

ALLIUM TEST

Vplyv chemikálií z kozmetiky na rast cibule a jej DNA

KONTEXT

Allium test je biologická metóda používaná na hodnotenie potenciálnej toxicity chemických látok v životnom prostredí. Kým chemické analýzy poskytujú kvantitatívne informácie o znečisťujúcich látkach, biologické testy odhalujú ich vplyv na organizmy a poskytujú informácie o cytotoxicite a genotoxicite. **Cytotoxicita** označuje schopnosť látky poškodiť alebo zničiť bunky, zatiaľ čo **genotoxicita** ovplyvňuje genetický materiál (DNA) a môže viesť k cytotoxickým účinkom.

Cibuľa, vedecky nazývaná *Allium cepa* L., môže slúžiť ako bioindikátor – organizmus, ktorý pomáha hodnotiť stav životného prostredia, jeho znečistenie alebo toxicitu prostredníctvom merateľných biologických reakcií. Samotný test sa preto nazýva Allium test.



Počkaj, na tento test použijeme cibuľu?

Nebude potom laboratórium
zaváňať ako kuchyňa?

Áno, ale robíme to pre vedu!

A navyše uvidíme, ako tieto chemikálie
ovplyvnia DNA cibule.

Super, nie?



Allium test je rýchly, cenovo nenáročný, citlivý na nízke koncentrácie chemických látok a univerzálny pri hodnotení cytotoxicity aj genotoxicity. Je neinvazívny, široko používaný na monitorovanie životného prostredia a poskytuje jasné pozorovania chromozómov rastlín.

Test funguje tak, že sa cibule vystavia rôznym koncentráciám chemického roztoku. Potom sa počas stanoveného obdobia (zvyčajne 72 – 96 hodín, t. j. 3 – 4 dni) sleduje rast koreňov cibule. Cytotoxicita sa určuje meraním dĺžky koreňov – kratšie korene indikujú vyššiu toxicitu. Genotoxicita sa hodnotí pod mikroskopom skúmaním chromozómových abnormalít počas delenia buniek (mitózy) v sfarbených bunkách koreňových špičiek.

V nasledujúcom experimente študenti spoznajú škodlivé účinky chemických látok v životnom prostredí na rast buniek a reprodukciu cibule, čím získajú cenné údaje pre hodnotenie environmentálnych rizík.



Takže v podstate sme cibuľoví detektívi, ktorí hľadajú stopy v jej bunkách?



Presne tak! A čím kratšie sú korene, tým je chemikália toxickejšia.

Je to ako záhada, ktorú musíme vyriešiť.

CIEĽ EXPERIMENTU

Hodnotiť **cytotoxické** a **genotoxické** účinky chemickej látky (napr. kozmetickej zložky) na cibuľu (*Allium cepa*) pozorovaním rastu koreňov a chromozómových zmien v bunkách koreňových špičiek.



VZDELÁVACIE CIELE

Na konci tohto experimentu budú študenti schopní:

Všeobecné vzdelávacie ciele:

- ✓ Pochopiť význam environmentálnej toxikológie.
- ✓ Naučiť sa rozdiel medzi cytotoxicitou a genotoxicitou.
- ✓ Zlepšiť laboratórne zručnosti a techniky.
- ✓ Rozvíjať vedecké bádanie a kritické myslenie.

Špecifické vzdelávacie ciele

- ✓ Porozumieť postupu *Allium testu* a jeho významu pri hodnotení cytotoxicity a genotoxicity.
- ✓ Meraním dĺžky koreňov určiť cytotoxicitu a pozorovaním chromozómových abnormalít hodnotiť genotoxicitu.
- ✓ Hodnotiť vplyv testovaných chemikálií na rast rastlín a genetický materiál.
- ✓ Porozumieť tomu, ako môžu testované environmentálne toxíny ovplyvniť rast rastlín a integritu chromozómov.
- ✓ Aplikovať získané poznatky pri posudzovaní environmentálnych rizík.



Takže v podstate robíme cibuli kozmetickú premenu?



Áno, ale namiesto toho, aby vyzerala úžasne, skontrolujeme, či prežije!

ČAS

Cytotoxický test:

Časť I: 90 minút

Časť II (po 96 hodinách): 90 minút

Genotoxický test:

*Časť III (po ďalších 24 hodinách): 90 minút

Je možné vykonať len **cytotoxický test** – prvú a druhú časť experimentu; najmä v prípade menej vybavených laboratórií alebo ak študenti nepochádzajú priamo z oblasti zameranej na vedu alebo technológiu. V opačnom prípade odporúčame vykonať aj tretiu časť – **genotoxický test**.



POTREBNÉ MATERIÁLY

Vybavenie:

- 15 sklenených skúmaviek bez viečka (počet skúmaviek prispôsobte počtu vzoriek a testovaných koncentrácií),
- 6 stojanov na skúmavky (vhodných pre min. 5 skúmaviek),
- plastové Pasteurove pipety (kvapkadlá),
- automatické pipety s hrotmi,
- kadičky (100, 250 a 500 ml),
- odmerné banky (100 ml),
- pinzeta,
- min. 15 cibúľ (*Allium cepa* L.),
- pravítko,
- sklíčka pod mikroskop,
- krycie sklíčka,
- varná platňa,
- svetelný mikroskop so zväčšením 400× (alebo aspoň 100×).

Chemikálie:

- testovaný chemický alebo kozmetický výrobok (napr. 30 % peroxid vodíka alebo šampón),
- voda z vodovodu (negatívna kontrola),
- 1% roztok 0,1 M HCl alebo ocot (pozitívna kontrola),
- farbivo acetoorceín,
- 1% roztok HCl,
- fixačný prostriedok (etanol a kyselina octová v pomere 3:1).

BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA



Pred vykonaním tohto experimentu si dôkladne prečítajte časť **Všeobecné bezpečnostné opatrenia**.

Okrem toho dbajte na nasledujúce bezpečnostné opatrenia:

- ⚠ **Bud'te opatrní pri zahrievaní:** Pri zahrievaní látok dávajte pozor, aby ste sa nepopálili. Používajte vhodné nástroje a zdroje tepla.
- ⚠ **Bud'te opatrní pri práci s farbivami:** S farbivami pracujte v digestore, pretože majú silný zápach. Farbiace látky sú silné, preto vždy používajte nitrilové rukavice a ochranný laboratórny plášť.



Áno, radšej plač spôsobený cibuľou než úrazom.

*Bezpečnosť na prvom mieste!
Nechceme žiadne zranenia
súvisiace s cibuľou.*



POSTUP



Krok 1 → Pripravte si pracovný priestor

Uistite sa, že vaše pracovisko je čisté a bez rušivých vplyvov. Pripravte si všetky potrebné materiály. Oblečte si ochranné pomôcky.

Krok 2 → Pripravte experiment

Koncentrácie: Pripravte 3 rôzne koncentrácie (c_1 – c_3) alebo riedenia (R_1 – R_3) testovanej chemikálie. Môžete si vybrať aj kozmetický výrobok. Každú koncentráciu otestujte v 3 opakovaných meraniach (A, B a C).

TESTOVANÁ CHEMIKÁLIA/TESTOVANÝ KOZMETICKÝ VÝROBOK: _____

PIKTOGRAMY: _____

Objem: Každý testovací roztok by mal mať konečný objem 100 ml.

Pri použití špecifickej chemikálie:

Vypočítajte množstvo zásobného roztoku (R_0) a vody z vodovodu potrebnej na každý testovací roztok (R_1 – R_2).

RIEDENIE		Koncentrácia chemikálie/produktu		Objem chemikálie (ml)	Objem H ₂ O (ml)
R₀	Neriedený (zásoba)	C_0		/	/
R₁	10×	C_1			
R₂	100×	C_2			
R₃	1000×	C_3			

Pri použití kozmetického výrobku:

Odhadnite približné riedenia na základe objemových percent.

RIEDENIE		Koncentrácia chemikálie/produktu		Objem produktu (ml)	Objem H ₂ O (ml)
R₁	25%	C_1			
R₂	10%	C_2			
R₃	1%	C_3			

Kontrolné vzorky: Ako negatívnu kontrolu (C_{neg}) použite vodu z vodovodu a ako pozitívnu kontrolu (C_{pos}) 1 % roztok 0,1 M HCl alebo ocot.

Pozitívne a negatívne kontroly sú nevyhnutné na overenie výsledkov. Pozitívna kontrola vykazuje očakávaný účinok, čím potvrdzuje, že experiment funguje. Negatívna kontrola nevykazuje žiadny účinok, čím zabezpečuje, že všetky pozorované zmeny sú spôsobené testovanou látkou.

Skúmavky: Pripravte sklenené skúmavky bez závitov a uzáverov.

Skúmavky vhodne označte (napr. c1 A) a vložte do plastových stojanov. Všetky tri replikáty každej testovanej koncentrácie by mali byť umiestnené v samostatnom stojane. Označte aj stojany na skúmavky, aby nedošlo k zmiešaniu vzoriek.



A nechceme žiadnych nepozvaných hostí, takže označujme starostlivo!

Všetko označiť? To je ako organizovať vedeckú párty!



Cibuľa (*Allium cepa* L.): Vyberte cibule podobnej veľkosti (3 testované koncentrácie v 3 opakovaných meraniach + 2 kontroly, spolu 15 cibúl), aby dobre sedeli na skúmavkách a minimalizovalo sa odparovanie kvapaliny.

Opatrne odrežte minimálnu vrstvu (do 2 mm) vysušenej koreňovej základne, aby sa koreňové tkanivo vystavilo testovanému roztoku. Uistite sa, že cibuľa zostane neporušená.

Krok 3 → Vykonajte experiment

Časť I:

1. Pomocou kvapkadla opatrne naplňte skúmavky pripravenými roztokmi až po okraj.
2. Cibule jemne položte na skúmavky a uistite sa, že sú ponorené v testovacom roztoku.
3. Každý deň kvapkadlom dopĺňajte odparený alebo spotrebovaný roztok, v prípade kontrolných vzoriek používajte vodu.
4. Stojany so skúmavkami umiestnite na dobre osvetlené miesto, napríklad na stôl pri okne.
5. Po 4 dňoch zmerajte dĺžku koreňov (A) a pripravte mikroskopické preparáty na cytogenetickú analýzu (B).

Časť II: CYTOTOXICITA

6. Vyberte cibule zo skúmaviek a pravítkom zmerajte dĺžku piatich najdlhších koreňov.

***Časť III: GENOTOXICITA:**

7. Odrežte 0,5 cm špičky z troch najdlhších koreňov pre každú koncentráciu.

8. FIXÁCIA:

- Ponorte koreňové špičky do fixačného roztoku (etanol a kyselina octová v pomere 3:1).
- Uložte ich do mrazničky na približne 24 hodín.

Fixácia zachováva bunky a udržiava ich podobnosť so živými organizmami.

9. FARBENIE:

- Pripravte orceínové farbenie (jeden roztok pre každú skupinu).
- Pripravte vodný kúpeľ s teplotou 60 °C.
- Nalejte 1 % HCl do kadičky a ohrejte ju vo vodnom kúpeli.
- Vytiahnite špičku koreňa z fixačného roztoku a ponorte ju na 5 minút do ohriatej HCl.
- Po 5 minútach opláchnite špičku koreňa destilovanou vodou.
- Špičku koreňa umiestnite na mikroskopové sklíčko, pridajte orceínové farbenie.
- Vzorku zakryte krycím sklíčkom a jemne stlačte špičku koreňa, čím pripravíte rozotretý preparát.

Krok 4 → Sledujte a zaznamenávajúte údaje**CYTOTOXICITA**

Po 96 hodinách (4 dňoch) zaznamenajte namerané hodnoty do tabuľky a vypočítajte priemernú dĺžku koreňov.



Meranie koreňov? Nevedel som, že cibule majú sťažšie krásy.



No, najdlhšie korene vyhrávajú cenu za najnižšiu toxicitu!

Merané dĺžky koreňov

Koncentrácia	C_{neg}		C_{pos}		C_1		C_2		C_3	
Opakované meranie	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Koreň 1 (mm)										
Koreň 2 (mm)										
Koreň 3 (mm)										
Koreň 4 (mm)										
Koreň 5 (mm)										
Priemerná dĺžka koreňa (mm)										

*GENOTOXICITA

Mikroskopia: Pozorujte delenie buniek a chromozómy pod svetelným mikroskopom. Identifikujte aspoň 100 buniek v metafáze a posúďte stav chromozómov. Uvedte percentuálny podiel všetkých buniek v metafáze a buniek s poškodenými chromozómami.

1. Spočítajte a zaznamenajte celkový počet buniek pozorovaných v každej vzorke (minimálne 100, optimálne 1000). (Študenti môžu skombinovať svoje výsledky, aby dosiahli čo najvyšší počet spočítaných buniek).
2. Spočítajte a zaznamenajte počet buniek, ktoré prechádzajú mitózou.
3. Spočítajte a zaznamenajte počet buniek v metafáze.



Počítanie buniek? To je ako mikroskopické hľadanie pokladu!

A tým pokladom je pochopenie, ako chemikálie ovplyvňujú naše životné prostredie!



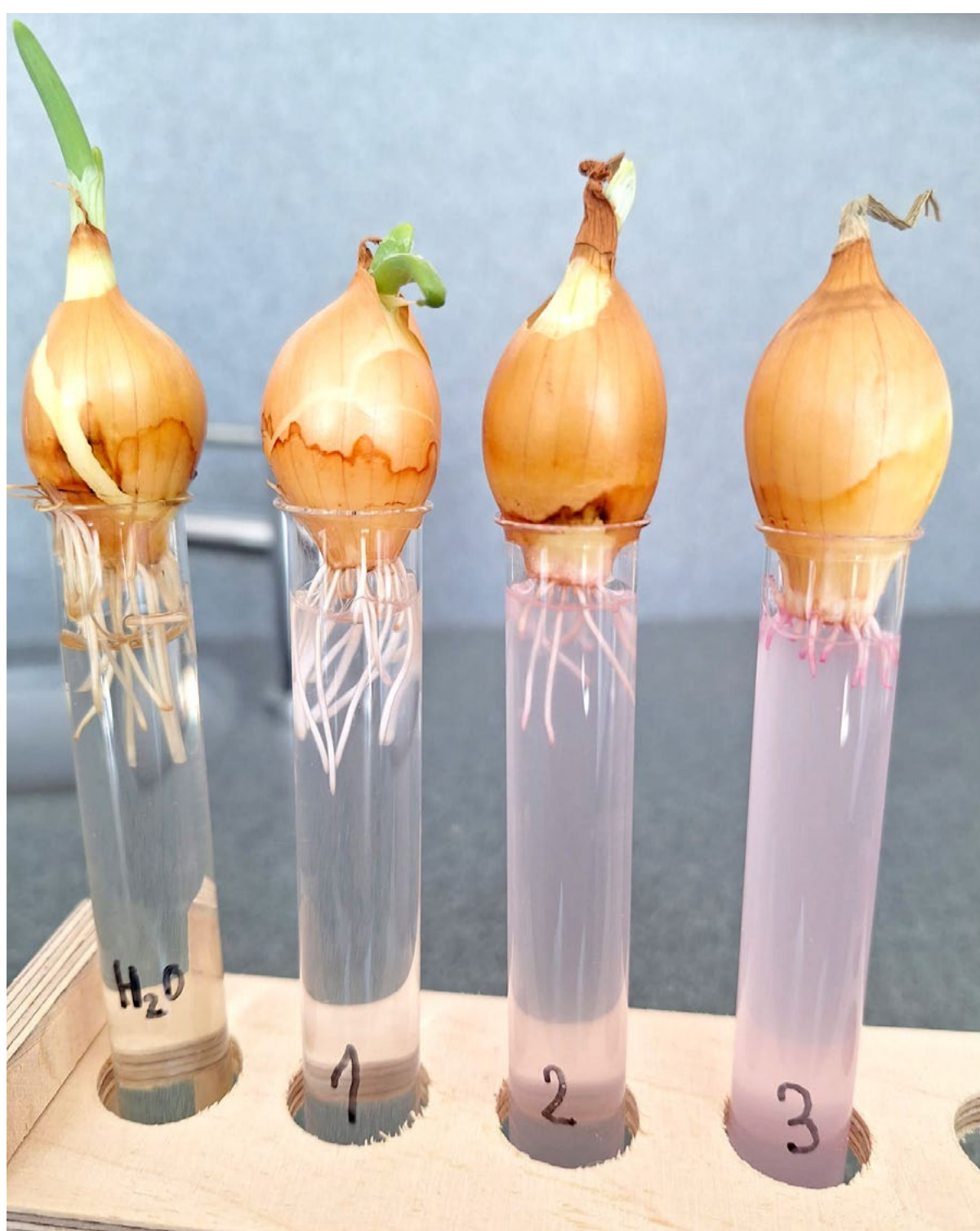
Výpočet indexov:

Mitotický index: Počet buniek v mitóze na 1000 skúmaných buniek.

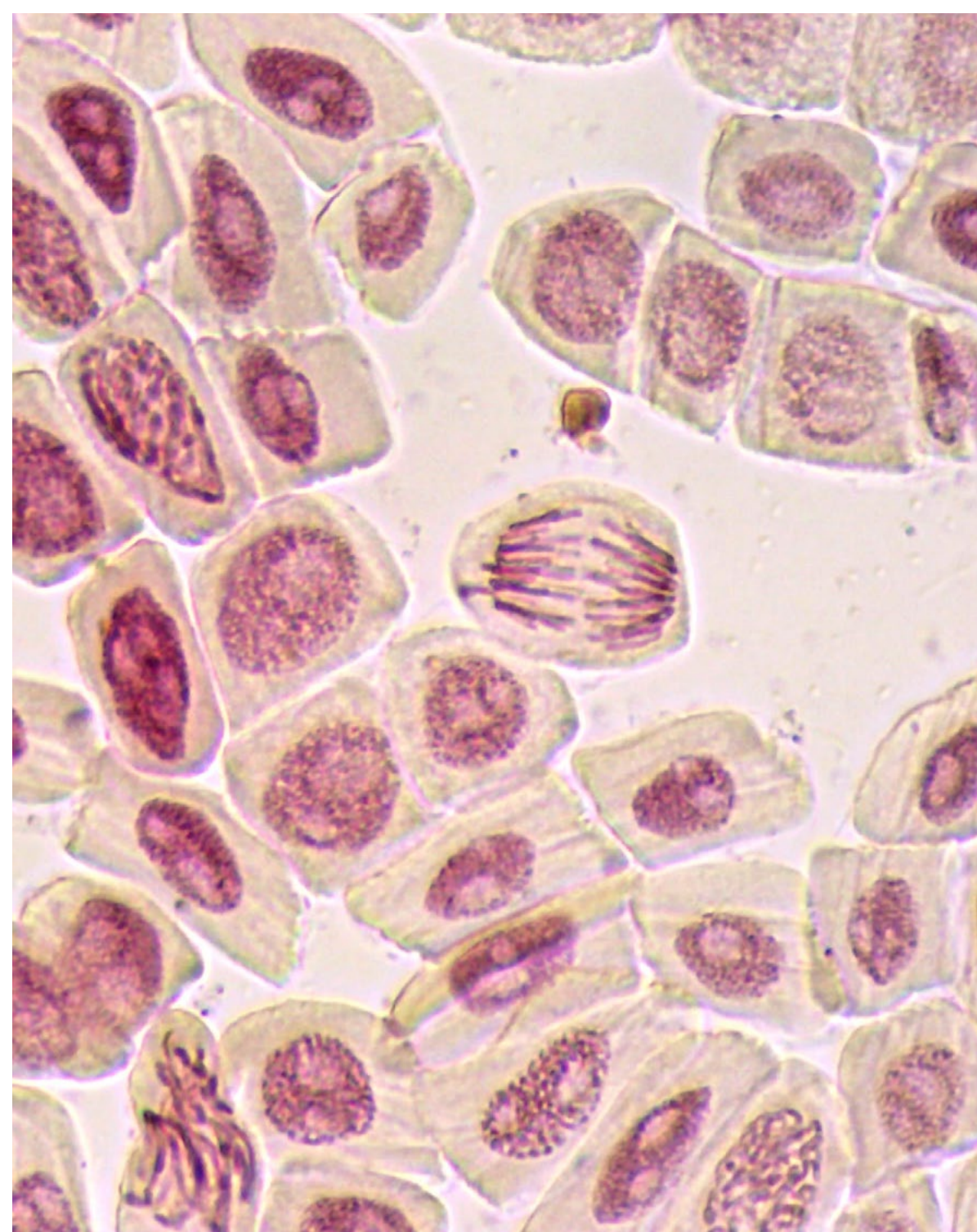
$$\frac{\text{Počet buniek v mitóze}}{\text{Celkový počet buniek}} \times 100$$

Metafázový index: Počet buniek v metafáze na 1000 buniek v mitóze.

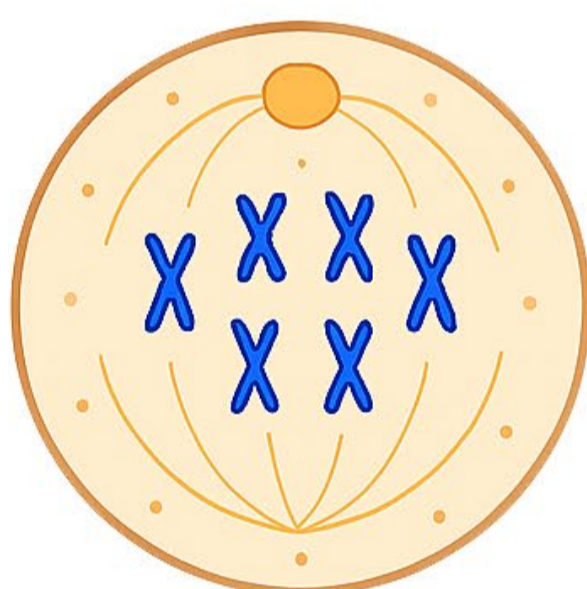
$$\frac{\text{Počet buniek v metafáze}}{\text{Počet buniek v mitóze}} \times 100$$



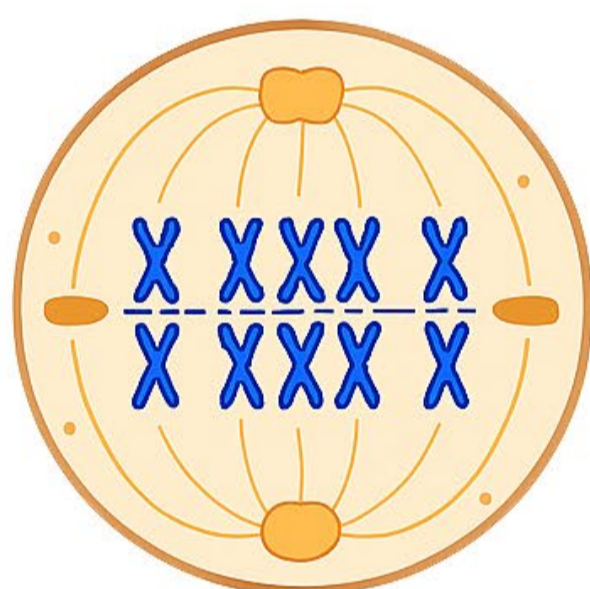
Test cytotoxicity



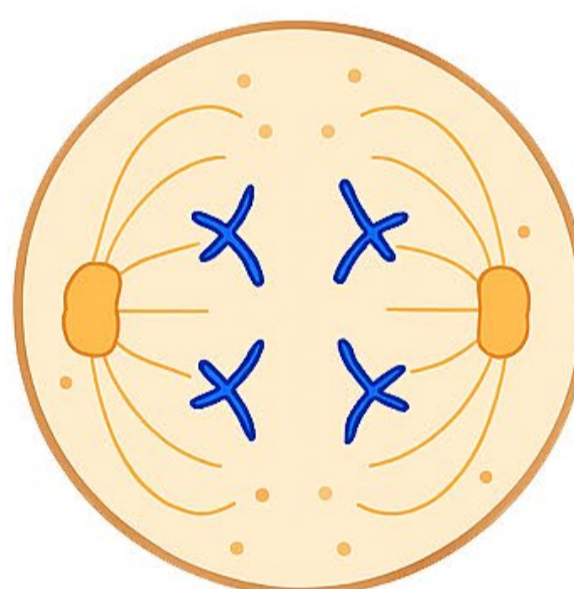
Test genotoxicity



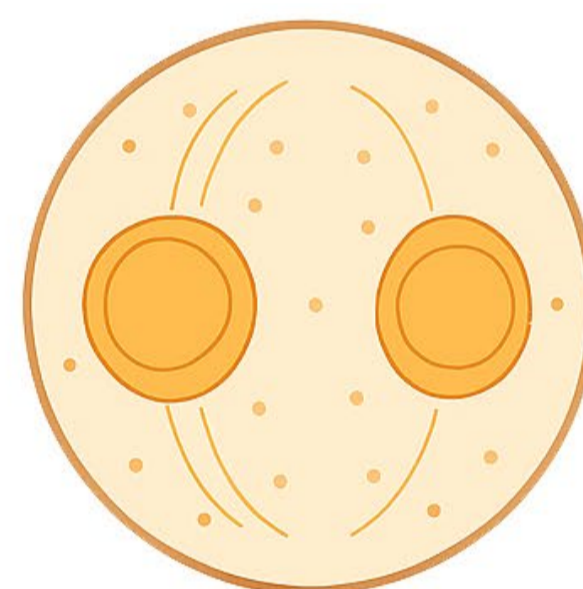
1. Prophase



2. Metaphase



3. Anaphase



4. Telophase

Obrázok 2: Fázy delenia buniek (interfáza – bunka rastie a kopíruje svoju DNA; **profáza** – chromozómy sa zhlukujú a stávajú sa viditeľnými; **metafáza** – chromozómy sa zoradia uprostred; **anafáza** – chromatidy sa od seba oddelia; **telofáza** – vytvoria sa dve nové jadrá; cytokinéza – bunka sa rozdelí na dve)

VÝSLEDKY

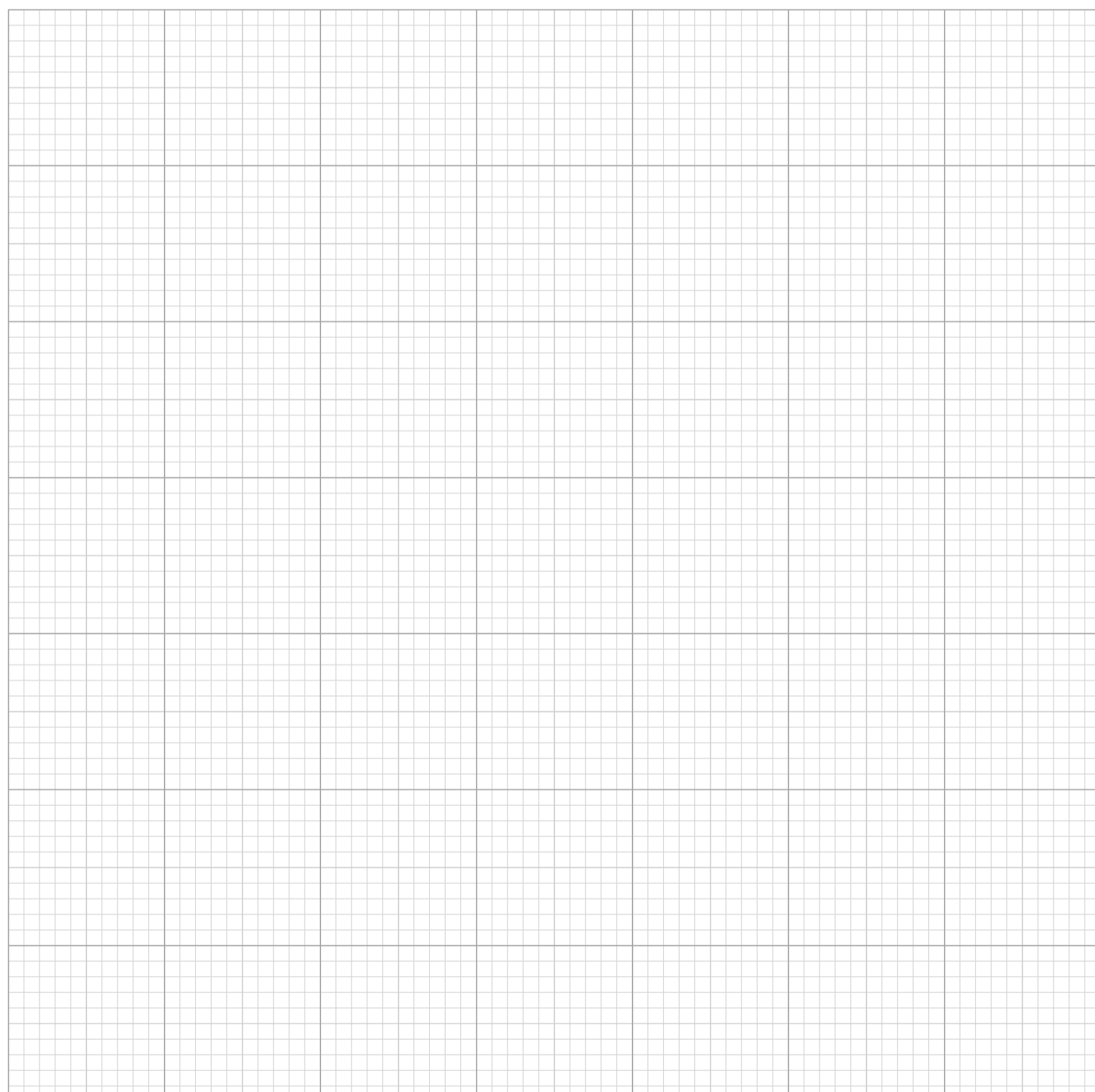


CYTOTOXICITA

Priemerná dĺžka koreňov: Vypočítajte priemernú dĺžku zo všetkých opakovaných meraní.

Koncentrácia	Priemerná dĺžka koreňa (mm)
C_{neg}	
C_{pos}	
C_1	
C_2	
C_3	

Na základe priemerných dĺžok nameraných koreňov vytvorte graf, ktorý znázorňuje vzťah medzi dĺžkou koreňa a koncentráciou testovanej chemikálie.



Komentáre:

GENOTOXICITA*Údaje o mitotickom a metafázovom indexe**

<i>Vzorka</i>	<i>Celkový počet buniek</i>	<i>Počet buniek v mitóze</i>	<i>Počet buniek v metafáze</i>	<i>Mitotický index (%)</i>	<i>Metafázový index (%)</i>
C_{neg}					
C_{pos}					
C_1					
C_2					
C_3					

REFLEXIA



Na otázky odpovedajte ústne alebo písomne. Pri práci sa zamerajte na spoluprácu a rozvoj kritického myslenia.

Diskutujte:

1. Čo je ekotoxikológia a prečo je dôležitá v súvislosti s kozmetikou, ktorú používame každý deň?
2. Ako môžu chemikálie v životnom prostredí ovplyvňovať život rastlín a zvierat?
3. Aké sú bežné zdroje znečisťujúcich látok v životnom prostredí?
4. Ako kozmetika a jej chemické zložky vplyvajú na životné prostredie?
5. Môžu chemikálie v kozmetike ovplyvňovať aj ľudské zdravie? Ak áno, ako?
6. Aké rozdiely ste pozorovali v dĺžke koreňov medzi kontrolnou skupinou a testovanými skupinami?
7. Myslíte si, že doba expozície by ovplyvnila rast koreňov v tomto teste?
8. Prečo je dôležité používať kontrolnú skupinu pri vykonávaní tohto testu?
9. Viete definovať všetky fázy mitózy?
10. Aké typy abnormalít delenia buniek ste pozorovali pod mikroskopom v testovaných vzorkách?
11. Ako môže pozorovanie delenia buniek pomôcť určiť genotoxické účinky chemickej látky?
12. Aké závery môžete vyvodiť o genotoxicite testovanej chemikálie na základe svojich pozorovaní?



Naozaj to potrebujeme vedieť?

Nemôžeme sa jednoducho opýtať rastlín a zvierat?

Keby tak vedeli rozprávať! Ale keďže nemôžu, je to na nás.



Hľadajte súvislosti:

13. Čo podľa vás znamená, keď hovoríme o „chemickom koktaile“ v kozmetike?
14. Prečo je dôležité brať do úvahy kombinované účinky viacerých chemických látok v jednom výrobku?
15. Aké sú podľa vás potenciálne riziká používania výrobkov, ktoré obsahujú zmes rôznych chemických látok?



*Chemický koktail? To znie ako párty,
na ktorú by som fakt nešla.*



*Presne tak, miešanie chemikálií
môže byť receptom na katastrofu.*

PRE PEDAGÓGOV



Ďalšie aktivity (voliteľné)

Navrhňte nový experiment úpravou jednej premennej, napríklad pridaním inej chemikálie alebo chemickej zmesi. Môžete tiež sledovať delenie buniek v rôznych časových intervaloch od začiatku pôsobenia látky (po 24, 48, 72 a/alebo 96 hodinách).

Úprava experimentu pre **žiakov stredných škôl**

- ✓ **Zamerajte sa na meranie dĺžky koreňov:** Namiesto cytogenetickej analýzy nechajte žiakov zmerať a porovnať dĺžku koreňov cibule vystavenej rôznym koncentráciám domácich alebo kozmetických výrobkov.
- ✓ **Použite menej koncentrácií:** Znížte počet vzoriek na tri (napr. kontrolná, nízka a vysoká koncentrácia), aby ste zjednodušili zber a analýzu údajov.
- ✓ **Pozorujte zmeny:** Povzbudzujte žiakov, aby podrobne pozorovali rast koreňov a akékoľvek viditeľné zmeny v ich morfológii.

Príklad

- ✓ **Ciel:** Zmerať vplyv chemikálie používanej v domácnosti (napr. octu) alebo kozmetického výrobku (napr. šampónu) na rast koreňov cibule.
- ✓ **Postup:** Použite 3 koncentrácie (0 %, 10 % a 50 % roztok octu/šampónu) a po 96 hodinách zmerajte dĺžku koreňov.
- ✓ **Zber údajov:** Zapište dĺžku koreňov a porovnajte priemernú dĺžku medzi jednotlivými koncentraciami.

Úprava experimentu pre **žiakov základných škôl**

- ✓ **Pozorujte rast koreňov:** Zamerajte sa na pozorovanie a meranie rastu koreňov bez použitia chemických látok.
- ✓ **Používajte bezpečné materiály:** Použite bezpečné, netoxické látky, ako je voda, slaná voda a cukrová voda, zriedené mydlo na ruky, telové mlieko alebo kondicionér, aby ste pozorovali ich vplyv na rast koreňov.
- ✓ **Vykonávajte praktické činnosti:** Realizujte aktivity, pri ktorých žiaci kreslia a označujú časti cibule a koreňov.

Príklad

- ✓ **Ciel:** Pozorovať, ako rôzne druhy vody ovplyvňujú rast koreňov cibule.
- ✓ **Postup:** Použite 3 druhy vody (voda z vodovodu, zriedené mydlo na ruky a zriedený kondicionér) a po 96 hodinách zmerajte dĺžku koreňov.
- ✓ **Zber údajov:** Zapište dĺžku koreňov a vykonajte jednoduché porovnania. Nechajte žiakov nakresliť obrázky toho, čo pozorovali.