

Primjena Allium-testa u nastavi biologije

Iva Kokotović, Sandra Radić Brkanac

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb, Hrvatska

ikokotovic1@gmail.com

SAŽETAK

Allium-test je jednostavni biotest za određivanje ukupne toksičnosti i genotoksičnosti kojeg učenici uz pomoć nastavnika ili samostalno mogu provesti u školi te njime testirati učinak različitih otopina na modelni organizam *Allium cepa* L. (obični luk). Allium-test je dobar primjer projekta u nastavi jer se svojim opsegom može prilagoditi dobi učenika, a potiče njihovu kreativnost i samostalnost u provedbi i prezentiranju samog projekta. Sam projekt i rezultati istog potiču učenike na razvijanje svijesti o vodenom okolišu i učinku onečišćenja na svim njegovim razinama.

Cljučne riječi: *Allium-test; vodeni okoliš; projekt u nastavi*

UVOD

Problemska nastava je model nastave u kojem je učenje najčešće organizirano oko projekta. Projekti su kompleksni zadatci bazirani na izazovnim pitanjima ili problemima koji uključuju učenike u osmišljavanje samog projekta te njegovu provedbu donošenjem odluka, provjerom činjeničnog znanja i rješavanjem problema. Stoga je projektna nastava često ujedno i problemski orijentirana nastava. Projektna nastava daje učenicima mogućnost da rade samostalno kroz dulji vremenski period (Lou i sur., 2012).

Primjer projekta u nastavi može biti procjena kvalitete vode i njezinog utjecaja na biljne organizme primjenom Allium-testa. Taj je dobro poznat i jednostavan biotest pogodan za izvedbu u laboratorijima u kojima se rutinski testira učinak različitih otopina, a njime se može odrediti ukupna toksičnost, citotoksičnost i genotoksičnost (Fiskesjö, 1985). Uzorci vode rijeke Save sakupljeni na lokacijama Lukavec, Rugvica, Jesenice i Hrušćica koju su bili testirani ovim testom nisu inhibirali rast korjenčića luka, no pokazali su se genotoksičnim, a uzorak s lokacije Jesenice i citotoksičnim (Kokotović, 2019).

Allium cepa L. (obični luk) je zeljasta trajnica iz porodice Alliaceae, a njegov podzemni organ je karakteristična lukovica (Nikolić, 2013). Kao pokazatelji toksičnosti prate se:

- 1) makroskopske promjene kao što su rast i oblik korijena te pojava listova na lukovici
- 2) mikroskopske promjene kao što su mitotska aktivnost (određivanje mitotskog indeksa tj. broj stanica u diobi) te pojava kromosomskih i mitotičkih nepravilnosti (Fiskesjö, 1988).

Allium-test ima mnoge prednosti poput niske cijene, jednostavne izvedbe i dostupnosti lukovica tijekom cijele godine, malog broja dugačkih kromosoma ($2n = 16$) i raspoloživosti velikog broja stanica na jednom mikroskopskom preparatu što doprinosi pouzdanosti dobivenih rezultata (Leme i Marin-Morales, 2009; Radić i sur., 2014). Učenici mogu testirati kako na modelni organizam utječe voda iz bunara, potoka, jezera, rijeke koja se nalazi u blizini škole ili njihovog mjesta stanovanja. Različiti onečišćivači će uzrokovati promjene u rastu i obliku korjenčića te dovesti do kromosomskih i mitotičkih nepravilnosti. Na temelju teorijskog znanja i opažanja tijekom uzorkovanja učenici mogu postaviti hipotezu o utjecaju testne vode na modelni organizam. Ako znamo koji je zagađivač prisutan u testnim vodama učenici ih mogu povezati sa svojim rezultatima. Projekt učenici mogu provesti uz pomoć nastavnika u školi, a rezultati mogu biti obrađeni statistički ili samo opisani ovisno o dobi učenika. Iako

projekt traje nekoliko dana unutar samog dana oduzima relativno malo vremena, što ostavlja učenicima dovoljno vremena za izvršavanje ostalih obaveza.

PRILAGODBA METODA RADA ZA UČENIKE

S obzirom da se ovim testom provjerava toksičnost treba paziti pri odabiru postaje istraživanja da one nisu izričito opterećena onečišćenjem, već da su to dostupna područja na lokalnim tekućicama. Uzorkovanje bi posebno u osnovnoj školi trebao provesti nastavnik, a u srednjoj školi to mogu biti i učenici, ali pod njegovim strogim nadzorom nastavnika biologije. Sam postupak i primjena ove metode na uzorcima vode tekućica nije opasna za zdravlje učenika, ali je poželjno da se učenike zaštiti od dodira s vodom uzorka. Pri uzorkovanju i kasnije u radu s uzorcima treba poštivati sve mjere opreza i koristiti zaštitne rukavice.

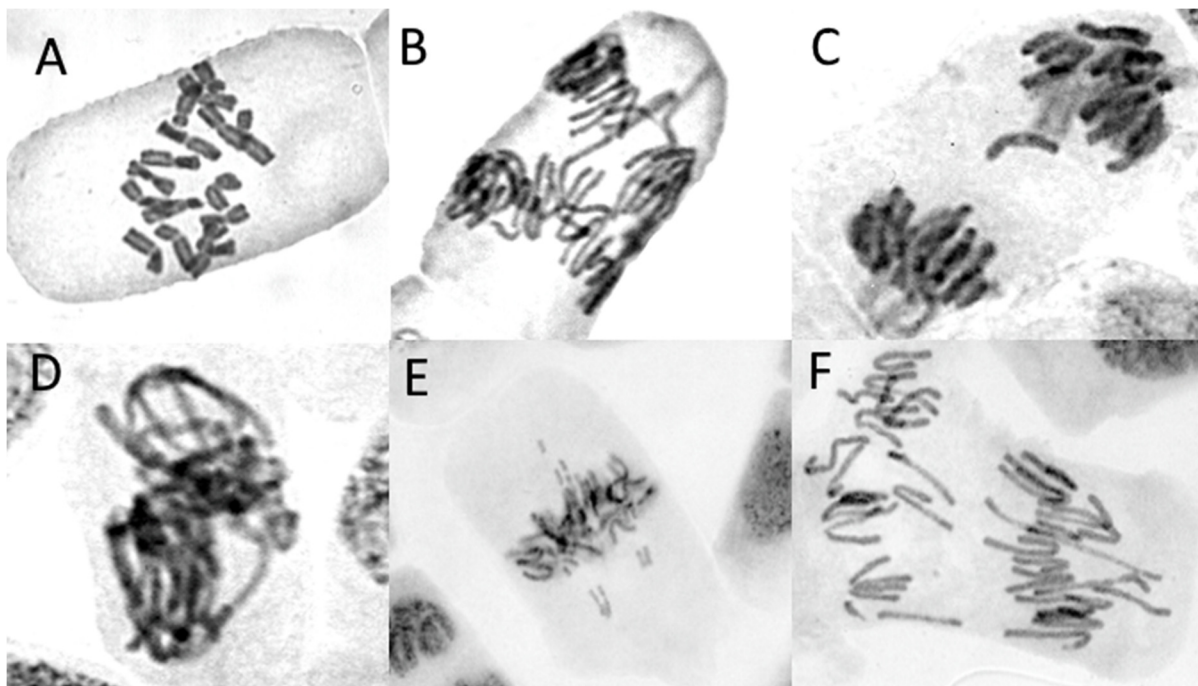
Materijali i metode prilagođeni za osnovnu školu

Učenici uz pomoć nastavnika prikupljaju uzorke vode koju žele testirati. Uzorci vode se ne filtriraju. Baza lukovica (smeđi prsten korijena) se očisti pomoću skalpela ili noža, a da se pritom ne ošteti sama lukovica. Lukovice se stave na vrh staklene posude odgovarajućeg promjera te se bazom urone u destiliranu vodu (može se koristiti i odstajala vodovodna voda) dok korjenčići ne postignu duljinu od otprilike 2 cm. Nakon toga lukovice se premjeste na uzorke testnih voda odnosno destilirane vode (kontrolne lukovice). Inhibicija rasta korjenčića i promjene u morfologiji korjenčića se bilježe nakon 72 h izlaganja testnim vodama i destiliranoj vodi. Duljina korjenčića izmjeri se ravnalom i bilježi u mm. Promjene u morfologiji korjenčića, kao što su promjena boje korjenčića, kuke na vršku korjenčića ili c-tumori, mogu se promatrati golim okom. Inhibicija rasta korjenčića luka kao i promjene u morfologiji samih korjenčića koriste se kao pokazatelji ukupne toksičnosti uzoraka površinskih voda. Učenici rezultate istraživanja mogu bilježiti u tablice u koje će upisivati koliko su narasli korjenčići te potom napraviti dijagrame kako bi se bolje vidio utjecaj testnih voda na modelni organizam. Svaki učenik može testirati različiti uzorak, a prilikom izlaganja rezultata može se raspravljati zašto se neki rezultati podudaraju, zašto neki uzorci ne odstupaju značajno od kontrole, može li se testna voda koristiti za zalijevanje vrta u kojem uzgajamo povrće i kakve bi posljedice imala za biljku.

Materijali i metode prilagođeni za srednju školu

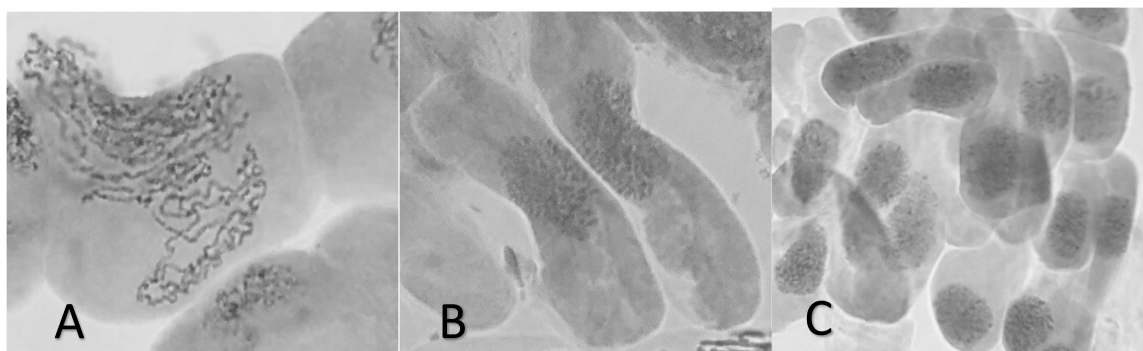
Postupak je isti kao i za osnovnu školu, no uz makroskopske promjene mogu se promatrati i mikroskopske tj. može se utvrditi citotoksični (broj stanica u diobi odnosno mitotski indeks) genotoksični učinak (pojava kromosomskih i mitotičkih nepravilnosti). Nakon što su korjenčići postigli duljinu od 2 cm, učenici označuju 3-5 korjenčića vodootpornim markerom; ti korjenčići služe za određivanje inhibicije rasta korijena i morfoloških promjena. Nakon toga se lukovice premjeste na uzorke testnih voda i destiliranu vodu (kontrola). Preporučaju se tri lukovice za svaki uzorak testne vode i kontrolu. Nakon 24 h izlaganja testnim vodama i običnoj destiliranoj vodi (kontrola) korjenčići se fiksiraju u mješavini 96% etanola i ledene octene kiseline u omjeru 3:1 (30 min do 24h). Fiksiranjem se zaustavlja dioba stanica. Ukoliko se promatraju mikroskopske promjene, a projekt se radi u školi, bilo bi poželjno da se radi nakon nastave s obzirom da je bitno da vrijeme fiksiranja korjenčića bude točno nakon 24h, a učenici nemaju svaki dan sat biologije u isto vrijeme. Učenici uzorke mogu fiksirati doma, a u školu ih donijeti samo na analizu pod uvjetom da su napravili fiksativ. Prije same analize korjenčići se prvo omekšaju zagrijavanjem u 1M HCl te zatim oboje 1%-tnom otopinom aceto-karmina. Pri izradi preparata, otkine se vršni dio korjenčića (intezivno obojana zona primarnog meristema), stavi na predmetno stakalce u kap aceto-karmina te macerira staklenim štapićem. Macerirani korjenčići se pokriju pokrovnicom i laganim pritiskom zgnječe ("squash") (Sharma i Sharma, 1972). Predmetna i

pokrovna stakalca prethodno se očiste u etanolu. Mikroskopiranje i fotografiranje se vrši pomoću svjetlosnog mikroskopa. Za analizu mitotske aktivnosti poželjno je pregledati najmanje 3000 stanica (1000 stanica u svakoj od tri replike) po svakom uzorku voda, a za analizu kromosomskih aberacija najmanje 100 diobenih stanica vrškova korjenčića luka po uzorku (kontrola, uzorci testnih voda). Ukoliko više učenika radi na projektu treba paziti da isti učenik broji sve tri replike jednog uzorka kako bi došlo do što manjih pogrešaka. Mitotski indeks se računa kao omjer broja stanica u diobi i ukupnog broja stanica uzorka i izrazi u postocima. Tipovi mitotičkih i kromosomskih nepravilnosti koje se mogu promatrati uključuju: lomove, anafazne mostove i sljepljivanje, c-mitozu, zaostale kromosome i anafaze s multipolarnim vretenom (slika 1).



Slika 1 Primjeri citogenetičkih učinaka uzoraka vode rijeke Save u meristemskim stanicama vrškova korijena luka: (A) c-metafaза, (B) anafazni most s multipolarnim diobenim vretenom, (C) anafaza sa zaostalim kromosomom (D) sljepljivanje u anafazi, (E) metafaza s lomovima, (F) anafaza s multipolarnim diobenim vretenom

Prilikom izrade mikroskopskih preparata "squash" tehnikom može doći do pucanja i razvlačenja stanica na što učenicima treba skrenuti pažnju, ukoliko vrškovi korjenčića nisu dovoljno macerirani pod mikroskopom možemo vidjeti nakupinu stanica koju prilikom brojanja stanica preskačemo (slika 2).



Slika 2 Primjer meristemskih stanica vrškova korijena luka: (A) puknuće, (B) razvučena stanica, (C) nakupina

Učenici dobivene rezultate statistički obrađuju i međusobno uspoređuju. Dobivene rezultate mogu povezati s literaturnim izvorima te procijeniti koji zagađivači bi uzrokovali koje mitotičke i kromosomske nepravilnosti.

ZAKLJUČAK I METODIČKI ZNAČAJ

Onečišćenje voda aktualna je tema našeg doba i okruženja u kojem živimo te može biti zanimljiva za istraživanje i poticajna učenicima različite dobi. Učenici mogu procijeniti kvalitetu vode i povezati ju s učinkom koji ostavlja na biljku. Zbog sve većeg onečišćenja vodenog okoliša javlja se potreba za njegovim redovitim monitoringom. Allium-test je dovoljno osjetljiv test za ispitivanje toksičnosti vode, dok je luk modelni organizam pristupačan i nastavnicima i učenicima. Učenici provedbom Allium-testa mogu steći praktična znanja i izgraditi pozitivan stav prema očuvanju okoliša. Sam projekt može doprinijeti njihovoj samostalnosti, snalažljivosti i interpretaciji dobivenih rezultata na temelju istraživanja i prezentaciji istih kao i poboljšanju komunikacijskih vještina.

NAPOMENA

Ovaj članak pripremljen je prema diplomskom radu: Procjena toksičnosti vode rijeke Save upotrebom običnog luka (*Allium cepa* L.) kao modelnog organizma izrađenom na Biološkom odsjeku, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Sandre Radić Brkanac.

LITERATURA

- Fiskesjö G. (1985). The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102: 99-112
- Fiskesjö G. (1988). The Allium test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research* 197: 241-260
- Kokotović I. (2019). Procjena toksičnosti vode rijeke Save upotrebom običnog luka (*Allium cepa* L.) kao modelnog organizma. Diplomski rad, PMF, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Leme D.M., Marin-Morales M.A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation Research* 682: 71-81
- Lou S., Chung C., Dzan W., Shih R. (2012). Construction of a Creative Instructional Design Model Using Blended, Project-Based Learning for College Students. *Creative Education* 3: 1281-1290
- Nikolić T. (2013): *Sistematska botanika*. Alfa, Zagreb.
- Radić S., Vujčić V., Cvetković Ž., Cvjetko P., Oreščanin V. (2014). The efficiency of combined CaO/electrochemical treatment in removal of acid mine drainage induced toxicity and genotoxicity. *Science of the Total Environment* 466-467: 84-89
- Sharma A.K., Sharma A. (1972). *Chromosome techniques: Theory and practice*. Butterworths and Co. Ltd, London, str. 97-111.

Allium test application in biology teaching

Iva Kokotović¹, Sandra Radić Brkanac¹

¹ University of Zagreb, Faculty of science, Department of biology, Zagreb, Croatia
ikokotovic1@gmail.com

ABSTRACT

Allium-test is a simple biotest for determining toxicity and genotoxicity which students can perform at school, with the help of teachers or independently, to test the effects of different solutions on the model organism *Allium cepa* L. (the common onion). The Allium test is a good example of project-based learning because it can be adapted to the age of the students, and it enforces their creativity and independence in the implementation and presentation of the project itself. The project itself and its results encourages students to develop awareness of the aquatic environment and the impact of pollution at all its levels.

Keywords: *Allium-test; aquatic environment; project-based learning*