

6. ročník (2021/2022)



Experimentální bonus

Termín odevzdání: 13. 2. 2022

MUNI | RECETOX

MUNI Ústav experimentální
SCI biologie

Milí řešitelé, v letošním ročníku se podíváme na biotesty. Stejně jako v letech předchozích není samotná experimentální část příliš časově náročná, je ale důležité myslet na to, že bude chvíli trvat, než semena naklíčí (7 dní) a poté bude třeba získaná data zpracovat a vyhodnotit. Z tohoto důvodu není vhodné nechávat řešení úlohy na poslední chvíli, naopak doporučuji si řešení dopředu promyslet a naplánovat.

Monika Kuncová (e-mail: kuncovamoni@seznam.cz)

Zárodky problémů

50 bodů

Teoretická část

8,5 bodů

Zamysleli jste se někdy nad tím, jaké látky denně vyléváme do umyvadel či záchodu? Nemohly by způsobovat problémy v životním prostředí (dále ŽP)? Zachytí čističky odpadních vod veškeré potenciální škodliviny? Pojďme si tyto otázky (a mnohé další) postupně zodpovědět.

Možná, že vás při čtení úvodu zaujal pojem biotesty. Tyto testy byly vytvořené proto, aby dávaly člověku lepší přehled o (ne)bezpečnosti látek a jejich účincích na dané organismy. Má to ale háček – v přírodě na organismy nepůsobí látky jednotlivě, ale jako koktejl (kombinace) mnoha desítek chemických substancí, které mají odlišné účinky na různé druhy organismů. Efekt koktejlu látek se může měnit s druhem zastoupených látek i s jejich koncentrací, proto je nemožné otestovat účinky všech látek na ŽP.

Aby si přesto mohli lidé udělat hrubou představu, snaží se co nejvíce přizpůsobit podobu testů podmínkám v přírodě. Zpravidla proto do testování zahrnují organismy ze všech tří trofických úrovní (producenty, konzumenty a destruenty), aby ověřili, jak daná látka (směs látek) působí na různé druhy organismů. Dalším kritériem je délka trvání expozice. Biotesty můžeme rozdělit na akutní, semiakutní (semichronické) a chronické. Akutní biotesty se zpravidla používají na hodnocení letality a trvají v rozmezí několika málo hodin či dnů - obvykle 24 h, případně 48 h až 96 h. Chronické biotesty trvají dny, týdny až měsíce a hodnotí neletální efekty. Důležité je si také předem ujasnit počet zapojených druhů (jde-li o biotesty jednodruhové či vícedruhové) a na jaké úrovni biologických systémů biotest cílí. (buněčné a tkáňové kultury in vitro, terénní experimenty, mikro/mezokosmos, populace, intaktní živý organismus, . . .) Jinak budou designované testy mortality, růstové testy či reprodukční testy, také typ vzorku a matrice může výrazně ovlivnit výsledky a jejich interpretaci. Proto je důležité si vše předem pořádně promyslet, naplánovat a mít jasno, co kdy a proč děláte.

Pro možnost porovnání účinků látek byly vytvořeny standardizované testy, jejichž výsledky jsou objektivní a reprodukovatelné (opakovatelné). Standardizací se zabývají mnohé organizace, např. ISO (International Standardization Organization), OECD (Organization for Economic Cooperation Development) nebo ČSN (Česká státní norma).

V letošním experimentálním bonusu se podíváme na biotest s hořčicí bílou (*Sinapis alba*) a na pěti vzorcích si budeme demonstrovat reakci organismu vystaveného různým che-

mickým látkám. Jedná se o biotest zjednodušený a upravený do domácích podmínek vycházející ze standardizovaného biotestu.

1. Najděte na stránkách OECD (Organization for Economic Cooperation Development) číslo a název směrnice, podle které si myslíte, že byl zpracován standardizovaný biotest, ze kterého vznikl letošní experimentální bonus. [0,5 b]

2. Zamyslete se a uveďte alespoň 2 výhody a 2 nevýhody standardizovaných biotestů. [2 b]

V přírodních vědách se vyčleňují dvě vědy, které se zabývají toxickými účinky látek, toxikologie a ekotoxikologie. Tyto dva zdánlivě podobné pojmy lidé často zaměňují, je ale důležité si v nich udělat jasno. Záměna těchto dvou pojmů může způsobit špatnou interpretaci výsledků, které se dále šíří jako dezinformace, což může mít v extrémních případech až fatální následky.

3. Uveďte alespoň 5 konkrétních rozdílů mezi toxikologií a ekotoxikologií. [2,5 b]

Při testování léčiv dochází k nesčetnému testování vlivu přípravku na lidské zdraví. Přes všechny snahy výzkumníků se ale může stát, že nežádoucí účinky mohou udeřit tam, kde by je nikdo nečekal. Jako příklad si uveďme situaci s jistým léčivem, které se v 90. letech v Asii používalo pro zmírnění bolesti hospodářských zvířat, což mělo pozitivní dopad např. na produkci mléka. Pokud ale zvíře, ošetřované tímto přípravkem, zahynulo a farmář nezajistil jeho odklizení z pastviny, stalo se potravou pro supy. V důsledku požívání takové potravy se populace supů snížila během 10 let z 300 000 na 1 000 jedinců.

4. O jakou účinnou látku se jednalo a v jakých případcích (uveďte alespoň 1 příklad) ji můžeme najít? [0,5 b]

5. Podrobně popište, proč měla konzumace uhynulé zvěře ošetřované přípravkem s touto účinnou látkou tak neblahý vliv na populaci supů. Vyberte z nabízených možností orgánových toxicit tu, která odpovídá nejvíce zasažené orgánové soustavě u supů: hepatotoxicita; neurotoxicita; nefrotoxicita; hemotoxicita; imunotoxicita. [1 b]

6. Najděte, nastudujte si a ve stručnosti popište libovolnou případovou studii, kdy došlo po zavedení testované látky do oběhu k zásahu do ekosystému, poklesu populace organismů či defektům plodů. [2 b]

Více teoretické části po experimentu . . .

Experimentální část

Nyní si již dostáváme k samotné experimentální části. Než začnete řešit, projděte si tipy k řešení, měly by vám pomoci s přípravou na experiment.

Tipy a triky od autorky:

- Mějte přehled
 - Před samotným řešením si několikrát pročtěte zadání a ujistěte se, že víte, co a proč děláte.
- Dočítejte zadání do konce
 - Čtěte pozorně, ať se zbytečně nepřipravujete o bodíky, byla by to škoda.
- V klidu a včas
 - V rámci řešení se po vás, kromě založení a vyhodnocení experimentu, očekávají výpočty koncentrací a vzhled do problematiky, nechte si proto na řešení potřebné množství času. Výrazně nedoporučuji začínat později než týden před deadline (šibeniční, leč teoreticky zvládnutelné), raději dříve! Minimalizujete tak chyby z nedostatku času či stresu.
- Uvádějte postupy
 - U výpočtu koncentrací se co nejvíc rozepisujte, v případě chyby v postupu vám to může vynést alespoň část bodů.
- Usnadněte si práci
 - Doporučuji udělat celý pokus najednou, v případě testování na vícero fází (např. jeden den/týden půlku experimentu, druhý den/týden druhou půlku) by bylo potřeba si pokaždé namíchat novou pozitivní kontrolu (a uvést to v tabulce)!
- Spočítejte si to
 - U výpočtů koncentrace a ředění se vyplatí strávit krátký čas vymyšlením vhodné strategie a pár jednoduchými operacemi s využitím malého množství média se dostat k výsledku než spotřebovat barely destilované vody.
- Nebojte se ozvat či být kreativní
 - Experiment je designován na domácí podmínky, to ale neznamená, že nemůžete poprosit např. učitele ve škole o laboratorní pomůcky. Nemáte-li k nim přístup, nic se neděje, zapojte hlavu a využijte, co máte po ruce.
- Hlídejte si deadline
 - Nezapomeňte odevzdat své řešení. Nevadí, nebude-li kompletní či bezchybné, důležité je si to zkusit. ☺

Přeji vám hodně zdaru, již teď se těším na vaše řešení. ☺

Seznam potřebných pomůcek a materiálu

- Semínka hořčice bílé (*Sinapis alba*) – celá, nemořená
 - Nemořená hořčice není koření ze supermarketu, lze sehnat v zahradnických potřebách, některých květinářstvích, obchodech se zdravou výživou či na internetu pod hesly hořčice k setí, hořčice ke klíčení či zelené hnojení.
- Filtrační papír
- Petriho misky
 - Jako alternativu můžete použít sterilní víčka od zavařovacích sklenic, které před kultivací uzavřete potravinářskou fólií.
- Permanentní fix na popisování vzorků
- Lžička/pinzeta/párátko
 - Slouží k dostání semínek na filtrační papír. Osvědčila se mi čajová lžička v kombinaci s pinzetou/párátkem.
- Odměrné nádoby
 - Nejlepší by byly malé odměrné válce. Nemáte-li je k dispozici, použijte alternativy dle možností (kapátka, skleničky s ryskami, ...).
- Nádoby na ředění vzorků
- Nádoba na odpad
 - Dobře poslouží např. kelímek od jogurtu.
- Podkladový černý papír
- Právítko či milimetrový papír
- Destilovaná voda
 - Dopředu si naplánujte a spočítejte potřebné množství dle možností ředění (citlivosti odměrného nádobí). Nemělo by být potřeba využít více než 2 l destilované vody včetně započítané rezervy, při chytrém ředění vám postačí i pouhého 0,5 l.
- Technický líh
 - V případě nouze lze využít destiláty, nikoliv ale alkoholické nápoje neznámého obsahu ethanolu!
- Tableta paralenu
- Jar či jiný detergent
- Vaše oblíbená káva s kofeinem
- Chemikálie na otestování dle vlastní volby

Příprava vzorků

Médium

Jako médium použijeme destilovanou vodu. Bude sloužit k nabobtnání semen a ředění roztoků.

Negativní kontrola (NK)

Negativní kontrola slouží jako ukazatel vývinu organismu bez použití potenciálně škodlivých látek. Ukazuje nám tedy, jak by se organismus vyvíjel za standardních podmínek. Použijeme destilovanou vodu.

Pozitivní kontrola (PK)

K ověření negativního dopadu látky na organismy použijeme technický líh (ethanol). PK vytvoříme celkově 3, jmenovitě půjde o 1% roztok, 0,5% roztok a 0,25% roztok ethanolu. V případě použití jiné látky s obsahem ethanolu to nezapomeňte uvést ve svém řešení, tzn. vždy uvádějte základní roztok, ze kterého počítáte koncentrace! Jako alternativu můžete použít destiláty (doporučuji však technický líh), nikoliv pivo!

Vzorek 1 – léčivo

Dopad léčiv na živé organismy si budeme demonstrovat na tabletce Paralenu. K pokusu využijeme vzorky o koncentraci 0,500 mg/L¹, 0,250 mg/L a 0,125 mg/L. Součástí řešení bude také výpočet koncentrace potřebné k získání těchto roztoků z tablety (můžete vycházet i z poloviny tablety, podaří-li se vám ji přepůlit na stejné poloviny).

Vzorek 2 – detergent

Nejprve si vytvořte základní roztok – 1 kapka detergentu ve 100 ml média. K samotnému testování použijeme 1% roztok, 0,5% roztok a 0,25% roztok základního roztoku. Součástí řešení bude opět výpočet koncentrace. Počítejte s danou teoretickou hmotností: 1 kapka = 0,047 g.

Vzorek 3 – kofein

Posledním ze zadaných vzorků bude vzorek kofeinu. Základním roztokem bude šálek vaší oblíbené kávy. Vytvořte 1% roztok, 0,5% roztok a 0,25% roztok z kávy ke vzorkování. Pro výpočet koncentrace kofeinu ve vzorcích použijte informace na obalu kávy, nakupujete-li v bezobalovém obchodě či na kávě není uveden obsah kofeinu, použijte příloženou tabulku (viz příloha na konci) nebo jiné tabulky z internetu či literatury. Zdroj koncentrace pro výpočet zdokumentujte (foto / print screen / odkaz).

Vzorek 4 – vlastní výběr

Závěrečný vzorek bude ve vaší režii. Zamyslete se nad chemikáliemi, které byste rádi otestovali či nad látkami, které často používáte. Nebojte se popustit uzdu fantazii. Součástí řešení bude mikrouvaha, proč jste si vybrali tuto látku (čím vás zaujala a jaký výsledek (inhibice/stimulace) byste pravděpodobně očekávali) a výpočet ředění (koncentrace nepovinná). Možné příklady pro inspiraci: kyselina citrónová, kyselina octová, jedlá soda, vývar z těstovin, voda po malování temperami, močovina, odtoková voda z pračky, ...

¹Koncentrace odpovídající 0,500 mg tablety rozpuštěné v litru destilované vody (chytře řed'te).

Postup při zakládání pokusu

Pokud máte k dispozici dostatečné množství Petriho misek, použijte je. V opačném případě nabízím alternativu ve formě víček od zavařovacích sklenic (doporučený průměr víčka je 8 - 9 cm).

V rámci řešení bude bodovaný i postup - u každého vzorku nafaťte vzorek než jej uložíte ke kultivaci a poté při vyhodnocování (1 vzorek = 2 fotografie). Tyto fotografie vložte do svého řešení k výpočtu koncentrace (u vlastního vzorku k ředění) daného vzorku.

Příprava materiálu a sterilizace nádobí

- Petriho misky pečlivě umyjte, nechte uschnout vnitřní stranou dolů na savém materiálu, otřete ethanolem a nechte jej odpařit.
- V případě víček od zavařovacích sklenic je minimálně 30 minut povařte ve vodě (kovové předměty nelze dávat do mikrovlnné trouby).
- U jiných alternativ postupujte dle materiálu – plastové či skleněné misky přes noc ponořte do 10% roztoku Sava a poté opláchněte destilovanou vodou.



Namočení semínek v kultivačním médiu

- Alespoň 20 minut před sázením na misky naložte semínka do kultivačního média.
- Pro šetření času doporučuji namočit semínka před ředěním roztoků.



Popsání misek a vložení filtračního papíru

- Na každou misku/víčko napište *datum* založení experimentu, *název* vzorku a jeho *koncentraci* (např. 1. 12. 2021, léčivo, 0,500 mg/L).
- Pro přehlednost si sjednoťte značení.
- Do misek vložte nastříhaná kolečka filtračního papíru tak, aby pokrývala většinu plochy dna a zároveň se nekrčila. (kolečka nastříhejte o pár milimetrů v průměru menší než je dno misky/víčka, ve kterém zakládáte experiment).



Příprava roztoků

- Nařeďte si roztoky viz sekce Příprava roztoků.
- Do každé misky/víčka nalijte 5 ml příslušného roztoku.
- Dejte si pozor, aby se roztok v Petriho misce / víčku shodoval s popiskem na víčku!



Semínka

- Do každé misky vložte 10 semínek.
- Dávejte pozor na ředění!
 - Při přendávání semínek do misek nejprve přeneste semínka na savý materiál (papírovou utěrku, kapesník, toaletní papír) a po krátkém odkapání jednotlivě přeneste na misku.
 - Pokud byste nalili semínka do připravených misek včetně kultivačního média, docházelo by pak k nechtěnému ředění roztoku v miskách a tím byste si zkreslovali výsledky experimentu.



Uzavření misek a kultivace

- Zavřete Petriho misky / zapečete víčka od zavařovacích sklenic potravinovou fólií a odneste je na tmavé místo s cca 20 °C (šuplík, skříň, krabice, ...).
- V případě menšího počtu misek či použití víček od sklenic je potřeba zakrýt misku/víčko potravinovou fólií, aby nedocházelo k odparu roztoku.



Vyhodnocení

- Po sedmi dnech otevřete misky a změřte velikost kořínků od hypokotylu (prvního stonkového článku mezi kořenem a dělohami) včetně po kořenovou čepičku.
- Nemá-li vyklíčené semínko hypokotyl, запиšte do tabulky hodnotu 0, nevyklíčí-li, uveďte do políčka pomlčku a tuto hodnotu vyřaďte z výpočtů.
- Doplňte tabulky (pro každý vzorek a PK zvlášť, celkem tedy 5 tabulek) a na jejich základě odpovězte na následující doplňující otázky.
 - % kontroly spočítejte jako průměr délky kořene vzorku podělený průměrem kontroly.
 - % inhibice spočítejte jako odečet % kontroly od 100 %.
 - Tabulka k vyplnění se nachází v příloze na konci experimentálního bonusu.



Doplňující otázky

7. Která z vámi měřených látek je nejtoxičtější? Svou odpověď podložte argumenty a uveďte její hodnoty NOEC a LOEC. Do které třídy toxicity spadá dle vás nejtoxičtější a nejméně toxický vzorek? [3,5 b]

8. Zařadili byste experimentální část mezi toxikologický nebo ekotoxikologický biotest? Svou odpověď zdůvodněte. [1 b]

9. Standardní doba biotestu s hořčicí bílou bývá 72 h, případně 96 h. Zamyslete se a pokuste se přijít na vhodné zdůvodnění, proč je expoziční doba v letošním experimentálním bonusu zhruba 2x delší. Může to mít nějaké výhody či nevýhody? [1 b]

Dostanou-li se farmaka do řek, nastává problém v ŽP. Jak se tam ale dostanou v dnešním světě plném norem, zákonů a regulí?

10. Jaké negativní dopady mohou mít léčiva ve vodách na živé organismy? Uveďte alespoň 2 příklady. Jak nejčastěji se tyto látky dostávají do vod? [2 b]

11. Dokáží čističky odpadních vod zbavit vodu veškerých potenciálně škodlivých látek? Pokud ne, jak je to možné? Vysvětlete. [2 b]

Čistírny odpadních vod (dále ČOV) mohou být mnoha typů. Rozdělují se dle velikosti a způsobu čištění. Nejčastějším typem používaných ČOV v ČR je mechanicko-biologická čistírna, do povědomí se opět dostávají také kořenové čistírny.

12. Přáli byste si mít v blízkosti svého bydliště raději mechanicko-biologickou ČOV nebo kořenovou čistírnu? Svou odpověď zdůvodněte klady a zápory daných čističek. [1 b]

Děkuji, že jste plnili letošní experimentální bonus. Byla bych ráda, kdybyste si z jeho řešení odnesli hlavně vhled do problematiky ŽP a možná i nějaké soft-skills. ☺

Příloha 1: Příklad tabulky pro vyplnění vzorku

	Negativní kontrola	Vzorky %v/v		
Koncentrace	-	1	0,5	0,25
Celkem semen	10	10	10	10
Počet nevyklíčených semen				
Délka kořenů [cm]				
Průměrná délka kořenů [cm]				
Procento kontroly	100			
Procento inhibice				

Příloha 2: Tabulka pro výpočet koncentrace kofeinu v kávě

Příprava	Servíruje se (ml)	Kofein (v mg)	Kofein ve 100 ml
Black Insomnia	44	137	312,1
Espresso	44	77	175
Filtrovaná káva	236	210	89
Turecká káva	59	50	84,7
Flat White (2 shoty)	200	154	77
Nescafe Dolce Gusto	236	106	44,9
Cappuccino (1 shot)	354	77	43,5
Caffè Americano (1 shot)	180	64	35,5
Caffè Latte (1 shot)	473	77	32,6
Instantní káva	236	57	24
Bezkofeinová káva	236	5	2,1

Zdroj: www.vybornakava.cz