



DOM  
MLADIH  
RIJEKA



Kandela

JAČANJE KAPACITETA DOMA MLADIH U PRUŽANJU  
PODRŠKE DAROVITOJ DJECI U PROGRAMIMA TEHNIČKE  
KULTURE

## SAMOSTALNI PROJEKTI POLAZNIKA EDUKATIVNIH PROGRAMA DOMA MLADIH U ŠKOLSKOJ GODINI 2019. / 2020.

# AgaRi

### UVOD

Bakterije žive svuda oko nas i kao takve čine najbrojniju skupinu organizama na Zemljiji. Bez njih, svijet koji znamo ne bi bio moguć. Bakterije žive u našem tijelu i na našoj koži, na svim površinama oko nas, na zemlji i u dubini mora. Ono što je važno razumjeti kada pričamo o bakterijama je da nisu sve bakterije loše. Bakterije koje izazivaju bolesti zovu se patogene bakterije. Postoje i bakterije koje izazivaju bolesti samo ako ih je previše ili ako se nalaze na krivom mjestu. Tako na primjer Escherichia coli je potpuno normalan stanovnik debelog crijeva, ali njena pojava u krvi ili u mokraćno - genitalnom sustavu može izazvati probleme.

Postojala su dva cilja ovog projekta. Prvi je bio uhodati metode za uzgoj i identifikaciju bakterija te pokušati identificirati neke od bakterija koje žive oko nas, a drugi je bio da svi mi vidimo kako je zapravo raditi u laboratoriju.

U nastavku Vam donosimo našu priču i naše rezultate.

### METODE

Prvi korak u našem projektu bilo je naći najbolju hranjivu podlogu (agar) za bakterije. Pretražujući literaturu našli smo različite recepte koje smo isprobavali

Osnovna receptura sastojala se od sljedećih sastojaka: izvor proteina, šećer kao izvor energije za bakterije, sol te agar kako bi podloga bila kruta. Za uzgoj bakterija ne može se koristiti želatina, jer neke bakterije imaju sposobnost razgrađivanja želatine.

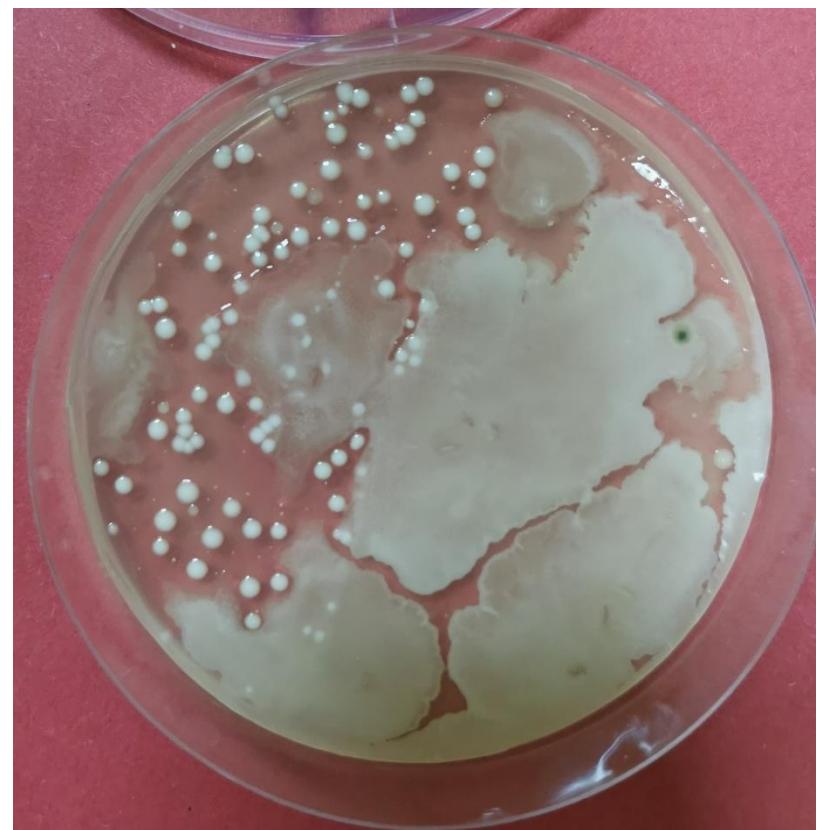
Kao izvor proteina u laboratoriju se danas koristi enzimski tretirani proteini goveda ili kvasaca. U nedostatku toga mi smo probali s termičkim mesnim ekstraktom i goveđom juhom u kocki. Termički mesni ekstrakt dobili smo tako da su se komadići čistog mišića mase 200 g kuhalili 3 sata u destiliranoj vodi. Važno je bilo da je meso s čim manje masnoće, jer se masnoća odvaja od hranjive podloge te radi probleme prilikom nasadihanja bakterija. Zbog velike koncentracije soli i konzervansa na hranjivom agaru napravljenom s goveđom kockom mogle su rasti samo neke bakterije stoga smo nadalje radili s mesnim ekstraktom. Osim toga probali smo i različite koncentracije soli i šećera te su za optimalnu hranjivu podlogu pronađene koncentracije: 5% šećera, 0,5% soli, 1,5% agar agara u mesnom ekstraktu napravljenom kako je napomenuto gore.

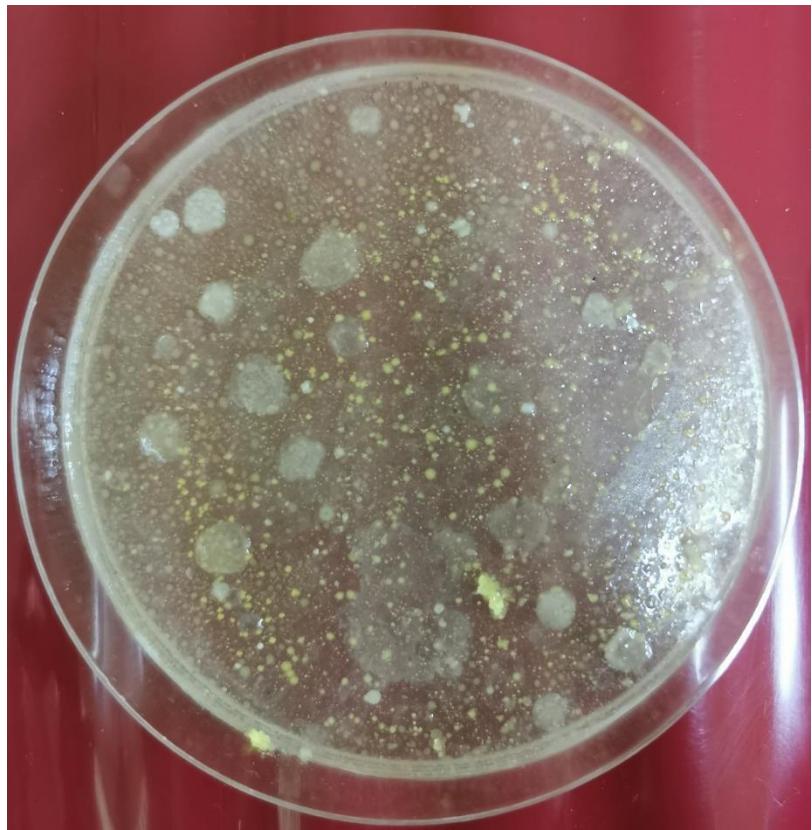






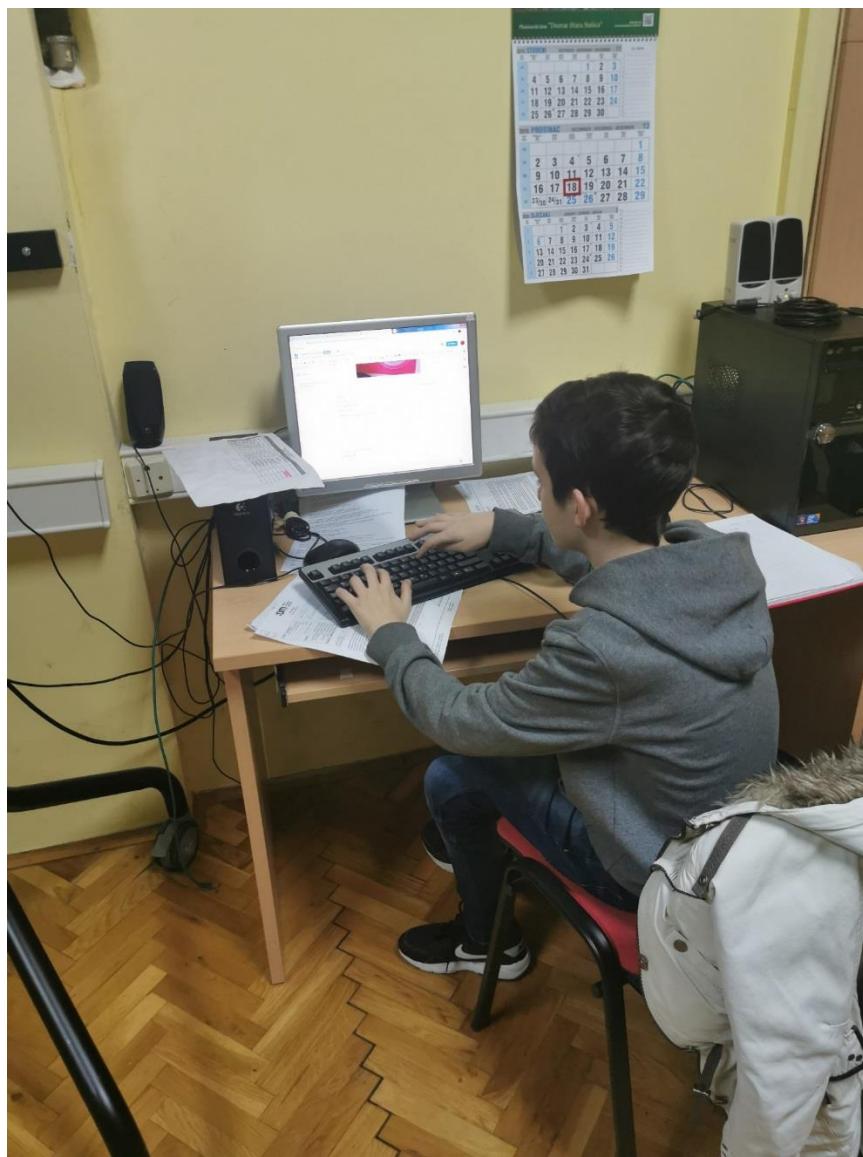
Prilagođavanje različitih koncentracija gore navedenih sastojaka kao i prilagođavanje uvjeta u kojima se odvijala inkubacija bakterija omogućila nam je da se riješimo kontaminacije. Postoji još jedan važan faktor koji nam je na kraju stvorio najveće probleme. Kako je došla zima uvjeti za uzgoj bakterija bili su bolji. Iako je na nižoj temperaturi bakterijama trebalo dulje da stvore kolonije, nisu nas mučile gljivice i pljesni, a raznolikost bakterija nakon nasadivanja se povećala





### Napredak tijekom uhodavanja protokola

Sljedeći korak bio je uhodati protokole za identifikaciju bakterija: pokušali smo napraviti naše varijante agara za ispitivanje aktivnosti lipaze i lecitinaze (EYA agar), hemolizina koji razgrađuje crvene krvne stanice (blood agar), laktaze koja razgrađuje laktozu (MacConkey agar), želatinaze koja razgrađuje žalatinu, amilaze i drugih enzima koji razgrađuju škrob. Iako je u ovoj fazi većina njih bila uhodana, zbog velikih kontaminacija koje su došle s promjenom vremena pokusa (s ranog proljeća na sredinu ljjeta) neki od uhodanih protokola nisu se mogli koristiti. Osim toga bilo je nužno i napraviti skriptu po kojoj ćemo identificirati bakterije na kraju.



Vito tijekom pisanja skripte



Maksim i Nika u pripremi agar-a

Konačne recepte koji smo dobili izgledali su ovako:

	Hranjiva podloga za dokazivanje	Potrebno u agar dodati	Identifikacija aktivnosti enzima
1	Lipaze i lecitinaze	10% emulzije žumanjka (žumanjak: voda=1:1)	Nastajanje neprozirne nakupine oko kolonija
2	Hemolizina	5% krvi	Nestajanje obojenja od krvi oko kolonija ili nastanak zelenkastog obojenja
3	Laktaze	2% laktoze	Nakon inkubacije prolići s pH indikatorom, promjena medija u kiselo pokazuje razgradnju laktoze

4	Želatinaze	2% želatine umjesto agar agar	Želatina se razgradi
5	Enzima koji razgrađuju škrob	3% škrob	Nakon inkubacije prolići s otopinom joda, plavo obojenje pokazuje da pristutnost škroba dok njegov nedostatak pokazuje da su bakterije razgradile škrob

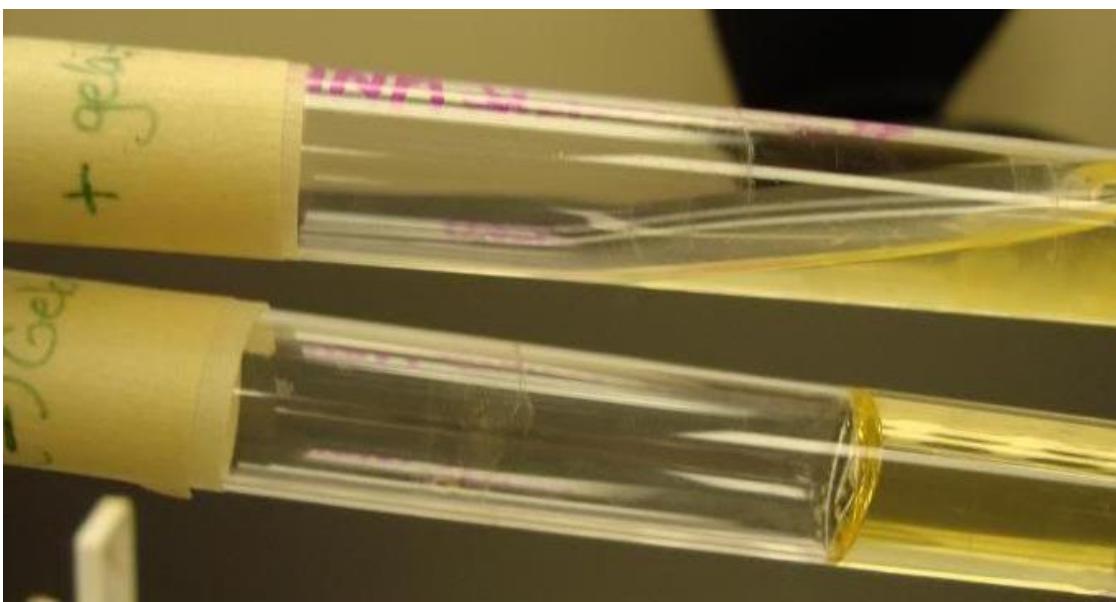
Točno tu nas je prekinula korona. S obzirom da nemamo inkubator najlakše je bilo raditi na proljeće, naša učionica je bila klimatizirana, suhog zraka i temperature od 20tak stupnjeva. Promjene uvjeta kao što je visoka razina vlage i visoke temperature koje je dovelo ljetu (eksperimenti su nastavljeni tek u srpnju) bile su savršene za razvoj gljivica i pljesni. Osim toga bakterije su rasle brže, što je značilo da je kontaminacija bila česta, a testovi teško čitljivi. Kada smo nastavili s pokusima nije bilo moguće napraviti test na aktivnost hemolizina dok je test za aktivnost laktaze bilo teško očitati.



Testiranje aktivnosti amilaze i drugih enzima koji razgrađuju škrob (gore pozitivno dolje negativno)



Testiranje aktivnosti laktaze (gore negativno-plavo, dolje pozitivno-rozo)



Testiranje aktivnosti želatinaze (gore pozitivno dolje negativno)



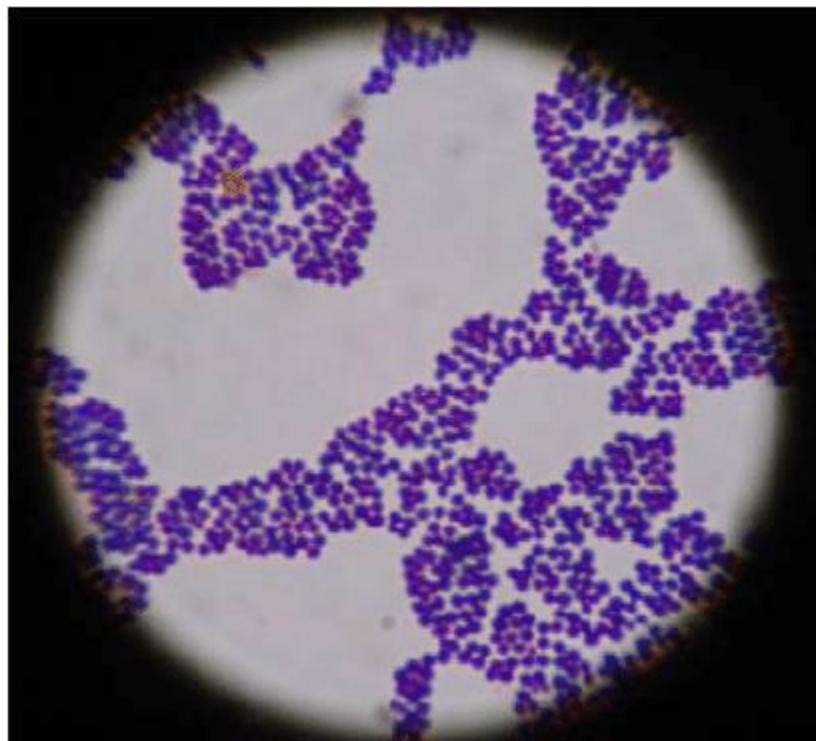
Testiranje aktivnosti lipaze i lecitinaze – bijeli sloj oko ovih bakterija pokazuje da su te bakterije pozitivne na jedan od dva enzima.

Kada smo konačno uspjeli nastaviti s radionicom, napravili smo hranjivi agar na kojem su nam nakon inkubacije naraslo devet različitih bakterijskih kolonija. Zbog ponovnih problema s kontaminacijom, nažalost broj različitih bakterijskih kolonija nije bio onako visok kao tokom uhodavanja protokola. Svaku od tih različitih kolonija smo presadili na novi agar te smo iz tog agara kasnije uzimali bakterije za ostale testove.



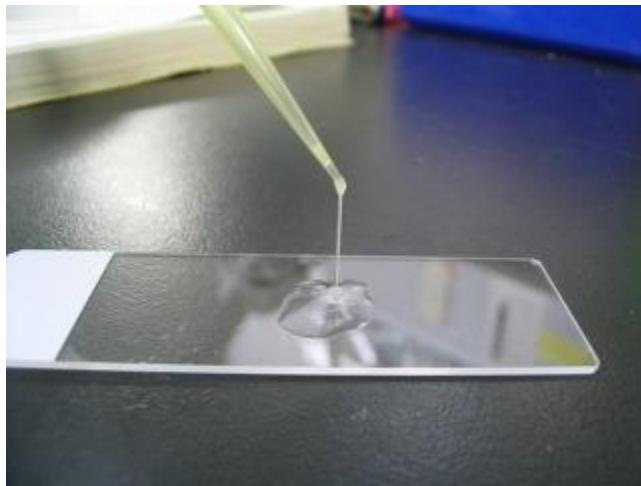
Nasađene bakterije iz jedne kolonije

Osim gore navedenih testova, promatran je oblik, boja, površina i rubovi bakterijskih kolonija, te je mikroskopiranjem određen oblik bakterija.



Stafilokok pod mikroskopom

Također je za svaku od pronađenih bakterija napravljen i KOH test kako bi se odredila debljina stanične stjenke bakterija te ih se klasificiralo kao Gram pozitivne (s debljom stjenkom s puno peptidoglikana) i Gram negativne bakterije (s tanjom stjenkom). Ako su bakterije bile Gram negativne prilikom tretiranja s 10% kalijeva hidroksida došlo bi do izljevanja staničnog sadržaja te bi smjesa bakterija i KOH postala sluzava.



KOH test – Gram negativne bakterije

## REZULTATI

Pretražujući literaturu, po našim rezultatima te po samim rezultatima iz literature pokušali smo pretpostaviti vrste bakterija. U tablici ispod prilažemo rezultate testova te našu prepostavku vrste.

	Morfologija kolonije	Oblik bakterija	KOH test Gram	Lipaza/ Lecitinaza	Laktaza	Škrob	Želatinaza	Ime bakterije
1	Okrugla bijela povišena kolonija	Okrugle bakterije u nakupinama (stafilokoki)	+	+	+	-	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
2	Okrugla povišena kolonija žućkasto-zelenkaste boje neobičnog slatkog mirisa	Štapići (bacili)	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	Žućkaste slabo izbočene okrugle kolonije	Štapići (bacili)	+	+	+	+	+/- *	<i>Bacillus cereus</i> ili <i>subtilis</i> *

	nepravilnih rubova							
4	Bijela, okrugla povišena kolonija	Okrugle bakterije u lancima (streptokoki)	+	+	+	+	-	Enterococci faecalis
5	Okrugla bijela povišena kolonija	Okrugle bakterije u lancima (streptokoki)	+	+	+	-	-	Streptococcus mitis

\* U ponovljenom testu za testiranje aktivnosti želatinaze rezultati su bili različiti (vjerojatno kao posljedica ljudske greške). S obzirom da se od nema dostupnih testova ove dvije vrste bacila razlikuju samo po tome, ne možemo zaključiti koji je od navedenih bacila pronađen.

S obzirom da nismo imali na raspolaganju druge testove kakvi bi nam bili na raspolaganju u pravom laboratoriju, uvelike smo se oslonili na informacije iz literature. Prilikom pisanja skripte i traženja bakterija po dobivenim rezultatima eliminirali smo sve jako opasne bakterije koje ne bi očekivali u okruženju zdravih ljudi, a pretražili smo zapravo samo one bakterije koje smo očekivali na spomenutim površinama. S obzirom da je uzet bris s WC školjke, tipkovnice, ruku i iz usta očekivali smo *S. epidermidis* kao čestog stanovnika ljudske kože, *S. mitis* kao čestog stanovnika u ljudskim ustima i *E. faecalis* kao bakteriju koja nastanjuje probavni sustav čovjeka. Ipak očekivali smo i *E. coli*, također iz crijeva, koju nismo pronašli. Mogući razlozi su:

1. jer je nije bilo ni u jednom od uzoraka, što je malo vjerojatno
2. jer joj nije odgovarao hranjivi agar, isto ne pretjerano vjerojatno ili
3. zato što jednostavno nismo zamijetili da je ta kolonija drugačija od onih od kojih smo uzimali uzorke što je najvjerojatnije

### ***Staphylococcus epidermidis***

*S. epidermidis* je bakterija koja u normalnim uvjetima nastanjuje površinu ljudske kože. Iako obično ne izaziva bolesti (nije patogena) ona može izazvati bolest kod ljudi s lošim imunitetom. Najčešće predstavlja problem za ljudi koji imaju kirurške implantate ili katetere, jer kod takvih može izazvati upalu. Unatoč tome, kod zdravih ljudi *S. epidermidis* ne samo da ne izaziva infekciju neko zapravo djeluje kao način obrane kože od drugih, opasnijih bakterija.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Kao i *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* je obično bezopasna za zdrave pojedince i dio je normalne kožne populacije bakterija. Infekciju ovom bakterijom kod zdravih pojedinaca su rijetke i ona je obično blagih simptoma. Ipak kod ljudi sa slabim imunitetom ova bakterija izaziva velike probleme zato jer je prirodno često otporna na veliki broj antibiotika. Infekcija ovom bakterijom pojavljuje se kod ljudi s cističnom fibrozom ili opeketinama i kod takvih bolesnika može dovesti do oboljenja kože, upale pluća ili čak sepse (zagađenje krvi).

### ***Bacillus cereus***

*B. cereus* je još jedna od čestih bakterija. Često je se nalazi na zemlji ili u hrani. Neke podvrste ove bakterije mogu izazvati lošu reakciju ako se pojedu dok druge podvrste djeluju kao probiotik, odnosno poboljšavaju

probavu. *B. cereus* je jedna od bakterija koja čuva tijelo od infekcija tako da se za svoje mjesto u želucu natječe s bakterijama koje uzrokuju trovanje hranom kao što je *Salmonela*.

### ***Bacillus subtilis***

*B. subtilis* se može naći u tlu i u probavnom sustavu ljudi. Ova bakterija sposobna je stvoriti endosporu, zaštitu od vanjskih uvjeta, zbog čega može preživjeti uvjete koji su previše ekstremni za neke druge bakterije uključujući visoke temperature (kuhanje). Ovo je jedna od rijetkih bakterija koja nastanjuje ljudsko tijelo, a da u pravilu ne ugrožava niti ljudi s smanjenim imunitetom.

### ***Enterococci faecalis***

Kao i mnoge gore navedene bakterije *E. faecalis* normalan je stanovnik ljudskog tijela i nalazi se prvenstveno u gastrointestinalnom traktu, ali je mnogo puta zabilježeno, najčešće kod ljudi koji su već bili u bolnici iz drugih razloga, bakterija uzrokovala infekcije koje ugrožavaju život. Posebna opasnost u zarazi ovom bakterijom leži u tome što je prirodno veliki broj tih bakterija otporan na različite antibiotike.

### ***Streptococcus mitis***

*S. mitis* je bakterija koja se prirodno nalazi na području usta i grla zdravih ljudi. Kao i sve gore navedene bakterije i ova bakterija može uzrokovati bolest - bakterijski endokarditis. Riječ je o infekciji prve (unutarnje) od tri ovojnice srca koja je naravno opasna po život.

Zanimljivo je da je ova bakterija pronađena na kameri Survivor3 letjelice koja je 1967.godine poslana na Mjesec gdje je provela dvije i pol godine. Iako su znanstvenici skloniji objašnjenju da je do kontaminacije došlo nakon povratka na Zemlju, postoje i oni koji vjeruju da su te bakterije preživjele dvije godine na Mjesecu. S obzirom da ovoj bakteriji, ali i većini gore navedenih, nije nužan kisik za preživljjenje ta je mogućnost moguća. Ova slavna putujuća bakterija postala je razlog zašto danas NASA ima stroge protokole za sterilnost sve opreme kako bi se izbjegla potencijalna kontaminacija novoistraživanih planeta (za sada prvenstveno Marsa) kako naše bakterije ne bi poremetile mikrofloru planeta ako ona postoji.

## **OSVRT NA CILJEVE**

Postojala su dva cilja ovog projekta. Prvi je bio uhodati metode za uzgoj i identifikaciju bakterija te pokušati identificirati neke od bakterija koje žive oko nas, a drugi je bio da svi mi vidimo kako je zapravo raditi u laboratoriju. Nažalost zbog ove situacije s epidemijom korona virusa, nismo uspjeli napraviti sve što smo namjeravali, a s obzirom da nismo imali inkubator, promjena vremena u vruće i sporno onemogućila je neke metode. Unatoč tome uspjeli smo uzgojiti neke bakterije te uz pomoć uhodanih, uspješnih metoda i literature pretpostaviti imena barem nekih od bakterija i time barem djelomično ostvariti prvi cilj. Drugi cilj je bio u potpunosti ostvaren. Kao i u pravom laboratoriju ni nama ništa nije iz prve polazilo za rukom.

## PORUKA MENTORICE

Treći cilj bio je cilj mene kao mentorice. Htjela sam da ova radionica zaokruži trogodišnje druženje i učenje u Domu mladih, te da im dočaram kako izgleda znanost van knjiga. Nažalost, zbog korone moj cilj nije ostvaren. Tijekom radionice nisam se pretjerano trudila da fotografijama zabilježim njihov rad računajući da do kraja radionice ima vremena. Zbog toga su samo četiri od polaznika na slikama. Nije bilo zadnje radionice na kojoj bi pričali neobavezno, jeli pizzu i pili sok i slikali fotografiju za kraj ovog izvještaja. Oni su upravo zakoračili u novo poglavlje života – srednju školu, njihove glave su usmjerene na druge stvari, iskreno vjerujem da je meni najteže palo šta nije bilo nikakve završne, oproštajne proslave. Ali oni su bili moja prva generacija, svaki od njih me izudio mnogo puta - neki puno puta više nego drugi (svi mi znamo o kome pričam 😊), ali svakog sam upoznala dovoljno dobro da mi se teško pozdraviti od njih. Na kraju u nedostatku ovogodišnje slike, evo slika od kraja prošle godine. Na njoj se nalazi Rino od kojeg smo se prošle godine oprostili kada je krenuo u srednju školu, i nažalost ne nalazi se Vito. Ali ovo je najbolje šta se može bez photoshopa.

