

TEST S CIBULÍ (ALLIUM)

Jak chemikálie ovlivňují růst kořenů cibule a případně i její DNA.

KONTEXT

Allium test je biologická metoda, která se používá ke zjišťování, zda jsou chemické látky v životním prostředí škodlivé. Zatímco chemické rozborů ukazují, kolik znečišťujících látek se v prostředí nachází, biologické testy sledují, jak tyto látky působí na živé organismy. Díky Allium testu můžeme poznat, zda látky poškozují buňky (**cytotoxicita**) nebo jejich genetickou informaci – DNA (**genotoxicita**), což může vést i k dalšímu poškození buněk.

Cibule (latinsky *Allium cepa* L.) může sloužit jako bioindikátor, tedy živý organismus, který pomáhá zjistit stav životního prostředí. Podle reakcí cibule lze poznat například míru znečištění nebo škodlivost různých látek. Tento způsob zkoumání se proto nazývá Alliový test neboli Allium test.



Počkej, my na tenhle test používáme cibuli?

Nebude to pak v laboratoři smrdět jako v kuchyni?



Jo, ale je to pro vědu!

A navíc uvidíme, jak tyhle chemikálie zasahují do DNA cibule.

To je přece super, ne?

Test s cibulí je rychlá a levná metoda, která dokáže odhalit i velmi nízkou koncentraci chemických látek. Používá se k hodnocení toho, zda látky poškozují buňky (cytotoxicita) nebo genetickou informaci v nich (genotoxicita). Je neinvazivní, často se využívá při sledování stavu životního prostředí a umožňuje dobře pozorovat chromozomy v buňkách cibule.

Test funguje tak, že cibulové hlízy jsou vystaveny různým koncentracím chemického roztoku. Kořeny cibulí jsou poté sledovány z hlediska růstu po stanovenou dobu, obvykle 72–96 hodin (3–4 dny). Cytotoxicita se určuje měřením délky kořenů – kratší kořeny ukazují na vyšší toxicitu. Genotoxicita se navíc hodnotí pod mikroskopem zkoumáním chromozomálních abnormalit během buněčného dělení (mitózy) v obarvených buňkách kořenových špiček.

V tomto experimentu budou studenti zkoumat škodlivé účinky chemických látek v prostředí na růst a dělení buněk *cibule* a získají tak cenné informace pro hodnocení rizik pro životní prostředí.



Takže jsme vlastně cibuloví detektivové, kteří hledají stopy v jejich buňkách?

Přesně tak! A čím kratší kořeny, tím toxičtější je daná chemická látka.



Je to jako záhada, kterou musíme vyřešit.

CÍL EXPERIMENTU

Cílem je posoudit **cytotoxické** a **genotoxické** účinky chemické látky (např. kosmetické složky) na cibuli (*Allium cepa*) prostřednictvím sledování růstu kořenů a chromozomálních změn v buňkách kořenových špiček.



VZDĚLÁVACÍ CÍLE

Na konci tohoto experimentu budou studenti schopni:

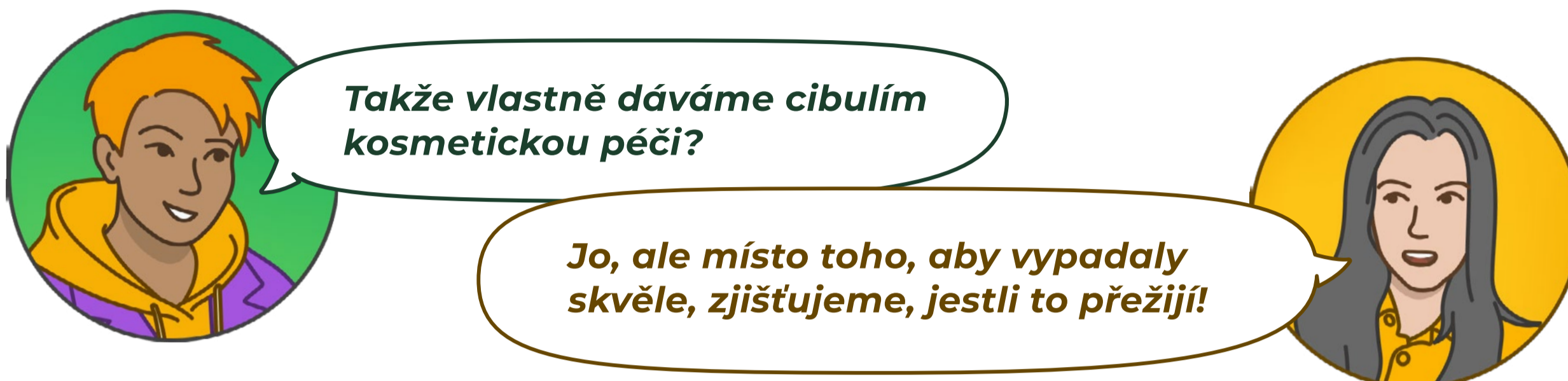
Obecné vzdělávací cíle

- ✓ Pochopit význam environmentální toxikologie.
- ✓ Rozlišovat mezi cytotoxicitou a genotoxicitou.
- ✓ Zlepšit laboratorní dovednosti a techniky.
- ✓ Rozvíjet schopnosti vědeckého bádání a kritického myšlení.

Specifické vzdělávací cíle

- ✓ Porozumět postupu Alliového testu a jeho významu při hodnocení cytotoxicity a genotoxicity.
- ✓ Měřit délku kořenů pro stanovení cytotoxicity a identifikovat chromozomální abnormality pro posouzení genotoxicity.
- ✓ Vyhodnotit vliv testovaných chemických látek na růst rostlin a genetický materiál.

- ✓ Pochopit, jak testované environmentální toxiny ovlivňují růst rostlin a integritu chromozomů.
- ✓ Aplikovat získané poznatky při hodnocení environmentálních rizik.



ČAS

Test cytotoxicity:

Část I: 90 minut

Část II (po 96 h / 4 dnech): 90 minut

Test genotoxicity:

Část III (po dalších 24 h / 1 dni): 90 minut

Je možné provést pouze **test cytotoxicity** – první a druhou část experimentu; zejména v případě méně vybavených laboratoří nebo pokud studenti nepocházejí přímo z přírodovědného či technického oboru.

V opačném případě doporučujeme provést také třetí část – **test genotoxicity**.



POTŘEBNÉ MATERIÁLY

Vybavení:

- 15 skleněných zkumavek bez víčka (konečný počet přizpůsobte počtu vzorků a testovaných koncentrací)
- 6 stojánků na zkumavky (vhodných alespoň pro 5 zkumavek)
- Plastové Pasteurovy pipety (kapátka)
- Automatické pipety s odpovídajícími špičkami
- Kádinky (100, 250 a 500 ml)
- Odměrné baňky (100 ml)
- Pinzeta
- 15 cibulí (nebo více)
- Milimetrové pravítko
- Podložní mikroskopická skla
- Krycí sklíčka
- Topná deska
- Světelný mikroskop se zvětšením 400× (nebo alespoň 100×)

Chemikálie:

- Testovaná chemická látka / kosmetický přípravek (PŘÍKLAD: 30 % peroxid vodíku nebo šampon)
- Voda z vodovodu (negativní kontrola)
- 1 % roztok 0,1 M HCl nebo ocet (pozitivní kontrola)
- Orcein-octové barvivo
- 1 % roztok HCl
- Fixační roztok (etanol a kyselina octová v poměru 3:1)

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ



Před provedením tohoto experimentu se ujistěte, že jste si přečetli a porozuměli části **Obecná bezpečnostní opatření** v této příručce.

Dále věnujte pozornost následujícím specifickým bezpečnostním opatřením:

- ⚠ **Opatrnost při zahřívání:** Při zahřívání látek dbejte zvýšené opatrnosti, abyste předešli popáleninám. Používejte vhodné nástroje a zdroje tepla.
- ⚠ **Opatrnost při práci s barvivy:** S barvivy pracujte v digestoři, protože mají silný zápach. Barviva jsou intenzivní, proto vždy používejte nitrilové rukavice a ochranný laboratorní plášť.



Jo, raději budu brečet kvůli cibuli než kvůli nehodě.

Bezpečnost především! Nechceme žádná zranění způsobená cibulí.



POSTUP



Krok 1 → Příprava pracovního prostoru

Ujistěte se, že je vaše pracovní plocha čistá a bez rušivých vlivů. Připravte si všechny potřebné pomůcky. Oblékněte si ochranné prostředky.

Krok 2 → Příprava experimentu

Koncentrace: Připravte 3 různé koncentrace (c_1 – c_3) nebo ředění (R_1 – R_3) testované chemické látky. Můžete také zvolit kosmetický přípravek. Každou koncentraci testujte ve 3 opakováních (A, B a C).

TESTOVANÁ CHEMICKÁ LÁTKA / KOSMETICKÝ PŘÍPRAVEK: _____

PIKTOGRAMY: _____

Objem: Každý testovací roztok by měl mít objem 100 ml.

Pokud používáte konkrétní chemickou látku:

Vypočítejte množství zásobního roztoku (R_0) a vody z vodovodu potřebné pro každý testovací roztok (R_1 – R_2).

ŘEDĚNÍ		Koncentrace chemická látka / produktu		Objem chemické látky (ml)	Objem H ₂ O (ml)
R₀	Neředěný (zásobní roztok)	C_0		/	/
R₁	10×	C_1			
R₂	100×	C_2			
R₃	1000×	C_3			

Pokud používáte kosmetický přípravek:

Odhadněte přibližná ředění na základě objemových procent.

ŘEDĚNÍ		Koncentrace chemická látka / produktu		Objem produktu (ml)	Objem H ₂ O (ml)
R₁	25%	C_1			
R₂	10%	C_2			
R₃	1%	C_3			

Kontrolní vzorky: Použijte vodu z vodovodu (C_{neg}) jako negativní kontrolu a 1 % roztok 0,1 M HCl nebo ocet jako pozitivní kontrolu (C_{pos}).

Pozitivní a negativní kontroly jsou nezbytné pro ověření platnosti výsledků. Pozitivní kontrola vykazuje očekávaný účinek a potvrzuje, že experiment funguje, zatímco negativní kontrola nevykazuje žádný účinek a zajišťuje, že pozorované změny jsou způsobeny testovaným ošetřením.

Zkumavky: Připravte skleněné zkumavky bez závitů a bez uzávěrů.

Zkumavky vhodně označte (např. C1 A) a umístěte je do plastových stojánků. Všechny tři repliky každé testované koncentrace by měly být umístěny ve vlastním stojánku. Stojánky rovněž označte, aby nedošlo k záměně vzorků.



A nechceme žádné nezvané hosty, takže pečlivě označuj!

Označování všeho? To je jak organizovat vědeckou párty!



Cibule (*Allium cepa* L.): Vyberte cibule (3 testované koncentrace ve 3 opakováních + 2 kontroly – celkem 15 cibulí) podobné velikosti tak, aby dobře pasovaly na horní část zkumavek a minimalizovalo se odpařování kapaliny.

Opatrně odřízněte minimální vrstvu (max. 2 mm) zaschlé kořenové báze, aby se odkryla kořenová tkáň a mohla být vystavena testovanému roztoku. Dbejte na to, aby báze cibule zůstala neporušená.

Krok 3: → Provedení experimentu

Část I:

1. Pomocí kapátka opatrně naplňte zkumavky připravenými roztoky až po okraj.
2. Jemně umístěte cibule na horní část zkumavek tak, aby byly ponořeny do testovaného roztoku.
3. Denně doplňujte odpařený nebo spotřebovaný roztok kapátkem, u kontrolních vzorků vodou.
4. Stojany se zkumavkami umístěte na dobře osvětlené místo, např. na laboratorní stůl u okna.
5. Po 4 dnech změřte délky kořenů (Část II) a *připravte mikroskopické preparáty pro cytogenetickou analýzu (Část III).

Část II: CYTOTOXICITA:

6. Vyjměte cibule ze zkumavek a změřte délky pěti nejdelších kořenů pomocí milimetrového pravítka.

***Část III: GENOTOXICITA:**

7. Z každé koncentrace odstříhnete špičky (0,5 cm) tří nejdelších kořenů.

8. FIXACE:

- Ponořte kořenové špičky do fixačního roztoku (ethanol–kyselina octová, 3:1).
- Uložte je do mrazáku přibližně na 24 hodin.

Fixace zachovává buňky a udržuje jejich podobu jako u živých organismů.

9. BARVENÍ:

- Připravte barvivo orcein (jeden roztok pro každou skupinu).
- Připravte vodní lázeň na 60 °C.
- Do kádinky nalijte 1% HCl a zahřejte ji ve vodní lázni.
- Vyjměte kořenovou špičku z fixačního roztoku a ponořte ji na 5 minut do zahřáté HCl.
- Po 5 minutách kořenovou špičku opláchněte destilovanou vodou.
- Umístěte kořenovou špičku na podložní sklíčko a přidejte barvivo orcein.
- Přikryjte vzorek krycím sklíčkem a rozmačkejte kořenovou špičku, aby vznikl nátěr (mikroskopický preparát).

Krok 4 → Monitorování a záznam dat**CYTOTOXICITA**

Po 96 hodinách (4 dnech) zaznamenejte naměřené hodnoty do tabulky a vypočítejte průměrnou délku kořenů.



Měření kořenů? Nevěděl jsem, že cibule mají soutěže krásy.



No jistě, nejdelší kořeny vyhrávají cenu za nejnižší toxicitu!

Měření délky kořenů

Koncentrace	C_{neg}		C_{pos}		C_1		C_2		C_3	
Opakování	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Kořen 1 (mm)										
Kořen 2 (mm)										
Kořen 3 (mm)										
Kořen 4 (mm)										
Kořen 5 (mm)										
Průměrná délka kořenů (mm)										

*GENOTOXICITA

Práce s mikroskopem: Pomocí světelného mikroskopu pozorujte dělení buněk a jejich chromozomy. Vyhledejte alespoň 100 buněk v metafázi a zhodnoťte stav jejich chromozomů. Zapište procento všech buněk v metafázi a také procento buněk s poškozenými chromozomy.

1. Spočítejte a zaznamenejte celkový počet buněk pozorovaných v každém vzorku (alespoň 100, optimálně 1000). (Studenti mohou své výsledky sloučit, aby dosáhli co nejvyššího počtu spočítaných buněk.)
2. Spočítejte a zaznamenejte počet buněk procházejících mitózou.
3. Spočítejte a zaznamenejte počet buněk v metafázi.



Počítání buněk? To je jako hledání pokladu pod mikroskopem!



A tím pokladem je pochopení toho, jak chemické látky ovlivňují naše životní prostředí!

Výpočet indexů

Mitotický index: Počet buněk v mitóze na 1 000 pozorovaných buněk.

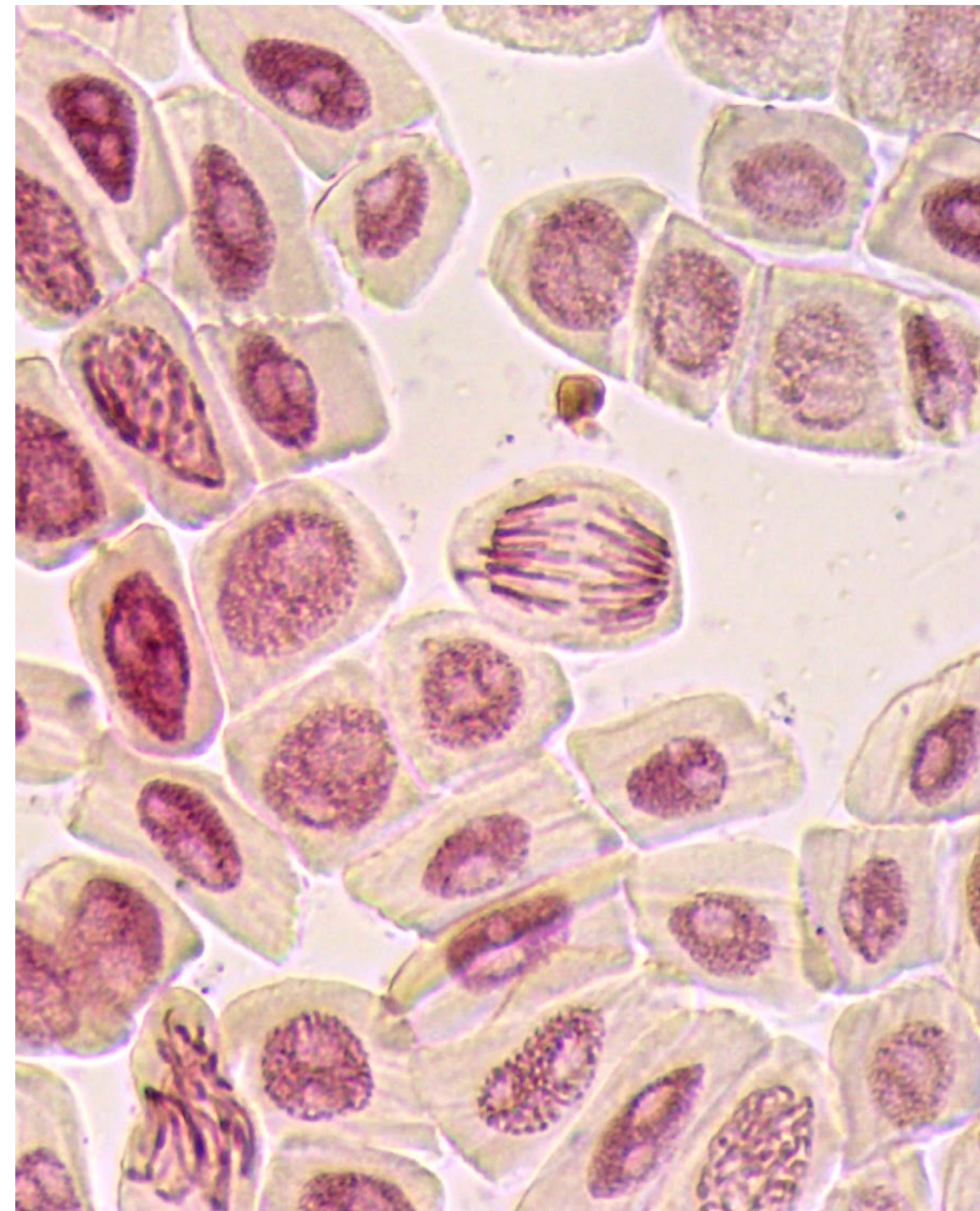
$$\frac{\text{počet buněk v mitóze}}{\text{celkový počet buněk}} \times 100$$

Metafázový index: Počet buněk v metafázi na 1 000 buněk v mitóze.

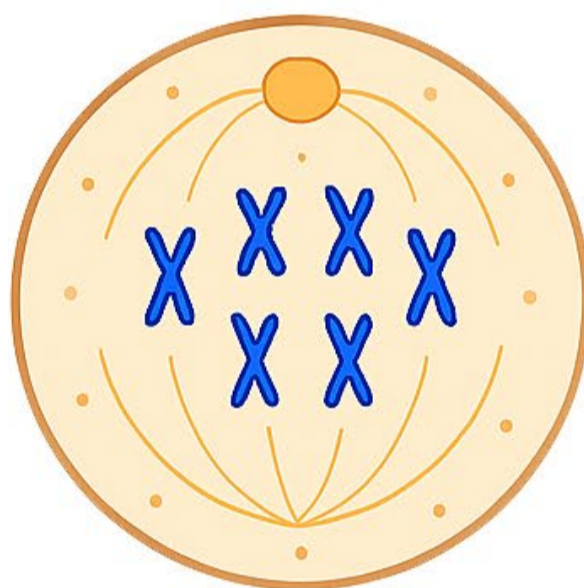
$$\frac{\text{počet buněk v metafázi}}{\text{počet buněk v mitóze}} \times 100$$



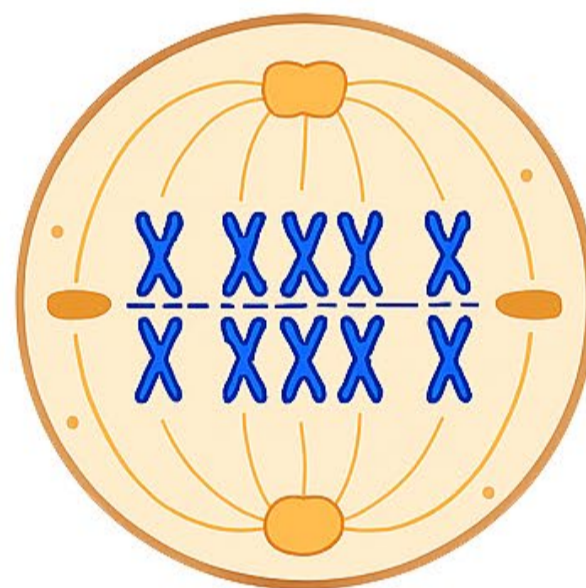
Test cytotoxicity



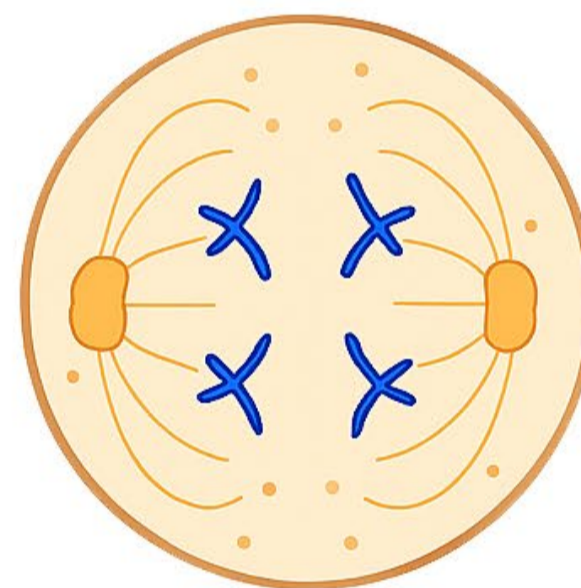
Test genotoxicity



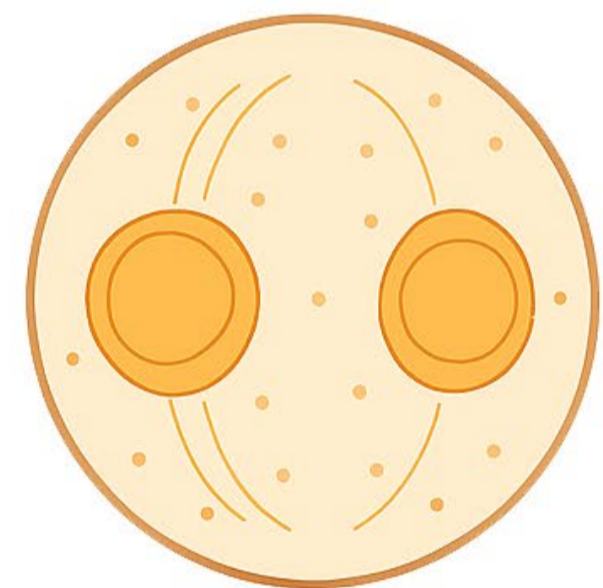
1. Prophase



2. Metaphase



3. Anaphase



4. Telophase

Fáze buněčného dělení: (Interfáze – buňka roste a kopíruje svou DNA; **1. Profáze** – chromozomy se zhušťují a stávají se viditelnými; **2. Metafáze** – chromozomy se seřadí uprostřed buňky; **3. Anafáze** – chromatidy jsou od sebe oddělovány; **4. Telofáze** – vznikají dvě nová buněčná jádra; Cytokineze – buňka se rozdělí na dvě dceřiné buňky)

VÝSLEDKY

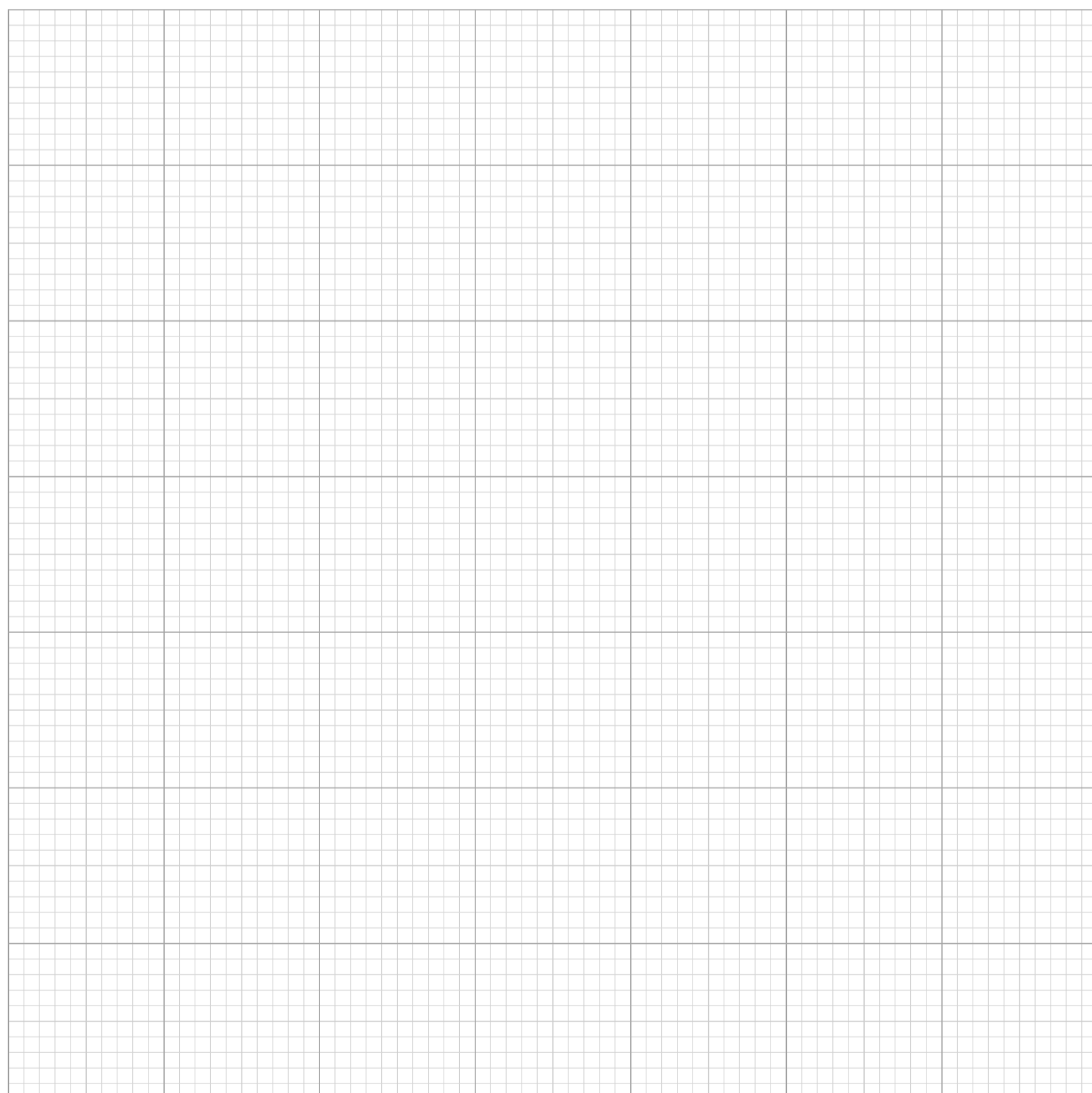


CYTOTOXICITA

Průměrná délka kořenů: vypočítejte průměrnou délku kořenů ze všech opakování.

Koncentrace	Průměrná délka kořene (mm)
C_{neg}	
C_{pos}	
C_1	
C_2	
C_3	

Pomocí průměrných délek naměřených kořenů vytvořte graf, který znázorní vztah mezi délkou kořene a koncentrací testované chemické látky.



Komentáře:

***GENOTOXICITA**

Tabulka pro prezentaci dat – mitotický a metafázový index

<i>Vzorek</i>	<i>Celkový počet buněk</i>	<i>Počet buněk v mitóze</i>	<i>Počet buněk v metafázi</i>	<i>Mitotický index (%)</i>	<i>Metafázový index (%)</i>
C_{neg}					
C_{pos}					
C_1					
C_2					
C_3					

ODPOVĚZ NA KLÍČOVÉ OTÁZKY



Odpovězte na otázky ústně nebo písemně. Během práce klademe důraz na spolupráci a kritické myšlení!

1. Co je ekotoxikologie a proč je důležitá ve vztahu ke kosmetice, kterou denně používáme?
2. Jak mohou chemické látky v životním prostředí ovlivňovat rostliny a živočichy?
3. Jaké jsou nejčastější zdroje znečištění životního prostředí?
4. Jak kosmetika a její chemické složky ovlivňují životní prostředí?
5. Mohou chemické látky v kosmetice ovlivnit také lidské zdraví? Pokud ano, jakým způsobem?
6. Jaké rozdíly jste pozorovali v délce kořenů mezi kontrolní skupinou a ošetřenými skupinami?
7. Myslíte si, že by doba působení látky mohla ovlivnit růst kořenů v Allium testu? Proč?
8. Proč je při provádění Allium testu důležité používat kontrolní skupinu?
9. Dokážete vyjmenovat a popsat všechny fáze mitózy?
10. Jaké poruchy buněčného dělení jste pozorovali pod mikroskopem u ošetřených vzorků?
11. Jak může pozorování buněčného dělení pomoci určit genotoxické účinky chemické látky?
12. Jaké závěry o genotoxicitě testované látky můžete vyvodit na základě svých pozorování?



Opravdu tohle musíme vědět?

**Nestačilo by se zeptat
rostlin a zvířat?**



**Kéž by uměly mluvit! Ale když
nemohou, je to na nás.**

Zamyslete se kriticky:

13. Co podle vás znamená pojem „chemický koktejl“ v kosmetice?
14. Proč je důležité zohlednit společné působení více chemických látek v jednom výrobku?
15. Jaká rizika podle vás může přinášet používání produktů, které obsahují směs různých chemických látek?



Chemický koktejl? To nezní jako párty, na kterou bych chtěla jít.



Přesně tak – míchání chemikálií může být recept na problém.

PRO PEDAGOGY: DOPLŇUJÍCÍ AKTIVITY A ÚPRAVY EXPERIMENTU



Další aktivity/rozšíření (volitelné):

Navrhnete nový experiment tím, že změníte jednu proměnnou – například přidejte jinou chemickou látku nebo směs látek. Sledujte dělení buněk v různých časových intervalech (např. po 24, 48, 72 a 96 hodinách expozice).

Úprava experimentu pro střední školy:

Zjednodušený postup:

- ✓ **Zaměřte se na měření délky kořenů:** místo složité cytogenetické analýzy nechejte studenty měřit a porovnávat délku kořenů cibule při různých koncentracích domácí nebo kosmetické látky.
- ✓ **Použijte méně koncentrací:** např. jen tři vzorky – kontrola, nízká a vysoká koncentrace, aby byla data jednodušší k zaznamenání a analýze.
- ✓ **Vizualní pozorování:** povzbuzujte studenty, aby pozorovali a popisovali viditelné změny v růstu kořenů a jejich morfologii.

Příklad:

- ✓ **Cíl:** Změřit vliv domácí chemikálie (např. ocet) nebo kosmetického produktu (např. šampon) na růst kořenů cibule.
- ✓ **Postup:** Použijte tři koncentrace (0%, 10%, 50% roztoku octa/šamponu) a měřte délku kořenů po 96 hodinách.
- ✓ **Sběr dat:** Zaznamenejte délku kořenů a porovnejte průměrné hodnoty mezi jednotlivými koncentracemi.

Úprava experimentu pro základní školy:

Zjednodušený postup:

- ✓ **Základní pozorování růstu kořenů:** zaměřte se na měření délky kořenů bez použití chemických látek.
- ✓ **Použijte bezpečné materiály:** např. voda, slaná voda, sladká voda, nebo zředěné přípravky jako mýdlo, tělové mléko či kondicionér.
- ✓ **Praktické aktivity:** zahrňte kreslení a označování částí cibule a kořenů.

Příklad:

- ✔ **Cíl:** Pozorovat, jak různé typy vody ovlivňují růst kořenů cibule.
- ✔ **Postup:** Použijte tři druhy vody (kohoutková, zředěné mýdlo, zředěný kondicionér) a měřte délku kořenů po 96 hodinách.
- ✔ **Sběr dat:** Zaznamenejte délku kořenů, udělejte jednoduché porovnání a nechte studenty kreslit své pozorování.