

ALLIUM TEST

Preučevanje vpliva kemikalij iz kozmetike na rast čebule in njeno DNK

ZA ZAČETEK

Allium test je biološka metoda, ki se uporablja za oceno potencialne toksičnosti kemikalij v okolju. Medtem ko kemijske analize zagotavljajo kvantitativne informacije o onesnaževalih, biološki testi razkrivajo njihove učinke na organizme in ponujajo vpogled v citotoksičnost in genotoksičnost. **Citotoksičnost** se nanaša na sposobnost snovi, da poškoduje ali uniči celice, medtem ko **genotoksičnost** vpliva na genetski material (DNK) in lahko vodi do citotoksičnih učinkov.

Čebula, znanstveno imenovana *Allium cepa* L., lahko služi kot bioindikator - organizem, ki z merljivimi biološkimi odzivi pomaga oceniti okoljske razmere, kot sta onesnaženje ali strupenost. Sam test se zato imenuje Allium test.



Čakaj, za ta test uporabljamo čebulo?

Ali ne bo zaradi tega laboratorij dišal po kuhinji?

Ja, ampak to je za znanost!

Poleg tega bomo videli, kako te kemikalije vplivajo na DNK čebule.

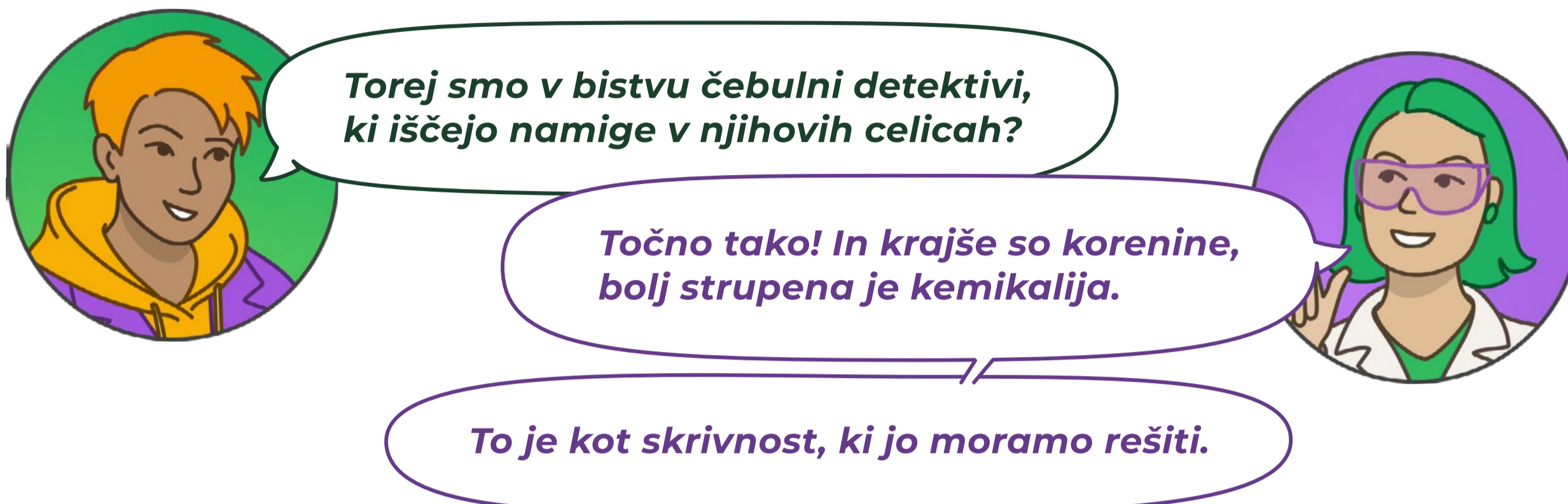
Super, kajne?



Allium test je hiter, stroškovno učinkovit, občutljiv na nizke koncentracije kemikalij in vsestranski pri ocenjevanju tako citotoksičnosti kot genotoksičnosti. Je neinvaziven, široko uporaben pri okoljskem monitoringu in omogoča jasna opazovanja rastlinskih kromosomov.

Test deluje tako, da se čebulice (*Allium cepa*) izpostavi različnim koncentracijam kemične raztopine. Nato se v določenem časovnem obdobju, običajno med 72 in 96 urami (3–4 dnevi), spremlja rast korenin čebule. Citotoksičnost se določi z merjenjem dolžine korenin – krajše korenine kažejo na višjo toksičnost. Genotoksičnost pa ocenjujemo pod mikroskopom z opazovanjem kromosomskih nepravilnosti med celično delitvijo (mitozo) v obarvanih celicah korenin.

V tem eksperimentu bodo študenti odkrivali škodljive učinke okoljskih kemikalij na celično delitev in rast *Allium cepa* L., kar bo omogočilo pridobivanje dragocenih podatkov za oceno okoljskega tveganja.



CILJ EKSPERIMENTA

Oceniti **citotoksične** in **genotoksične** učinke kemikalije (npr. kozmetične sestavine) na čebulo (*Allium cepa*) z opazovanjem rasti korenin in kromosomskih sprememb v celicah konic korenin.



UČNI CILJI

Ob koncu tega eksperimenta bodo študenti sposobni:

Splošni učni cilji:

- ✓ Razumeti pomen okoljske toksikologije.
- ✓ Spoznati razliko med citotoksičnostjo in genotoksičnostjo.
- ✓ Izboljšati laboratorijske spretnosti in tehnike.
- ✓ Razviti znanstveno raziskovanje in kritično mišljenje.

Specifični učni cilji:

- ✓ Razumeti postopek Allium testa in njegov pomen pri ocenjevanju citotoksičnosti in genotoksičnosti.
- ✓ Izmeriti dolžino korenin za določanje citotoksičnosti ter prepoznati kromosomske nepravilnosti za oceno genotoksičnosti.
- ✓ Oceniti vpliv testnih kemikalij na rast rastlin in genetski material.
- ✓ Razumeti, kako lahko preučevani okoljski toksini vplivajo na rast rastlin in kromosomsko celovitost.
- ✓ Uporabiti ugotovitve pri oceni okoljskega tveganja.



*Torej želimo čebulo s kozmetiko
polešpati?*



*Ja, samo da ne preverjamo, ali so videti
čudovito, ampak ali sploh preživijo!*

ČAS

Test citotoksičnosti:

- 1. del: 90 min
- 2. del (po 96 h / 4 dneh): 90 min

Test genotoksičnosti:

- 3. del (po dodatnih 24 h = 1 dnevju): 90 min

Možno je izvesti samo **test citotoksičnosti** - prvi in drugi del eksperimenta; zlasti v primeru manj opremljenih laboratorijev ali če študenti ne prihajajo neposredno iz naravoslovno- ali tehnično-usmerjenih programov. V nasprotnem primeru priporočamo izvedbo tudi tretjega dela - **testa genotoksičnosti**.



MATERIALI in PRIPOMOČKI

Pripomočki:

- 15 steklenih epruвет brez pokrova (*končno število prilagodite številu vzorcev in testnih koncentracij*),
- 6 stojal za epruvete (primernih za vsaj 5 epruвет),
- plastične Pasteurjeve pipete (kapalke),
- avtomatske pipete s konicami,
- čaše (100, 250 in 500 ml),
- merilne bučke (100 ml),
- pinceta,
- 15 čebulic (*Allium cepa* L.) (*ali več*),
- milimetrsko ravnilo,
- objektna stekla,
- krovna stekla,
- grelna plošča,
- svetlobni mikroskop s 400-kratno povečavo (*ali vsaj 100×*).

Kemikalije:

- testna kemikalija/kozmetični izdelek (PRIMER: 30-odstotni vodikov peroksid ali šampon),
- voda iz pipe (negativna kontrola),
- 1 % raztopina 0,1 M HCl ali preprosto kis (pozitivna kontrola),
- orcein – očetno barvilo,
- 1 % raztopina HCl,
- fiksativ (etanol in očetna kislina v razmerju 3:1).

VARNOSTNI UKREPI



Pred izvedbo eksperimenta se prepričajte, da ste prebrali in razumeli poglavje **Splošni varnostni ukrepi** v tem priročniku.

Poleg tega upoštevajte naslednje posebne varnostne ukrepe:

- ⚠ **Bodite previdni pri segrevanju:** Pri segrevanju snovi bodite previdni, da ne pride do opeklin. Uporabljajte ustrezna orodja in vire toplote.
- ⚠ **Bodite previdni pri barvanju:** Z barvili rokujte v digestoriju, saj imajo močan vonj. Barvila so močna, zato vedno uporabljajte nitrilne rokavice in zaščitni laboratorijski plašč.



Ja, raje jokam zaradi čebule kot zaradi nesreče.

Varnost je na prvem mestu! Ne želimo poškodb, povezanih s čebulo.



PRIPRAVA EKSPERIMENTA



Korak 1 → Priprava delovne površine

Poskrbite, da bo vaš delovni prostor čist in brez motečih dejavnikov. Pripravite vse potrebne materiale. Nosite varnostno opremo.

Korak 2 → Priprava eksperimenta

Koncentracije: Pripravite 3 različne koncentracije (c_1 – c_3) ali razredčitve (R_1 – R_3) testne kemikalije. Lahko izberete tudi kozmetični izdelek. Vsako koncentracijo testirajte v treh ponovitvah (A, B in C).

TESTNA KEMIKALIJA / KOZMETIČNI IZDELEK: _____

PIKTOGRAMI: _____

Volumen: Vsaka testna raztopina mora imeti končni volumen 100 ml.

Če uporabljate kemikalijo:

Izračunajte količino osnovne (začetne) raztopine (R_0) in vode (H_2O), ki jo potrebujete za pripravo vsake testne raztopine (R_1 – R_2).

REDČENJE		Koncentracija kemikalije		Volumen kemikalije (ml)	Volumen H_2O (ml)
R_0	Začetna raztopina	C_0		/	/
R_1	10×	C_1			
R_2	100×	C_2			
R_3	1000×	C_3			

Če uporabljate kozmetični izdelek:

Ocenite približno razredčitev glede na volumenske odstotke.

REDČENJE		Koncentracija izdelka		Volumen izdelka (ml)	Volumen H_2O (ml)
R_1	25%	C_1			
R_2	10%	C_2			
R_3	1%	C_3			

Kontrolni vzorci: Kot negativni kontrolni vzorec uporabite vodo iz pipe (C_{neg}), kot pozitivni kontrolni vzorec pa 1 % raztopino 0,1 M HCl ali kis (C_{pos}).

Pozitivna in negativna kontrola sta bistveni za preverjanje veljavnosti rezultatov. Pozitivna kontrola pokaže pričakovani učinek in potrди, da eksperiment deluje, medtem ko negativna kontrola ne pokaže učinka, s čimer zagotovimo, da so morebitne spremembe posledica testirane snovi.

Epruvete: Pripravite steklene epruvete brez navojev in pokrovčkov.

Epruvete ustrezno označite (*npr. c1 A*) in jih postavite v plastična stojala za epruvete. Vse tri ponovitve posamezne testne koncentracije naj bodo v svojem stojalu za epruvete. Tudi stojala označite, da se vzorci ne zamenjajo.



In ne želimo nobenih neželenih gostov, zato označujte pazljivo!

Označevanje vsega? Zdi se, kot da bi organizirali znanstveno zabavo!



Čebula *Allium cepa* L.: Izberite čebulice (3 testne koncentracije v 3 ponovitvah + 2 kontrolna vzorca - skupaj 15 čebulic) podobne velikosti, da se dobro prilegajo na vrh epruвет in zmanjšajo izhlapevanje tekočine.

Previdno odrežite minimalni sloj (do 2 mm) posušenega koreninskega dna, da se koreninsko tkivo izpostavi testni raztopini. Poskrbite, da pri tem čebulico ne poškodujete.

Korak 3 → Izvedba eksperimenta

1. del:

1. S kapalko previdno napolnite epruvete s pripravljenimi raztopinami do vrha.
2. Čebulice nežno postavite na vrh epruвет, tako da bodo potopljene v testni raztopini.
3. Vsak dan s kapalko dodajte izhlapelo ali uporabljeno raztopino, pri kontrolnih vzorcih pa vodo.
4. Stojala z epruветami postavite na dobro osvetljeno mesto, npr. na mizo ob oknu.
5. Po štirih dneh izmerite dolžino korenin (2. del) in pripravite mikroskopske preparate za citogenetsko analizo (3. del).

2. del: CITOTOKSIČNOST

6. Čebulice odstranite iz epruвет in z milimetrskim ravnilom izmerite dolžino petih najdaljših korenin.

***3. del: GENOTOKSIČNOST**

7. Za vsako koncentracijo odrežite 0,5 cm dolge konice treh najdaljših korenin.

8. FIKSACIJA:

- Konice korenin potopite v fiksativ (etanol-ocetna kislina, 3:1).
- Za približno 24 ur jih shranite v zamrzovalniku.

Fiksacija ohranja strukturo celic in jih stabilizira, tako da ostanejo čim bolj podobne stanju v živem organizmu.

9. BARVANJE:

- Pripravite barvilo orcein (ena raztopina na skupino).
- Pripravite vodno kopel pri 60 °C.
- V čašo nalijte 1 % HCl in jo segrejte v vodni kopeli.
- Vzemite konico korenine iz fiksativa in jo potopite v segreto HCl za 5 minut.
- Po 5 minutah sperite konico korenine z destilirano vodo.
- Konico korenine položite na objektno steklo in dodajte barvilo orcein.
- Vzorec prekrijte s krovnim steklom in s pritiskom nanj zmečkajte konico korenine, da pripravite razmaz (mikroskopski preparat).

Korak 4 → Spremljanje in beleženje podatkov**CITOTOKSIČNOST**

Po 96 urah (4 dneh) zabeležite meritve v tabelo in izračunajte povprečne dolžine korenin.



Merjenje korenin? Nisem vedel, da imajo čebulice lepotna tekmovanja.

Seveda ga imajo. Tiste z najdaljšimi koreninami dobijo nagrado za najmanj strupene!



Meritve dolžine korenin

Koncentracija	C_{neg}		C_{pos}		C_1		C_2		C_3	
Ponovitev	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Korenina 1 (mm)										
Korenina 2 (mm)										
Korenina 3 (mm)										
Korenina 4 (mm)										
Korenina 5 (mm)										
Povprečna dolžina korenin (mm)										

*GENOTOKSIČNOST

Mikroskopija: Opazujte celično delitev in kromosome pod svetlobnim mikroskopom. Prepoznajte vsaj 100 celic v metafazi in ocenite stanje kromosomov. Zabeležite odstotek vseh celic v metafazi ter celic s kromosomskimi poškodbami.

1. Preštejte in zabeležite skupno število opazovanih celic v vsakem vzorcu (najmanj 100, optimalno 1000). (Študenti lahko združijo svoje rezultate, da dosežejo čim večje število prešteti celic).
2. Preštejte in zabeležite število celic, ki so v mitozii.
3. Preštejte in zabeležite število celic v metafazi.



Štetje celic? To je kot mikroskopski lov na zaklad!

In zaklad je razumevanje, kako kemikalije vplivajo na naše okolje!



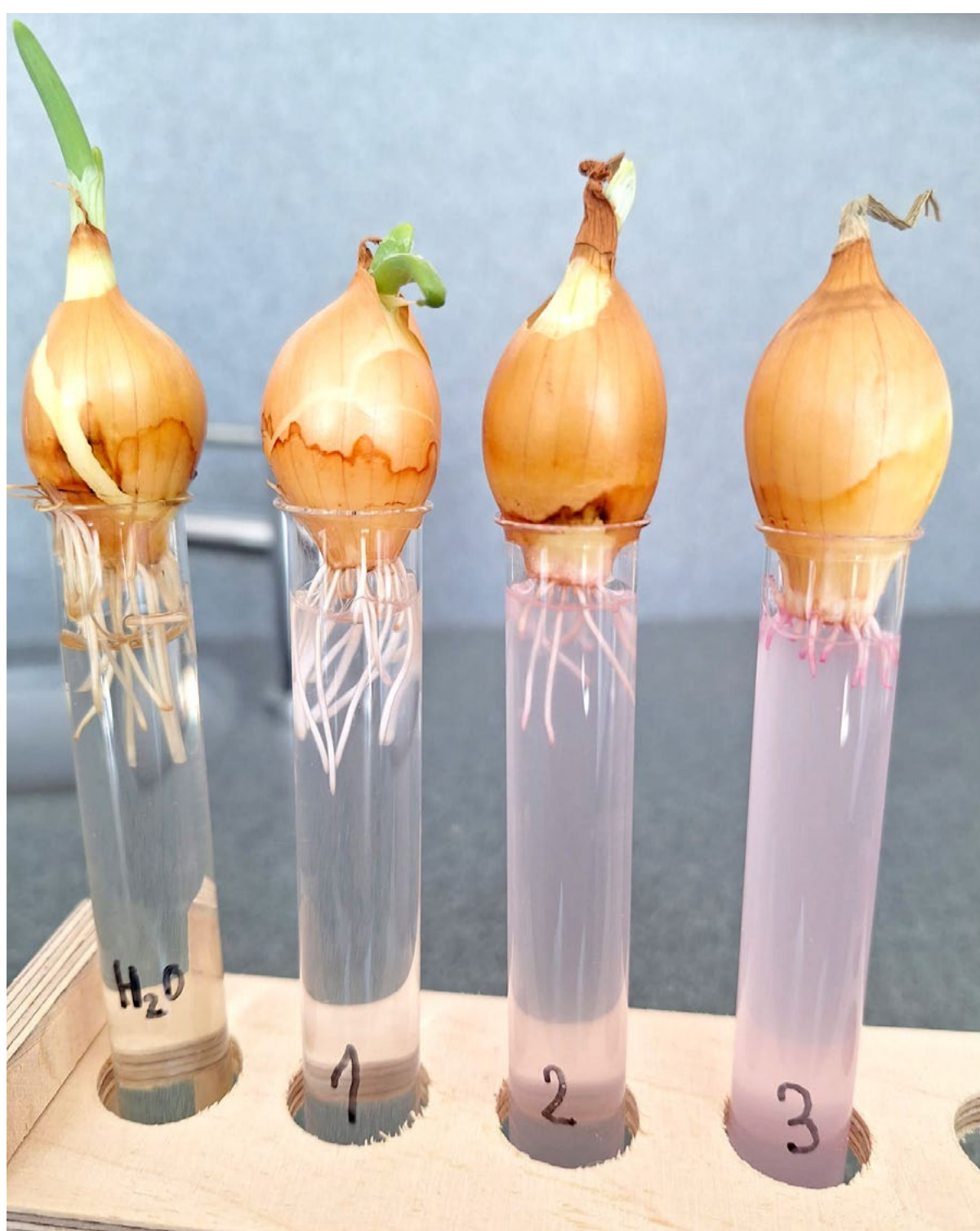
Izračun indeksov:

Mitotski indeks: Število celic v mitozii na 1000 pregledanih celic.

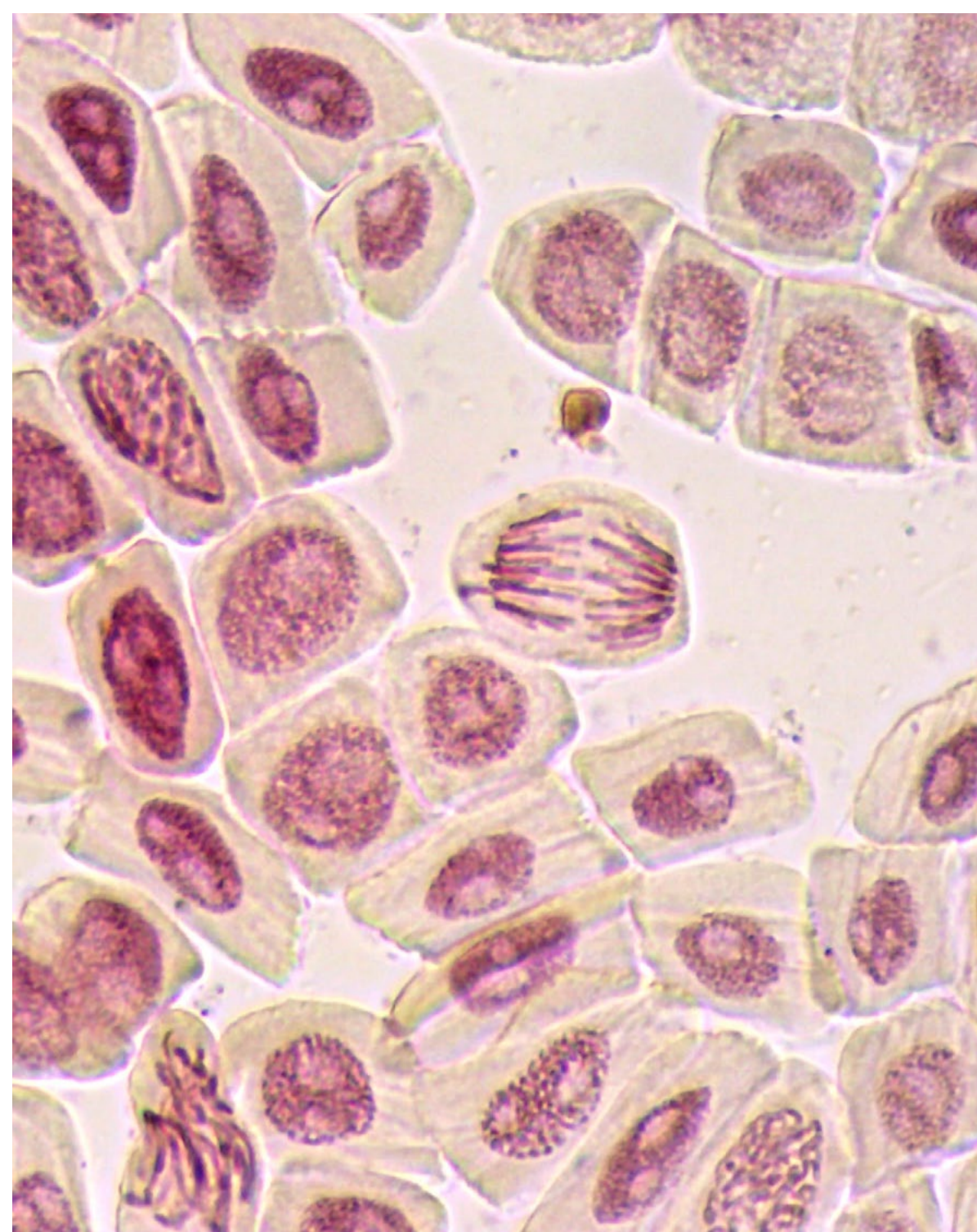
$$\frac{\text{Število celic v mitozii}}{\text{Skupno število celic}} \times 100$$

Metafazni indeks: Število celic v metafazi na 1000 celic v mitozii.

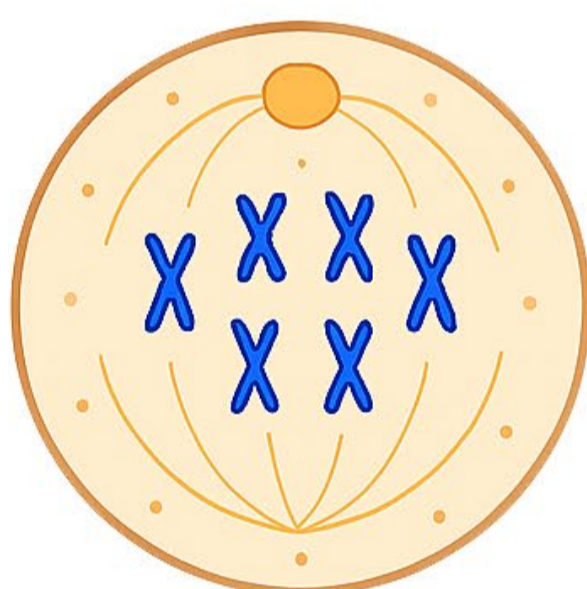
$$\frac{\text{Število celic v metafazi}}{\text{Število celic v mitozii}} \times 100$$



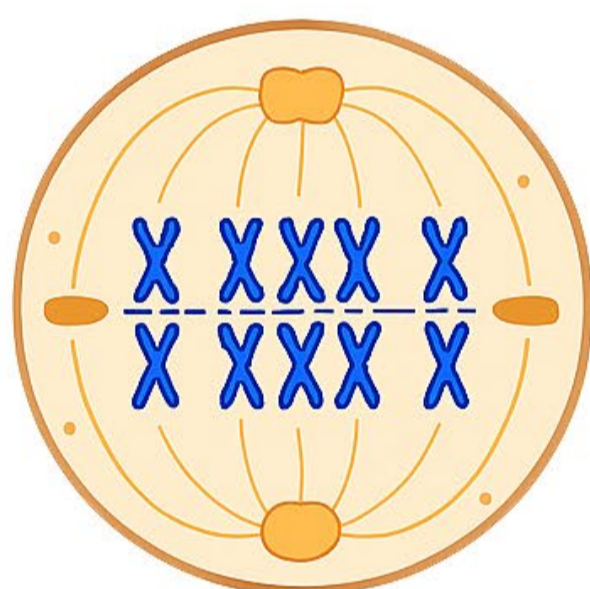
Test citotoksičnosti



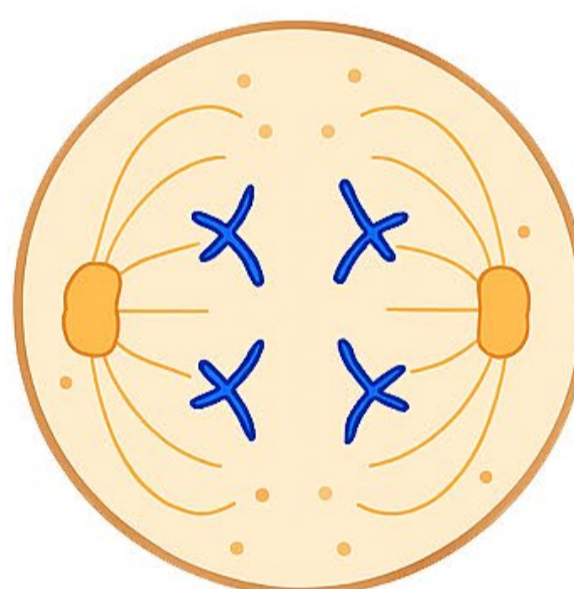
Test genotoksičnosti



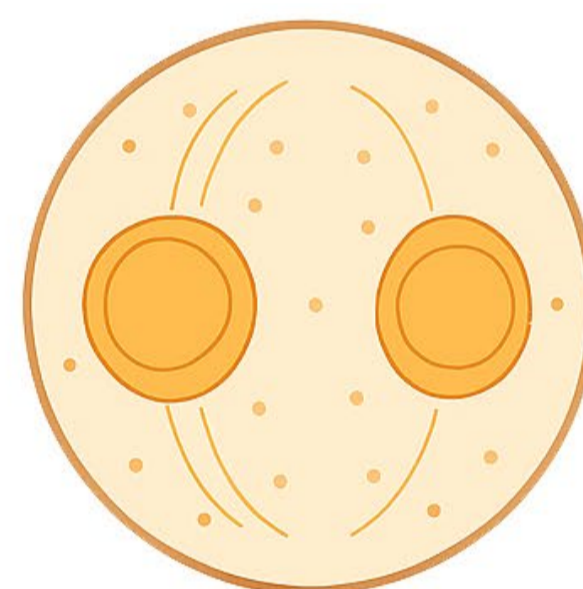
1. Prophase



2. Metaphase



3. Anaphase



4. Telophase

Slika 2: Faze celične delitve (Interfaza – celica raste in kopira svojo DNK; **Profaza** – kromosomi se zgostijo in postanejo vidni; **Metafaza** – kromosomi se poravnajo na sredini celice; **Anafaza** – kromatide se razdelijo; **Telofaza** – nastaneta dve novi jedri; Citokineza – celica se razdeli na dve novi celici)

REZULTATI

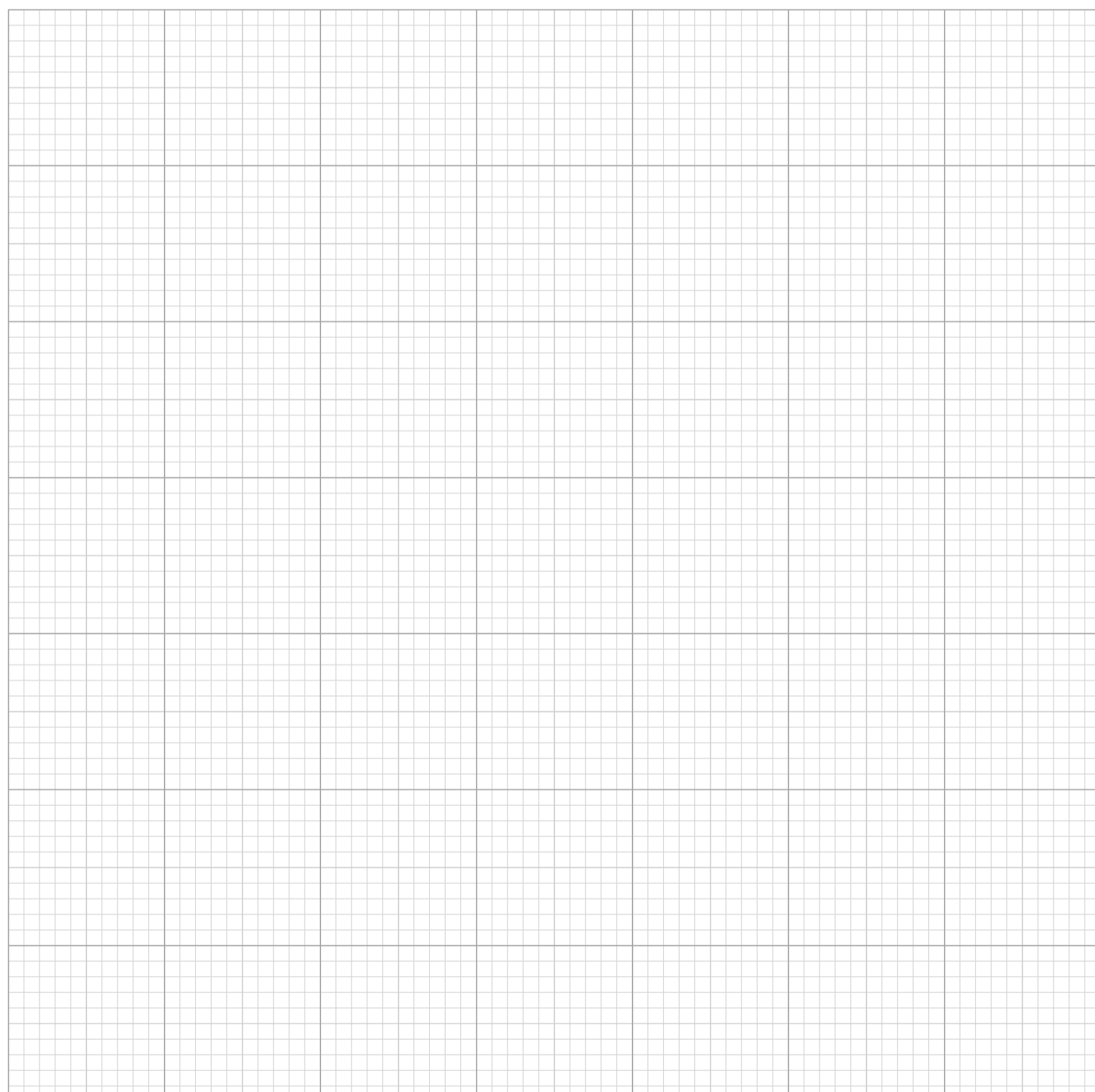


CITOTOKSIČNOST

Povprečne dolžine korenin: izračunajte povprečne dolžine med vsemi ponovitvami.

Koncentracija	Povprečna dolžina korenin (mm)
C_{neg}	
C_{pos}	
C_1	
C_2	
C_3	

Na podlagi povprečnih dolžin izmerjenih korenin narišite graf, ki prikazuje odnos med dolžino korenin in koncentracijo testne kemikalije.



Komentarji:

GENOTOKSIČNOST*Tabela za predstavitev podatkov za mitotski in metafazni indeks**

Vzorec	Skupno število celic	Število celic v mitozi	Število celic v metafazi	Mitotski indeks (%)	Metafazni indeks (%)
C _{neg}					
C _{pos}					
C ₁					
C ₂					
C ₃					

ODGOVORITE NA KLJUČNA VPRAŠANJA



Na vprašanja odgovorite ustno ali pisno. Poudarite sodelovanje in kritično razmišljanje skozi celoten postopek!

1. Kaj je ekotoksikologija in zakaj je pomembna v zvezi z našo vsakodnevno uporabo kozmetike?
2. Kako lahko kemikalije v okolju vplivajo na življenje rastlin in živali?
3. Kateri so pogosti viri onesnaževal v okolju?
4. Kako kozmetični izdelki in njihove kemične sestavine vplivajo na okolje?
5. Ali lahko kemikalije v kozmetiki vplivajo tudi na zdravje ljudi? Če da, kako?
6. Kakšne razlike v dolžini korenin ste opazili med kontrolno skupino in testnimi skupinami?
7. Ali bi po vašem mnenju različni časi izpostavljenosti v tem eksperimentu vplivali na rast korenin?
8. Zakaj je pri izvajanju Allium testa pomembno vključiti kontrolno skupino?
9. Poskusite opisati vse faze mitoze?
10. Katere vrste nepravilnosti v celični delitvi ste opazili pod mikroskopom pri testnih vzorcih?
11. Kako lahko opazovanje celične delitve pomaga določiti genotoksične učinke kemikalije?
12. Kakšne zaključke lahko izpeljete o genotoksičnosti testirane kemikalije na podlagi svojih opazovanj?



Ali moramo to res vedeti?

Ali ne moremo preprosto vprašati rastlin in živali?

Ko bi le znale govoriti! A ker ne morejo, moramo to ugotoviti sami.



Kritično razmislite

13. Kaj po vašem mnenju pomeni izraz »kemični koktajl« v kontekstu kozmetičnih izdelkov?
14. Zakaj je pomembno upoštevati skupne učinke več kemikalij v enem izdelku?
15. Kakšna so po vašem mnenju morebitna tveganja pri uporabi izdelkov, ki vsebujejo mešanico različnih kemikalij?



Kemični koktajl? Ne zveni kot zabava zame.



Ja, mešanje kemikalij je lahko recept za katastrofo.

ZA UČITELJE



Dodatne aktivnosti/razširitve (neobvezno):

Predlagajte nov eksperiment s spremembo ene spremenljivke - na primer dodajte drugo kemikalijo ali mešanico kemikalij. Spremljate lahko tudi delitev celic v različnih časovnih obdobjih (po 24, 48, 72 in/ali 96 urah) izpostavljenosti.

Prilagoditev eksperimenta za **srednješolce**:

Eksperiment poenostavite:

- ✓ **Osredotočite se na merjenje dolžine korenin:** Namesto citogenetske analize naj učenci izmerijo in primerjajo dolžino korenin čebulic, izpostavljenih različnim koncentracijam gospodinjskega ali kozmetičnega izdelka.
- ✓ **Uporabite manj koncentracij:** Zmanjšajte število vzorcev na tri (npr. kontrolna, nizka in visoka koncentracija), da poenostavite zbiranje in analizo podatkov.
- ✓ **Vizualno opazovanje:** Podrobno vizualno opazujete rast korenin in vse vidne spremembe v morfologiji korenin.

Primer:

- ✓ **Cilj:** Izmeriti vpliv gospodinjskega sredstva (npr. kisa) ali kozmetičnega izdelka (npr. šampona) na rast korenin čebulic.
- ✓ **Postopek:** Uporabite tri koncentracije (0 %, 10 % in 50 % raztopine kisa/šampona) in izmerite dolžino korenin po 96 urah.
- ✓ **Zbiranje podatkov:** Zabeležite dolžine korenin in primerjajte povprečne vrednosti med različnimi koncentracijami.

Prilagoditev eksperimenta za **osnovnošolce**:

Eksperiment poenostavite:

- ✓ **Osnovno opazovanje rasti korenin:** Osredotočite se na opazovanje in merjenje rasti korenin brez uporabe kemikalij.
- ✓ **Uporabite varne materiale:** Uporabite varne, nestrupene snovi, kot so voda, slana voda in sladka voda, razredčeno milo za roke, losjon ali balzam, in opazujte njihov vpliv na rast korenin.
- ✓ **Praktične dejavnosti:** Vključite praktične dejavnosti, kot so risanje in označevanje delov čebulic in korenin.

Primer:

- ✔ **Cilj:** Opazovati, kako različne vrste vode vplivajo na rast čebulnih korenin.
- ✔ **Postopek:** Uporabite tri različne vodne raztopine (vodo iz pipe, razredčeno milo za roke in razredčen balzam) in po 96 urah izmerite dolžino korenin.
- ✔ **Zbiranje podatkov:** Zabeležite dolžino korenin in naredite preproste primerjave. Učenci naj narišejo slike svojih opazovanj.