	
	1.49E-05±2.11E-05	2.39E-07±2.11E-07	
	2.17E-05±1.15E-05	0.00E+00	

Opomba: / – poskus ni bil izveden, ker konjugacija v kontrolnem poskusu s plazmidom R6K ni potekla

ZRC SAZU, Inštitut za raziskovanje krasa, Postojna

Janez Mulec

Jamska mikrobiologija v okviru geomikrobiologije predstavlja interdisciplinarno področje mikrobiologije in geologije, ki proučuje mikroskopske oblike življenja v jamah in njihove vplive na tamkajšnje naravne procese.

V Sloveniji, pa tudi drugje po svetu, še ni dolge tradicije raziskovanja mikroorganizmov, vezanih na kraško podzemlje, čeprav vendarle velja omeniti eno prvih »najdb« mikroorganizmov, *Peridinium stygium* in *Gymnodinium sp.*, v jami Pivka jama pri Postojni že leta 1878. Na prisotnost in morebiten širši pomen mikroorganizmov v kraških jamah sta 100 let kasneje, leta 1977, kot ena prvih opozorila France Megušar in Boris Sket z opisom sestave mikrobne združbe v površinskih »organskih prevlekah« iz Planinske jame na 6. mednarodnem speleološkem kongresu v Olomoucu na Češkem. V naslednjih letih so se večinoma izvajale le posamične raz-

iskave, ki so bile namenjene takrat perečim težavam, npr. mikrobiološki kakovosti kraških voda. V obdobju, ki je sledilo, pa velja omeniti pomemben doprinos Mihaela Briclja k razumevanju kraške hidrologije in podzemnih vodnih povezav s pomočjo sledilnih poskusov, v katerih so uporabljali bakteriofage.

Tudi na Inštitutu za raziskovanje krasa Znanstvenoraziskovalnega centra Slovenske akademije znanosti in umetnosti v Postojni se sprva mikroorganizmom v podzemlju niso sistematično posvečali. V zadnjih 20. letih pa smo na Inštitutu začeli s postopnim raziskovanjem mikroorganizmov v jamah. Sprva je šlo predvsem za iskanje značilnih in posebnih mikrohabitats, ki jih kolonizirajo mikroorganizmi, medtem ko v zadnjem času skušamo odgovoriti na globalno pomembna vprašanja, povezana z vlogo mikrobiote v podzemlju. Nedavne študije so pokazale, da so jamski mikrobiomi lahko precej pomembnejši od do sedaj znanega, saj služijo kot modelni sistemi za obravnavanje temeljnih vprašanj mikrobne ekologije, ekotoksikologije in astrobiologije ali vir biotehnoloških pomembnih metabolitov.

Mikroorganizmi v krasu imajo zelo pomembno vlogo pri globalnem kroženju ogljika. Na eni strani je



mikrobiota preko (bio)geokemijskih ciklov vpletena v kroženje snovi in pretok energije, po drugi pa je podvržena tudi interakcijam z mikrobi, katerim podzemlje ni primarni habitat oziroma jim služi le v vmesni fazi pri njihovem prenosu v novo okolje. V tem pogledu je zlasti zanimiv vidik podzemlja kot vir mikrobni patogenov za ljudi in živali, npr. za netopirje. Pomembno je omeniti tudi dejstvo, da zaradi precejšnje zakraselosti slovenski kras v podzemlju omogoča več medsebojnih mikrobni interakcij in potencialnih prenosov genov v naravni rezistom preko vodnega cikla, kroženja zraka v manjših in večjih razpokah in jamah ter s pomočjo migratornih živali. Visoka stopnja zakraselosti se zrcali tudi v hitro vidnem učinku človekovih posegov na površju v podzemlju. Na primeru kraških izvirov se je izkazalo, da so za (zgodnje) zaznavanje organskega onesaženja velikokrat bolj značilni mikrobiološki indikatorji kot fizikalno kemijski, saj se ob poplavnem valu koncentracija mikrobni indikatorjev poveča tudi za faktor 10.

Kljub majhnosti je Slovenija pokrajinsko, ekološko in habitatno izjemno pestra. Na Inštitutu dajemo poseben poudarek razumevanju strukture in delovanju mikrobni združb v ekstremnih okoljih, njihovim življenjskim strategijam in mehanizmom prilagajanja ter njihovem odzivu na spreminjajoče se okoljske pogoje. Izguba vrstne pestrosti zaradi klimatskih sprememb je globalen problem, ki pa je najbolj pereč v izginjajočih habitatih, npr. ledenih jamah. Na to smo opozorili na primeru študije mikrobiote iz Paradane v Trnovskem gozdu, največje ledene jame v Sloveniji. Izzivov pri proučevanju jamskih mikroorganizmov in raziskovalnih vprašanj, na katera je treba dobiti odgovore, je torej precej. Največji izziv v jamski mikrobiologiji so naravni procesi, ki jim botrujejo mikroorganizmi, posebej njihova vloga pri nastajanju mineralov in sige (litogeneza) oziroma njihova vloga v litolitičnih mehanizmi propadanja mineralov in kamnin.

Slovenski (klasični) kras tako v nacionalnem kot svetovnem merilu še vedno predstavlja velik potenci-

▲ Jamarji poimenujejo takšno mikrobno prerast jamsko zlato. Pojavlja se na mestih v jamah, bogatih z vnosom organskega materiala.

▼ Razrast micelija na naplavini v Škocjanskih jamah.



al za raziskave naravnih procesov in ocenjevanje vplivov človeka na podzemlje in kakovost voda. Množični turizem v jami pušča določeno sled, tudi mikrobiološko, ki jo skušamo čim bolj omiliti. Takšna primera omilitvenih ukrepov, ki smo ju prenesli v prakso, sta namestitvev dezinfekcijske bariere pred vhodom v Postojnsko jamo za zmanjšanje vnosa organskega materiala v jamo na obuvalih obiskovalcev ter nadgra-

»Izguba vrstne pestrosti zaradi klimatskih sprememb je globalen problem, ki pa je najbolj pereč v izginjajočih habitatih.«

dnja postopka za odstranjevanje zelenih organskih obrasti okoli svetil v jamah – lampenflore, ki je posledica umetnega osvetljevanja jamskega inventarja. Pri tem je ključno izvajanje ustreznega monitoringa učinkovitosti, prilagojenega za jamsko okolje. Pomembno je omeniti tudi, da množični turizem vpliva na spreminjanje kakovosti jamskega zraka in vnos ter prenos mikroorganizmov, zlasti tistih, ki jih vnesejo v podzemlje turisti. Seveda je pri interpretaciji ključno poznavanje naravnih pogojev in primerjava z naravnim mikrobim

»ozadjem«, ki ima svojstven sestav pa tudi dinamiko. Posebnost Škocjanskih jam, ki so uvrščene na UNESCO-v seznam svetovne naravne dediščine, so tudi tam prisotne kolonije netopirjev, ki pripadajo kar devetim vrstam. Netopirjem pripisujemo pomembno vlogo okoljskega indikatorja. V luči masovnega umiranja netopirjev v severni Ameriki zaradi glivnega patogena *Pseudogymnoascus destructans*,

smo izvedli študijo o prisotnosti tega patogena tudi v Sloveniji, ter ga dokazali v gvanu netopirjev iz Škocjanskih jam ter jame Huda luknja blizu kraja Gornji Dolič pri Mislinji. Med drugim je tudi ta študija pripomogla k usmerjanju znanstvene in strokovne pozornosti v večjo potrebo po proučevanju in zaščiti netopirjev v Sloveniji. Drugega pomembnega glivnega patogena *Histoplasma capsulatum* tako za netopirje kot za ljudi zaenkrat v slovenskih jamah nismo dokazali. Dobro poznavanje problematike in narave terenskega dela je, kljub



► Vzorčenje netopirskega gvana v Škocjanskih jamah.

majhnosti raziskovalne skupine in s tem omejene raziskovalne infrastrukture na Inštitutu, omogočilo, da je Inštitut skupaj s partnerji prispeval nekatera zanimiva spoznanja s področja jamske mikrobiologije. V tem pogledu je pomembno omeniti odlična, tako formalna kot neformalna sodelovanja, ki jih ima Inštitut z drugimi slovenskimi raziskovalnimi skupinami na Medicinski fakulteti in Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, Nacionalnem inštitutu za biologijo, Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano, Univerzi v Novi Gorici in na Inštitutu Jožef Stefan.

Inštitut že od leta 1993 v Postojni organizira mednarodno krasoslovno šolo »Klasični Kras«. Glavni namen srečanja je predstavitev trenutnega razumevanja krasa v okviru izbrane teme, spodbujanje razprave med udeleženci v okviru predavanj, predstavitev posterjev in s temo šole povezanimi ekskurzijami na območju klasičnega krasa v Sloveniji. Razvoj molekularne biologije in splošni

napredek v naravoslovju je v zadnjih letih botroval temu, da se čedalje več raziskav o mikroorganizmih in njihovih interakcijah navezuje tudi na kras in kraško podzemlje z jamami. Leta 2014 je krasoslovna šola z naslovom »Kras in mikroorganizmi« pritegnila kar 94 udeležencev iz 20 držav. V naslednjih letih bomo pripravili srečanje s podobno tematiko in prepričani smo, da bo udeležencev, ki jih bo ta tematika s številnimi novimi dognanji pritegnila, še precej več. Kraško podzemlje namreč še vedno ponuja veliko možnosti za odkrivanje novih vrst, metabolnih poti in biološko aktivnih snovi, uporabljenih v medicini in farmaciji. V prihodnosti pričakujemo še veliko zanimivih podatkov o doslej slabo raziskanih praživalih, arhejah in viriomihi, ki zaenkrat predstavljajo pogosto spregledan, a sestavni del podzemnega ekosistema.

▼ Včasih uporabljamo jame za izvajanje poskusov. Slika prikazuje raziskave rasti alg v odvisnosti od svetlobnega režima v Postojnski jami.



Mikrobiološki intervju

Zaslužni profesor dr. Peter Raspor

Priprava: Polonca Štefanič



► prof. dr. Peter Raspor. Pogovor za nacionalko. Vir: osebni arhiv Peter Raspor.

Profesor dr. Peter Raspor, zaslužni profesor Univerze v Ljubljani, je bil rojen v Dolgi Poljani leta 1954. Njegovo izobraževanje se je začelo v pekovski šoli v Mariboru (1971) in nadaljevalo v živilski tehnični šoli (1975). Diplomiral je iz živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti (BF) Univerze v Ljubljani (UL), doktorat s področja biotehnologije pa je zaključil v Zagrebu (1987). Po doktoratu se je odpravil na podoktorsko specializacijo na London Institute Labatt v Kanado (1989). Po povratku v domovino je postal docent za področje biotehnologije in industrijske mikrobiologije (1986), nato je bil leta 1992 izvoljen v izrednega profesorja. Istega leta je ustanovil Katedro za biotehnologijo in dve leti pozneje postavil podiplomski študij Biotehnologije na UL (1994) ter leta 1996 postal redni profesor. Leta 2004 je postavil dodiplomski študij Biotehnologije na BF (2004).

Kot pedagog je mentoriral 55 disertacij, 18 magistririjev in 145 diplom. Vodil je več deset projektov s področja živilstva, industrijske mikrobiologije in biotehnologije ter varnosti živil. Njegova bibliografija do danes (18. april 2021) obsega 1845 enot, 217 znanstvenih člankov in preko 100 vabljenih predavanj. Za svoje delo je med drugim prejel tri častne doktorate in več najvišjih državnih nagrad: Nagrado republike Slovenije na področju šolstva (2003), Zlato medaljo Univerze v Ljubljani (2007), Jesenkovo nagrado za življenjsko delo na pedagoškem, raziskovalnem in strokovnem področju (2011). Leta 2018 ga je predsednik Slovenije odlikoval z medaljo za zasluge za izjemen znanstveni in pedagoški prispevek na področju biotehnologije, mikrobiologije, živilstva in prehrane.

Bil je dvomandatni generalni sekretar FEMS, predsednik EFFoST, predsednik COST. Organiziral je več kot 80 strokovnih in znanstvenih srečanj, med katerimi je prvi kongres FEMS (2004), ki je pritegnil več kot 1500 udeležencev in kjer so postavili Evropsko deklaracijo o mikrobiologiji. Organiziral je EFFoST-a (2008), kjer je zasnoval Evropsko deklaracijo o hrani, prehrani in tehnologiji. Pomagal je pri nastanku več biotehnoloških podjetij in bil med ustanovitelji inkubatorja na UL.

▼ prof. dr. Peter Raspor. Zadnje priprave pred konferenco. Vir: osebni arhiv Peter Raspor.



► KAKŠNO JE BIL VAŠE PRVO SREČANJE Z MIKROBIOLOGIJO?

Moje prvo srečanje z mikrobiologijo, da sem se tega res zavedal, se je zgodilo, ko sem vstopil v pekovski uk. Pekari so mi dali paket kvasa v roko in naročili: »No, mulc, zdej boš pa ti ta kvas lepo raztopil v vodi!« In seveda, vedel sem že, da kvas obstaja, nikoli ga pa v življenju nisem videl v tako velikih paketih, kot smo ga imeli tam. Seveda sem sledil navodilu in ga prenetel v mlačni vodi, ko je k meni pristopil mojster Edi Velikonja in me opazoval pri delu. Pogovor je tekel o kvasu. Razlagal je, koliko časa zdaj potrebuje kvas oz. kvasovke, da bodo »prišli k sebi«. To bi rekel, da je bilo moje prvo realno srečanje z

»V tistem letu preizkušenj sem se odločil, da bom nadaljeval študij. Po premisleku sem se odločil za univerzo v Zagrebu, saj sem prišel do stališča, da se znanja več pridobi, če se zamenja okolje in učitelje. Prof. Adamičeva se je s tem strinjala in me podpirala.«

mikrobiologijo. In potem sem seveda občudoval to, kar je on napovedal, da se bo dogajalo in kako hitro se bo dogajalo. Takrat sem se prvič zavedal moči tega organizma in kaj lahko naredi v nekaj urah. To je bilo, vsebinsko gledano, moje prvo zavedanje mikrobiologije – sveta drobnoživk, kot je pozneje zapisal profesor Konjajev v knjižici za svoje vnuke. Da sem pa kvasovke lahko videl skozi mikroskop, je moralo miniti še kar nekaj let. Zanimivo se mi zdi, da ko sem jih prvič res videl, se mi je potrdila moja predstava o teh organizmih...

► POTEM PA JE NEKAJ LET PRETEKLO, PREDEN STE SE ZARES POSVETILI MIKROBIOLOGIJI?

Ja, potem je preteklo realno gledano deset let, vmes sem odslužil vojsko, končal srednjo šolo in spet delal, vodil pekarno v Ajdovščini, kjer smo postavljali nove tehnolo-

gije, med drugim peke francoskega kruha. Potem pa sem pustil delo in šel redno študirat živilsko tehnologijo, zahvaljujoč Titovi štipendiji. Ko sem končal živilsko tehnologijo, naj bi nadaljeval delo v Mlinotestu. Vendar se ni izšlo tako na hitro. Stvari so se nekako spremenile, saj sem diplomiral eno leto pred planiranim zaključkom študija. Leto prehitro sem prišel v Mlinotest. Direktor tovariš Štrukelj me je začudeno vprašal: »Kaj pa ti delaš tukaj?« Veselo sem odvrnil: »Ja, pravzaprav sem končal, diplomiral sem iz uporabe protimikrobnih snovi za podaljšanje trajnosti kruha«. Nato je z resnim obrazom dejal: »Kam te naj pa damo? Po planu prideš ob letu.« In tako sem os-

tal na cesti, kljub temu, da sem eno leto prej diplomiral in prištedil državi eno letno štipendijo. Tisto leto sem se preživljal tako, kot se zdaj preživljajo mnogi mladi tudi sedaj. Ponoči sem hodil delat v pekarno Center, kjer me je takratni direktor tovariš Vojko Cuder spodbujal in mi plačeval kot študenta preko servisa. Sočasno sem podnevi voluntiral pri prof. Adamičevi (Oddelek za živilstvo BF), kjer smo postavljali, kot je profesorica dejala, »mutagenozo«. To je bilo za mene zelo izzivalno področje, saj smo delali takrat precej aktualne študije o vplivu mutagenov na spremembo metabolizma. Tako smo delali na bakterijskem prokariotskem sistemu *Salmonella typhimurum* in kvasnem evkariotskem sistemu *Saccharomyces cerevisiae*.

V tistem letu preizkušenj sem se odločil, da bom nadaljeval študij. Po premisleku sem se odločil za uni-

verzo v Zagrebu, saj sem prišel do stališča, da se znanja več pridobi, če se zamenja okolje in učitelje. Prof. Adamičeva se je s tem strinjala in me podpirala. Odprla mi je vrata v Zagrebu, po premisleku sem se odločil za biotehnologijo, čeprav sem najprej mislil da bom delal na kruhu ... Seveda se to ni zgodilo čez noč. Mnogo zapletov se je zgodilo, da me je uspela zaposliti na BF in še več, da sem postal eden od prvega ducata mladih – takrat novih raziskovalcev pri slovenski raziskovalni skupnosti. To bi bila lahko posebna zgodba. Pa ostanimo pri študiju. Odhod v Zagreb je pomenil marsikaj, tudi dodatne življenjske stroške in šolnine. Vendar tako se je v meni začela rojevati biotehnologija v širšem pomenu besede, kot sem jo v času magistrskega in doktorskega študija lahko spoznal. Takrat smo na tem nivoju vse študirali iz originalnih del, kot so jih publicirali prvi avtorji. Nekatere članke smo analizirali v originalnih tiskovih, starih tudi sto let. To je bilo pomembno obdobje in stil zagrebške šole takrat, imenovane tudi industrijska mikrobiologija. Mnogo tega znanja je potem pomagalo ustoličiti tovrstne aktivnosti na Biotehniški fakulteti. Mikrobiologija pa je bila vseskozi moja primarna aktivnost, saj sem začel delati takoj na kvasovkah, postavljati zbirko, da bi sploh lahko začel raziskovati... Takrat me je »obsedlo«, da moram najti kvasovke, ki so povezane z razgradnjo škroba (še vedno sem verjel, da bom delal na kruhu). Prof. Adamičeva je videla moje nagnjenje do kvasovk, saj je tudi sama obranila doktorat na kvasovki *Candida albicans*. Moram reči, da se dobro spominjam tistih pogovorov in lepih fotografij, ki sta jih posnela skupaj s prof. Megušarjem. Leta so fotografije visle na hodniku, kjer smo lahko lepo videli psevdomicelij. To me je zelo fasciniralo. Tako sem začel zbirati ali boljše nabirati kvasovke. Izbiral sem

zelo posebne rodove kvasovk, ki rastejo na škrobu: *Schwanniomyces*, *Lipomyces*, *Endomycopsis*. Večino sem pridobil kot darila iz zbirk v Zagrebu, Budimpešti, Bratislavi. Tako je nastajala prva zgodba, ki jo je vodil raziskovalni izziv amilolize škroba s potencialom proizvodnje enoceličnih proteinov. Ta izziv me je peljal naprej na doktorski študij v Zagrebu.

► KLJUČNO NAKLJUČJE.

Ob doktoratu sem uvidel, da bi se bilo treba še česa naučiti, ne nazadnje aktualnega jezika v znanosti, angleščine. Odločitev, da bi šel na podoktorsko specializacijo, je bila tako zelo samoumevna. Naključje je hotelo, da sem spoznal Grahama Stewarta, ki je bil takrat v svetovni komisiji za kvasovke in je bil velik prijatelj prof. Alačevičeve v Zagrebu. Ko

▼ prof. dr. Peter Raspor. Vir: klikni.



je prof. Alačevićeva organizirala svoj znameniti GIM86 (Genetics of Industrial Microorganisms) v Splitu, ki je bil predviden samo teden dni za svetovnim mikrobiološkim kongresom v Manchesteru (Microbe 86), sem sodeloval v programu izvedbe GIM86, kot je bila praksa za magistrske študente biokemijskega inženirstva na PBF (Prehrambeno-biotehnoški

Organizatorji kongresa so uredili bivanje in vse ostalo. Tako sem šel na prvi mednarodni kongres s prvim angleškim posterjem, ki je bil napisan na roko. K temu posterju je prišel prof. Graham Stewart. Z mojo takratno angleščino sva se pogovarjala o amilolitičnih kvasovkah. Hitro mi je bilo jasno, da se pogovarjam z velikim poznavalcem področja. Takrat

»Kot najboljši podiplomski študent tistega leta v Jugoslaviji sem dobil plačano karto v Manchester. Organizatorji kongresa so uredili bivanje in vse ostalo. Tako sem šel na prvi mednarodni kongres s prvim angleškim posterjem, ki je bil napisan na roko.«

fakultet) v Zagrebu. Med tem časom pa smo bili nekateri mladi mikrobiologi izbrani po kriterijih IUMS na podlagi poslanih izvlečkov za aktivno sodelovanje v Manchesteru na kongresu. Kot najboljši podiplomski študent tistega leta v Jugoslaviji sem dobil plačano karto v Manchester.

so se na kongresih začele pojavljati pripombe, kar mi je povedalo, da se pogovarjam s kvasologom, ki sem ga po imenu poznal iz člankov. Mnogo je spraševal, debata je tekla v smeri, da je pripeljala do vprašanja kam na postdoc ... Teden dni za tem dogodkom je profesor predaval v Splitu in sva se spet srečala. Takrat me je direktno povabil, da naj pridem v London, Ontario, na podoktorsko specializacijo. Nekaj mesecev za tem sem šel, družina se mi je pridružila v letu 1988. V času razpadanja Jugoslavije, me je profesor Stewart prepričeval, naj ostanem v Kanadi. Toda ostal sem zvest obljubi, ki sem jo dal sebi. Vrnil sem se v domovino in začel predavati, postavljati katedro za biotehnologijo, se vključil v izvedbo študija mikrobiologije in začel snovati študij biotehnologije in vse ostale zgodbe raziskovanja, ki so izhajale primarno iz nastale zbirke industrijskih mikroorganizmov.

► KDAJ STE ZAČELI S PEDAGOŠKIM DELOM?

V bistvu sem pedagoško začel pomagati pri vajah takoj, ko sem prišel na Biotehniško fakulteto leta 1984. Prof. Adamičeva je bila precej od-

ločna oseba. Nekega dne je rekla: » Drugi teden boste pomagal na vajah.« In sem se moral pripraviti. Določene vaje sem lahko pripravil in vodil, seveda pod njenim očesom. Imel sem nekaj težav z izvolitvijo, zaradi nekaterih običajnih situacij, ki so še danes znane na Biotehniški fakulteti, ampak potem so me seveda izvolili v asistentski naziv in sem čisto legalno opravljal vaje na mikrobiologiji. Ker sem takrat še študiral v Zagrebu in ker je prof. Adamičeva videla področje industrijske mikrobiologije kot potencialno zelo uporabno, je predlagala postavitev tega predmeta v študij živilstva. Udeja-

mogoče še kaj drugega): kako izpeljati vsak teden ta zaplet, da bi kljub »obvezni« kavi šel prevzet otroka od vzgojiteljice in ne od čistilke v vrtcu ... S tem sem imel večno težavo (smeh). Prof. Megušar mi je takrat ponudil in obenem prosil, če bi bil pripravljen pomagati pri postavljanju študija mikrobiologije. To je bila zame izjemna življenjska izkušnja, ne samo mikrobiološka, tudi človeška. Tisto znanje in izkušnje sem pozneje koristno uporabil tudi pri postavljanju študija biotehnologije in dvakratnem vodenju kolegija mikrobiologije. Še danes mi je jasno, da je bila to izjemno poučna šola, čeprav

»Znal sem se dobro obrniti tako kot v laboratoriju kot tudi pred študenti. Mogoče sem malo podedoval to od nje (prof. Adamič), ona je bila precej odločna profesorica, in mogoče sem se tega malo tam priučil.«

njanje tega predmeta me je doletelo, tako sem del tega predmeta tudi predaval od samega začetka. Po izvolitvi v docenta pa sem operativno v celoti že vodil predmet Industrijska mikrobiologija in takrat smo začeli s prvimi diplomanti usmerjenimi v to področje. Seveda so bili skladno s takratno prakso vsi diplomati formalno vodeni s strani profesorice. Moram povedati, da sem imel srečo, da je prof. Megušar, s katerim sva se dobro razumela pogosto namenil čas tudi strokovnemu pogovoru z menoj. Bile so tudi bolj anekdotične zadeve v tem srečevanju. Profesor je namreč naravnost oboževal močno črno kavo, ki je morala biti ob petkih popoldne ob štirih. Tako je vsak petek popoldne kuhal kavo (prav takrat, ko bi jaz moral po hčerko v vrtec...) To je je bila tedensko velika (pre)izkušnja (danes bi rekli stres,

ne vedno lahka. Tudi zato imam tako prof. Megušarja kor prof. Adamičevo v zelo lepem in visokem strokovnem spominu.

► KAJ VAS JE BOLJ OSREČEVALO, PEDAGOŠKO ALI RAZISKOVALNO DELO?

V bistvu oboje, ker če me raziskovalno ne bi vleklo, se ne bi spravil postavljati zbirke industrijskih mikroorganizmov. To je bilo zelo zahtevno in zelo mukotrpno početje v razmerah, ko ni bilo praktično ničesar na voljo. To je bil čas, ko smo bili lačni tuje literature, kemikalij, opreme ... V tem pogledu smo dejansko stradali in z vso zagnanostjo iskali rešitve. Veliko odpovedovanja, veliko težav, pomembneži na oddelku niso razumeli oziroma verjeli, da so mladi sposobni to zadevo sploh speljati. Enako velja za pedagoško delo, vpeljava novih vaj, novih načinov poučevanja, seminarjev ...Tako je

▼ prof. dr. Peter Raspor. Priprava na vzorčenje viskih kvasovk v vinogradu. Vir: osebni arhiv Peter Raspor.



bilo. Najbrž danes mladi tudi enako čutijo prepreke in jih skladno z možnostmi okolja in lastnega znanja rešujejo. Tudi mi smo počeli enako. To nas je vse, ki smo takrat bili na tem nivoju, tudi mene, osrečevalo in izpolnjevalo. Predaval sem vedno z veseljem in predanostjo. Dajati novosti študirajočim, do katerih sem se prebil z velikim odpovedovanjem

»Na mene so zelo vplivali prof. Johanidesova (dr. Vera Johanides) kot prva dama evropske biotehnologije, in njen učenec, prof. Marič, ki je bil tudi moj mentor, ter prof. Alačevičeva, ki je imela profil izredno širokega znanja in je izjemno dobro obvladovala streptomicete in tudi kvasovke.«

marsičesa (tudi s kupovanjem knjig in revij v tujini, ki so bile nato vse darovane knjižnici BF), je bila zame neke vrste nagrada ... Ko se je prof. Megušar odločil, da bom vodil predmet pri mikrobiologiji, in ne njegova kolegica prof. Adamičeva, bi takrat lahko to vodilo v konfliktno situacijo. Vedeti moramo, da je po odhodu prof. Konjajeva katedra za mikrobiologijo prerasla v dve enoti; okoljsko in živilsko mikrobiologijo, v glavnem zaradi različnih pogledov na objekt dela – mikroorganizem. Vendar je bila profesorica ob takratnem vabilu kolege Megušarja zelo razumevala in je rekla: »Če vam je profesor to ponudil, to morate sprejeti, vi ste to sposobni izpeljati v dober predmet za študij mikrobiologije.« Tako sem bil takrat na neki način most med enotama okoljske in živilske mikrobiologije in stvari so z mojega današnjega vidika, zelo dobro in učinkovito potekale. Prof. Megušar je bil navdušen nad konceptom predmetov, ki sem ga predstavil (to so bili Biomasa in sekundarni metaboliti, Bioprocenstvo in Mikrobiologija živil), čeprav na začetku ni bil najbolj

navdušen nad živilsko mikrobiologijo in jo je videl zelo drugače. Vendar sem se trudil z novimi pristopi in predstavil koncept tako, da je dobil znanstvene elemente. Mislim, da je bila tudi prof. Adamičeva vesela, da mi je uspelo spraviti živilsko mikrobiologijo pod streho celotne mikrobiologije, v nekaterih razgovorih je to lepo pokazala. Resnici na ljubo

moram priznati, da sem del tistega znanja, ki je bilo nujno za graditev konceptov, pridobil v Zagrebu in v Londonu. Takrat so na mene zelo vplivali prof. Johanidesova (dr. Vera Johanides) kot prva dama evropske biotehnologije. Zagreb je namreč začel z biotehnologijo leta 1952 kot prvi študij biotehnologije v Evropi. In potem njen učenec prof. Marič, ki je bil tudi moj mentor, in prof. Alačevičeva, ki je imela izredno široka znanja in je izjemno dobro obvladovala streptomicete in tudi kvasovke. Moram priznati, da bi brez zagrebške doktorske šole in londonske podoktorske šole težko naredil to, kar sem v letih, ki so sledila v Ljubljani na Biotehniški fakulteti. Najbrž bi bili rezultati lahko zelo drugačni pri spravljaju teh znanj v krogotok življenja fakultete.

► KAJ JE BIL MED VAŠIMI MIKROBIOLOŠKIMI IZKUŠNjami NAJVEČJE PRESENEČENJE ZA VAS?

Največje presenečenje ... Eno zelo primarnih presenečenj oz. frustracij je bilo, ko sem prišel v Kanado na postdoc. Po planu naj bi delal na amilolitičnih kvasovkah. Resno

sem se pripravil na ta izziv in priletel v London Ontario na petek dober teden dni pred božičem leta 1987. V ponedeljek, prvi dan uradnega začetka na inštitutu LABATT, me je prof. Stewart poklical v pisarno in mi povedal, da projekt na amilolitičnih kvasovkah odpade. Ponudil je dve možnosti: 1) napišeš svoj projekt do petka ali 2) greš delat na Inštitut k dr. D'Amore, in sicer kot tehnik. Najbrž vsak lahko dojamе šok trenutka. Lahko bi se ustrašil in se umaknil na ponujeno mesto in »nekaj« raziskoval ... Še danes se čudim svoji takratni trenutni odločitvi. Mogoče hrabrosti, da sem se spravil pisati projekt. Napisal sem ga v enem tednu. Osredotočil sem se na flokulacijo, ki me je takrat intrigirala, ker sem imel velike težave pri amilolitičnih kvasovkah. Še danes hranim takra-

»V ponedeljek, prvi dan uradnega začetka na inštitutu LABATT, me je prof. Stewart poklical v pisarno in mi povedal, da projekt na amilolitičnih kvasovkah odpade. Ponudil je dve možnosti: 1) napišeš svoj projekt do petka ali 2) greš delat na Inštitut k dr. D'Amore, in sicer kot tehnik. Najbrž vsak lahko dojamе šok trenutka.«

tni zapis projekta, ki ga je (Graham) preletel z očmi in komentiral z »well enough«. Nato ga je poslal v Ottawa na National Research Council in oni so mi odobrili znatno vsoto za dve leti dela. Graham se je pozneje, ko je že bil direktor »Institut of Brewing in Distilling« v Edinburghu in sva komunicirala in se srečevala, znal spomniti na Kanado in tisti čas in spodoben finančni okvir za raziskovalno delo. Pravzaprav si z njim dopisujem od takrat; v zadnjih letih vsaj za novo leto. Enako tudi z vsemi mojimi učitelji in kolegi, ki so še živi, in tudi mojimi nekdajnimi študenti,



tistimi, ki se me spomnijo in mi tudi napišejo kakšno misel ... Dejansko sem potem dve leti delal na tem projektu. Nekaj let nazaj, ko sem pospravljaj, sem naletel na zapis predloga projekta. Ko sem ga

▲ Otvoritev prvega FEMS kongresa v Ljubljani. Vir: osebni arhiv Peter Raspor.

prebral, sem si mislil, pa kako so to odobrili? Morate vedeti, da je bila takratna moja angleščina iz večerne šole, ki sem jo obiskoval tik preden sem šel v Kanado. Ampak ideja je bila očitno dobra in se niso spotikali ob določene zadeve, kot se danes spotikamo v sedanjih evalvacijskih postopkih, kjer je administracija enako pomembna kod unikatnost in prodornost vsebine. Očitno so takratni presojevalci gledali, kaj je bistvo ideje in sporočila v ponujenem projektu. Delo je dobro teklo in nastalo je nekaj patentov, ki so po takratni regulativi pripadali inštitutu

in ne akterjem raziskave. Tako da me na tisti čas dokumentirano spominja samo en znanstveni prispevek z imenom avtorjev. Vse skupaj je zanimiva izkušnja, ki je v mnogočem pomagala, ko sem pozneje postavljala biotehnologijo, da sem ta element »lastnine« vnesel v dodiplomske in podiplomske študije.

► KATERA IZKUŠNJA VAS JE KOT MIKROBIOLOGA NAJBOLJ OBLIKOVALA?

Gotovo me je kot mikrobiologa oblikoval študij živilske tehnologije skozi diplomsko delo, primarno pa me je zaznamovala zagrebška šola, oplemenitena z izkušnjo v Kanadi, ko sem moral napisati projekt in resnično pokazati, kaj je mikroorganizem sposoben narediti oz. bi bil sposoben narediti in to dokazati v eksperimentalnem delu v zelo heterogenem timu, ki je bil usmerjen v preučevanje pivskih kvasovk. Druga izkušnja, ki je dogradila molekularno znanje, je bila, ko sem šel na kratko izmenjavo na Dansko, v pivovarno Carlsberg leta 1991–92 v zaprti oddelku reševati probleme s flokulacijo. Takrat sem se direktno srečal z molekularnimi tehnikami. Koncept gledanja na mikroorganizem iz morfološkega, ki je do takrat prevladoval, se je zvezno prevesil na pogled iz vidika dednine. Nikoli se nisem odpovedal pomembnosti fiziologije, ki se je z leti prevesila v »omike«. To je v meni spremenilo marsikateri pogled in sledile so ideje, proučevanja populacije kvasovk iz različnih vidikov. Če je bilo na začetku v modi izkoriščanje sekundarnih surovin, se je z molekularnimi tehnikami razvilo preučevanje populacij kvasovk. To je bilo usmerjeno v vidike dedne heterogenosti kvasovk v Sloveniji, pa tudi ocetnokislinskih bakterij in nekaterih drugih industrijsko pomembnih bakterij. Seveda ne smemo pozabiti, da so se pogledi na mikrobiologijo temeljito brusili v diskusijah in eksperimentih številnih doktorandov in doktorandov. Pa tudi med diplo-

manti je bilo kar nekaj študentov iz pravega testa, da so doprinali k mikrobiološkemu in osebnostnemu razvoju.

► KAKŠEN JE VAŠ POGLED NA POLOŽAJ MIKROBIOLOGIJE V SLOVENIJI?

V tistih časih (Konjajevo, Megušarjevo/Adamičevo, Likarjevo, Cimermanovo obdobje) so bile mikrobiološke skupine na Univerzi na fakultetah, ki sodijo pod okrilje znanosti v življenju in na dveh institutih. Nekateri skupine so bile kar velike in so imele jasno prepoznavne voditelje. Na Biotehniški je dominiral prof. Megušar, na veterini prof. Batis, na kemijskem inštitutu prof. Cimermanova, na medicinskem mikrobiološkem inštitutu pa prof. Likar in prof. Drinovec ter prof. Gubina, če omenim nekatere ..., bi pa lahko še koga dodal. Poglejte, koliko centrov mikrobiologije je danes nastalo iz teh nekaj poganjkov. To drevo ima mnogo vej, nekatere od teh zelo lepo rastejo in imajo mnogo poganjkov, nimajo pa vse veje toliko plodov, kot bi človek pričakoval. Mogoče se je to mikrobiološko drevo v Sloveniji malo preveč razbohotilo in bi bilo treba poskrbeti, da bi bile nekatere veje močnejše, imele boljše zaledje v mikrobiologiji in bi strmele k simbiozi in ne k antagonizmu. Takrat smo bili, kljub temu da smo bili med seboj kompetitivni, sposobni sestaviti skupaj pomembne projekte, ki so strmeli in vodili v skupno dobro. Recimo sposobni smo bili napisati slovenske knjige, ki smo jih napisali v »panslovanskem duhu«. Tega v današnji populaciji »leaderjev« ni tako jasno zaznati. Če prav vidim, ni celovite pripravljenosti razdajati se za ta element pedagoškega dela. V pedagoškem delu sem se s takim delom kar trudil in naredil nekaj korakov v tej smeri. Tako smo uspeli ohraniti oz. pripeljati skupaj slovenske mikrobiologe. Kljub težkim časom ob razpadu Jugoslavije nismo zapadli v odtujenost in otopečnost ali samozadostnost. Po razpadu

jugoslovanskega mikrobiološkega društva smo hitro organizirali prvi slovenski mikrobiološki kongres na Bledu in se odprli v svet.

Ko govorimo o današnji mikrobiologiji kot vedi, moram reči, da je mikrobiologija v Sloveniji lahko ponosna, da je bila sposobna integrirati vsa bazična znanja, ki vstopajo iz molekularne biologije in biokemije do zavidljivega nivoja. Dodati moram, da so se mikrobiologi, sploh diplomanti mikrobiologije, res izkazali v tem kontekstu kot strokovnjaki z ogromno osnovnega znanja, da so omenjene metode raziskovalnega dela spravili v realno operativno prakso. To si mora Biotehniška fakulteta skupaj s sodelujočimi fakultetami

preveč pristopa, ki temelji na »me too« – jaz to delam, jaz bom pa tudi to delal. Mi smo kljub vsemu samo dvomilijonski narod, tako vsaj mislim, da je precej prostora za izboljšanje in združevanje in sodelovanje na teh nivojih dela tako s sosedi in tudi širše. Mogoče bi k temu odpiranju lahko kaj doprinesel spet mikrobiološki kongres, kot pred 20 leti. Takrat je močno prispeval k temu, da smo vstopili v nove sredine. Če bi to vajo ponovili, se bi, to verjamem, ponovno strukturirali. Menim, da je čas, da bi po dvajsetih letih mogoče res kaj takega naredili. S tem bi pozitivno vplivali na vitalnost mikrobiologije in jo potegnili na naslednji raziskovalni in operativni nivo širšega sveta. Tudi

»Mikrobiologija v Sloveniji je lahko ponosna, da je bila sposobna integrirati vsa bazična znanja, ki vstopajo iz molekularne biologije in biokemije, do zavidljivega nivoja.«

UL, predvsem medicinsko, škodi v ponos. Podobno velja za študijski program biotehnologije. Na žalost, če gledamo določene druge stroke, so premalo naklonjene temu, da bi integrirale sodobna znanja in sodobne tehnike in metode stroke oz. znanstvene veje v svoje delo. Tudi zato je velika prednost v mikrobiologiji, za raziskovalna in operativna dela, ker se izjemno hitro adaptira in koristi sodobna znanja v reševanju realnih (ne samo namišljenih), aplikativnih problemov. Mikrobiologi bi morali poskrbeti, da bi dobili ustrezne komparativne certifikate za določene pozicije v današnji družbi, česar pa nimajo in niso nikoli tega uspeli »spravit skupaj«, tudi zaradi tega, ker nismo uspeli, da bi študij mikrobiologije postal svoj oddelek s svojo hrbtenico in da bi se na ta način samostojno obračal proti svetu. Če gledamo Slovenijo, pa postaja na področju raziskovanja v mikrobiologiji

s pomočjo mikrobiologov, ki smo jih izvozili v globalni svet ...

► KAKŠNO JE VAŠE MNENJE O ŠTUDIJU BIOTEHNOLOGIJE IN MIKROBIOLOGIJE?

Biotehnologija je en segment preseka mikrobiologije, en segment preseka rastlinskega in en segment preseka animalnega sveta, kamor sodi človek. Vsako spreminjanje teh tretjin v prid katerekoli pelje v napačno smer – v debalansiranje in to ni dobro. Moram priznati, da se pri študiju biotehnologije ta odklon že vidi v praksi. Da se razumemo, govorimo o študiju, raziskovanje gre tako po poteh denarja. Tudi pri študiju mikrobiologije bi bilo nujno neke elemente znanja postaviti v celoviti kontekst mikrobiologije. Mikrobiologi nis(m)o tukaj kot učitelji in raziskovalci samo za to, da gradimo lastno pomembnost in lastni raziskovalni vrčiček. Tu smo zato, da odpremo vrata našim naslednikom, da gredo

naprej. Tako sem deloval, ko sem bil aktivno v raziskovalni in pedagoški srenji. Prednost sem dal študentu

»Mi nismo tukaj kot učitelji in raziskovalci samo za to, da delamo lastno krono. Mi smo zato, da odpremo vrata našim naslednikom, da gredo naprej, zato smo tukaj.«

in njegovi viziji njegovega razvoja, ne pa avtoreprodukciji svojih lastnih videnj in apetitov. Samo zato smo pravi učitelji in mentorji tukaj in na teh mestih v študijah mikrobiologije in biotehnologije. Moram priznati, da vidvam kar nekaj strokovnjakov (s spoštljivostjo do njihovega strokovnega profila), ki jim mogoče malo spodleti na tem elementu, ki sem ga ravnokar omenil. Nekaj takih je zraslo tudi v moji raziskovalni sredini ... Tako bi se bilo treba o tej stvari pogovoriti tudi v okviru mikrobiološkega društva in se temeljito pogovoriti v okviru študija.

► NA KAJ STE NAJBOLJ PONOSNI?

Najbolj sem ponosen na ljudi, ki so se razvili v celovite osebnosti z mojo skromno pomočjo in usmerjanjem, ko je bilo to potrebno. Ne samo v strokovnem/raziskovalnem pogledu, tudi v človeškem. Kakorkoli obrnem, je pri meni doktoriralo 55 ljudi, od tega moram povedati, da mi je bila

»Najbolj sem ponosen na ljudi. Kar dobršen del teh ljudi je učiteljev, so pa seveda vmes tudi politiki, visoki strokovnjaki, voditelji firm, uspešni gospodarstveniki in uspešni državni uradniki. Tako mislim, da sem prispeval tej družbi v tem kontekstu kar nekaj profilov in gotovo za učitelja pomembnejšega dosežka ni.«

mati narava naklonjena in je bila približno polovico moških in žensk. Tako da tisti, ki govorijo, da imajo

moški primat na doktorskem nivoju, jim moram takoj pojasniti, da se, izhajajoč iz lastne izkušnje seveda,

motijo. Moški nimajo nobenega primata, ampak so enaki med enakimi, se pravi enaki med ženskami. To sem stalno dokazoval, ko so študentke in študenti prihajali k meni na pogovor. Včasih samo informativno, včasih zelo osredotočeno. Vsakemu od njih sem namenil čas in mu pomagal z izkušnjami. Pogovarjali smo se in skušali najti optimalno rešitev za izziv, ki so ga doživljali. Kar spodoben del teh ljudi je danes učiteljev. Seveda so vmes tudi politiki, visoki strokovnjaki v institutih in podjetjih, lastniki in voditelji firm, uspešni gospodarstveniki in seveda uspešni državni uradniki. Mislim in verjamem, da sem nekaj znanja in veščin pripeljal v našo družbo in državo. Kot učitelj, raziskovalec in mentor sem delal nepolnih 25 let, ko so na BF ugotovili, da sem goden za tretma po ZUJFU. V povprečju sta vsako leto doktorirali dve osebi, ob vseh diplomatih, postavljanju študijev,

katedre in predstojniških, evropskih in ostalih bremenih, ki so bila na mojem hrbtu ... V tem kontekstu je pot-

rebno poudariti, da je v tem naboru kar nekaj strokovnjakov, ki so visoko profilirani in številni med njimi so bili kot študirajoči in so še danes pokončni ljudje. Gotovo za učitelja ni pomembnejšega dosežka, ko dela obračun ... Pri čisto operativnih razi-

»Zelo cenim mikrobiologe, ki so bili pripravljeni dati svoj čas za delo v društvu, me pa boli, ko vidim dobre mikrobiologe, ki si ne utrgajo niti desetinke časa za to, da bi nekaj naredili za skupnost, ki se imenuje mikrobiologija.«

skavah mi je ljubo, da sem imel možnost postaviti zbirko industrijskih mikroorganizmov (to je ta operativna infrastruktura), in da sem zmozel zbrati toliko denarja, da smo začeli z biotehnološkim/bioprocenim laboratorijem in tudi drugim, kjer se sled po mojem nepričakovnem in z moje strani nenačrtovanem odhodu nekako zamegljuje. Kakorkoli, vesel sem, da sem odprl vrata raziskavam naravnih populacij kvasovk. Začelo se je s pivskimi kvasovkami, ki imajo danes za posledico rojevanje malih pivovarn. Nadaljevalo se je z vinskimi kvasovkami po slovenskih regijah, kar je pripeljalo v rojevanje nekaterih vinskih zgodb, ki so relativno dobro sprejete tudi v svetu. Izjemno mi je žal, da zgodbe, ki sem jo odprl sočasno, na populaciji acetobakterij nismo spravili naprej. Vesel sem pa, ko vidim, da gre del te zgodbe naprej v Mariboru in da ni šla čisto v propad, kar se je zgodilo kar nekaj skupinam v Evropi, čeprav je to zelo zanimiv organizem, ne samo z vidika industrije.

Nenazadnje sem vesel, da sem botroval kar nekaj uspešnim slovenskim biotehnološkim podjetjem, ki se danes lepo ohranjajo v svojih poslovnih sredinah. Da ne naštevam vseh, naj omenim samo Podjetje BIA, ki je kot prvo zaoralo biotehnološko ledino še v Jugoslaviji in gre

naprej preko hčerke BIA Separation v globalni svet. So pa še drugi doktorji, ki so se uspešno umestili v podjetništvo ...

Pa seveda, kot učitelj naj na koncu posebej omenim postavljanje diplomskih in podiplomskih študijev

ne samo v Ljubljani, tudi na Dunaju, v Mariboru, ki imajo vsi globoke korenine v mikrobiologiji.

► KAKŠEN JE VAŠ ODNOS DO SLOVENSKEGA MIKROBIOLOŠKEGA DRUŠTVA?

Pozitiven. Zelo na kratko, pozitiven, in tak kar sem rekel: jaz zelo cenim mikrobiologe, tudi tiste, ki so bili pripravljeni izstopiti iz okvirjev in dati svojo pripravljenost za delo v društvu, in moram reči, da me boli, ko vidim dobre mikrobiologe, ko si ne utrgajo niti desetinke časa za to, da bi nekaj naredili za skupnost, ki se imenuje mikrobiologija. Če se za-zrem vase, oz. skozi prehojeno pot, koliko dni in noči sem vložil v to, kar razumem kot celovito mikrobiologijo, potem seveda težko sprejemem,

▼ prof. dr. Peter Raspor, kongres FEMS, Ljubljana 2003. Vir: osebni arhiv Peter Raspor.



da nekateri vidijo res samo sebe in lastno korist.

► **KAKO VAM JE USPEVALO USKLAJEVANJE ZASEBNEGA IN POKLICNEGA ŽIVLJENJA?**

(smeh) ... Tozadevno pravzaprav nisem vedno uspel. Ampak skušal sem dejansko nekako speljati. Če danes gledam iz te perspektive, npr.: ko sem bil generalni sekretar in sem moral biti več kot leto vsak petek, soboto in nedeljo v Delftu (Nizozemska), da sem čez teden bil na fakulteti, se čudim, kako sem to sploh speljal. Ko se danes ozrem nazaj, gledam, premetavam dogodke v glavi in pogosto ne razumem, kako sem lahko vse to zmogel. Gotovo pa ima pri tem pomembno vlogo zvestoba do poslanstva in dela, ki sem jo gradil pri sebi in vcepljal študentom in navduševal najožje sodelavce. Kot pravijo športniki, »brez njih ni športa«. Vsi tisti, in teh ni malo, ki so s srcem in stroko hodili z menoj

»Mene mojstri niso nič »šparali«, takrat v tistih časih se ni noben šel nikamor pritožiti. Se je zgodilo, da sem dobil tudi kakšno klofuto. Vzgojni proces je potekal tudi tako, da si z glavo končal v kotlu z moko.«

in ob meni, najbrž to razumejo. Vsaj upam, da je tako.

► **S ČIM BI SE UKVARJALI, ČE NE BI BILI MIKROBIOLOG?**

No, če ne bi padel v to, saj veste, kje bi bil: bil sem v pekarni v Ajdovščini. To je sicer zanimivo vprašanje, zelo zanimivo vprašanje, kaj bi. Ampak, če ne bi šel v pekarno v Ajdovščino, in sem moral iti, ker ni bilo ne kod ne kam v takratnih družinskih razmerah skromnosti, saj sem moral priti čim prej do kruha ne le zase ... No, potem bi pa bilo zelo zanimivo. Če bi šel na gimnazijo, vprašanje, kam bi se pot zavrtila; takrat smo morali še delati sprejemne izpite, jaz nisem bil odličen v osnovni šoli, bil sem dober.

Torej smo morali delati sprejemne izpite, naredil sem sprejemni izpit za gimnazijo, naredil pa sem tudi sprejemni izpit za elektrotehnično šolo v Ljubljani. Takrat je mene tudi ta poklic privlačil, ampak ker ni bilo denarja, sem se šel pač učiti za peka. Tako sem bil takoj pri kruhu, že prvo noč (smeh).

► **IMATE POKLICNO DEFORMACIJO?**

Mislite z mikrobiologijo? Ravno sedaj me je prišla obiskat moja vnukinja, s katero bova pekla kruh. Čeprav ima 6 let, ve, kaj so kvasovke in zakaj. Sem jo naučil. Drugače pa je tu tudi pranje rok in razkuževanje (razkuževanje bolj zdaj). Ampak če smo pri higieni in pranju rok, to šolo sem »dal skozi« v vajeniškem obdobju in je bila učinkovita. Tako to je. Ko si enkrat v živilski stroki, ki ima za seboj ceh, neki ustaljeni red, ki teče stoletja, potem vedite, da te stvari »štima« . To gotovo velja za peke. Mene in tudi druge vajence

sem to sprejel in to je tam ostalo. Če gledam s stališča takratnih dogodkov, je bilo to samoumevno in meni na kraj pameti ni prišlo, da bi se kot 14-letni otrok doma mami zjokal, ko sem dobil klofuto. Ampak naslednjič nisem več naredil narobe. Ali je bil to najbolj primeren način vzgoje, bi se dalo diskutirati. Kakšno klofuto manj bi tudi lahko dobil, ampak ok (smeh). Je bilo, kar je bilo.

Če ostanem pri vprašanju o poklicni deformaciji, saj me je malo zaneslo ... Danes je sodobno delati kisle kruhe. Delo s kvasnimi nastavki mi je blizu. Vse sedanje razprave o »drožeh« mi pa ravno ne sedijo v strokovno znanje, ki ga imam. Drugih mikrobnih procesov doma ne udeležam: ne vinarim, pa tudi piva ne varim. Sem pa pomagal enim in drugim z nasveti. Nekateri so pos-

»Zavedati se moramo, da smo minljivi. Bolj ko si star, bolj ti je to jasno. Če ti to ni jasno, potem si nor in imaš glavo v pesku. Če pa to sprejmeš, pa se vprašaš, kaj lahko storim, da temu ubežim.«

tali kar dobri, naj rečem zelo dobri. No, seveda je poklicna deformacija je tudi poučevanje – to me še tu pa tam doleti formalno, pa tudi včasih v pravem okolju potegne v neformalno ... poučevanje. Pa me pravi prijatelj spodbudijo, da skrajšam ...

► **KAKŠEN JE VAŠ POGLED NA KORONA-SVET?**

Ko se pojavi nekaj popolnoma novega, kot se je to pojavilo in nas oplazilo, vedno pomislim, da ena lastovka še ne naredi pomladi. Torej se bo pojavljajo še kaj novega, sedaj, ko se tali led in prihajajo na plano virusi, stari 30.000-40.000 let, iz ledene dobe, nekateri so/bodo tudi patogeni. Zavedati se moramo, da smo minljivi. Bolj ko si star, bolj ti je to jasno. Če ti to ni jasno, potem si nor in imaš

glavo v pesku. Če pa to sprejmeš, pa se vprašaš, kaj lahko storim, da temu ubežim. Verjetno je raziskovanje samo en vidik preventivnega in kurativnega delovanja, poučevanje pa drugi, nič manj pomemben. Tretji segment je obnašanje in zgled. Kako se mi obnašamo do matere Narave? Ta vidik je tisti, ki nas bo zaznamoval. Menim, da je korona posegla v naše dnevno življenje in je že stopilo zavedanje, da bo jutri vstopil med ljudi novi patogen, in potem tretji in tako naprej. Nas ljudi je enostavno preveč, če si hočemo ali nočemo to priznati. Mi smo kot biološka populacija presegli kvoto naravo vzdržnega ravnotežja tega sveta. In ker smo kvoto presegli, si sproti izmišljujemo rešitve, kako bi ukanili naravo in sebe oh-

ranili. Do neke mere nam še vedno uspeva. Gotovo je vakcinacija ena od takih poti, ki nam pomaga peljati kolo človeštva naprej z minimalnim kalom, če govorim industrijsko. Količ daleč ga bomo še vrteli na Zemlji samo v lastni prid, pa je vprašanje Narave z veliko začetnico. Nobena stvar ni večna, tudi mi ne. To nas bo gotovo zaznamovalo v našem razmišljanju. Mene je dejansko v zadnjem letu to močno pretreslo. Zatekel sem se k svinčniku in papirju in napisal desetine haikujev na to temo – da bi ubesedil razmišljanja in izzive in tesnobe. Podobno sem poskusil z epom o Viroslavu, ki odlikuje moč korona virusa v nekoliko poljudnejšem kontekstu. Naj omenim ti dve

zgodbi. Jih je še nekaj ... To so načini, s katerimi skušam »običajniku« odpreti oči, kako resni so ti problemi in izzivi. Kdo dela narobe, če kdo? Ali imamo pravico vsak drugače misliti? Verjetno, da, saj tudi živali mislijo drugače, ena teče sem, ena teče tja, mar ne? Skratka, tukaj je znaten kup dilem, s katerimi se je začelo srečevati človeštvo, ki prihaja v točko preloma lastne civilizacije. Vse, kar se dogaja, vodi samo še denar in politika današnjega časa nima nobene

Spomin človeka, bi rekel, je velika zagonetka. Kako smo si mi ljudje sposobni prikrojiti resnico ... In to sem doživel tudi v svoji 30-letni zgodbi mikrobiologije na Biotehniški fakulteti. In zgodi se, da se s kom pogovarjaš in le-ta reče, ali da je pozabil ali pa da nič ne ve o tem. Ampak to nas je teplo že v času faraonov, po koncu rimskega cesarstva, ko smo uničili civilizacijo in pozabili vrednote. In zdaj se nam dogaja podobno, ker pozabljamo in zanemar-

»Pozabljamo na sočloveka. Tako hitro, kot se ekran izklopi, tako hitro pozabimo na tiste, ki so na respiratorjih, kot na tiste, ki so ubiti v vojnah. Saj ta fenomen ni od danes. Spomin človeka, bi rekel, je velika zagonetka. Kako smo si mi ljudje sposobni prikrojiti resnico...«

moči več, da karkoli naredi. Vsaj tako se odraža v stanju okrog nas.

► SE VAM ZDI, DA V TEJ SITUACIJI POZABLJAMO NA KAJ?

Ja, pozabljamo na sočloveka. Tako hitro, kot se ekran izklopi, tako hitro pozabimo na tiste, ki so na respiratorjih, kot na tiste, ki so ubiti v vojnah. Saj ta fenomen ni od danes.

jamo osnovne civilizacijske vrednote. Zame je bila vedno največja vrednota posredovati znanje naprej in se prepričati, ali je bilo to znanje pravilno razumljeno. In tega učitelji ne smemo zavreči niti zanemarjati v vsakodnevnem opravilu poučevanja.

► POZNATE KAKŠNO ZANIMIVO ANEKDOTO IZ SVETA MIKROBIOLOGIJE?

Seveda se je v letih nabralo tudi nekaj anekdot. Vendar ste ta pogovor vodili tako strokovno in strukturirano, da bi zaključil z zahvalo vašim vprašanjem in trudu, da ste me poslušali in beležili. Anekdote bom pa pustil za kdaj drugič, če nam bodo čas in okoliščine mile, se bomo ob njih nasmejali. Mogoče pa lahko podelim z vami eno pesmico, ki sem jo pred kratkim poslal izbranim mikrobiološkim kolegicam oz. kolegom. Mogoče je v tem heretičnem času še najbolj primerna za zaključek ...

SITO IN LJULJKA

Brez sita ni moč ločiti ljuljke od žita.
In če se ta proč ne spravi,
še najboljše seme se zapravi.

Sejalci morajo ljuljko odstraniti.
Zato nikar se sita sramovati ali bati,
če želja je dobro letino obrati.

Če gospodar do sejalca ni zaupljiv
in do sita zahteven in spoštljiv,
bo še najboljše seme izgubil.

Sito ostaja za modre, poštene,
delavce strokovno vzgojene,
resno orodje, ki bistvo dobi
in ga sejalec nikdar ne taji.

A če želja iskrena je, da žito rodi,
sejalci sebičnosti ne popuste,
sicer jih ljuljke neslišno peste,
dokler njih same ne pogube.

(Peter Raspor, 16. 3. 2021)

▼ prof. dr. Peter Raspor v Laboratoriju za bioprocese BF UL. Vir: osebni arhiv Peter Raspor.



Intervju mi je bil v čast in v veliko veselje, saj je bil prof. Raspor tudi moj profesor. Bil je strah in trepet študija in izpita pri predmetu Biotehnologija smo se strašansko bali. Za nas je bil bajeslovno bitje nekje med sanjami in resničnostjo - na primer, vsi smo sanjali, da bomo naredili izpit, pa ga potem mnogi niso. Večkrat. Kot študenti se nismo niti zavedali, kaj vse je prof. Raspor storil za nas, za našo prihodnost, preko postavitve študija, zasnove predmetov

in prenosa znanja, ki ga je pridobival s svojimi bogatimi izkušnjami doma in v tujini. Tega se začneš zavedati mnogo pozneje. In ko zdaj podrobneje berem njegov življenjepis in njegove dosežke, se obrnem nazaj na svoja študentska leta in se mi zazdi, da smo mogoče pa imeli prav in je vseeno — bajeslovno bitje. Iskrena hvala za vse.

Polonca

Strokovni članek**Higiensko stanje vrtcev v oddelkih prvega starostnega obdobja**

Maša Štular¹, Urška Jamnikar-Ciglencič², Stanka Vadnjal², Majda Biasizzo², Urška Henigman², Mojca Jevšnik¹

¹Zdravstvena fakulteta Univerze v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana;

²Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, strakl.masa@gmail.com

Vrtci predstavljajo okolje, v katerem se pogosto širijo nalezljive bolezni. Namen raziskave je bil analizirati higiensko stanje površin, opreme, igrač in rok strokovnih delavk ter ugotoviti higienske navade glede umivanja rok pri strokovnih delavcih in otrocih prvega starostnega obdobja.

S pomočjo opazovalne liste smo izvedli opazovanje strokovnih delavk, kako si med delovnim procesom umivajo in po potrebi razkužujejo roke. Istočasno smo pri otrocih prvega starostnega obdobja opazovali, kako izvajajo umivanje rok med bivanjem v vrtcu. V izbranih vrtcih smo z odvzemom vzorcev brisov na snažnost iz vnaprej določenih vzorčnih mest ugotavljali prisotnost bakterij *Staphylococcus aureus*, streptokokov, enterobakterij in skupnega števila mikroorganizmov pred izvedenem čiščenju in po njem ter morebitnem razkuževanju. Z odkritim opazovanjem smo ugotovili, da strokovne delavke ustrezno skrbijo za higiensko prakso, prav tako so v veliko pomoč otrokom pri umivanju rok. Iz rezultatov brisov rok vzgojiteljic in pomočnic vzgojiteljic je razvidno, da je bila bakterija *S. aureus* poleg streptokokov in enterobakterij najpogostejše prisotna na rokah vzgojiteljic in v enem primeru pri pomočnici vzgojiteljice. Na določenih površinah so bili po čiščenju največkrat najdeni streptokoki, sledile so bakterija *S. aureus* in enterobakterije.

V vrtcih je vzdrževanje higiene površin, opreme in igrač zelo pomembno, vključno z doslednim umivanjem in po potrebi razkuževanjem rok strokovnih delavk in umivanjem rok otrok. Tako strokovne delavke kot otroci bi za doseg učinkovito umitih rok morali podaljšati čas umivanja rok. Obstoječa načrta čiščenja in razkuževanja površin, opreme ter igrač sta v izbranih vrtcih ustrezno tehnično pripravljena, vendar izvedba čiščenja v enem vrtcu ni bila dovolj učinkovita.

Ključne besede: vrtci, bakterije, higiena, umivanje rok, razkuževanje rok, čiščenje, razkuževanje

Uvod

Vrtci predstavljajo zaradi povečane gostote otrok idealno okolje za širjenje nalezljivih bolezni, zato je vzdrževanje higiene površin, opreme in igrač še kako pomembno, vključno z doslednim umivanjem in po potrebi razkuževanjem rok strokovnih delavk in umivanjem rok otrok. Otroci veljajo še za posebej ranljivo populacijo, saj raziskave kažejo, da pri otrocih, mlajših od 5 let, prihaja do nesorazmerno visokega števila bakterijskih črevesnih okužb [1]. Otroci običajno razvijajo svoje higienske navade že na začetku svojega življenja, zato je pomembno, da strokovni delavci v vrtcih zagotovijo ustrezno spodbujanje higienskih navad.

Pravilnik o normativih in minimalnih tehničnih pogojih za prostor in opremo vrtca narekuje, da mora biti za prostore, kjer poteka dejavnost predšolske vzgoje, in za opremo izdelan načrt rednega vzdrževanja in čiščenja. Za preverjanje tega se vodi evidenca [2]. Z namenom preprečevanja prenosa mikroorganizmov je treba igrače in ostale površine, ki

pridejo v stik z otroki, redno čistiti in po potrebi razkuževati, po načrtu čiščenja in razkuževanja [3].

Roke so glavni prenašalci patogenih mikroorganizmov, zato je zelo pomembno, da si strokovni delavci po vsakem nečistem opravilu temeljito umijejo roke po standardiziranem postopku, v primeru epidemioloških indikacij pa se svetuje še razkuževanje rok. Umivanje rok je stroškovno učinkovito in preprost ukrep za preprečevanje nalezljivih bolezni po vsem svetu [4].

Dosledno in pogosto umivanje rok pri strokovnih delavcih in otrocih lahko prispeva k zmanjšanju respiratornih in črevesnih okužb za skoraj tretjino. V skladu z nacionalnimi smernicami glede higiene rok bi si morali otroci umiti roke pred obrokom, po uporabi stranišča in po zunanjih aktivnostih oziroma po vsakem nečistem opravilu. Slednje so na podlagi opazovanja preverjali van Beeck in sodelavci v 115 izbranih vrtcih (2318 otrok in 231 strokovnih delavcev) [5]. Poleg higienskega vedenja otrok so proučevali higienske pripomočke za izvedbo umivanja rok (tekoče milo, papirnate brisačke



◀ Vrtec. Slika je simbolična.
Vir: Creative Commons.

itd.). Raziskovalci so z opazovanjem prišli do sklepa, da 31 % otrok upošteva smernice glede umivanja rok. Odstotek otrok, ki si umiva roke po uporabi stranišča in po zunanjih aktivnostih, je znašal 48 %. Najmanj so si otroci umivali roke pred obrokom, in sicer samo v 15 %. V 38 % v igralnicah ni bilo tekočega mila na doseg rok otrok, 17 % igralnic pa ni imelo na voljo papirnatih brisačk. V več kot 40 % igralnic ni bilo ustreznih higienskih pripomočkov za roke [5].

Ključno vlogo pri širjenju črevesnih okužb in okužb dihal igra kontaktni prenos prek onesnaženih rok in predmetov [5]. Bakterije lahko preživijo na površinah in se naknadno prek stika prenesejo na roke. Preživetje mikrobov na neživih površinah je odvisno od različnih dejavnikov, in sicer od vrste mikroba, relativne vlažnosti ali vsebnosti vlage, ki je prisotna na površini, temperature in materiala, iz katerega je površina, in njegovih lastnosti. Bakterije običajno najdemo na poroznih površinah pri vlažnih pogojih [6].

Enterobakterije iz družine *Enterobacteriaceae* so vzrok številnih črevesnih bolezni, tudi sepse in okužbe sečil [1]. Nekatere med njimi spada jo med intestinalne patogene, druge pa med oportuniste, ki prizadenejo ljudi z oslabiljenim imunskim sistemom [7]. Za najpogostejše povzročitelje bakterijskih okužb pri ljudeh veljajo streptokoki, ki povzročajo angino, pljučnico, škrlatinko in šen. Okužbe, ki jih povzročajo streptokoki, lahko potekajo kratek čas in so pri tem blage, lahko pa so zelo hitre, pri čemer je življenje obolelega ogroženo. Bakterije vrste *S. aureus* se nahajajo praktično povsod, v zemlji, zraku, vodi in na površinah. Primarni izvori stafilokokov pri človeku so nosna votlina, gnojne rane in vneto

grlo, lahko so na koži, v očeh in prebavnem traktu, od koder prehajajo v zrak, na obleko in na druga mesta [8].

Namen naše raziskave je bil analizirati higiensko stanje površin, opreme, igrač in rok strokovnih delavk ter ugotoviti higienske navade glede umivanja rok pri strokovnih delavcih in otrocih v oddelkih prvega starostnega obdobja izbranih slovenskih vrtcev.

Materiali in metode

V praktičnem delu raziskave smo s pomočjo opazovalne liste analizirali higiensko stanje izbranih vrtcev (vrtec A in B) s poudarkom na izvedbi čiščenja in umivanja rok strokovnih delavk in otrok v oddelkih prvega starostnega obdobja. V odkrito opazovanje je bilo vključenih šest oddelkov prvega starostnega obdobja dveh izbranih vrtcev.

Na podlagi izvedenega opazovanja in spremljanja higienskih kriterijev smo ocenili kritične površine v izbranih vrtcih. Tako smo izmed šestih opazovanih skupin izbrali tri skupine, kjer smo z brisi na snažnost odvzeli vzorce iz naslednjih vzorčnih mest:

- igrač gladkih površin,
- mize,
- blazine,
- plezalna igrala,
- pipe,
- previjalna miza,
- kahlica,
- klop,

-roke vzgojiteljice ter pomočnice vzgojiteljice.

Po vsakem vzorčenju smo odvzete vzorce brisov ustrezno transportirali (hladilna torba s hladilnimi telesi, umerjenim termometrom in zapisnikom) v akreditirani laboratorij Inšti-

tuta za varno hrano, krmo in okolje na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani, kjer so potekale nadaljnje mikrobiološke analize.

»Higienska praksa strokovnih delavk v izbranih vrtcih je ustrezna, higienske navade otrok pa relativno dobre, vendar bi bilo za doseg učinkovitejšega umivanja rok treba podaljšati čas umivanja rok pri otrocih.«

Pred izvedenim čiščenjem in po njem ter morebitnem razkuževanju smo ugotavljali prisotnost naslednjih bakterij, katere smo z uporabo masne spektrometrije z aparaturom MALDI-TOF tudi determinirali:

- *S. aureus*,
- streptokoki,
- enterobakterije,
- in skupno število mikroorganizmov SŠMO.

Na podlagi mikrobioloških analiz smo ovrednotili rezultate in strnili glavne ugotovitve higienskega stanja oziroma učinkovitosti programov čiščenja in razkuževanja površin, opre-

me in igrač ter izbranimi vrtcema podali predloge oziroma smernice za izboljšave.

Rezultati in diskusija

Pri odkritem opazovanju umivanja in morebitnega razkuževanja rok strokovnih delavk med delovnim procesom smo s pomočjo opazovalne liste ugotovili, da:

- so strokovne delavke nadzor nad umivanjem rok pri otrocih v posamezni skupini izvajale ustrezno,
- je bila tehnika umivanja rok pri strokovnih delavkah in otrocih ustrežna,
- so tekoče milo strokovne delavke in otroci uporabili pri vsakem umivanju rok,

▼ Tabela 1: Rezultati brisov rok prvega vzorčenja v treh oddelkih izbranih vrtcev.

BRISI ROK		Enterobakterije	Koagulaza pozitivni stafilokoki	Streptokoki	Determinacija drugih bakterijskih izolatov
Roka vzgojiteljice (vrtec A, oddelek 1)		ni najdeno	najdeno	ni najdeno	
	determinacija	/	<i>Staphylococcus aureus</i>	/	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Roka pomočnice vzgojiteljice (vrtec A, oddelek 1)		ni najdeno	ni najdeno	najdeno	
	determinacija	/	/	<i>Streptococcus parasanguinis</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Roka vzgojiteljice (vrtec B, oddelek 2)		ni najdeno	najdeno	ni najdeno	
	determinacija	/	<i>S. aureus</i>	/	<i>S. epidermidis</i>
Roka pomočnice vzgojiteljice (vrtec B, oddelek 2)		najdeno	ni najdeno	ni najdeno	
	determinacija	<i>Enterobacter cloacae</i>	/	/	
Roka vzgojiteljice (vrtec B, oddelek 3)		ni najdeno	ni najdeno	ni najdeno	
	determinacija	/	/	/	<i>S. epidermidis</i> , <i>B. cereus</i>
Roka pomočnice vzgojiteljice (vrtec B, oddelek 3)		ni najdeno	ni najdeno	ni najdeno	
	determinacija	/	/	/	

- v obeh vrtcih ustrezno vodijo evidence o pranju igrač, evidence čiščenja in vzdrževanja prostorov ter opreme.

Iz tega sledi ugotovitev, da je bila higienska praksa strokovnih delavk v izbranih vrtcih ustrezna in da so higienke navade otrok relativno dobre, vendar bi bilo za doseg učinkovitejšega umivanja rok treba podaljšati čas umivanja rok pri otrocih. Na podlagi različnih študij so raziskovalci dokazali, da se je s pravilnim postopkom umivanja rok zmanjšal odstotek driske za 42–47 % in pojavnost pljučnice pri otrocih, mlajših od 5 let, za 50 % [9].

Pri mikrobioloških analizah vzorcev je iz rezultatov brisov rok vzgojitelj in pomočnik vzgojitelj (tabela 1) razvidno, da:

- je na rokah vzgojiteljic bila najpogostejše prisotna bakterija *S. aureus*,
- so na rokah pomočnic vzgojiteljic bili najpogostejše prisotni streptokoki (izolati *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus oralis* in *Streptococcus salivarius*) in izolirana bakterija *Enterobacter cloacae*.

Kot izhaja iz zgornjih rezultatov, je bil na podlagi mikrobioloških analiz postopek umivanja rok pri nekaterih strokovnih delavkah neustrezen.

Na določenih površinah pred čiščenjem in po njem (igračke gladkih površin, pipa, miza, plezalna igrala, previjalna miza, klop) je bila največkrat ugotovljena prisotnost naslednjih mikroorganizmov (tabela 2):

- streptokoki, *S. parasanguinis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. cristatus*, *S. salivarius*, *S. vestibularis* in *S. sanguinis*,

- sledila je bakterija *S. aureus*,

- prisotnost enterobakterij smo v primerjavi s prvim vzorčenjem dokazali večkrat, in sicer na plezalnih igralih, klopi ter na kahlci (izolirana *Proteus mirabilis* in *Escherichia coli*),
- vrednosti parametra SŠMO so bile v dveh oddelkih izbranih vrtcev višje v primerjavi z enim izmed oddelkov. Na nekaterih površinah je bilo po čiščenju v enem vrtcu prisotnih več patogenih mikroorganizmov kot pred čiščenjem, kar pripisujemo slabi izvedbi čiščenja s strani strokovnih delavk in čistilk.

Miza in pipa v drugem vrtcu sta bili ustrezno očiščeni, saj bakterije *S. aureus* po čiščenju ni bilo. Ravno nasprotno so dokazali Ibfelt in sodelavci, saj na nobenem izmed vzorčnih mest (blazine, igrače in miza) niso našli bakterije *S. aureus* [10]. V našem primeru je bila bakterija *S. au-*

reus samo s čiščenjem odstranjena z mize in pipe, medtem ko so Jimenez in sodelavci pri testiranju učinkovitosti različnih dezinfekcijskih sredstev za razkuževanje površin in igrač v vrtcu ugotovili, da je imela bakterija *S. aureus* v primerjavi z ostalimi testiranimi bakterijami večji delež preživetja [3]. Iz tega lahko sklepamo, da je bakterija *S. aureus* odpornejša na razkužila in da imajo v drugem vrtcu, konkretno za mize in pipe, ustrezna sredstva za čiščenje.

Zaključek

Na podlagi dobljenih rezultatov smo izbranimi vrtcema za zmanjševanje bakterijskih okužb svetovali, da že v prvi fazi omejijo širjenje bakterij na način, da strokovne delavke dosledno in pravilno izvajajo umivanje rok ter spodbujajo otroke k pogostemu in doslednemu umivanju rok. Menimo, da je vloga strokovnih delavk ključnega pomena pri prenašanju ustreznega znanja na mlajše generacije, ki se učijo predvsem s posnemanjem odraslih in z njihovim zgledom.

Literatura

1. Staskel DM, Briley ME, Field LH, Barth SS. Microbial evaluation of foodservice surfaces in Texas child-care centers. *Journal of the American Dietetic Association*. 2007;107(5):854–859.
2. Pravilnik o normativih in minimalnih tehničnih pogojih za prostor in opremo vrtca. Uradni list RS, št. 73/00, 75/05, 33/08, 126/08, 47/10, 47/13, 74/16 in 20/17. 2000
3. Jimenez M, Martinez CI, Chaldez C. Disinfection alternatives for contact surfaces and toys at child care centers. *International journal of environmental health research*. 2010;20(6):387–394.
4. Damayanti S, Askreny A, Ariyani A. Comparison the number of bacteria between washing hands using soap and hand sanitizer as a bacteriology learning resource for students. *Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia*. 2017;3(3):258–265.
5. van Beeck AHE, Zomer TP, van Beeck EF, Richardus JH, Voeten H A CM, Erasmus V. Children's hand hygiene behaviour and available facilities: an observational study in Dutch day care centres. *The European Journal of Public Health*. 2015;26(2):297–300.
6. Bright K R, Boone S A, Gerba CP. Occurrence of bacteria and viruses on elementary classroom surfaces and the potential role of classroom hygiene in the spread of infectious diseases. *The Journal of School Nursing*. 2010;26(1):33–41.
7. Jenkins C, Rentenaar RJ, Landraid L, Brisse S. Enterobacteriaceae V: Cophen J, Powderly WG, Opal SM, (ur). Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8th edition. Atlanta: Elsevier Inc., 2017;1564–78.
8. Nacionalni inštitut za javno zdravje. Stafilokokni enterotoksin. 2016. Dostopno na: <http://www.nijz.si/sl/stafilokokni-enterotoksin> <2. 4. 2019>.
9. Liu X, Zhao Z, Hou W, Polinder S, van Beeck EF, Zhang Z, Zhou Y, Liu G, Xie X, Cheng J, Richardus JH, Erasmus V. A multimodal intervention to improve hand hygiene compliance via social cognitive influences among kindergarten teachers in China. *PLoS one*. 14(5).
10. Ibelt T, Englund EH, Permin A, Madsen JS, Schultz AC, Andersen LP. International perspectives. Presence of Pathogenic Bacteria and Viruses in the Daycare Environment. *Journal of environmental health*. 2015;78(3):24–29.

▼ Tabela 2: Prisotnost izbranih mikrobioloških parametrov na pipi v posameznem oddelku izbranih vrtcev.

BRISI SANITARU: pipa		Enterobakterije	Koagulaza pozitivni stafilokoki	Streptokoki	SŠMO (CFU/površina)	Determinacija drugih bakterijskih izolatov
VRTEC A, oddelek 1	PRED ČIŠČENJEM	ni najdeno	ni najdeno	ni najdeno	2.400	
	Determinacija	/	/	/	/	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Streptococcus parasanguinis</i> , <i>Staphylococcus pasteuri</i>
	PO ČIŠČENJU	ni najdeno	ni najdeno	najdeno	600	
	Determinacija	/	/	<i>Streptococcus salivarius</i>	/	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus warneri</i>
VRTEC B, oddelek 2	PRED ČIŠČENJEM	najdeno	najdeno	najdeno	7.500	
	Determinacija	<i>Escherichia coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	/	<i>S. warneri</i>
	PO ČIŠČENJU	ni najdeno	ni najdeno	ni najdeno	<50	
	Determinacija	/	/	/	/	
VRTEC B, oddelek 3	PRED ČIŠČENJEM	ni najdeno	ni najdeno	ni najdeno	150	
	Determinacija	/	/	/	/	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus hominis</i>
	PO ČIŠČENJU	ni najdeno	ni najdeno	ni najdeno	ni najdeno	
	Determinacija	/	/	/	/	

Strokovni članek**Sumljive pošiljke z belim prahom v Sloveniji – sum na bioterorizem**

Jana Avberšek¹, Miša Korva², Bojan Papić¹, Miroslav Petrovec², Tatjana Avšič Županc², Tina Pirš¹, Matjaž Ocepek¹, člani intervencijske skupine IMP – VF[&] in IMI – MF[#]

¹ Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

² Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[&] Člani intervencijske skupine IMP – VF: Majda Golob, Igor Gruntar, Maja Kavalič, Brane Krt, Darja Kušar, Jasna Mičunović, Urška Zajc, Irena Zdovc

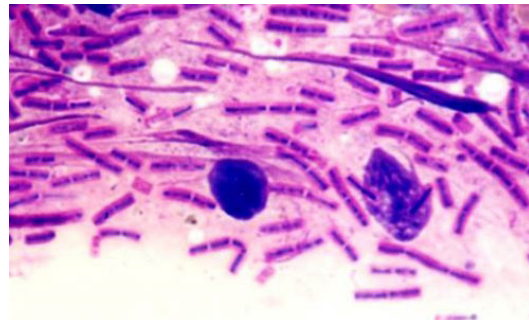
[#] Člani intervencijske skupine IMI – MF: Tjaša Cerar Kišek, Mateja Jelovšek, Rok Kogoj, Marko Kolenc, Katarina Resman Rus, Martin Sagadin, Andrej Steyer, Tina Uršič
jana.avbersek@vf.uni-lj.si

Bioterorizem je namerna uporaba bakterij, virusov ali toksinov za povzročitev bolezni ali smrti pri ljudeh, živalih ali rastlinah. Ogroženost Slovenije zaradi bioterorističnih napadov naj bi bila po ocenah pristojnih služb nizka, vendar je ni mogoče popolnoma zanemariti.

Uprava Republike Slovenije za zaščito in reševanje je pripravila državni načrt za pravočasen, strokoven, nadzorovan ter koordiniran odziv na pojav bioterorizma v Sloveniji. Izrednega pomena je tudi zanesljiva laboratorijska analiza in pravilna prepoznava potencialnega bioterorističnega agensa, ki jo izvajata intervencijski skupini Medicinske in Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. V zadnjih devetih letih smo posredovali že 142-krat, vendar v nobeni sumljivi pošiljki nismo ugotovili potencialnih bioterorističnih agensov.

Ključne besede: bioterorizem, antraks, pisemske pošiljke, intervencija

▼ Levo: *Bacillus anthracis* na krvnem agarju. Vir: VF – IMP.
Desno: Mikroskopski preparat *Bacillus anthracis* iz tkiva okužene živali (povečava 1000x). Vir: VF – IMP.

**Uvod in zgodovina bioterorizma**

Bioterorizem je vsaka namerna uporaba patogenih mikroorganizmov ali njihovih toksinov v splošni populaciji. Namen je povzročiti obolenje ali smrt pri ljudeh, živalih ali rastlinah. Bioteroristični napadi so običajno povezani z ideološkimi cilji posameznikov ali skupin. Njihov namen je pri ljudeh povzročiti paniko, množične žrtve in gospodarske izgube [1]. V primerjavi s klasičnimi terorističnimi sredstvi je cena izdelave bioloških orožij relativno nizka, saj so mikroorganizmi razmeroma dostopni in enostavni za proizvodnjo v velikih količinah, mogoče je enostavno širjenje (npr. preko aerosola), z enkratno uporabo lahko škodujejo velikemu številu ljudi, ob prvi uporabi pa jih je težko ugotoviti, saj so prvi klinični znaki bolezni lahko podobni epidemijam običajnih bolezni [2, 3]. Biološke agense delimo v tri različne skupine glede na razpoložljivost, enostavnost proizvodnje in širjenja ter tveganje ki ga predstavljajo za posameznika [4, 5]. V skupini A, ki predstavljajo največje tveganje, so *Bacillus anthracis*, toksin *Clostridium botulinum*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, virus črnih koz in virusi hemoragičnih mrzlic [4]. Javni zdravstveni sistemi morajo biti dodatno pripravljeni, da pravočasno prepoznajo odstopanja od običajnih epidemij, ki jih povzročajo različni mikroorganizmi. Pomembna je tudi ustrezna opremljenost laboratorijev z vpeljanimi diagnostičnimi metodami in usposobljenim kadrom [2, 3, 6].

Biološko orožje so uporabljali že v časih pred našim štetjem pri osvajanju ozemlja ali vojskovanju. Plemena na otoku Vanuatu v Oceaniji naj bi uporabljala puščice, kontaminirane s tetanusom, Hanibal zaboje s strupenimi kačami, ki jih je odvrget na

sovražnikove ladje, Grki, Rimljani in Perzijci pa so vodne izvire sovražnikov zastrupljali s trupli ljudi in živali. Enako taktiko so kasneje uporabili celo Američani med državljansko vojno. V 14. stoletju, med epidemijo kuge, so Mongoli (Zlata horda) katapultirali trupla bolnikov preko obzidja, da so premagali nasprotnike v mestu Kaffa (polotok Krim). Leta 1495 so španski vojaki prodajali Francozom vino, ki so ga zmešali s krvjo gobavih bolnikov. Uporaba podobnih pristopov se je nadaljevala tudi med 1. svetovno vojno, zato je več držav leta 1925 podpisalo t. i. Ženevski protokol, ki prepoveduje uporabo kemičnega in biološkega orožja v vojni. Vendarle so Japonci med 2. svetovno vojno v kitajski vasi zastrupili vodni vir s povzročitelja kolerice in tifusa ter kontaminirali oblačila vojnih ujetnikov z različnimi patogenimi bakterijami. Šele leta 1972 se je s podpisom Konvencije o biološkem in toksičnem orožju, ki prepoveduje razvoj, proizvodnjo in kopičenje mikroorganizmov ali toksinov za namen napadov, končalo ustrahovanje med državami. Kljub prepovedi nekatere države niso povsem prekinile raziskav, zato se je v tem času razmahnil nekontroliran in skrbno prikrit razvoj biološkega orožja. Leta 2001 je tako prišlo do ponovnega bioterorističnega napada v ZDA, ko je bilo več pisemskih pošiljk, kontaminiranih s sporami *B. anthracis*, poslanih politikom in novinarjem. Okuženih je bilo 22 ljudi, od tega jih je pet umrlo, več kot 32.000 ljudi pa je prejelo profilaktično antibiotično zaščito [1].

Uporaba orožja za množično uničevanje v teroristične namene je realna grožnja varnosti sodobnega sveta, vendar pa je trenutno verjetnost bioterorističnega napada v Sloveniji relativno nizka [7]. Vendarle je tudi pri nas nujna pripravljenost ob rednem usposabljanju in izobraževanju

nju osebja, ki je ključna za ublažitev posledic morebitnih bioterorističnih napadov.

Postopek ukrepanja ob intervenciji zaradi suma uporabe bioterorističnega agensa

Ko oseba prejme sumljiv paket ali pošiljko, o tem obvesti policijo ali regijski center za obveščanje. Intervencija se začne z aktivacijo različnih ekip: pristojne policijske postaje, gasilske enote širšega pomena (GEŠP), enote za protibombno zaščito ter

»Če pisemska pošiljka vsebuje prašnato snov, izolirano nukleinsko kislino pomnožujemo s PCR v realnem času za dokazovanje genov *rpoB*, *capC* in *pag* bakterije *B. anthracis*.«

intervencijskih skupin Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete (IMP–VF) in Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete (IMI – MF). Te poskrbijo za zavarovanje območja in oseb, ki so bile v stiku s pošiljko, in vzorčenje. Posamezno intervencijsko skupino IMP – VF/IMI – MF sestavljata dva delavca, ki skupaj pokrivata klasično in molekularno diagnostiko potencialnih bioterorističnih mikroorganizmov. Intervencijska skupina IMP – VF/IMI – MF v laboratoriju 3. stopnje biološke varnosti izvede mikrobiološko analizo prejetega vzorca. Gasilci pustijo kraj dogodka zavarovan, dokler iz laboratorija ne dobijo delnih rezultatov molekularnih preiskav (po približno treh urah). Mikrobiološka analiza je navadno končana v 24–48 urah.

Laboratorijska analiza pošiljk

V skladu z državnim načrtom zaščite in reševanja ob uporabi orožij ali sredstev za množično uničevanje v teroristične namene oziroma ob terorističnem napadu s klasičnimi sredstvi imata oba laboratorija izdelana interna algoritma diagnostike potencialnih bioterorističnih agensov [7].

Vsebinsko pisemske pošiljke vedno analiziramo s klasičnimi in molekularnimi mikrobiološkimi metodami.

Najprej iz vsebine pisemske pošiljke izoliramo nukleinsko kislino za hitro preliminarno molekularno analizo. Če pisemska pošiljka vsebuje prašnato snov, izolirano nukleinsko kislino pomnožujemo z verižno reakcijo s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) v realnem času za dokazovanje genov *rpoB*, *capC* in *pag* bakterije *B. anthracis* [8]. Izolirano nukleinsko kislino analiziramo tudi s PCR, v katerem pomnožujemo 320 bp dolg odsek gena za 16S rRNA [9]. Ta gen je prisoten pri vseh bakterijah, zato po določanju njegovega nukleotidnega zaporedja in njegovi primerjavi z bazo podatkov lahko identificiramo pomnoženo bakterijsko vrsto. Vsebinsko pisemske pošiljke vzporedno nasadimo tudi na trdna in tekoča bakteriološka gojišča (krvni agar, čokoladni agar, Schaedlerjevo gojišče in tekoče gojišče TSB). Vse

sumljive kolonije identificiramo z masnim spektrometrom MALDI-TOF (Bruker, Nemčija).

standardizacije celotnega postopka od priprave vzorca do bioinformacijske analize. Zaradi kompleksnosti te metode in specifičnega predho-

»Ko oseba prejme sumljiv paket ali pošiljko, o tem obvesti policijo ali regijski center za obveščanje. Intervencija se začne z aktivacijo različnih ekip: pristojne policijske postaje, gasilske enote širšega pomena (GEŠP), enote za protibombno zaščito ter intervencijskih skupin Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete (IMP – VF) in Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete (IMI – MF).«

Sodobni pristopi k ugotavljanju in karakterizaciji bioterorističnih agensov

Klasične in molekularne metode, ki jih redno uporabljamo za ugotavljanje in identifikacijo bioterorističnih agensov, so usmerjene in praviloma ne omogočajo ugotavljanja specifičnih genetskih sprememb. Veliko nevarnost predstavljajo tudi načrtno genetsko spremenjeni mikroorganizmi, ki bi jih lahko zanesljivo identificirali samo s sekvenciranjem naslednje generacije (angl. next-generation sequencing, NGS), vključno s sekvenciranjem celotnih genomov (angl. whole-genome sequencing, WGS) oziroma bi samo s to metodo lahko ugotovili stopnjo virulence patogena (npr. namenski vnos zapisa za dejavnik virulence) [1, 3]. Po drugi strani metoda NGS predstavlja svoj vrstni izziv zaradi zahtevne bioinformacijske obdelave velike količine pridobljenih podatkov ter težavne

dnega znanja se intervencijska skupina IMP – VF ukvarja predvsem s sekvenciranjem bakterijskih patogenov, intervencijska skupina IMI – MF pa virusnih patogenov.

Z namenom vpogleda v trenutno stanje pripravljenosti držav za ugotavljanje bakterijskih bioterorističnih agensov z metodo NGS je ameriška organizacija 'United Nations Secretary-General's Mechanism for Investigation of Alleged Use of Chemical, Biological or Toxin Weapons' (UNSGM) v sodelovanju s Tehniško univerzo na Danskem (DTU) v letu 2018 organizirala preizkus usposobljenosti, ki se ga je udeležila tudi IMP – VF. Organizatorja sta k sodelovanju pozvala številne referenčne laboratorije po celem svetu, vključno z javnozdravstvenimi, veterinarskimi in splošnimi mikrobiološkimi laboratoriji ter laboratoriji, specializiranimi za biološko obrambo. Sodelujoče institucije so bile razporejene globalno; nekatere države so sodelovale z več laboratoriji.

Prvi del kontrole je bil namenjen ugotavljanju mikrobnih vrst in morebitnih namernih genetskih sprememb (vnos ali izbris zapisov za dejavnike virulence) v 36 neoznačenih vzorcih. Sodelujoči laboratoriji smo morali poročati, za katero vrsto gre,

okužbe med 14 vzorci živil. Med 60 sodelujočimi laboratoriji se je IMP – VF odrezal najbolje, in sicer z uspešnostjo 94,3 %. Za tak uspeh se je kot ključno izkazalo široko znanje udeležencev, ki pokriva področja klinične mikrobiologije, bioteroriz-

»Prejemniki pošiljk so največkrat vlada, Državni zbor in ministrstva in druge javne inštitucije: zapor, fakultete, RTV, zdravstvene ustanove, Zavod za zaposlovanje, Zdravniška zbornica, Zveza potrošnikov, Inšpektorat za delo, NIJZ in sodišča.«

ali je ta vrsta bioteroristični agens ter ali je izolat genetsko spremenjen in ima zaradi tega spremenjeno virulenco. Drugi del kontrole je obsegal ugotavljanje bioterorističnih agensov z metagenomskim pristopom; v njem smo laboratoriji morali poročati prisotnost specifičnih bioterorističnih agensov v 15 vzorcih metagenomskih zaporedij iz živil. Tretji del kontrole je bil usmerjen v preiskavo izbruha; v njem smo morali laboratoriji med 260 vzorci genomov brucel identificirati izbruh oz. gruče genetsko povezanih (klonalnih) izolatov, ki ji je sledila identifikacija vira

ma, biološke varnosti, mikrobnih genetike in bioinformatike. Večina sodelujočih inštitucij (44 od 60) je imela manj kot 80-odstotno uspešnost. Rezultati kažejo, da je Slovenija zelo dobro pripravljena na morebitno ugotavljanje in karakterizacijo bioterorističnih agensov z metodo NGS.

Intervencije v letih 2013–2021

V obdobju od leta 2013 do aprila 2021 smo sodelovali pri 142 intervencijah zaradi suma uporabe bioterorističnih agensov v pisemskih pošiljkah z neznano vsebino, največkrat z belim prahom. V pošiljkah smo ugotovili tudi druge sumljive snovi, kot so polenta, iztrebki, zrezek, zemlja ali čajne vrečke z belim prahom. Število intervencij se je po letu 2015 močno povečalo in od takrat je v povprečju približno 20 intervencij na leto (slika 1). Večje število intervencij v letu 2015 je posledica sedmih pošiljk na različnih inštitucijah v Ljubljani, ki so bile prijavljene isti dan. To je bila tudi najboljširnejša in-

tervenca, saj je bila poleg omenjenih sedmih intervencij istočasno še ena intervencija v Kopru, kar je zahtevalo zelo dobro komunikacijo med obema intervencijskima skupinama. Največ sumljivih pošiljk prejmejo naslovniki z območij, kjer je večja koncentracija političnih ali gospodarskih stičišč. Tako je bilo največ, 71, prejemnikov pisemskih pošiljk z belim prahom, v Ljubljani, sledijo Štajerska s 34 prejemniki, Primorska s 16 in širša Osrednjeslovenska regija s 14 prejemniki.

Prejemniki pošiljk so največkrat vlada, Državni zbor in ministrstva (29 primerov) ter druge javne inštitucije (31 primerov; npr. zapor, fakultete, RTV, zdravstvene ustanove, Zavod za zaposlovanje, Zdravniška zbornica, Zveza potrošnikov, Inšpektorat za delo, NIJZ in sodišča). V zadnjih treh letih se je podvojilo število pošiljk, ki so bile naslovljene na zasebne naslove prebivalcev (25 primerov).

Zaključek

Z več kot desetletnimi izkušnjami in stalnim usposabljanjem na področju novih metod imamo dobro vpeljan postopek za hitro posredovanje vseh ekip na terenu in laboratorijsko dokazovanje patogenov ob sumu uporabe bioterorističnih agensov. Na tak način kar najhitreje posredujemo rezultate, da lahko ljudje, ki pridejo v stik z vsebino pisemskih pošiljk, čim hitreje zapustijo karanteno na mestu dogodka. Do sedaj v nobenem primeru ni šlo za bioterorizem, smo pa v enem primeru dokazali bakterijo *Clostridium perfringens*, ki je lahko patogena za ljudi, vendar je bila v tem primeru nevarnost za okužbo ljudi zaradi načina prenosa bakterije majhna. Predvsem zaradi nepredvidljive situacije v svetu je težko

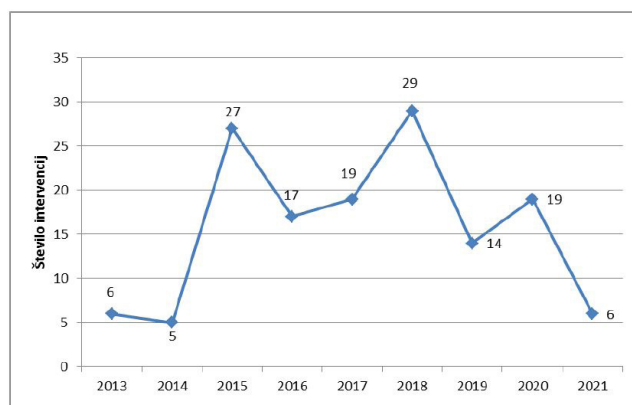
sprejeti odločitev, da je preiskovanje vseh sumljivih pisemskih pošiljk nesmiselno, zlasti, ko te prihajajo iz tujine.

Vir finančnih sredstev: Ukrepanje ob intervencijah zaradi suma uporabe bioterorističnega agensa sofinancira Ministrstvo za obrambo Republike Slovenije, Uprava RS za zaščito in reševanje.

Literatura

1. Oliveira M, Mason-Buck G, Ballard D, Branicki W, Amorim A. Biowarfare, bioterrorism and biocrime: A historical overview on microbial harmful applications. *Forensic Science International*. 2020; 314, 110366.
2. Koch L, Lopes A-A, Maiguy A, Guillier S, Guillier L, Tournier J-N, Biot F. Natural outbreaks and bioterrorism: How to deal with the two sides of the same coin? *Journal of Global Health*. 2020; 10, 020317.
3. Green MS, LeDuc J, Cohen D, Franz DR. Confronting the threat of bioterrorism: realities, challenges, and defensive strategies. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019; 19, e2–13.
4. Centers for disease control and prevention (CDC). Bioterrorism Agents/Diseases [citirano 21. 4. 2021]. Dosegljivo na: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
5. World Health Organization (WHO). Biological agents [citirano 21. 4. 2021]. Dosegljivo na: <https://www.who.int/csr/del/bepidemics/annex3.pdf>
6. Wagar E. Bioterrorism and the role of the clinical microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016; 29 (1), 175–189.
7. Državni načrt zaščite in reševanja ob uporabi orožij ali sredstev za množično uničevanje v teroristične namene oziroma terorističnem napadu s klasičnimi sredstvi. Uprava RS za zaščito in reševanje. 14.02.2005. 214-00-167/2003-30. Verzija 4.0, ažurirano 11/2014.
8. Ellerbrok H, Nattermann H, Özel M, Beutin L, Appel B, Pauli G. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 2002; 214, 51–59.
9. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *Journal of Medical Microbiology*. 2003; 52, 685–691.

▼ Število intervencij IMP – VF/IMI – MF po letih.



Mikrobiologija v industriji

Mikrobiologija skozi oči raziskovalne skupine podjetja Omega

Simon Koren in Nataša Toplak

V raziskovalni skupini podjetja Omega, d. o. o., se v sodelovanju z drugimi raziskovalnimi skupinami že več kot dvajset let ukvarjamo s proučevanjem zanimivih problematik, ki v veliki meri segajo na področje mikrobiologije.

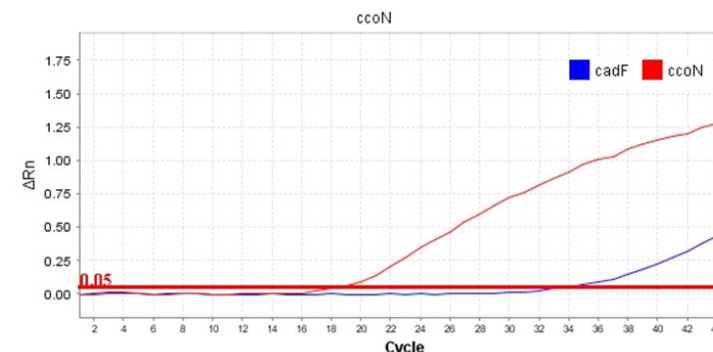
Mikrobiologija je veda, ki se ukvarja z zelo širokim področjem proučevanja mikroorganizmov. V zadnjih desetletjih se vse pogosteje vzporedno s klasičnimi mikrobiološkimi tehnikami uporabljajo tudi novejšje molekularne tehnike, ki omogočajo predvsem hitro, natančno in bolj informativno raziskovanje in analizo mikroorganizmov.

V raziskovalni skupini podjetja Omega, d. o. o., se v sodelovanju z drugimi raziskovalnimi skupinami že več kot dvajset let ukvarjamo s proučevanjem zanimivih problematik, ki v veliki meri segajo na področje mikrobiologije. Že tri leta po podelitvi Nobelove nagrade za verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo v sodelovanju z Inštitutom za mikrobiologijo in imunologijo (IMI, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani) pripravili prvi seminar s področja uporabe te tehnike, ki predstavlja temelj vseh modernih molekularnobioloških tehnik. Sodelovali smo tudi pri uvažanju nadgradnje te tehnike, PCR v realnem času oz. kvantitativnega PCR (qPCR). Prvi tovrstni instrument smo instalirali na prelomu tisočletja na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani. V zadnjih letih pa v

laboratoriju veliko uporabljamo tudi digitalni PCR (dPCR) in naslednjo generacijo sekvenciranja (NGS). Ukvarjamo se tako z analizo posameznih mikroorganizmov kot z metagenomskimi analizami. Še naprej pa veliko truda vlagamo v seznanjanje strokovne javnosti z razvojem sodobnih molekularnih tehnik. Vsako leto pripravimo več seminarjev, od katerih osrednji ostaja Genomika, ki jo prirejamo že od leta 1998 in na kateri se vsako leto srečamo tudi z mnogimi mikrobiologi.

Ena izmed naših prvih raziskav sega v leto 2002, ko smo skupaj z raziskovalci farmacevtskega podjetja Krka, d. d., Novo mesto, uspešno razvili dokazovanje rezidualne DNA testnega mikroorganizma z metodo qPCR [1]. Prvič smo se soočili z realnimi vzorci, ki so vsebovali velike količine proteinov in so zahtevali podrobno opredelitev in pripravo za natančno kvantifikacijo nukleinskih kislin testnega mikroorganizma.

Z razvojem tehnike qPCR in njenim razumevanjem ter s sodelovanjem z več raziskovalnimi skupinami nam je uspelo vpeljati vrsto različnih natančnih in občutljivih metod za detekcijo genetsko spremenjenih



qPCR krivulje hkratnega pomnoževanja dveh tarčnih genov *cadF* in *ccoN*, specifičnih za detekcijo *Campylobacter coli* in *Campylobacter jejuni*.

organizmov [2,3] ter zasnovati specifične oligonukleotidne začetnike in hidrolizirajoče sonde za uporabo v metodi qPCR za detekcijo rastlinskih virusov [4]. Sledila so leta analiz ter priprav metod za natančno določanje posameznih mikroorganizmov, ki so vključevale natančne analize genetskega zaporedja ter optimizacijo in validacijo postopkov z realnimi vzorci, med drugim smo opisali razvoj testov za določevanje *Listeria monocytogenes* [5]. Metodo detekcije smo kasneje nadgradili z novo generacijo qPCR, imenovano dPCR, kjer smo s pomočjo že znanih zaporedij oligonukleotidnih začetnikov in hidrolizirajoče sonde natančno določili število genomov *L. monocytogenes*.

»Pridobljene izkušnje smo skupaj z Inštitutom za mikrobiologijo in imunologijo uporabili v svetovno odmevni študiji, kjer je bil del zgodbe tudi uspešno sekveniran genom virusa Zika.«

genes in tako pripravili standard za določanje absolutnega števila genomov v realnih vzorcih [6]. Izziv pri raziskovalnem delu so predstavljali vedno bolj kompleksni vzorci in analize, kot je vzporedna hkratna učinkovita detekcija dveh različnih vrst bakterije *Campylobacter*, *C. jejuni* in *C. coli* [7] (Slika 1.)

Vzporedno z vedno hitrejšim razvojem metode qPCR, ki je postala izredno široko uporabna tako v raziskovalne kot diagnostične namene, pa se je pospešeno začela razvijati tudi revolucionarna nova tehnika določanja nukleotidnih zaporedij, tako imenovana naslednja generacija sekvenciranja (NGS), ki je predstavljala izziv za marsikatero raziskovalno skupino. Gre za tehniko, kjer pripravimo tako imenovane knjižnice, ki jih sestavljajo kratki fragmenti nukleinskih kislin. Nabor le-teh sekveniramo naenkrat, zato tehniko imenujemo tudi masovno sekveniranje. V našem laboratoriju smo tehniko NGS začeli uporabljati leta 2012. V eni izmed prvih odmevnej-

ših študij smo v sodelovanju z Inštitutom za mikrobiologijo in imunologijo (Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani), Nacionalnim inštitutom za biologijo in Veterinarsko fakulteto (Univerza v Ljubljani) prvič dokazali prisotnost orthoreovirusa v fecesu otroka s potrjeno klinično sliko akutnega gastroenteritisa. Postopek je

vključeval obogatitev virusne frakcije s CIM kromatografskim sistemom, odstranjanje gostiteljske DNA z encimom benzonazo, optimizacijo priprave knjižnice NGS, sekvenciranje na instrumentu Ion Torrent PGM ter bioinformatično sestavljanje za poredja genoma orthoreovirusa in nadaljnjo analizo. Pri tem smo dokazali prenos orthoreovirusa s sesalca, najverjetneje netopirja, na človeka, kar je bil prvi opis zoonoze tega tipa v Evropi [8]. Pridobljene izkušnje smo skupaj z Inštitutom za mikrobiologijo in imunologijo kasneje uporabili v svetovno odmevni študiji, kjer je bil del zgodbe tudi uspešno sekvenciran genom virusa Zika. V

»V našem laboratoriju je metagenomika ena izmed najuspešnejših tehnik, kar so omogočili predvsem kompleti reagentov za pripravo knjižnic in pripravljenih algoritmov za analizo podatkov, ki ne zahtevajo poglobljenega znanja bioinformatike.«

študiji so Mlakar s sod. prvič neposredno povezali in dokazali pojav mikroencefalije pri plodu ob okužbi nosečnice z virusom Zika [9]. Tehniko NGS smo odtlej skupaj z drugimi raziskovalnimi skupinami še večkrat s pridom uporabili za določitev nukleotidnih zaporedij več živalskih virusov [10-12]. Vzporedno s sekvenciranjem celotnih genomov virusov pa smo se ukvarjali tudi s precej večjimi genomi bakterij, pri čemer smo se osredotočili predvsem na klinično zanimive vrste. S skupino raziskovalcev iz Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano smo izvedli tipizacijo celotnih genomov invazivnih izolatov bakterije *Neisseria meningitidis* [13]. Po sekvenciranju

celotnih genomov pa smo skupaj z raziskovalci Univerzitetne klinike Golnik ubrali še pristop tarčnega sekvenciranja genov, ki so odgovorni za odpornost proti antibiotikom pri bakteriji *Mycobacterium tuberculosis*, kjer večkratna odpornost proti antibiotikom predstavlja resen klinični problem [14]. Na tem področju določanje bakterijskih odpornosti s pomočjo NGS pomembno dopolnjuje klasične tehnike, saj je metoda veliko hitrejša od spremljanja rasti v prisotnosti antibiotikov. Zaradi vedno bolj perečega problema razvoja odpornosti proti antibiotikom, predvsem v kliničnih mešanih vzorcih, študije na tem področju nadalju-

jemo s tarčnim sekvenciranjem še večjega nabora genov, povezanih z odpornostjo proti antibiotikom [15]. Tehniko NGS pa lahko preko sekvenciranja RNA uporabimo tudi za analize sprememb v izražanju genov. Ta pristop smo uporabili za proučevanje genetskih mehanizmov, ki so odgovorni za razvoj odpornosti proti določenemu tipu razkužil pri bakteriji *Staphylococcus epidermidis* [16].

Ob analizah izbranih vrst organizmov pa novejša molekularne tehnike naslednje generacije sekvenciranja v zadnjem desetletju omogočajo tudi proučevanje genetskega materiala vseh organizmov, prisotnih v določenem okolju, kar imenujemo metagenomika. S to metodo dobimo vpogled v celotno združbo mi-

kroorganizmov, kar je s klasičnimi mikrobiološkimi gojitvenimi metodami nemogoče. V naši pilotni študiji s tega področja smo izvedli metagenomsko analizo gliv v domačih gospodinjstvih pomivalnih strojih sodelavcev podjetja Omega in določili družine in rodove gliv v različnih strojih [17].

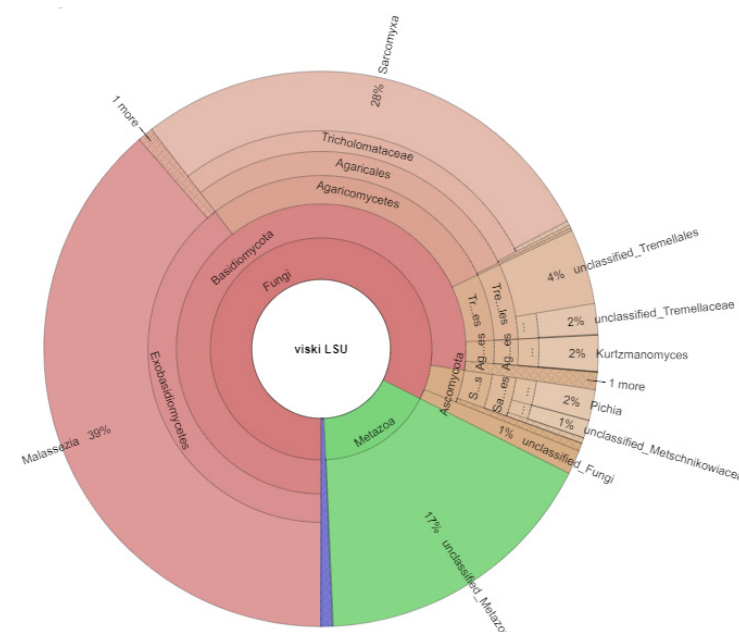
V našem laboratoriju je metagenomika ena izmed najuspešnejših tehnik, kar so omogočili predvsem kompleti reagentov za pripravo knjižnic sedmih hipervariabilnih regij gena 16S rRNA, ki se uporablja v taksonomiji bakterij, ter pripravljenih algoritmov za analizo podatkov, ki ne zahtevajo poglobljenega znanja bioinformatike. Med drugim smo metodo že uporabili na večjem številu človeških vzorcev, kjer se je Molan s sod. ukvarjala s korelacijo debelosti novorojencev in črevesne mikrobiote nosečnic v času nosečnosti [18]. Omenili bi še študije bakterij, prisotnih na koži proteusa v različnih okoljih [19] ter metagenomsko analizo bakterij, ujetih v ledu v ledeni jami

Paradana (Trnovski gozd, Slovenija) [20].

V zadnjih letih pa smo raziskovanje povezali tudi s študijami, ki se prepletajo s področjem poljudne znanosti, ki je zanimivo tudi za širšo javnost. Tako smo proučevali povezavo rasti kapnikov v rudniku Sitarjevec v Litiji, v katerem je nadpovprečna hitra rast kapnikov tesno povezana z mikroorganizmi na kapniku [21], lotili pa smo se celo interdisciplinarne študije mikrobiote v pokvarjenih in pozabljenih alkoholnih pijačah [22, 23].

Področje dejavnosti našega podjetja je veliko obsežnejše od tega, kar smo uspeli predstaviti v članku. Vsekakor pa mikrobiologija predstavlja del našega vsakdana in pomemben del raziskovalnih aktivnosti, od resnih študij patogenih organizmov pa vse do malodane otroške radovednosti. Na raziskovalni poti nam odpira vedno nova vprašanja. Odgovore nanje najuspešneje iščemo skupaj, tako da se zelo veselimo sodelovanja s široko skupnostjo slovenskih mikrobiologov tudi v prihodnje.

▼ Prikaz taksonomskih enot gliv, določenih z masivnim paralelnim sekveniranjem gena LSU v vzorcu, izoliranem iz pokvarjenega viskija (klikni **TUKAJ** za interaktivni prikaz).



Literatura:

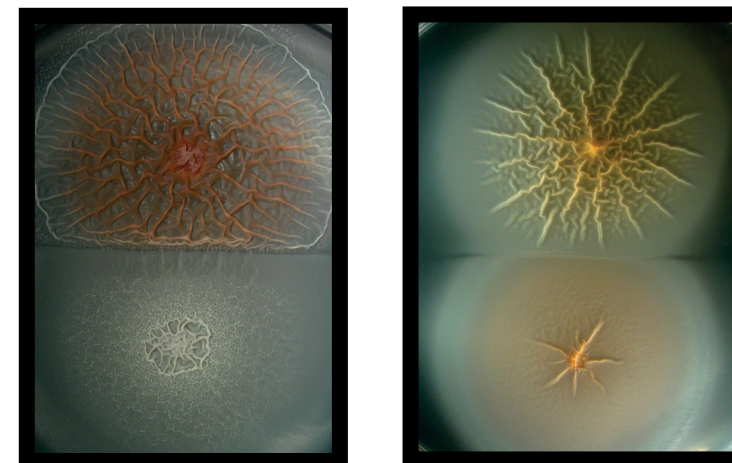
1. Plaper A, Kovač M, Toplak N. Metoda za določanje rezidualne DNA v biotehnoškem vzorcu s pomočjo kvantitativne veržne reakcije s polimerazo: tehnična izboljšava. Novo mesto: Krka, 2002.
2. Toplak N, Okršar V, Stanič Racman D, Gruden K, Žel J. A high-throughput method for quantifying transgene expression in transformed plants with real-time PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2004; 22, 237–250.
3. Cankar K, Ravnikar M, Žel J, Gruden K, Toplak N. Real-time polymerase chain reaction detection of Cauliflower mosaic virus to complement the 35S screening assay for genetically modified organisms. *Journal of AOAC International*. 2005; 88, 814–822.
4. Mavrič Pleško I, Toplak N, Viršek Marn M. New information on detection of Plum pox polyvirus using real time PCR. V: Pfaffl, Michael W. (ur.). *Proceedings qPCR 2005: The whole story of quantitative PCR - from Tissue Preparation to Bioinformatics*. 2nd International qPCR Symposium Industrial Exhibition TATAA Application Workshop & qPCR Matrix Workshop. München: Technische Universität München, 2005; 31–32.
5. Traunšek U, Toplak N, Jeršek B, Lapajne A, Majstorović T, Kovač M. Novel cost-efficient real-time PCR assays for detection and quantitation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*. 2011; 85, 40–46.
6. Klančnik A, Toplak N, Kovač M, Marquis H, Jeršek B. Quantification of *Listeria monocytogenes* cells with digital PCR and their biofilm cells with real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2015; 118, 37–41.
7. Toplak N, Kovač M, Piskernik S, Smole Možina S, Jeršek B. Detection and quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using real-time multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2012; 112, 752–764.
8. Steyer A, Gutiérrez-Aguirre I, Kolenc M, Koren S, Kutnjak D, Pokorn M, Poljšak-Prijatelj M, Racki N, Ravnikar M, Sagadin M, Fratric Steyer A, Toplak N. High similarity of novel orthoreovirus detected in a child hospitalized with acute gastroenteritis to mammalian orthoreoviruses found in bats in Europe. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51, 3818–3825.
9. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, Vesnaver Vipotnik T, Fabjan Vodusek V, Vizjak A, Pilem J, Petrovec M, Avšič Županc T. Zika virus associated with microcephaly. *The New England Journal of Medicine*. 2016; 374, 951–958.
10. Toplak I, Kuhar U, Kušar D, Papič B, Koren S, Toplak N. Complete genome sequence of a bovine viral diarrhea virus subgenotype 1 e strain, SLO/2407/2006, isolated in Slovenia. *Genome Announcements*. 2016; 4, e01310-16.
11. Mikuletič T, Černe D, Hostnik P, Toplak N, Koren S, Kuhar U, Jamnikar Čiglenečki U, Kutnjak D, Steyer A. Identification of novel reassortant mammalian orthoreovirus serotypes 1, 2, 3 from bats in Slovenia. V: Abstract book. 13th International Double-Stranded RNA Virus Symposium, 24-28 September 2018, Houffalize. Str. 175.
12. Toplak I, Rihtarič D, Grom J, Toplak N, Kuhar U. Nearly complete genome sequences of two bovine viral diarrhea virus isolates, subtype 1f strain SLO/1170/2000 and subtype 1d strain SLO/2416/2002. *Microbiology Resource Announcements*. 2019; 8, 1–2.
13. Kastrin T, Toplak N, Koren S, Paragi M, Žohar Čretnik T, Müller-Premru M, Zdošek B, Ribič H, Štrumbelj I, Gole A, Kavčič M, Berce I, Harlander T, Fiser J, Piltaver-Vajdec I, Tomič V. Slovenska skupina za meningitise. Uporaba sekvenciranja celotnega genoma za spremljanje invazivnih izolatov *Neisseria meningitidis* v javnem zdravstvu = Use of whole genome sequencing for public health surveillance of invasive *Neisseria meningitidis*. V: Petrovec M (ur.). *Mikrobiologija v javnem zdravstvu: [zbornik predavanj z recenzijami]*. Ljubljana: Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe SZD, 2018, 145–152.
14. Sodja E, Toplak N, Koren S, Kovač M, Truden S, Ilievski Poposka B, Žolnir-Dovč M. Next-generation sequencing of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in low-incidence countries. *Infekcija i imunitet*. 2019; 9, 773–778.
15. Benčič A, Toplak N, Koren S, Tomič V, Lužnik D, Dreo T. Determination of resistome using next-generation sequencing. V: Jovičević Klug P (ur.), et al. *Knjiga povzetkov = Book of abstracts*. 12. Studentska konferenca Mednarodne podiplomske šole Jožefa Stefana in 14. dan mladih raziskovalcev (Konferenca KMBO) = 12th Jožef Stefan International Postgraduate School Students' Conference and 14th Young Researchers' Day, 15th May 2020. Ljubljana: Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana = Jožef Stefan International Postgraduate School: Inštitut Jožef Stefan = Jožef Stefan Institute, 2020. Str. 42.
16. Ribič U, Jakše J, Toplak N, Koren S, Kovač M, Klančnik A, Jeršek B. Transporters and efflux pumps are the main mechanisms involved in *Staphylococcus epidermidis* adaptation and tolerance to didecylmethylammonium chloride. *Microorganisms*. 2020; 8, 1–18.
17. Koren S, Kovač M, Toplak N. Who lives in our dishwasher? Preliminary results of fungal metagenomic analysis of household dishwashers. *Acta agriculturae Slovenica*. 2015; 106, 5–12.
18. Molan K, Podlessek Z, Pongrac Barlovič D, Starčič Erjavec M, Ambrožič Avguštin J, Žgur-Bertok D. Gut microbiota of women with gestational diabetes mellitus and foetal macrosomia. V: Abstract book. FEMS 2019, 8th Congress of European Microbiologists, 7-11 July, 2019, Glasgow, Scotland. Frederiksberg: Federation of European Microbiological Societies, 2019. Str. 898.
19. Kostanjšek R, Prodan V, Stres B, Trontelj P. Composition of the cutaneous bacterial community of a cave amphibian, *Proteus anguinus*. *FEMS Microbiology, Ecology*. 2019; 95, 1–7.
20. Mulec J, Oarga-Mulec A, Holko L, Pašič L, Kopitar AN, El-eršek T, Mihevc A. Microbiota entrapped in recently-formed ice: Paradana Ice Cave, Slovenia. *Scientific Reports*. 2021; 11/1993, 1–12.
21. Toplak N, Koren S, Jeršek M, Kovač M, Kokalj M, Golež M, Zamik B, Jeršek B. Diversity of bacterial populations with iron oxide/hydroxide formations in the abandoned Sitarjevec mine (Slovenia). *Geomicrobiology Journal*. 2021; 38, 164–173.
22. Toplak N, Veronovski A, Mitar M, Jeršek B, Bidovec U, Kovač M, Koren S. Multidisciplinarni pristop za proučevanje mikrobnih skupnosti v pozabljenem burbonu = Multidisciplinary approach to study microbial communities in a forgotten bourbon. V: Smole Možina S (ur.), Paš M (ur.). *Živilstvo in prehrana med tradicijo in inovacijo: zbornik povzetkov = Food science, technology and nutrition between tradition and innovation: book of abstracts*. 30. Bitenževi živilski dnevi 2019 = 30th Food Technology Days 2019 dedicated to Prof. F. Bitenc, 19. junij 2019, Ljubljana. 1. elektronska izd. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2019. Str. 42.
23. Pristavec A, Koren S, Jeršek B, Veronovski A, Korošec L, Kovač M, Kovač M, Toplak N. The magic world of whiskey microbiota. *Acta agriculturae Slovenica*. 2020; 116, 237–243.

Iskrice v mikrobiologiji

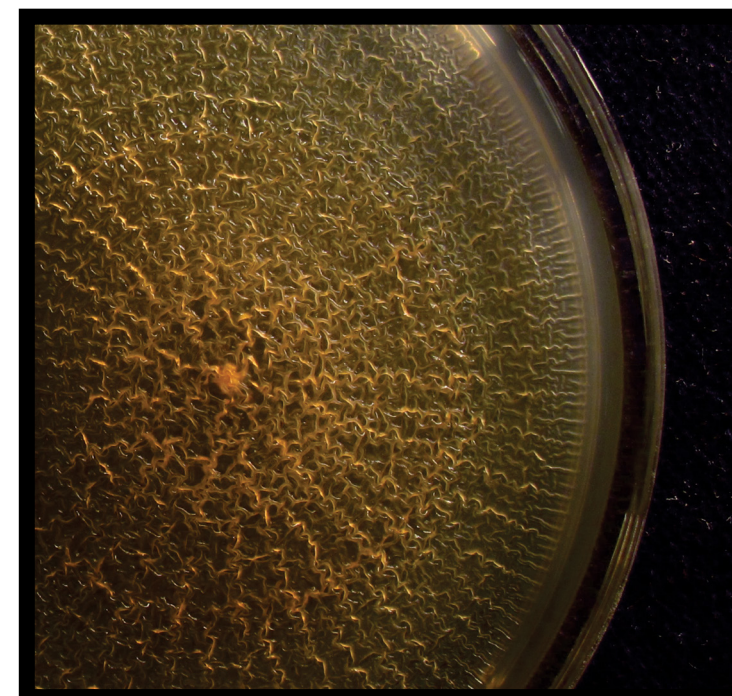
Mikrobiologija v sliki

“After a certain high level of technical skill is achieved, science and art tend to coalesce in esthetics, plasticity, and form. The greatest scientists are always artists as well.”

—Albert Einstein



◀ *Bacillus subtilis* na agarju CM s 5 mM KCl. Levo: Zgoraj sev PS-149, spodaj PS-11. Desno: zgoraj sev RO-FF-1, spodaj RO-H-1. Avtor: Polonca Štefanič.



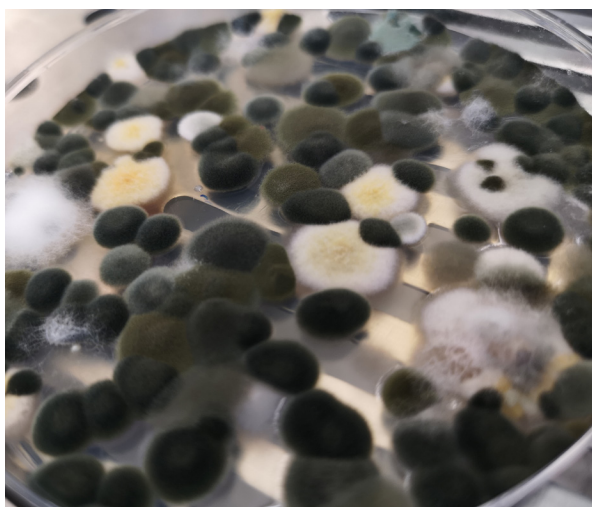
◀ *Bacillus subtilis* na agarju CM s 100 mM KCl. sev RO-FF-1. Avtor: Polonca Štefanič.

Mikrobiologija v sliki

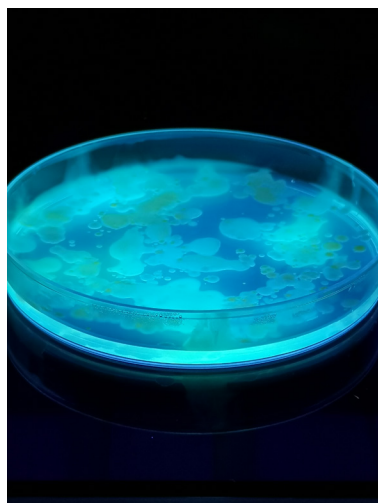


▲ Plesni iz pšeničnih zrn, porasle na gojišču DG18 s kloramfenikolom. Avtor: Valerija Tkalec.

▼ Plesni iz ječmenovih zrn, porasle na gojišču DG18 s kloramfenikolom. Avtor: Valerija Tkalec.



▼ Fluorescirajoči *Pseudomonas* spp. iz rizoplana pšenice na agarju King B. Avtor: Valerija Tkalec.



Mikronostalgija

dr. Franc Viktor Nekrep

Oglašam se od doma v Trzinu, kar pa je le streljaj do rodiškega oddelka Biotehniške fakultete, kjer sem aktivno preživel 35 mikrobioloških in mikrobiologovih let.

Zgodnji spomini na društvene aktivnosti v SMD so vezani na moje magistrsko študijsko bivanje v laboratoriju akad. prof. dr. Batisa v zgodnjih sedemdesetih letih prejšnjega stoletja, ko so veterinarji vodili slovensko društvo in tudi dosegli, da se je Jugoslovansko mikrobiološko društvo (JMD) preoblikovalo v Zvezo mikrobioloških društev Jugoslavije (SMDJ).

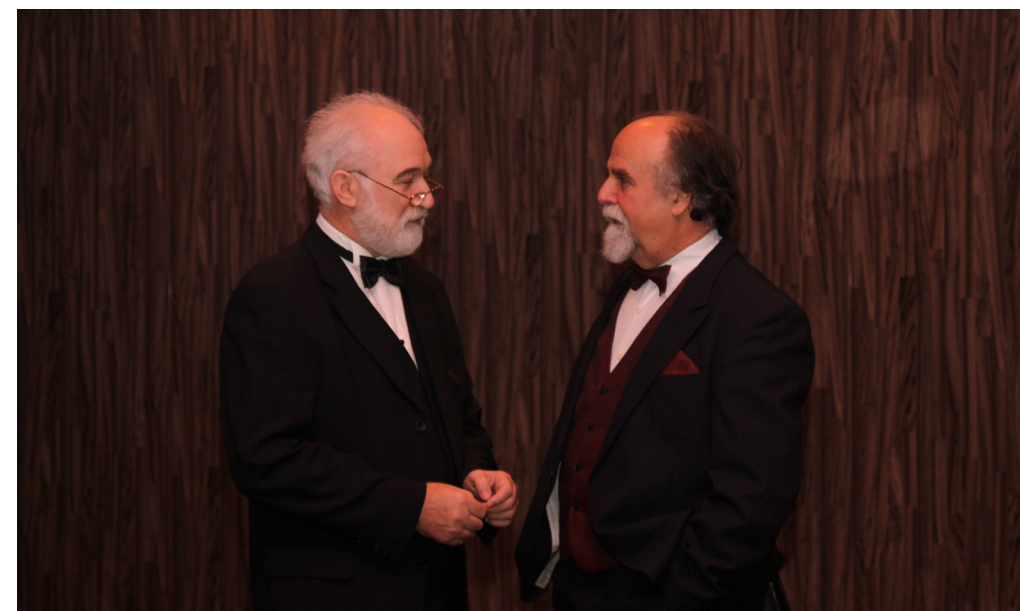
Naslednji konkretniji spomin je prav tako vezan na SMDJ, namreč na njegov zadnji kongres v Mariboru leta 1989, kjer sem v svojem prispevku predstavil teze za dodiplomski študij mikrobiologije, ki je nekoliko kasneje nato dejansko stopil v realizacijo. V ekipi matičarjev, profe-

sorjev Grabnarja, Janca, Megušarja in Nekrepa smo leta 1991 dobili zadolžitev Senata BF, da se lotimo priprave medoddelčnega in medfakultetnega dodiplomskega študija mikrobiologije, ki je nato doživel prvi vpis študentov leta 1993.

Dogodek, ki se ga prav tako rad spomnim, je 1. slovenski kongres SMD, kjer so mi zaupali njegovo organizacijo in smo jo skupaj, ob učinkoviti pomoči odbora in predvsem tajnika prof. Rasporja realizirali med 24. in 27. oktobrom 1993 na Bledu.

Še nekatere slike se mi pojavijo v spominu na SMD. Leta 1998 sem s pomočjo nekaj spleta večjih študentov oblikoval spletno stran SMD, ki je unikatno živela do leta 2003, preživela sicer do leta 2007, nato jo je formalno nadomestil leta 2003 sedanji splet www.smd.si, ki ga je v začetni verziji oblikoval kolega Enej Kuščer.

▼ prof. dr. Peter Raspor in prof. dr. Franc Viktor Nekrep, 50-letnica SMD. Vir: osebni arhiv Peter Raspor.





▲ 2. kongres mikrobiologov Slovenije z mednarodno udeležbo. Portorož, 27.-30. september, 1998. Vir: osebni arhiv dr. Peter Raspor.

Velja spregovoriti še o slovenskem mikrobiološkem slovarju. Ta je nastal v društveni Terminološki komisiji, ki je bila ustanovljena leta 1962 in jo je dolga leta vodil prof. dr. Banič. Vrhunec dela je bila izdaja tiskane verzije Mikrobiološkega slovarja leta 1994. Leta 2002 sem slovar preselil tudi na splet, kjer je stran delovala

ekologije (ISME) v Cankarjevem domu leta 1986, ki ga je organiziral prof. dr. Megušar v okviru SMD, smo s pomočjo ISKRE in centra MIRCEN na Karolinska Institute iz Stockholma vzpostavili pri nas prvo mednarodno kongresno spletno povezavo (Bio-net) s pogovori o bioplenu s kolegi po Evropi, Ameriki in vse do Avstralije;

»In še spomin, ki mi je posebno drag: leta 2010 mi je SMD podelilo Plenčičevo priznanje za življenjsko delo na pedagoškem področju mikrobiologije ...«

do leta 2013. Vmes so me znanci opozorili na slovarske zbirke Termania in po dogovoru s firmo Amebis smo prenesli leta 2010 naš slovar v to zbirko <http://www.termania.net/?searchIn=Linked&Id=96>, kjer deluje še danes. Slovar je bil podprt tudi z blogom MISLO Blog <https://misloblog.wordpress.com/>, ki pa žal ni zaživel.

Moja zasvojenost s spletom mi navrže še nek spomin. V času poteka mednarodnega kongresa mikrobne

ne pozabimo, to je bil čas pred uveljavitvijo interneta, ki je v Slovenijo prišel leta 1993.

dr. Franc Viktor Nekrep, zasl. prof. UL
25. 02. 2021

Mikropesem

MIKRO 7

Mikro
je nekaj malega.
Nekaj, kar ne mine,
saj večno jača skomine.

Mikro
vrta slehernika.
Se nevidno dotika,
pa tudi spotika.

Mikro
Čaka da bo makro.
Resda ne raste,
a mnoge preraste.

Mikro
Ni tisto, kar misliš,
čprav ga loviš,
se na poti zgubiš.

Mikro
Zdi se miniorno.
Pa ni!
Lahko je prodorno.

Mikro
glavnino prekriva,
vsebino zakriva,
praznino razkriva.

Mikro
Sliši se pikro.
Pa ni!
To se le zdi!

Peter Raspor, 25. 5. 2018

Mikrovici in zabava

Politiki pravijo, da smo v istem
čolnu.

Da, to drži!

Žal s(m)o nekateri na zunanji strani.
(Peter Raspor, 19. 7. 2020)

Kdo se je spomnil, da bi med
umivanjem rok peli "Happy
Birthday"? Zdaj, vsakič ko grem na
stranišče, moji otroci pričakujejo, da
pridem ven s torto.

**Pivo Corona je spremenilo svoje
ime, da bi se izognilo povezavi z
izbruhom koronavirusa.**



Mama mi je vedno govorila, da s
celodnevni ležanjem v postelji ne
bom dosegla ničesar. Ampak poglej
me zdaj, mama! Rešujem svet!

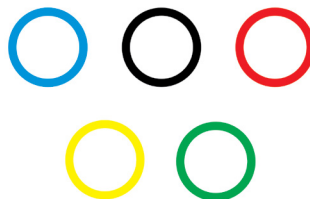
Nič ni lepšega, kot se sprostiti na
kavču po dolgem napetem dnevu,
preživetem na kavču.

121. dan karantene in doma me
pes gleda kot: »Vidiš? Zato žvečim
pohišstvo!«

Kako se najbolje izogniti dotiku
obrazu? S kozarcem vina v vsaki
roki.

Saj bi vam povedali še kak COVID vic, a se bojimo, da bil
brez okusa.

Olimpijske igre Tokyo 2020 (socialno distanciranje)



Če ste kupili 144 zvitkov toaletnega
papirja v pripravah na 14-dnevno
karanteno, bi verjetno morali
k zdravniku že dolgo pred
koronavirusom.

Anekdota iz laboratorijskih vaj:
Asistent: »Kaj je to mikrobiologija?«
Študent: »To je podobno kot
biologija, samo da je treba manj
znati.«

Celo življenje so mi govorili, naj bom
pozitiven, zdaj ko sem, se me pa vsi
izogibajo!

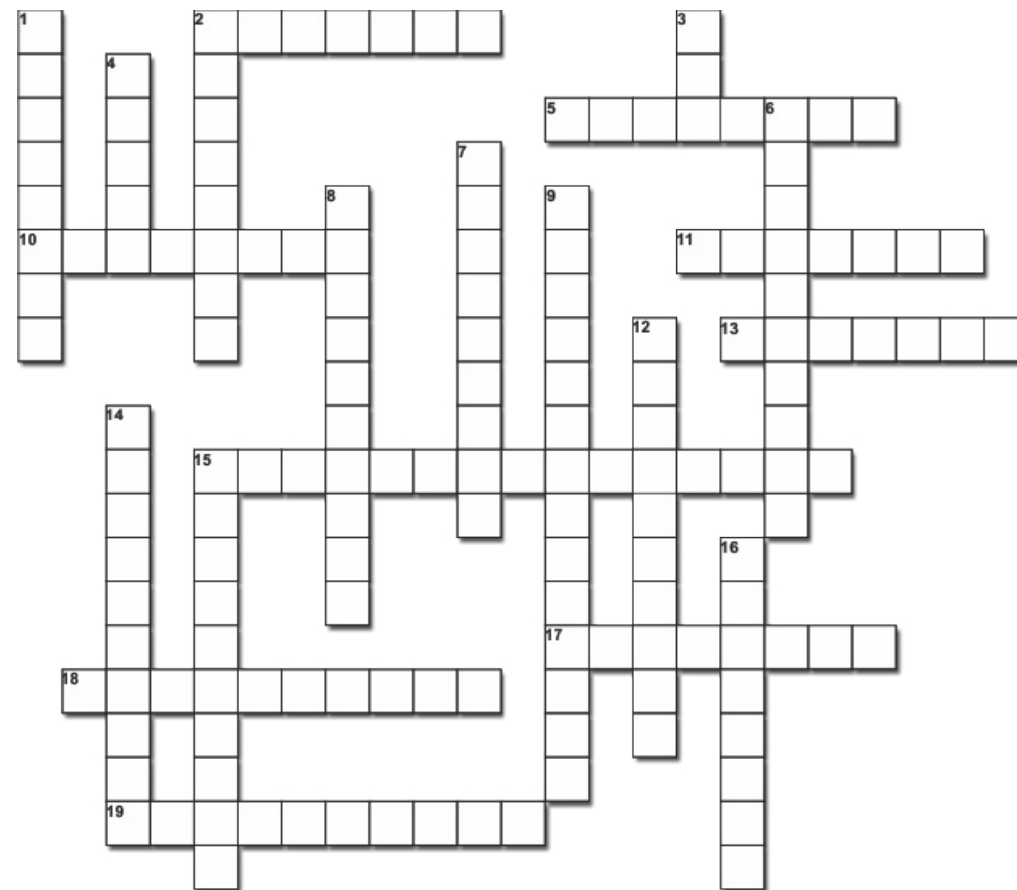
Reče fant punc: »A ti ješ Whiskas, ko
si taka mačka?« Punca mu odvrne:
»A ti ješ travo, ko si tak osel?«

»Videti ste zelo živčni«, reče
profesor študentu na izpitu. »Vas je
strah mojih vprašanj?«

»Ne, strah me je mojih odgovorov.«

Tisti, ki mislijo, da jim bo cepivo
proti COVID-19 spremenilo DNK, bi
to morali videti kot priložnost.

Mikrokrižanka



Vodoravno:

2. Sestavljen je iz ponavljajočih se strukturnih enot
5. *Yersinia pestis*
10. Brezbarven plin neprijetnega vonja
11. Svež zemeljski vonj
13. Vektorji za izdelavo metagenomskih knjižnic
15. Reakcijo povzročajo določene heterotrofne, redko
tudi avtotrofne bakterije v odsotnosti kisika
17. Veda o dedovanju lastnosti organizmov
18. Spolna dvoiličnost
19. Odsotnost mikroorganizmov

Navpično:

1. Omogoči razprtje dvojne vijačnice DNA
2. Med celicami se prenašajo s transformacijo,
transdukcijo ali konjugacijo
3. Mikrobiološka zanka
4. 0.000001
6. Veda, ki se ukvarja z glivami
7. Sladkor in dušikova baza
8. Otroška bolezen, *Streptococcus pyogenes*
9. Veda o mikroorganizmih
12. Pretekla predsednica društva SMD
14. Genom je iz dveh enakih molekul linearno
pozitivne polarne enovijačne RNK
15. Mikroskop
16. Parni sterilizator