

FAKULTETA ZA VARSTVO OKOLJA

DIPLOMSKO DELO

**UGOTAVLJANJE POTENCIALNE TOKSIČNOSTI PIROKTON
OLAMINA Z ENOSTAVNIMI RASTLINSKIMI BIOTESTI**

MANCA SRAKAR

VELENJE, 2024

FAKULTETA ZA VARSTVO OKOLJA

DIPLOMSKO DELO

**UGOTAVLJANJE POTENCIALNE TOKSIČNOSTI PIROKTON
OLAMINA Z ENOSTAVNIMI RASTLINSKIMI BIOTESTI**

MANCA SRAKAR

Varstvo okolja in ekotehnologije

Mentorica: viš. pred. dr. Anja Bubik

VELENJE, 2024



Številka: 726-5/2024-2

Datum: 8. 4. 2024

Na podlagi Diplomskega reda izdajam naslednji

SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

Študentka Fakultete za varstvo okolja **Manca Srakar** lahko izdela diplomsko delo z naslovom v slovenskem jeziku:

Ugotavljanje potencialne toksičnosti pirokton olamina z enostavnimi rastlinskimi biotesti

Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

Determination of the potential toxicity of pyroctone olamine by simple plant bioassays

Mentorica: **viš. pred. dr. Anja Bubik**

Diplomsko delo mora biti izdelano v skladu z Diplomskim redom FVO.

Pouk o pravnem sredstvu: zoper ta sklep je dovoljena pritožba na Senat FVO v roku 8 delovnih dni od prejema sklepa.

Prof. dr. Boštjan Pokorný
dekan



Fakulteta za varstvo okolja
Trg mladosti 7 | 3320 Velenje
t: 03 898 64 10 | e: info@fvo.si
www.fvo.si



IZJAVA O AVTORSTVU

Podpisana **Manca Srakar**, z vpisno številko **34210011**, študentka dodiplomskega študijskega programa Varstvo okolja in ekotehnologije, sem avtorica diplomskega dela z naslovom:

Ugotavljanje potencialne toksičnosti pirokton olamina z enostavnimi rastlinskimi biotesti, ki sem ga izdelala pod mentorstvom viš. pred. dr. Anje Bubik.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je predloženo delo moje avtorsko delo, torej rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela;
- da oddano delo ni bilo predloženo za pridobitev drugih strokovnih nazivov v Sloveniji ali tujini;
- da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem delu, navedena oz. citirana v skladu z navodili FVO;
- da so vsa dela in mnenja drugih avtorjev navedena v seznamu virov, ki je sestavni element predloženega dela in je zapisan v skladu z navodili FVO;
- se zavedam, da je plagiatorstvo kaznivo dejanje;
- se zavedam posledic, ki jih dokazano plagiatorstvo lahko predstavlja za predloženo delo in moj status na FVO;
- je diplomsko delo jezikovno korektno in da je delo lektorirala dipl. slov. (UN) in dipl. lit. komp. (UN) Anja Tomažič;
- da dovoljujem objavo diplomskega dela v elektronski obliki na spletni strani FVO;
- da sta tiskana in elektronska verzija oddanega dela identični.

Velenju, dne _____

Podpis avtorice: _____

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici viš. pred. dr. Anji Bubik za vso pomoč, nasvete, ves vložen čas in usmeritve pri nastajanju diplomskega dela. Hvala Fakulteti za varstvo okolja, da sem lahko v laboratoriju izvedla poskuse in meritve ter Aljoši za pomoč pri izvedbi.

Prav tako se zahvaljujem tudi družini in prijateljem za vso izkazano podporo.

Hvala.

IZVLEČEK

Prhljaj in seboroični dermatitis sta dve pogosti stanji kože, ki prizadeneta velik del svetovnega prebivalstva, ne glede na spol in starost. Nastanek prhljaja je pogosto povezan s prekomerno rastjo kvasovk iz rodu *Malassezia*, ki povzročajo srbenje in luščenje kože. Seboroični dermatitis – kronično vnetno stanje kože, pa povzroča rdečico in prav tako kot prhljaj tudi srbenje in luščenje kože. Pirokton olamin je eden izmed pogosto uporabljenih protiglavčnih učinkovin, ki se uporablja v številnih kozmetičnih izdelkih, še posebej v šamponih proti prhljaju.

V diplomskem delu smo ugotavljali potencialno toksičnost pirokton olamina z rastlinskimi biotesti. Z uporabo čebulnega (*Allium cepa L.*) testa in testa vrtne kreše (*Lepidium sativum*) smo želeli oceniti, kakšen je njegov vpliv na rast in celično delitev testnih rastlin. Pod izbranimi eksperimentalnimi pogoji smo potrdili njegov toksičen vpliv na rast obeh testnih rastlin, saj se je z večanjem koncentracije pirokton olamina celična rast upočasnila – dolžine koreninic čebule oz. poganjkov vrtne kreše so se skrajšale. Rast koreninic in poganjkov pri dveh najvišjih testiranih koncentracijah pirokton olamina je bila skoraj ničelna.

Za ugotavljanje vpliva pirokton olamina na celično delitev smo pri izvedbi čebulnega testa obarvali celične kromosome in pregledali koreninice čebule še pod mikroskopom ter določili mitotski indeks. Pri koreninicah, ki so bile izpostavljene višjim koncentracijam pirokton olamina, je bila opazna manjša celična delitev, prav tako pa smo opazili tudi nekatere poškodbe dednega materiala.

Z opravljenim laboratorijskim delom smo ugotovili, da sta oba rastlinska biotesta zelo uporabna in enostavna za izvedbo in ugotavljanje potencialne toksičnosti kemikalij na rastline. S pomočjo testov smo pokazali na potencialno toksičnost pirokton olamina, kar posledično odpira vprašanja glede varnosti uporabe te kemikalije tudi pri ljudeh.

Ključne besede: celična delitev, pirokton olamin, prhljaj, rastlinski biotesti, seboroični dermatitis, toksičnost.

ABSTRACT

Dandruff and seborrheic dermatitis are two common skin conditions affecting a large portion of the global population, regardless of gender and age. The development of dandruff is often associated with the excessive growth of yeast from the genus *Malassezia*, which causes itching and flaking of the skin. Seborrheic dermatitis, a chronic inflammatory skin condition, causes redness, and like dandruff, also leads to itching and flaking of the skin. Piroctone olamine is one of the frequently used antifungal agents found in numerous cosmetic products, especially in anti-dandruff shampoos.

In this thesis, we investigated the potential toxicity of piroctone olamine using plant bioassays. By employing the onion (*Allium cepa L.*) test and the garden cress (*Lepidium*) test, we aimed to assess its impact on the growth and cell division of test plants. Under our experimental conditions, we confirmed its toxic effect on the growth of both test plants, as the cellular growth slowed down with increasing concentrations of piroctone olamine—the lengths of onion roots and garden cress shoots decreased. The growth of roots and shoots at the two highest tested concentrations of piroctone olamine was nearly negligible.

To determine the effect of piroctone olamine on cell division, we stained the cellular chromosomes during the onion test and examined the onion roots under a microscope to determine the mitotic index. In roots exposed to higher concentrations of piroctone olamine, a decrease in cell division was observed, and we also noticed some damage to the genetic material.

Through our laboratory work, we concluded that both plant bioassays are highly useful and easy to perform for assessing the potential toxicity of chemicals on plants. The tests indicated the potential toxicity of piroctone olamine, which consequently raises questions about the safety of this chemical for use in humans as well.

Keywords: cell division, piroctone olamine, dandruff, plant bioassays, seborrheic dermatitis, toxicity.

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1 Namen in cilji	2
1.2 Hipotezi	2
2. PIROKTON OLAMIN.....	3
2.1 Zakonodaja.....	3
2.2 Lastnosti pirokton olamina.....	4
3. PRHLJAJ IN SEBOROIČNI DERMATITIS	5
4. RASTLINSKI BIOTESTI.....	6
4.1 Test z vrtno krešo (<i>Lepidium</i>)	6
4.2 Čebulni test (<i>Allium cepa L.</i>).....	7
5. MATERIALI IN METODE	8
5.1 Priprava raztopin Pirocton olamina.....	8
5.2 Kalitveni test z vrtno krešo <i>Lepidium sativum</i>	10
5.3 Čebulni test <i>Allium cepa L.</i>	10
5.4 MIKROSKOPIRANJE.....	12
5.4.1 Mitoza	12
5.4.2 Priprava preparata za mikroskopiranje	13
5.5 Določitev mitoznega in metafaznega indeksa.....	13
6. REZULTATI Z RAZPRAVO	15
6.1 Kontrolni vzorec kalitvenega testa vrtne kreše	15
6.2 Kontrolni vzorec čebulnega testa	17
6.3 Rezultati testa z vrtno krešo (<i>Lepidium</i>)	20
6.4 Rezultati čebulnega testa <i>Allium cepa</i>	27
6.5 Mikroskopiranje.....	31
6.6 Aberacije in nepravilnosti pri celični delitvi.....	34
7. SKLEPI.....	37
8. POVZETEK	41
9. SUMMARY	43
10. VIRI IN LITERATURA	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Šampon proti prhljaju	1
Slika 2: Vrtna kreša	6
Slika 3: Semena vrtne kreše.....	7
Slika 4: Čebulice Allium cepa L.	8
Slika 5: Pirokton olamin	8
Slika 6: Bučke s pripravljenimi raztopinami.....	9
Slika 7: Petrijevke s semenami vrtne kreše (Lepidium s.).....	1110
Slika 8: Čebulice izpostavljene raztopinami pirokton olamina	1111
Slika 9: Čebulice izpostavljene destilirani vodi, eni pozitivni in trem negativnim kontrolam	1111
Slika 10: Čebulice med eksperimentom in pod vplivom sončne svetlobe.. <u>Napaka! Zaznamek ni definiran.</u> 11	
Slika 11: Shema faz mitoze	1612
Slika 12: Segrevanje HCl nad vodno kopeljo	1613
Slika 13: Opazovanje preparatov koreninic čebule pod mikroskopom	1614
Slika 14: Rast poganjkov vrtne kreše v kontrolnih vzorcih	1716
Slika 15: Semena vrtne kreše izpostavljena deionizirani vodi po 3 dneh	1816
Slika 16: Semena vrtne kreše izpostavljena kontrolnemu vzorcu K1 po 3 dneh.....	1816
Slika 17: Rast koreninic čebule v kontrolnih vzorcih po 3, 5 in 7 dneh	1917
Slika 18: Zmanjšana rast koreninic v kontrolnem vzorcu K1 po 7 dneh	2418
Slika 19: Povečana rast koreninic v kontrolnem vzorcu K2 po 7 dneh	18
Slika 20: Povečana rast koreninic v kontrolnem vzorcu K3 po 7 dneh	19
Slika 21: Povečana rast koreninic v kontrolnem vzorcu K3 po 7 dneh	23
Slika 22: Kalitev semen vrtne kreše pod vplivom pirokton olamina po 48 urah	<u>Napaka! Zaznamek ni definiran.</u> 24
Slika 23: Kalitev semen vrtne kreše pod vplivom pirokton olamina po 72 urah	2825
Slika 24: Primerjava vpliva pirokton olamina na rast poganjkov semen vrtne kreše 2 in 3 dan po izpostavitvi.....	2926
Slika 25: Prikaz čebulic vseh koncentracij po 7 dneh.....	3027
Slika 26: Čebulni test, rast koreninic po 3 dneh	3028
Slika 27: Čebulni test, rast koreninic po petih dneh	29
Slika 28: Čebulni test, rast koreninic po sedmih dneh.....	30
Slika 29: Primerjava vpliva pirokton olamina na rast čebulic 3,5 in 7 dan.....	30
Slika 30: Čebulice izpostavljene najvišji koncentraciji pirokton olamina (0,003 nM)	31
Slika 31: Prikaz interfaze in telofaze delitve celice	32
Slika 32: Prikaz metafaze delitve celice	33
Slika 33: Prikaz citokineze delitve celic.....	33
Slika 34: Zlepjanje v metafazi	3634
Slika 35: Hipoploidna celica.....	<u>Napaka! Zaznamek ni definiran.</u> 35
Slika 36: Mitotsko združevanje v metafazi.....	35
Slika 37: Anafazni fragment.....	36
Slika 38: Čebulice izpostavljene pozitivni kontroli po 7 dneh.....	38
Slika 39: Čebulice izpostavljene najvišji koncentraciji pirokton olamina po 7 dneh.....	39
Slika 40: Čebulice izpostavljene najnižji koncentraciji pirokton olamina po 7 dneh	39

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Lastnosti pirokton olamina (Medmrežje 3 in 4).....	4
Preglednica 2: Raztopine pirokton olamina in kontrole.....	9
Preglednica 3: Prirastek poganjkov vrtne kreše od 2 do 3 dne.....	25
Preglednica 4: Prirastek korenin čebule od 3 do 7 dne.....	31
Preglednica 5: Število preštetih celic v fazah mitoze, mitotski indeks, metafazni indeks.....	32

1. UVOD

Ena izmed neštetih stvari, po katerih se ljudje med seboj razlikujemo, so tudi lasje. Ti predstavljajo raznolike fenotipske izraze. Lahko so ravni, valoviti, kodrasti, številnih barvnih odtenkov. So pomemben del samopodobe, saj jih lahko vsak preoblikuje po svoji želji. Imajo pa tudi zelo pomembno vlogo, saj so ravno lasje tisti, ki nam poleti zaščitijo kožo pred soncem, pozimi pa služijo kot topotna izolacija. Posamezna lasna vlakna so kompleksno sestavljene strukture. Las je v spodnjem delu pritrjen z lasno čebulico, ki je rahlo odebela in v njej poteka delitev celic. Lasno steblo je sestavljeno iz treh plasti – lasne kutikule, vmesne lasne skorje, imenovane korteks, in lasne sredice, ki se imenuje medula (Tobin, 2008, Koch in sod., 2018). Lasišče je prepleteno z neštetimi folikli, kjer se proizvaja velika količina sebuma, katerega naloga je ščititi lasišče pred zunanjimi vplivi. V nasprotnem primeru pa lahko te značilnosti lasišča pomenijo tudi občutljivost na površinske glivične kolonizacije.

Dandanes smo priča neštetim novim odkritjem v znanosti. Poleg številnih prednostih pa to pomeni tudi zelo skrbno in natančno ocenjevanje tveganj, do katerih lahko pride pri uporabi takšnih kemikalij. Te lahko najdemo v izdelkih, ki jih za osebno nego uporabljamo dnevno. Pirokton olamin je ena izmed ključnih učinkovin v boju proti prhljaju, prav tako pa se uporablja tudi za zdravljenje dermatitisa in podobnih kožnih stanj. Mnoga leta se je v ta namen uporabljaj cinkov piriton, a je bila njegova uporaba v izdelkih leta 2022 prepovedana (Pinto, 2021). Dokazali so, da ima škodljiv vpliv na ljudi in posledično tudi na vodne ekosisteme (Medmrežje 1).



Slika 1: Šampon proti prhljaju

Vir slike: <https://global.typology.com>

1.1 Namen in cilji

Namen diplomskega dela je bil preučiti pirokton olamin in prepoznati ugotoviti njegove potencialne toksične učinke s pomočjo uporabe enostavnih rastlinskih biotestov.

Cilji so bili ugotoviti, v kolikšnih količinah je priokton olamin prisoten v izdelkih za nego las, izvesti dva rastlinska biotesta – čebulni test (*Allium cepa L.*) in test vrtne kreše (*Lepidium sativum*) ter pod mikroskopom opazovati celično delitev korenin čebule in morebitne negativne vplive pirokon olamina nanjo.

V laboratoriju smo za ugotavljanje toksičnosti pirokton olamina uporabili dva enostavna biotesta:

- čebulni test (*Allium cepa L.*) in
- test vrtne kreše (*Lepidium sativum*).

Pri prvem testu smo ugotavljali vpliv kemikalije v različnih koncentracijah na celično delitev s spremeljanjem rasti korenin čebule v izbranem časovnem intervalu ter z mikroskopsko analizo dednega materiala v fazi celične delitve. Pri drugem testu pa smo v izbranem časovnem obdobju ob izpostavitvah različnim koncentracijam spremljali kaljivost vrtne kreše.

1.2 Hipotezi

Pred začetkom dela smo si zastavili dve hipotezi:

H1: Z večanjem koncentracije pirokton olamina se veča njegova potencialna toksičnost na izbrane rastline.

H2: Večje koncentracije pirokton olamina imajo negativne vplive na celično delitev.

2. PIROKTON OLAMIN

Mnoga leta se je v izdelkih proti prhljaju uporabljal cinkov pirition, a je bil ta marca leta 2022 na podlagi Uredbe EU št. 2021/1902 dokončno prepovedan (Pinto, 2021). Kot alternativa se danes pogosto uporablja pirokton olamin (1-hidroksi-4-metil-6-(2,4,4-trimetil)-2-(1H)piridinon,2-aminoetanolska sol), etanolaminska sol derivata hidroksamske kisline piroktona. Je v obliki prahu, bele do rahlo rumene barve in ima rahel značilen vonj (Medmrežje 6). Prvič ga je leta 1979 sintetiziralo podjetje Schwarzkopf-Henkel v Nemčiji (Kim in sod., 2011).

Prisoten je v šamponih in sredstvih za izpiranje las, saj je zanj značilno zmanjševanje mikrobnih kolonizacij. V izdelkih pa je prisoten tudi zato, ker je kemični konzervans. Sam mehanizem njegovega delovanja še ni povsem natančno znan. Znano pa je dejstvo, da ima zmožnost prodreti skozi celično membrano in tvoriti komplekse z železom, s čimer pride do zaviranja energetske presnove v mitohondrijih patogenih gliv (Kim in sod., 2011; Dubini in sod., 2005).

Za uporabo je varen, če se ga koristi v priporočenih odmerkih:

- ✓ 0,1 % se ga uporabi v izdelkih za izpiranje (*rinse-off*);
- ✓ 0,5 % v izdelkih, ki se jih ne odstranjuje (*leave-on*);
- ✓ 0,1–0,3 % v lasnih emulzijah;
- ✓ 0,2–0,5 % se ga uporabi kot konzervans;
- ✓ 0,2–0,5 % pa v sredstvih za odpravljanje vonja in v dišavnih milih (Medmrežje 6).

2.1 Zakonodaja

Kozmetični izdelki, trženi v EU, lahko vsebujejo le tiste snovi/konzervanse, ki so navedeni v prilogi VI k Direktivi o kozmetičnih izdelkih 76/768/EEC, »Seznam konzervansov, ki se uporablja v kozmetičnih izdelkih« (Eur-Lex, Medmrežje 7).

V prilogi je navedeno, da se lahko snovi, označene s simbolom (+), dodajojo kozmetičnim izdelkom tudi v koncentracijah, ki niso določene, če se uporablja za druge posebne namene. Pirokton olamin ima ta znak, zato se ga lahko uporablja v izdelkih v višjih koncentracijah, če se ga ne uporablja le kot konzervans. Odobren je bil za uporabo v kozmetičnih izdelkih z največjo koncentracijo 1 % za izdelke za izpiranje in 0,5 % za ostale izdelke (SCCS, Medmrežje 5).

2.2 Lastnosti pirokton olamina

Fizikalno-kemijske lastnosti pirokton olamina so povzete v Preglednici 1.

Preglednica 1: Lastnosti pirokton olamina (Medmrežje 3 in 4)

Ime	Pirokton olamin
Kemijsko ime po IUPAC	2-aminoethanol; 1-hydroxy-4-methyl-6-(2,4,4-trimethylpentyl)pyridin-2-one
Formula	C ₁₄ H ₂₃ NO ₂ .C ₂ H ₇ NO C ₁₆ H ₃₀ N ₂ O ₃
Kemijska struktura	
	Vir slike: PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)
Molska masa	298,42 g/mol
Videz	bel prah
Vonj	značilen vonj
Vrelišče	344,1 °C
Tališče	130–135 °C
Topnost v vodi	rahlo topen
Piktogrami	<p>jedko</p> <p>dražljivo</p> <p>nevorno za okolje</p> <p>Vir slik: PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)</p>

3. PRHLJAJ IN SEBOROIČNI DERMATITIS

Vročina in vlažnost sta dokazano dejavnika, ki prispevata k mastnemu lasišču (Narshana, 2010) in tako ustvarita idealno okolje za razmnoževanje mikroorganizmov, ki povzročajo prhljaj. Mikroorganizmi se prehranjujejo z lipidi, ki so na lasišču, in tako zmanjšujejo trdnost lasišča ter ga naredijo veliko bolj občutljivega (Saxena in sod., 2018).

Prhljaj in seboroični dermatitis sta pogosti dermatološki težavi. Stanji sta si nekoliko podobni, delita si nekatere značilnosti in podobno zdravljenje, razlika je le v lokaciji, kje se pojavita in pa po resnosti pojava (Gupta, 2004).

Prhljaj je znan kot eno izmed najpogostejših dermatoloških obolenj kože. Skoraj polovica celotne populacije na svetu se srečuje s tem problemom (Schwartz in sod., 2004). Poleg fizičnega nelagodja – srbenja in luščenja kože, je prhljaj pri nekaterih nekaj sramotnega in ima negativen vpliv na samopodobo posameznika (Manuel in Ranganathan, 2011). Srbeče lasišče je pogost in zelo moteč simptom. To je najpogosteje povezano s seboroičnim dermatitisom in luskavico, čeprav se velikokrat pojavi brez kakršne koli očitne kožne spremembe (Bernhard, 1995).

Srbečica se lahko pojavi zaradi različnih stanj – dermatoloških, nevroloških ali pa psihogenih bolezni. Pri bolnikih so v tem primeru najpogosteje prizadeti mesti lasišče in obraz (Ferm in sod., 2010). Znanstveno imenovan *Pityriasis capitis* je velikokrat povezan s prisotnostjo kvasovk iz rodu *Malassezia* (Shuster, 1984; Gupta in sod., 2004). *Malassezia* so vrsta bazidiomicetnih gliv in so del normalne kožne flore različnih vrst živali (Cabañes, 2014). Veliko kožnih bolezni je povezanih s to vrsto kvasovk. Teh vrst pa ni tako malo, saj je odkritih kar 17 različnih vrst te kvasovke (Velegaki in sod., 2015). Med temi je na človeški koži najbolj razširjena *Malassezia restricta*. Nekatere izvedene študije so pokazale, da večina vrst teh kvasovk za delovanje potrebuje lipide in da se pri razgradnji trigliceridov iz lojnic sproščajo dražilne proste maščobne kisline, ki povzročijo vnetje in luščenje lasišča (Findley, Oh in sod., 2013; Clavaud, 2013; Jourdain in sod., 2014; Xu in sod., 2016; Grimshaw in sod., 2019). *M. restricta* in še nekatere druge za svojo rast uporabljajo ogljik, ki je prisoten v območjih, bogatih z lipidi, zaradi česar je sebum lasišča zanje idealno okolje (Bonardi in sod. 2019).

Povzročitelj tako prhljaja kot tudi dermatitisa je že omenjena kvasovka *Malassezia spp.* To je od lipidov odvisna bazidiomicetna kvasovka, ki se nahaja na koži in sluznici ljudi in drugih toplokrvnih živalih. Njena taksonomija se spreminja že od leta 1846, ko je bila odkrita. Od leta 1853 pa je uvrščena v sedem različnih rodov in 17 različnih vrst. Je ena izmed glavnih sestavin kožnega mikrobioma. Na koži se pojavi kot komenzal, povezana je z različnimi kožnimi boleznimi in okužbami krvnega obtoka (Findley in sod., 2013). Faktorji, kot so npr. življenjski slog, okoljski pogoji, imunski sistem, higiena, velikokrat prispevajo k spremembam v kožni mikrobiomi, kar lahko posledično privede do pojava raznih kožnih stanj.

Zdravljenje prhljaja je osredotočeno na odpravljanje znakov bolezni, izboljšavo povezanih simptomov, še posebej srbenja in vzdrževanje remisije z dolgoročno terapijo. Razmnoževanje patogenih mehanizmov vrste *Malassezia* povzroča lokalno draženje in vnetje kože, zaradi česar je najpogosteja oblika zdravljenja uporaba lokalnih protigličnih in protivnetnih sredstev (Dessinioti in Katsambas, 2013).

Morda velikokrat niti ne pomislimo toliko na to, da imajo lahko izdelki, ki vsebujejo številne aktivne snovi, tudi negativne učinke na posameznika. Za ugotavljanje potencialne toksičnosti določenih snovi si lahko v veliko primerih pomagamo z rastlinskimi biotesti – dva izmed takšnih sta čebulni test in test vrtne kreše, ki sta bila uporabljeni tudi v naši diplomske nalogi.

4. RASTLINSKI BIOTESTI

V okolu se akumulira nešteto toksičnih in genotoksičnih snovi. Ni zadostno le določiti število in količino različnih onesnaževal v okolu, pomembno je predvsem dejstvo, ali pri ugotovljenih koncentracijah pride do škodljivih učinkov na žive organizme (Firbas, 2011).

Biotesti so testi, s katerimi preiskujemo učinke onesnaževal na žive sisteme. So sistemi testiranja, pri katerih zaznamo določen odziv, ki se pojavi pri testiranju na živih organizmih ali pa njihovih delih. Tako lahko določamo prisotnost oz. koncentracijo določene kemične substance. Ti temeljijo na uporabi bioloških odzivov kot sistema za odkrivanje biološko aktivnih snovi. Idealen biotest mora imeti visoko specifičnost, visoko občutljivost, kratek odzivni čas, hitro odzivnost rasti korenin, dobro razpoznavne faze mitoze, biti cenovno ugoden, imeti veliko dostopnost rastlinskega materiala, zadovoljivo enostavno manipulacijo in majhne zahteve po prostoru in opremi (Yopp, 1986).

4.1 Test z vrtno krešo

Vrtna kreša (*Lepidium sativum*), prikazana na Sliki 2, je rastlina, razširjena po vsem svetu. Uporablja se jo kot živilo, v medicini pa lahko tudi kot terapevtsko sredstvo za zdravljenje. Za njene izvlečke velja, da imajo številne koristne biološke učinke. Poleg tega se uporablja tudi kot testni organizem, kjer se opazuje kalitev njenih semen, ki so prikazana na Sliki 3, saj hitro raste in kali, enostavna je za gojenje, cenovno ugodna, občutljiva je na toksine – spremembe v rasti, barvi so hitro opazne in merljive (Baumgarten in Spiegel, 2004).



Slika 2: Vrtna kreša

Vir slike: <https://www.klubgaia.com/>



Slika 3: Semena vrtne kreše

Vir: <https://www.mikrozelenje.si>

4.2 Čebulni test

Z začetki konec šestdesetih in sedemdesetih let prejšnjega stoletja se je čebulni test razvil predvsem v Skandinaviji, še posebej, ko ga je priporočala Kraljevska Švedska Akademija (Royal Swedish Academy of Science). V večini raziskav na tem področju je obdržal vodilno vlogo (Fiskesjo 1993; Grant, 1999; Rank 2003; Ma 2005). Najpogosteje uporabljena rastlina pri teh testih je navadna čeba *Allium cepa L.*, prikazana na Sliki 4.

Kromosomi navadne čebule so relativno veliki in zato primerni za študijo kromosomskih poškodb (Firbas, 2004; 2006). Rastlina je postala objekt številnih raziskovanj in pomemben bioindikator za ugotavljanje prisotnosti strupenih snovi v okolju v povezavi s pojavljanjem motenj v celični delitvi – mitozi (Fiskesjo, 1985; Rank, 2003) in poškodbami metafaznih kromosomov (Al-Sabti, 1985, 1989; Firbas, 2004; Kumar in Panneerselvam, 2007; Ragunathan in Panneerselvam, 2007).

Čebulni test je zastavljen tako, da je testna rastlina *A. cepa* v času izvedbe v neposrednem in stalnem stiku z raziskanim vzorcem, kjer se tako pokaže usklajen in celokupen učinek onesnaževanja in delovanje med testno rastlino in potencialnimi citotoksini oz. genotoksini. Test temelji na različni hitrosti rasti in dolžini korenin testne rastline mlade čebule (*Allium cepa L.*) v vodnih medijih, ki so obremenjeni s kemikalijami, saj le-te zaustavljajo in upočasnujejo rast korenin. Odziv testne rastline glede na dolžino korenin imenujemo splošna strupenost (generalna toksičnost). Daljše kot so korenine, manjša je splošna strupenost in obratno, krajše kot so korenine, večja je strupenost (Povzeto po Firbas, 2011).



Slika 4: Čebulice *Allium cepa L.*

Vir: <https://www.narcisa-shop.com/>

5. MATERIALI IN METODE

Praktični del diplomske naloge je bil izveden v laboratoriju Fakultete za varstvo okolja v dveh delih. V prvem delu smo izvedli oba rastlinska biotesta – čebulni test in test vrtne kreše, ki sta trajala 7 oz. 3 dni. V drugem delu pa smo fiksiranim koreninicam v starosti 7 dniobarvali dedni material, pripravili mečkanec in celično delitev opazovali pod mikroskopom.

5.1 Priprava raztopin pirokton olamina

Pirokton olamin (TCI Chemicals, CAS No: 68890-66-4 | Product No: P2178), prikazan na Sliki 5, smo kupili v obliki belo-rumenega prahu. Raztopili smo ga v DMSO, saj je v vodi le delno topen. Vse bučke smo po pripravi raztopin ovili v alufolijo, kot je prikazano na Sliki 6, saj ta na svetlobi razpade. Med eksperimentom smo poskrbeli, da koncentracija DMSO ni presegla 0,1 % volumske koncentracije raztopine. Uporabljene testne koncentracije pirokton olamina (C1-C6) so podane v Preglednici 2.



Slika 5: Pirokton olamin

Vir slike: TCI Chemicals, <https://www.tcichemicals.com/US/en/p/P2178>

Pri vsakem eksperimentu so bili sočasno vključeni še pozitivni in negativni kontrolni vzorci. Za pozitivni kontrolni vzorec smo uporabili znane kemikalije pri ravneh izpostavljenosti, za katere je pričakovano ponovljivo in zaznavno povečanje toksičnosti – uporabili smo 10 % raztopino 0,1M HCl. Negativne kontrolne vzorce pa predstavlja le topilo oziroma nosilec v obdelovalnem mediju, kjer ne sme priti do škodljivih ali mutagenih učinkov (Firbas, 2011). V Preglednici 2 so prikazane tudi vse kontrolne raztopine, ki smo jih uporabili pri izvedbi testov. Ker smo predpostavili, da bi lahko imela 0,1 % koncentracija DMSO negativne učinke na delitev celic oz. kaljivost, smo kot negativni kontroli dodatno uporabili tudi koncentraciji 0,01 % in 0,001 % DMSO.



Slika 6: Bučke s pripravljenimi raztopinami

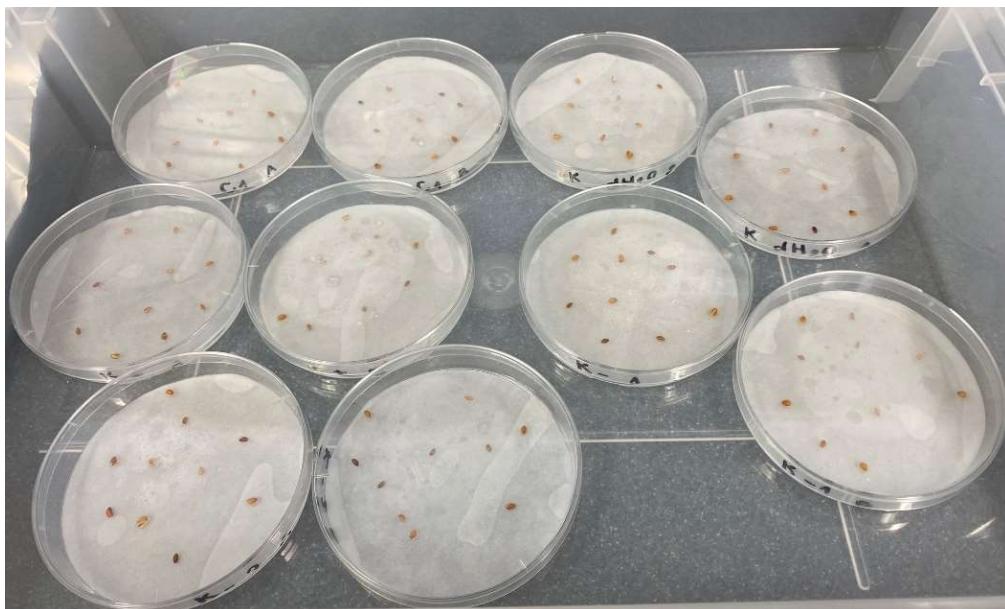
Preglednica 2: Raztopine pirokton olamina in kontrole

oznaka	PO (nM)	% DMSO
C1	0,003	0,1
C2	0,0015	0,05
C3	0,0003	0,01
C4	0,00015	0,005
C5	0,00003	0,001
C6	0,000015	0,0005
kontrola dH ₂ O	0	0,0000
POZ kontrola (10 % 0,1 M HCl)	0	0,0000
NEG kontrola 1	0	0,100
NEG kontrola 2	0	0,010
NEG kontrola 3	0	0,001

5.2 Kalitveni test z vrtno krešo *Lepidium sativum*

Test kalitve semen vrtne kreše smo izvedli s 6 koncentracijami pirokton olamina, kontrolo destilirane vode, pozitivno kontrolo (ta je vsebovala 10 % 0,1 M HCl) in še s 3 negativnimi kontrolami – (K_1 je vsebovala 0,100 % DMSO; K_2 0,010 % DMSO in K_3 0,001 % DMSO).

Vsako koncentracijo smo testirali v 2 paralelkah (A in B). V vsako petrijevko smo vstavili papirnate filtre in vanje položili po 10 semen vrtne kreše (Slika 7). Prvi dan smo na vsak filter nanesli 2 mL testne raztopine, pokrili s pokrovi in čez prekrili alufolijo, da so bile petrijevke v temi. Naslednji dan – po 24 urah – smo v vsako petrijevko dodali še po 1 mL vsake testne raztopine. Po 48 urah smo izvedli meritve poganjkov in še enkrat dodali 1 mL raztopine. Po 72 urah smo poganjke ponovno izmerili.



Slika 7: Petrijevke s semenami vrtne kreše (*Lepidium s.*)

5.3 Čebulni test *Allium cepa L.*

Čebulni test smo prav tako izvedli s 6 koncentracijami pirokton olamina, kontrolo destilirane vode, pozitivno kontrolo (ta je vsebovala 10 % 0,1 M HCl) in še 3 negativnimi kontrolami – (K_1 je vsebovala 0,100 % DMSO; K_2 0,010 % DMSO in K_3 je vsebovala 0,001 % DMSO).

Najprej smo poiskali primerno velike čebulice – takšne, da so bolj ustrezale epruveti. Čebulicam smo odrezali spodnji del, tako da je bilo vidno sveže tkivo, in odstranili tudi nekoliko zunanjih lupin. V stojala smo postavili za vsako koncentracijo po 6 epruvet in jih napolnili do vrha s testnimi raztopinami. Na epruvete smo postavili čebulice tako, da so bile v stiku s testno raztopino (Sliki 8 in 9). Vsa stojala smo tekom eksperimenta postavili na mesto, kjer je bila ves čas prisotna svetloba, kot je prikazano na Sliki 10.



Slika 8: Čebulice, izpostavljene raztopinami pirokton olamina



Slika 9: Čebulice, izpostavljene destilirani vodi, eni pozitivni in trem negativnim kontrolam



Slika 10: Čebulice med eksperimentom in pod vplivom sončne svetlobe

Čebulni test je trajal 7 dni – vmes smo opravili 3 meritve. Tretji, peti in sedmi dan smo izmerili dolžine 5 koreninic v vsaki paralelki in jih fotografirali. Vsak dan oz. po potrebi smo vmes dodajali raztopine, zato da so bile čebulice res ves čas v stiku s testno raztopino.

5.4 Mikroskopiranje

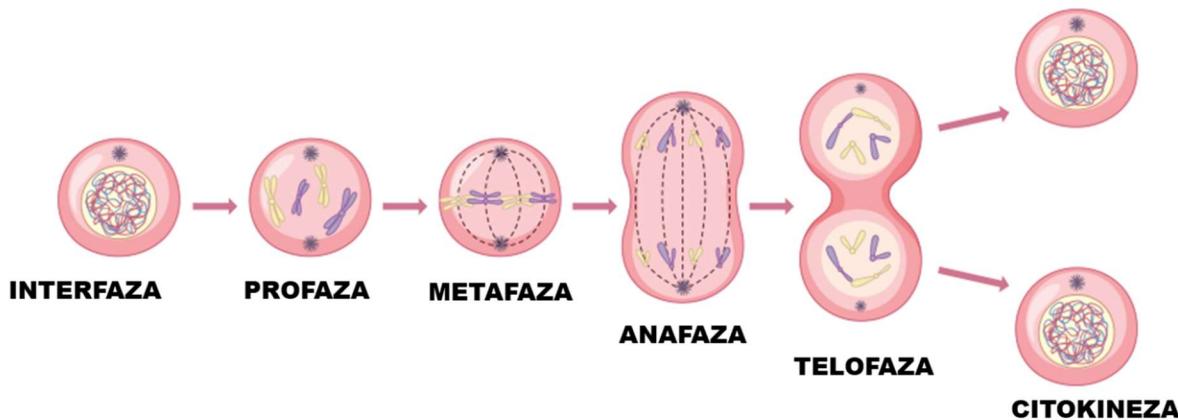
Ker smo želeli preveriti, ali ima pirokton olamin res kakršne koli toksične vplive na rast, smo s pomočjo barvanja genetskega materiala in mikroskopiranja opazovali celično delitev v koreninicah čebule.

Po sedmih dneh smo nekaj cm korenine čebulice vsakega vzorca odrezali in fiksirali v etanol-ocetni kislini v razmerju 3:1 in jih postavili v zamrzovalnik. Na ta način smo s fiksacijo ustavili metabolne procese in celično delitev, da smo lahko potem koreninice pobarvali in jih opazovali pod mikroskopom.

5.4.1 Mitoza

Za vse evkariontske celice je značilna mitoza. Mitoza je celična delitev (slika 11), pri kateri nastaneta dve novi genetsko identični celici. Vsaka celica vsebuje jedro, ki je okroglo, lahko pa tudi ovalne oblike. Z jedrno ovojnico je ločeno od citoplazme. V jedru lahko najdemo kromatin, ki je nosilec dednih lastnosti, je struktura iz deoksiribonukleinske kisline (DNA) in histonskih beljakovin; jedrce, ki je mesto sinteze ribosomske RNA; nukleoplazmo in jedrno ovojnico, ki pa je del endoplazmatskega retikuluma (Firbas, 2011).

Interfaza je del celičnega cikla med dvema zaporednima celičnima delitvama. Je čas, ko celica raste, podvoji svojo DNK in se pripravi na naslednjo delitev. Na začetku mitoze se prične kromatin kondenzirati (**profaza**) in se nadaljuje, ko doseže maksimalno kondenzacijo v obliki kromosoma (**metafaza**). Metafazni kromosomi so maksimalno kondenzirani kromatin, kjer so kromosomi razporejeni na ekvatorialnem območju celice in so bolj ali manj izrazito optično neprepoznaveni. V nadaljevanju delitve se kromatidi kromosoma ločita in odpotujeta vsaka v novo nastajajočo hčerinsko celico (**anafaza**). Kromatidi se nato v hčerinski celici ponovno dekondenzirata (**telofaza**). V sredini materinske celice se začne sestavljati celična plošča (citokinez) (Firbas, 2011).



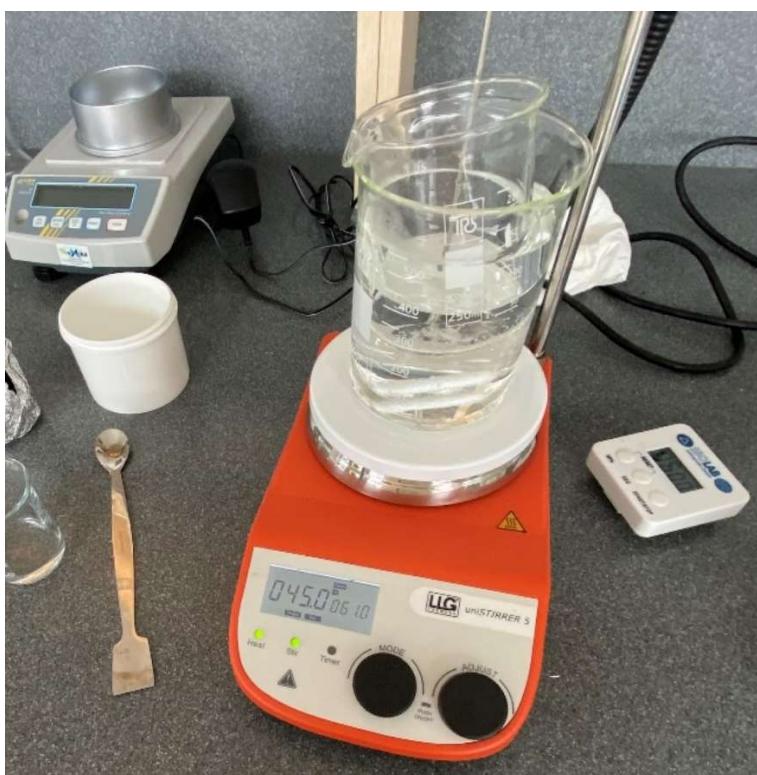
Slika 11: Shema faz mitoze

Prirejeno po: <https://www.geeksforgeeks.org/>

5.4.2 Priprava preparata za mikroskopiranje

Po sedmih dneh smo pri vsaki koncentraciji odrezali koreninice čebule in jih fiksirali v etanol-ojetni kislini v razmerju 3:1. To smo potem shranili v zamrzovalnik do nadaljnega, ko smo obarvali dedni material celic – kromosome.

Celice korenin oz. kromosome smo pobarvali tako, da smo najprej segreli vodo do 60 °C. V čašo smo nalili 1 % HCl in čašo segrevali nad vodno kopeljo, kot je prikazano na Sliki 12. Koreninico smo vzeli iz fiksativa in jo potopili v segreto HCl za 5 minut. Po 5 minutah smo jo vzeli iz HCl in sprali z destilirano vodo. Za tem smo jo postavili na objektno stekelce, nanjo kapnili barvilo orcein, pokrili s krovnim stekelcem in pritisnili, tako da smo dobili mečkanec. Preparat smo nato opazovali pod mikroskopom.

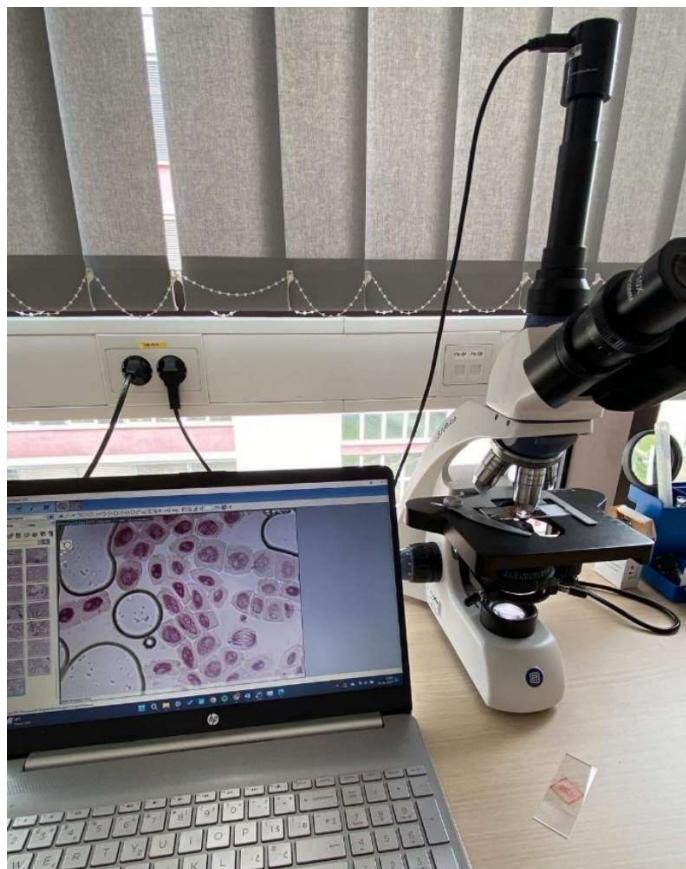


Slika 12: Segrevanje HCl nad vodno kopeljo

5.5 Določitev mitoznega in metafaznega indeksa

Ko smo koreninice pobarvali, smo s pomočjo kamere in programa Dino Capture 2.0 fotografirali preparate pod mikroskopom, kot je to prikazano na Sliki 13. Uporabili smo binokularni mikroskop (BioBlue.Lab) in preparate opazovali pri povečavi 400x. Določili smo mitozni indeks (število celic v mitozi oz. celice v fazi delitve na 1000 pregledanih celic) ter metafazni indeks (število metafaznih celic na 1000 pregledanih celic).

Citotoksični nivo snovi, ki nas zanima, se lahko določi na podlagi povečanja oziroma zmanjšanja mitotskega indeksa (Smaka-Kincl s sod., 1996).



Slika 13: Opazovanje preparatov koreninic čebule pod mikroskopom

Formula za izračun mitoznega indeksa:

$$\frac{\text{število celic v fazi mitoze}}{\text{skupno število celic}} \times 100$$

Formula za izračun metafaznega indeksa:

$$\frac{\text{število celic v metafazi}}{\text{število celic v fazi mitoze}} \times 100$$

6. REZULTATI Z RAZPRAVO

Za lažjo in bolj jasno predstavitev rezultatov smo pri vsakem biotestu najprej prikazali rezultate testov vseh kontrol (6.1 in 6.2), nato pa še rezultate z izbranimi raztopinami pirokton olamina (6.3. in 6.4.). Kalitev semen vrtne kreše in rast korenin čebulic smo prikazali v deležu glede na rast kontrolne skupine; vrednosti smo normalizirali glede na destilirano vodo v primeru kontrolnih eksperimentov in glede na kontrolo z najvišjo koncentracijo topila ($K^1 = 0,1\%$ DMSO) v primeru pirokton olamina.

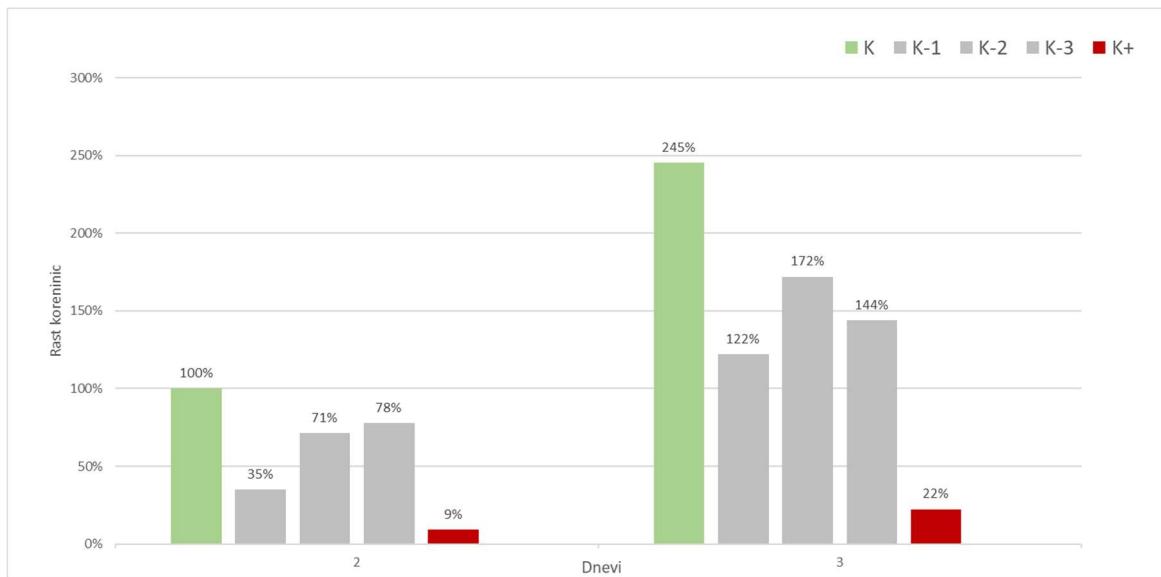
6.1 Kontrolni vzorec kalitvenega testa vrtne kreše

Zanimalo nas je, kateri vzorec predstavljal zgolj medij oz. topilo za pripravo raztopin pirokton olamina, zato smo preverili ustreznost negativne kontrole s testiranjem različnih raztopin DMSO.

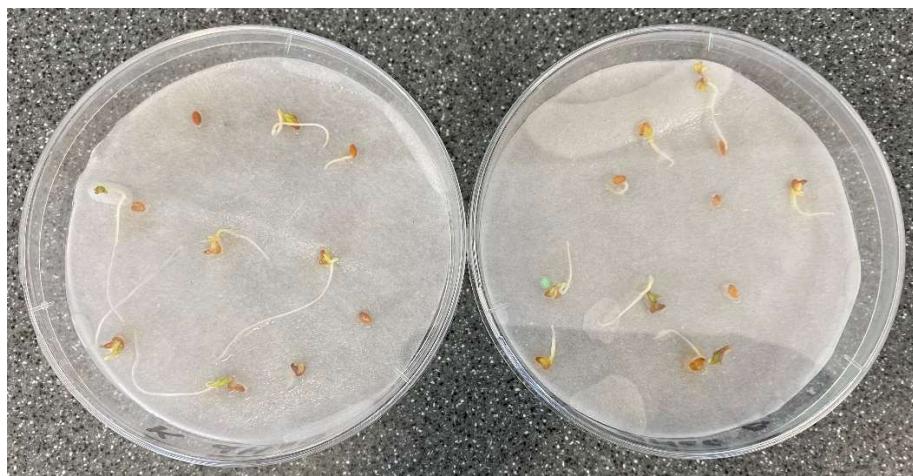
Ker je bil pirokton olamin raztopljen v DMSO (omejena topnost v vodi) ter nato redčen v deionizirani vodi, smo kot negativno kontrolo raztopine testirali več raztopin:

- deionizirano vodo (K),
- 0,1 % DMSO (K^1),
- 0,01 % DMSO (K^2),
- 0,001 % DMSO (K^3).

Rezultati kalitvenega testa s topili so prikazani na Slikah 14–16. Opazimo lahko, da je kalitev semen vrtne kreše pri obeh meritvah (po 2. in 3. dnevu) najvišja pri deionizirani vodi (K). Rast pa je bila visoka tudi pri K^1 in K^2 , še posebej tretji dan pri koncentraciji K^2 . Iz grafa (Slika 14) je razvidno, da je koncentracija K^1 rast celo nekoliko zmanjšala. Rezultati nakazujejo, da je kalitev semen ob prisotnosti DMSO v območju 0,001–0,1% zmanjšana, kar pa je potrebno pri eksperimentu s pirokton olaminom upoštevati. Zato smo za ugotavljanje učinka pirokton olamina kot kontrolo v nadaljevanju uporabili koncentracijo K^1 z najvišjo vsebnostjo DMSO.



Slika 14: Rast poganjkov vrtne kreše v kontrolnih vzorcih



Slika 15: Semena vrtne kreše, izpostavljena deionizirani vodi po 3 dneh



Slika 16: Semena vrtne kreše, izpostavljena kontrolnemu vzorcu K¹ po 3 dneh

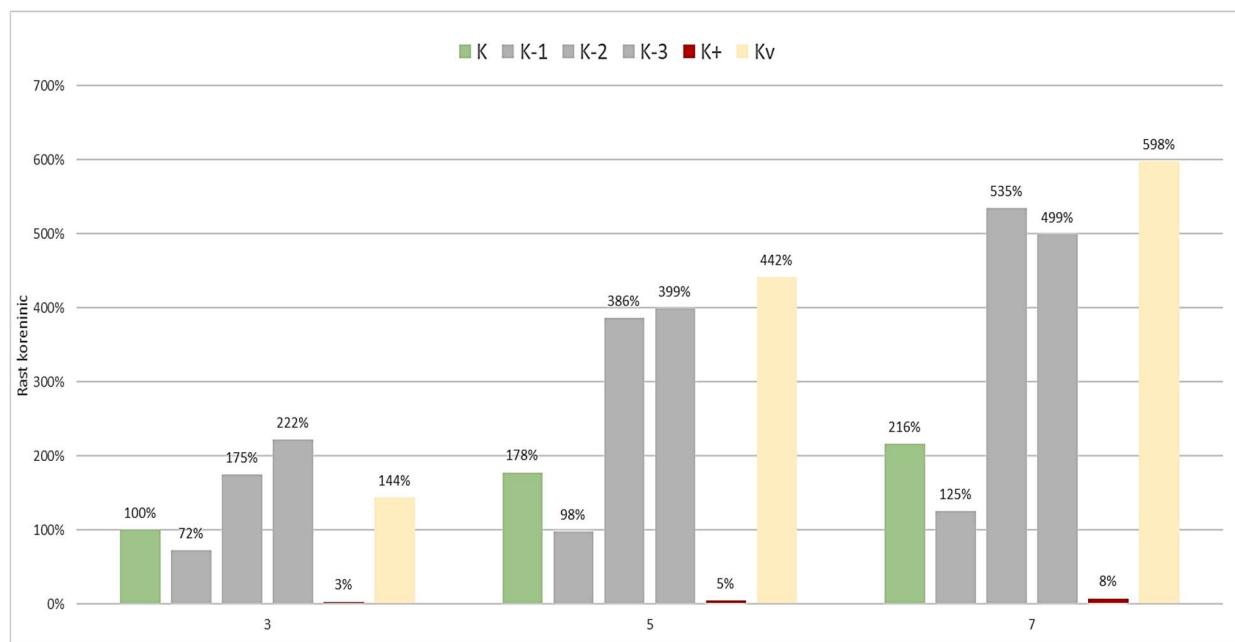
6.2 Kontrolni vzorec čebulnega testa

Ustreznost negativne kontrole smo preverili tudi pri izvedbi čebulnega testa.

Ker je bil pirokton olamin raztopljen v DMSO (omejena topnost v vodi) ter nato redčen v deionizirani vodi, smo kot negativno kontrolo raztopine testirali več raztopin:

- deionizirano vodo (K),
- vodovodno vodo (Kv),
- 0,1 % DMSO (K¹),
- 0,01 % DMSO (K²),
- 0,001 % DMSO (K³).

Rezultati čebulnega testa s topili so prikazani na Slikah 17–20, kjer lahko opazimo, da korenine veliko bolje rastejo v vodovodni kot deionizirani vodi, kar je bilo pričakovano (Slika 17, rumeno). Če pa primerjamo z rastjo v deionizirani vodi vse 3 raztopine DMSO, pa lahko ugotovimo, da K² in K³ celo spodbudita rast oz. delitev korenin, medtem jo K¹ rahlo zniža. Za ugotavljanje učinka pirokton olamina smo kot kontrolo v nadaljevanju prav tako uporabili K¹. Rast korenin po 7 dneh je prikazana na Slikah 18–20.



Slika 17: Rast koreninic čebule v kontrolnih vzorcih po 3, 5 in 7 dneh



Slika 18: Zmanjšana rast koreninic v kontrolnem vzorcu K¹ po 7 dneh



Slika 19: Povečana rast koreninic v kontrolnem vzorcu K² po 7 dneh



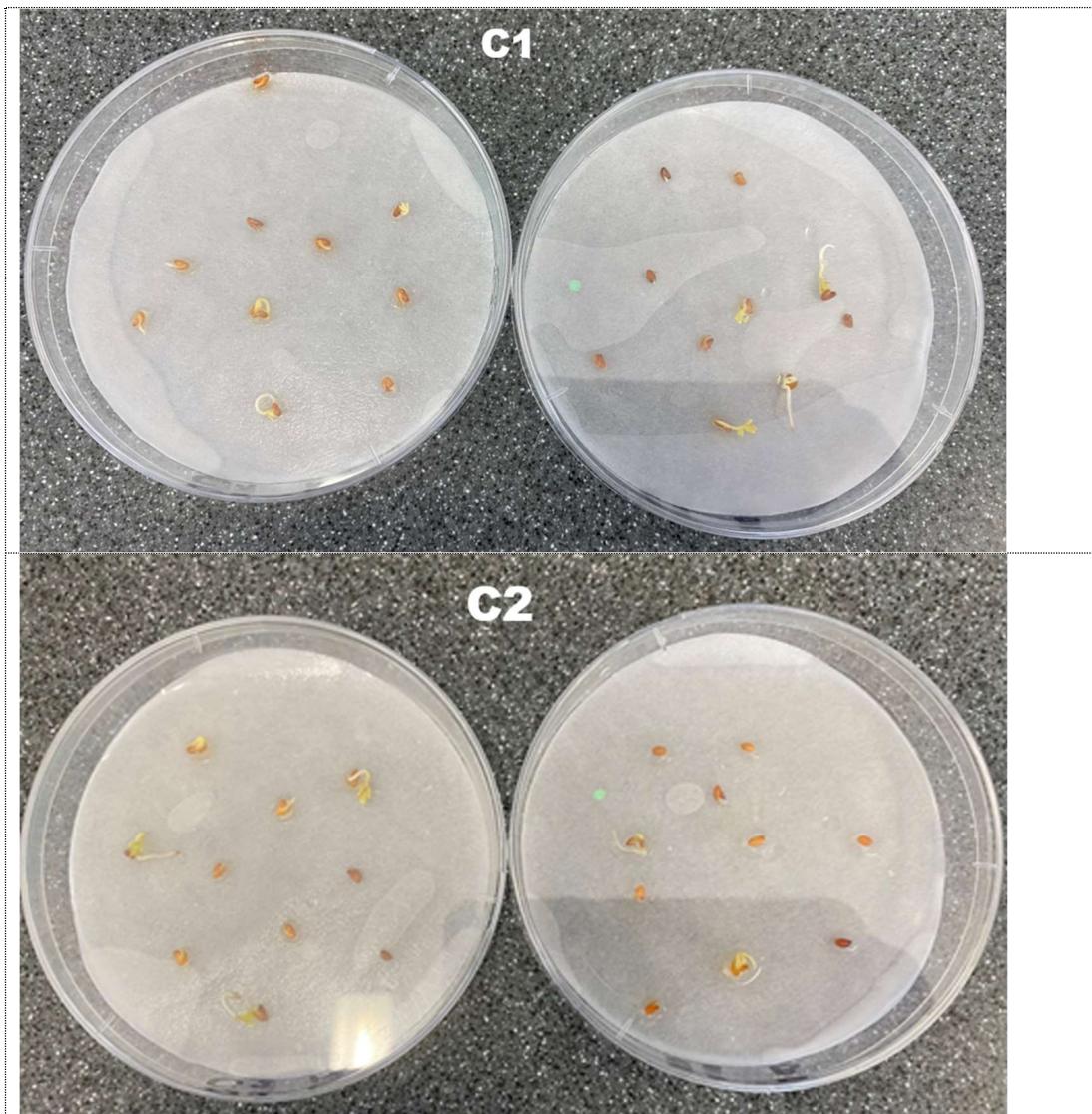
Slika 20: Povečana rast koreninic v kontrolnem vzorcu K^3 po 7 dneh

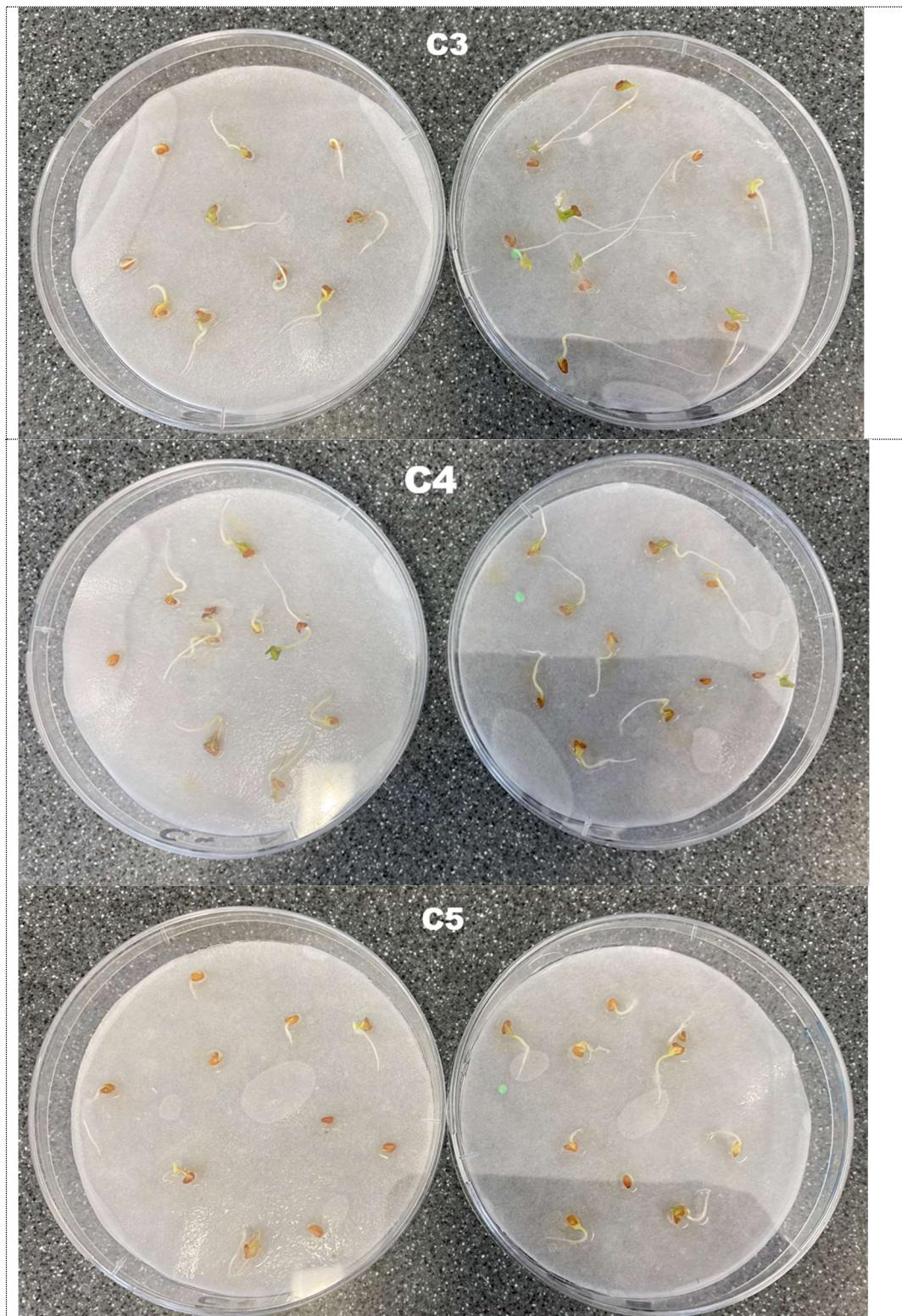
6.3 Rezultati testa z vrtno krešo

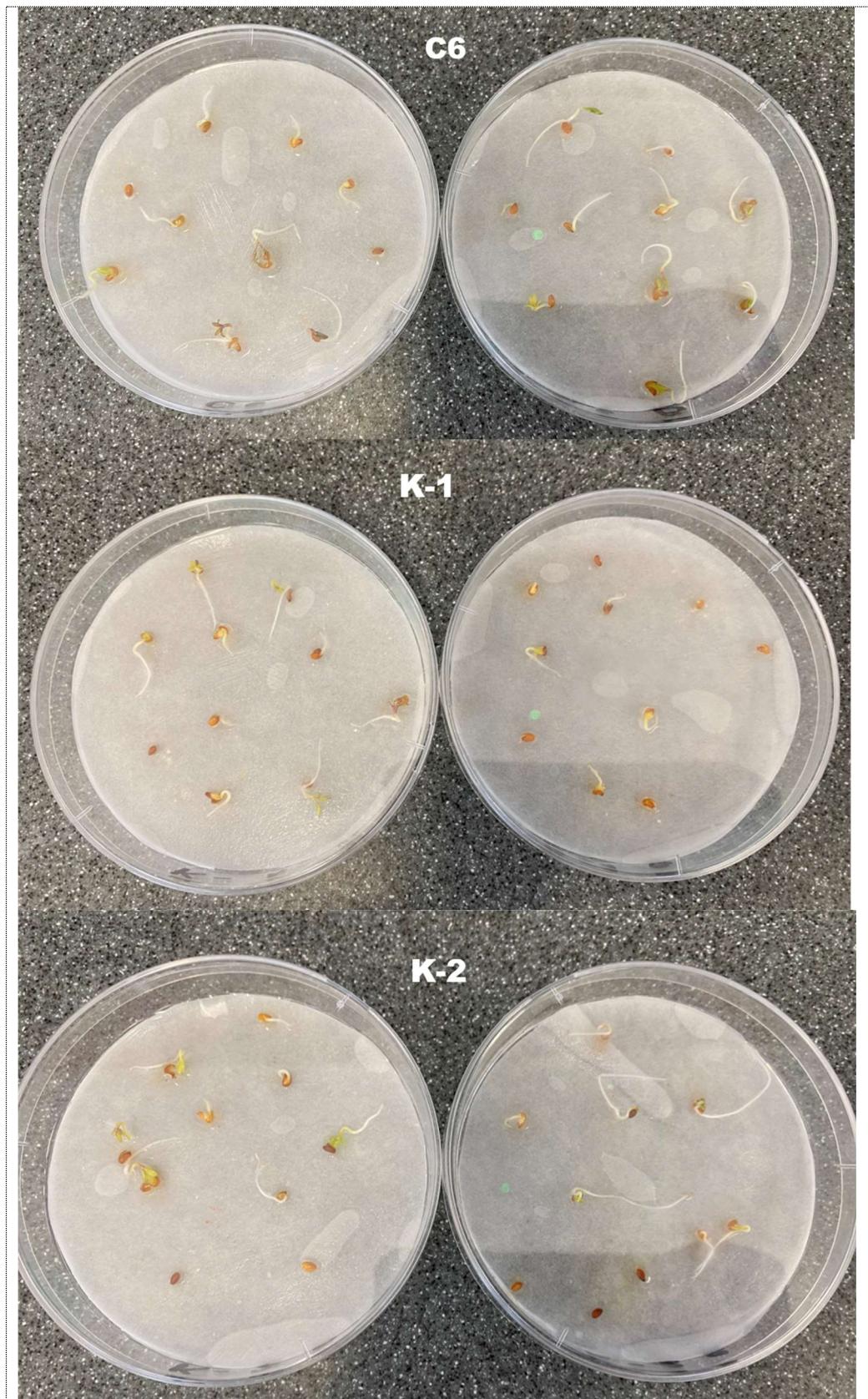
Kalitev semen vrtne kreše *Lepidium* smo opazovali z merjenjem poganjkov (v cm) ter jih prikazali v odvisnosti od kontrolne raztopine, ki so ji bila semena izpostavljena 2 in 3 dni.

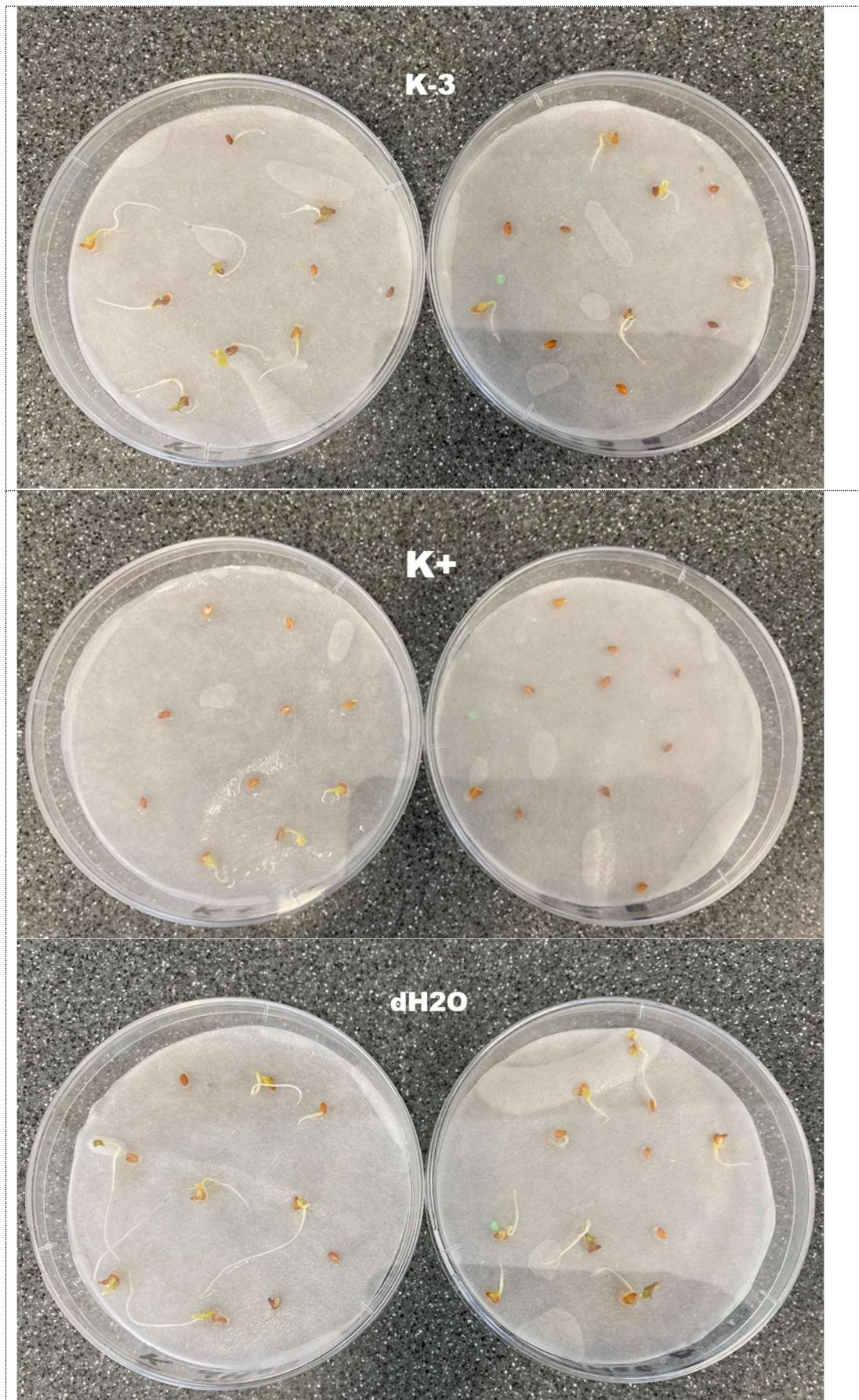
Pri testu smo uporabili šest različnih koncentracij pirokton olamina, kontrolne vzorce – destilirano vodo, pozitivno kontrolo (10 % 0,1 M HCl) ter 0,1 % DMSO.

Na Sliki 21 so prikazane fotografije kalitve semen za posamezen vzorec, na Slikah 22, 23 pa je kalitev prikazana v grafični obliki.



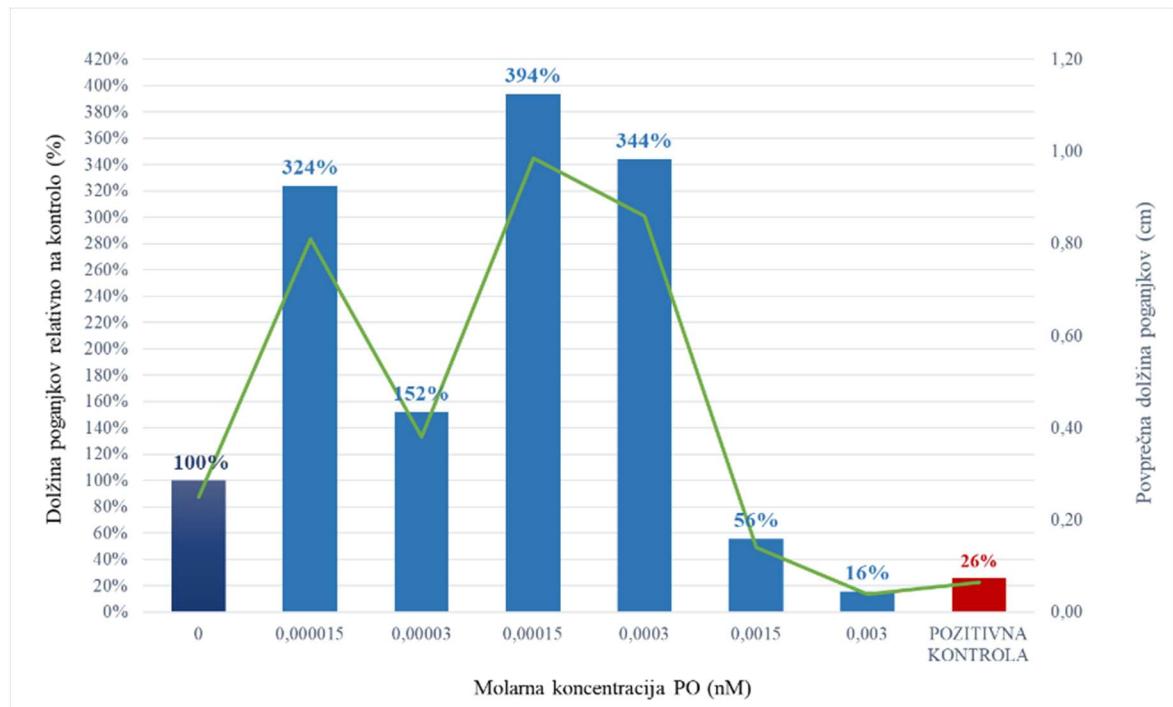






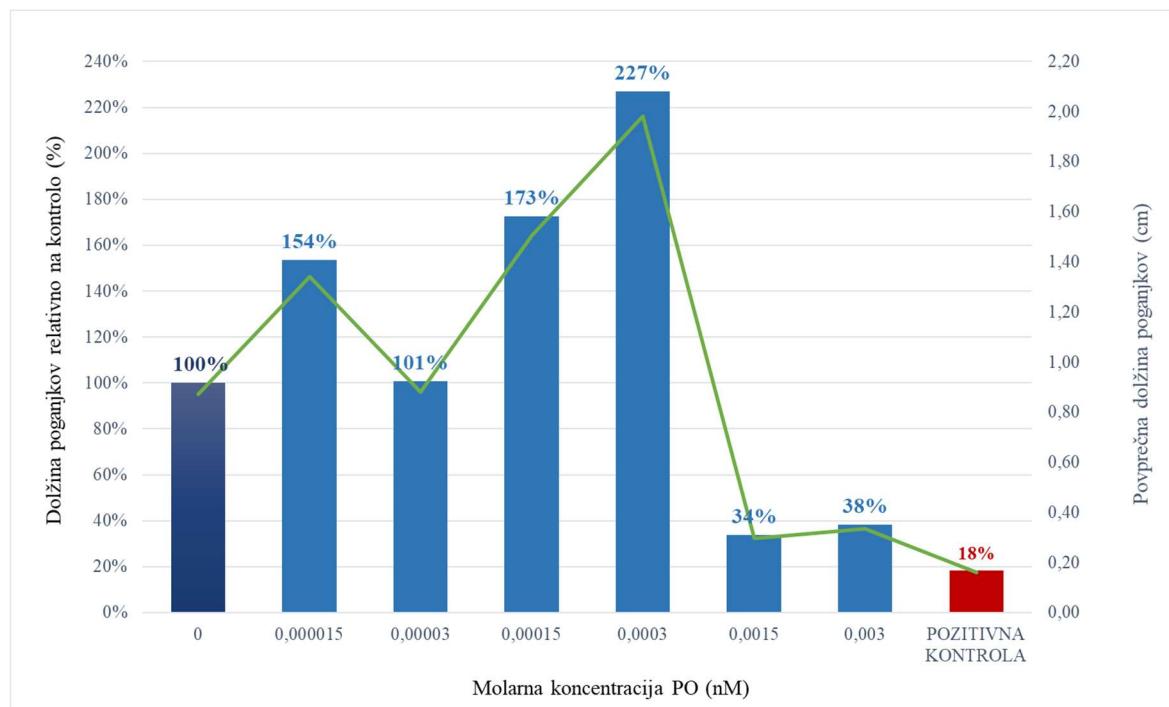
Slika 21: Prikaz kalitve semen vrtne kreše, izpostavljene vsem raztopinam po 7 dneh

Po 2 dneh (48 urah) izpostavljenosti semen izbranim koncentracijam pirokton olamina lahko opazimo, da so vse izbrane koncentracije vplivale na kalitev vrtne kreše (Slika 22). Najbolj sta kalitev zmanjšali najvišji dve koncentraciji, še posebej koncentracija, ki je vsebovala najvišjo koncentracijo pirokton olamina (0,003 nM). Ostale štiri koncentracije pa so celično delitev oz. rast poganjkov celo pospešile, saj smo zaznali precej daljše poganjke. Najdaljše poganjke smo izmerili pri koncentraciji, ki je vsebovala 0,00015 nM pirokton olamina.



Slika 22: Kalitev semen vrtne kreše pod vplivom pirokton olamina po 48 urah

Po 72 urah (Slika 23) je bil trend vplivov pirokton olamina podoben kot po 48 urah. Zanimivo pa je bilo to, da se je rast poganjkov pri prvi – najvišji koncentraciji (0,003 nM) povišala za 22 %, pri drugi najvišji koncentraciji (0,0015 nM) pa znižala za 22 %. Znižala se je tudi pozitivna kontrola, in sicer za 88 %. Prav tako so se znižale še vse ostale vrednosti. Največji upad je viden pri koncentraciji 0,000015 nM, tu se je dolžina poganjkov znižala za kar 221 %. Koncentracija 0,00003 se je najbolj približala negativni kontroli, od negativne kontrole je bila višja le za 1 %.



Slika 23: Kalitev semen vrtne kreše pod vplivom pirokton olamina po 72 urah

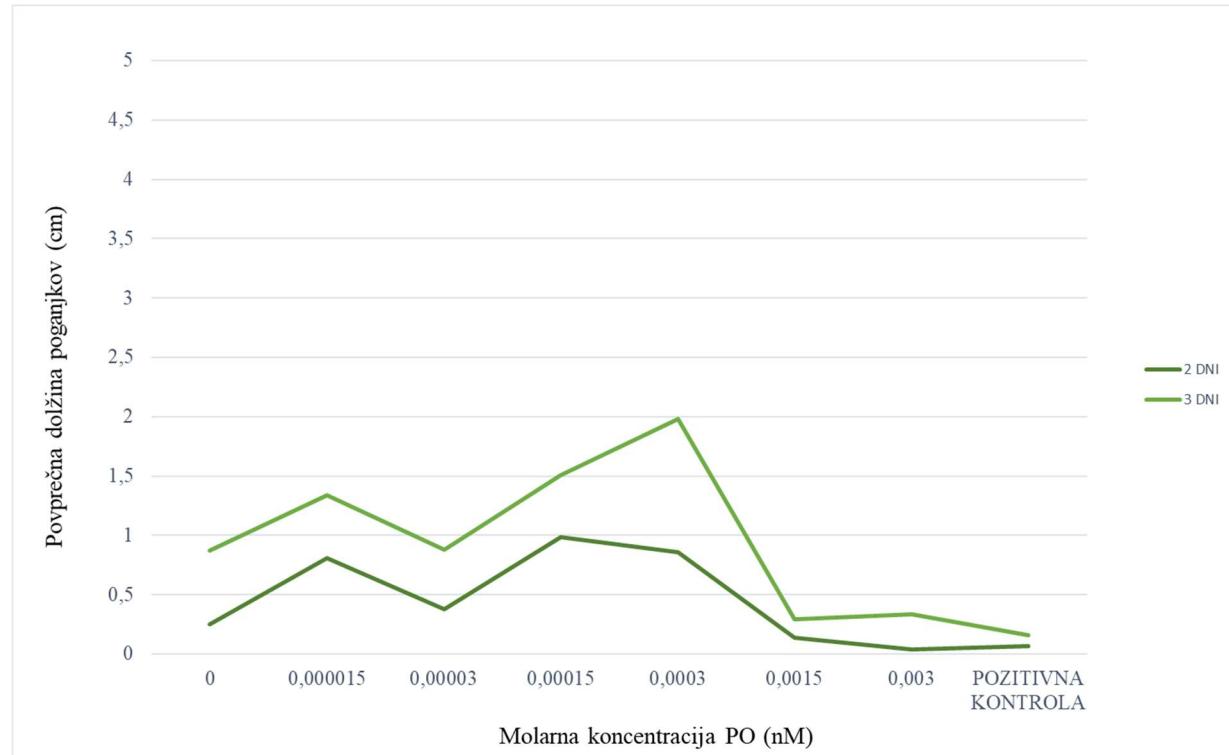
Iz dobljenih rezultatov lahko potrdimo, da je pirokton olamin deloval toksično na semena vrtne kreše. Pri semenih, ki so bila izpostavljena nižjim koncentracijam pirokton olamina, lahko opazimo, da le-ta ni imel velikega učinka na rast. Pri tem pa moramo upoštevati tudi to, da je bil pri raztopinah uporabljen DMSO, ki je verjetno pozitivno vplival na rast in razvoj, kot lahko vidimo, ni zaviral rasti pri manjših koncentracijah pirokton olamina. Da bi dobili bolj natančne rezultate, bi morali še dodatno preveriti, kakšen vpliv ima sam DMSO na rast, in izvesti dodatne teste z več različnimi koncentracijami, da bi bolj natančno ugotovili, pri kateri koncentraciji minimalno vpliva na rast.

V Preglednici 3 je prikazan prirastek poganjkov vrtne kreše od 2. do 3. dne. Največji prirastek je bil pri C1 – koncentraciji 0,003 nM. Ta je znašal kar 738 %. Najnižji prirastek pa je bil pri C4 – koncentraciji 0,00015 nM in je znašal 53 %.

Preglednica 3: Prirastek poganjkov vrtne kreše od 2. do 3. dne

	DMSO k	C6	C5	C4	C3	C2	C1
2 dni	0,25	0,81	0,38	0,99	0,86	0,14	0,04
3 dni	0,8722	1,3400	0,8800	1,5050	1,9800	0,2950	0,3350
	249 %	65 %	132 %	53 %	130 %	111 %	738 %

Na Sliki 24 je prikazana rast poganjkov semen vrtne kreše za 2. in 3. dan po izpostavitvi. Iz krivulje je razvidno, da je bila rast najvišja 3. dan pri koncentraciji 0,0003 nM. Najnižja rast pa je bila 2. dan pri koncentraciji 0,003 nM.



Slika 24: Primerjava vpliva pirokton olamina na rast poganjkov semen vrtne kreše 2. in 3. dan po izpostavitvi

6.4 Rezultati čebulnega testa *Allium cepa*

Vpliv pirokton olamina na rast oz. celično delitev korenin čebulic smo spremljali z merjenjem dolžin koreninic v izbranem časovnem okvirju (7 dni) ter rast primerjali s kontrolo. Na spodnji Sliki 25 je združeno prikazana rast koreninic za vsako koncentracijo po sedmih dneh.

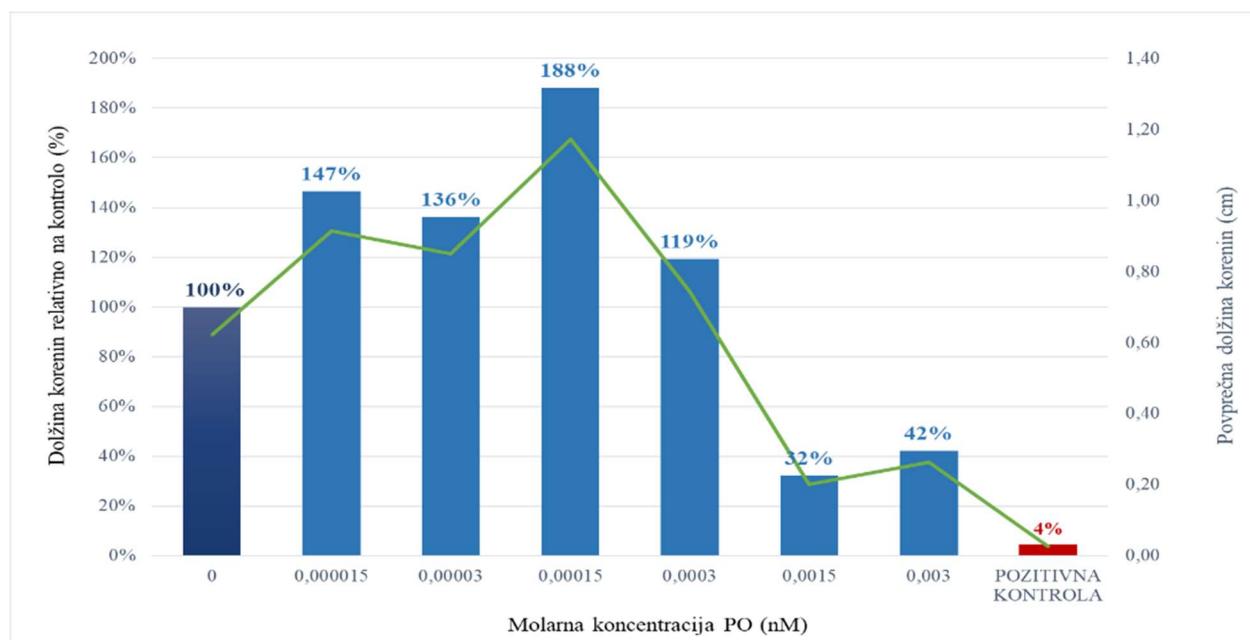


Slika 25: Prikaz čebulic vseh koncentracij po 7 dneh

Rezultate čebulnega testa smo prikazali v obliki dolžin koreninic v odvisnosti od kontrole po izpostavljenosti, 3, 5 in 7. Pri vsaki koncentraciji smo izmerili dolžine koreninic (v mm oz. cm) in jih zapisali v tabelo. To smo ponovili 3., 5. in 7. dan ter vsakič koreninice fotografirali in dodali testno raztopino, da je bila čebulica ves čas v stiku s testno raztopino.

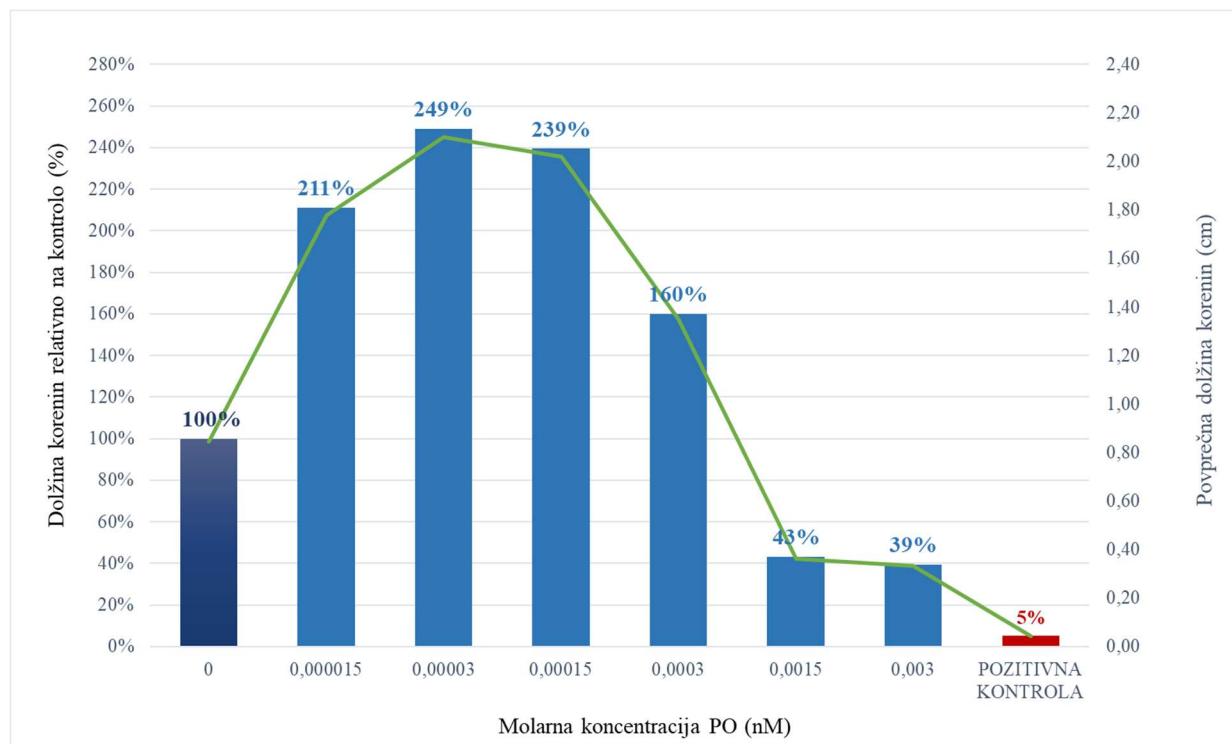
Rezultati so pokazali zelo podoben trend sprememb, kot smo jih opazovali pri kalitvi semen vrte kreše. Najvišji dve koncentraciji sta delitev celic oz. rast koreninic močno zmanjšali, medtem ko so ostale 4 nižje koncentracije rast celo rahlo vzpodbudile. Po pregledu dobljenih meritev smo ugotovili, da je opazno zmanjšana rast koreninic pri prvih dveh koncentracijah C1 in C2 (0,003 nM in 0,0015 nM), kjer je bila vsebnost pirokton olamina najvišja. Po sedmih dneh se je rast koreninic pri C3 (0,0003 nM); C4 (0,00015 nM); C5 (0,00003 nM) in C6 (0,000015 nM) celo povečala, kot lahko vidimo na Sliki 21. Pri pozitivni kontroli K+, kjer je bilo 10 % 0,1 M HCl, pa je bila rast skoraj ničelna. Naredili pa smo tudi tri negativne kontrole, kjer smo opazili, da se je rast pri manjših koncentracijah DMSO celo povečala.

Po treh dneh izpostavljanja čebulic raztopinam smo ugotovili, da je pri dveh koncentracijah – 0,003 nM in 0,0015 nM rast opazno manjša, na podlagi česar lahko sklepamo, da ima pirokton olamin res zaviralni učinek na rast. Pri ostalih koncentracijah – 0,0003 nM; 0,00015 nM; 0,00003 nM in 0,000015 nM pa je bila opazno veliko odstopanje od negativne kontrole (0). Največje odstopanje od negativne kontrole je bilo pri koncentraciji 0,00015 nM, ta je odstopala za kar 88 %. Pri pozitivni kontroli pa je bila rast minimalna.



Slika 26: Čebulni test, rast koreninic po 3 dneh

Po petih dneh (Slika 27) je koncentracija 0,003 nM padla za 3 %, koncentracija 0,0015 nM pa se zvišala za 11 %. Vse ostale koncentracije pa so narasle. Največji prirast je bil pri koncentraciji 0,00003 nM, ta se je zvišal za kar 113 %. Najmanjši prirast – 41 % pa je bil pri koncentraciji 0,0003 nM.

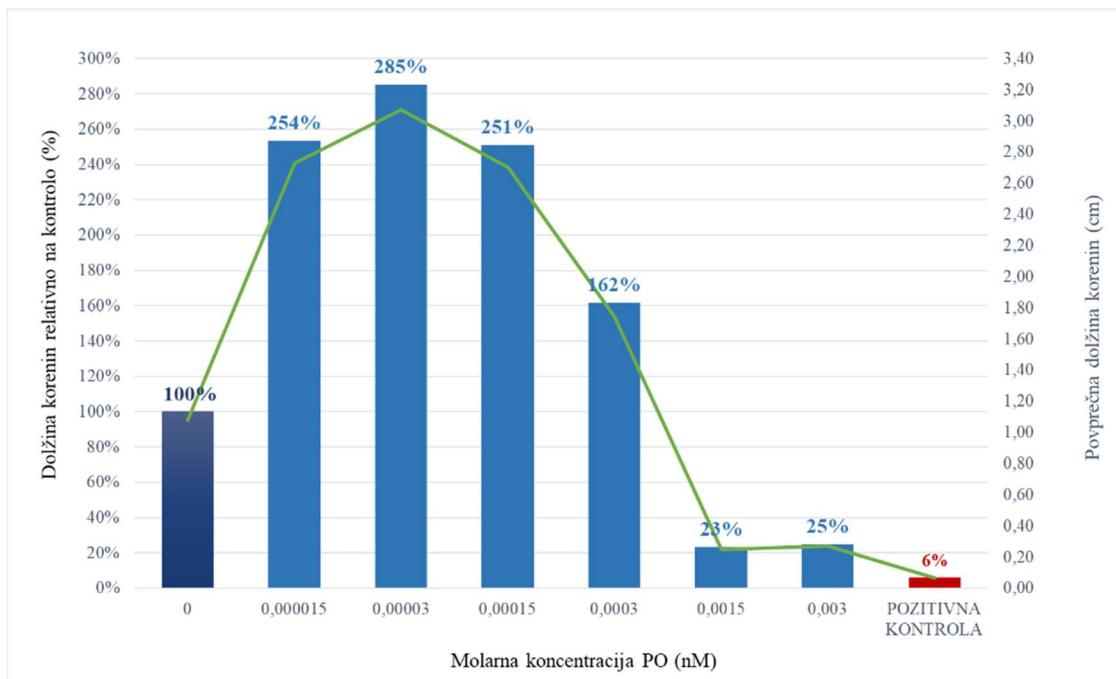


Slika 27: Čebulni test, rast koreninic po petih dneh

Po sedmih dneh (Slika 28) sta obe najvišji koncentraciji 0,003 nM in 0,0015 nM še bolj znižali rast korenin čebulic. Koncentracija 0,003 nM je rast znižala za 14 %, koncentracija 0,0015 nM pa za kar 20 %. Vse ostale koncentracije pa so povečale/pospešile rast korenin. Najmanj se je povišala koncentracija 0,0003 nM za 2 %, največ pa koncentracija 0,000015 nM za 43 %.

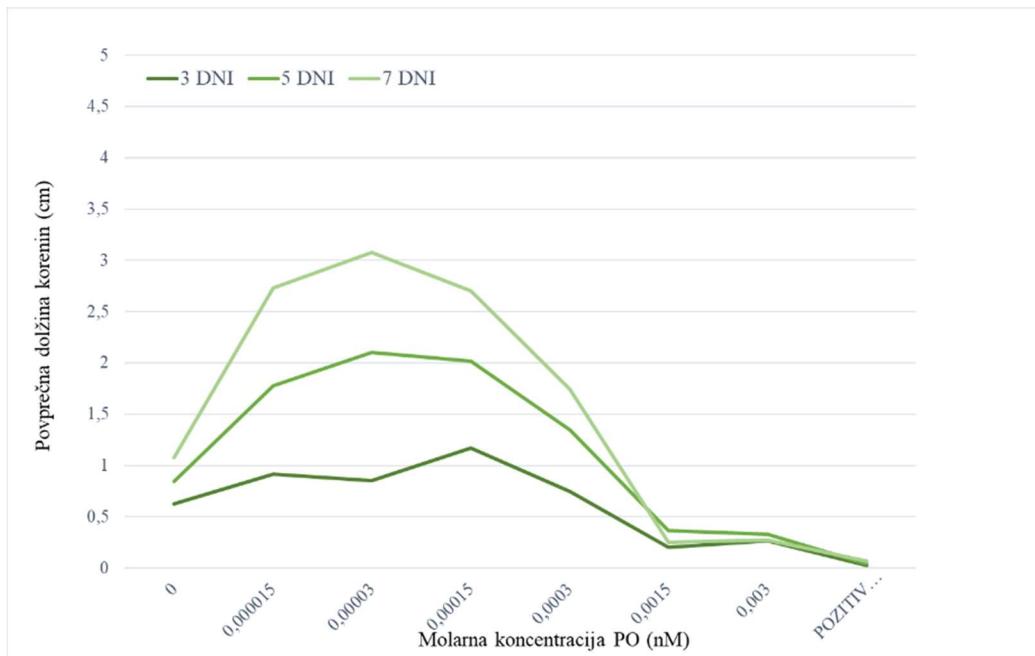
Zanimivost pri tem testu je to, da so že po treh dneh vse koreninice, ki so bile izpostavljene koncentracijam od 0,0003 nM do 0,000015 nM, presegle rast negativne kontrole.

Pozitivna kontrola pa je bila po vsakem merjenju za % višja, tako je bila prvi dan merjenja 4 % in zadnji dan merjenja 6 %.



Slika 28: Čebulni test, rast koreninic po sedmih dneh

Na Sliki 29 je prikazana rast koreninic za vse dni skupaj. Iz krivulje je razvidno, da so z vsako meritvijo vrednosti pri vseh koncentracijah približno enakomerno rastle. Za vrednosti 0,003 nM in 0,0015 pa lahko vidimo, da sta bili zadnji, 7. dan, veliko nižji kot pa 5. dan.



Slika 29: Primerjava vpliva pirokton olamina na rast čebulic 3., 5. in 7. dan

V spodnji Preglednici 4 je prikazan prirastek koreninic od tretjega do sedmega dne. Največji prirastek je bil pri C5 – koncentraciji 0,00003 nM. Ta je znašal kar 262 %. Najnižji prirastek pa je bil pri C1 – koncentraciji 0,003 nM in je znašal le 3 %. S tem smo ponovno dokazali, da ima pirokton olamin negativen vpliv na rast in razvoj koreninic čebule.

Preglednica 4: Prirastek korenin čebule od 3. do 7. dne

	DMSO k	C6	C5	C4	C3	C2	C1
Koncentracija (nM)	0	0,000015	0,00003	0,00015	0,0003	0,0015	0,003
3 DNI	0,6233	0,9133	0,8500	1,1733	0,7433	0,2000	0,2633
7 DNI	1,0767	2,7300	3,0733	2,7040	1,7433	0,2500	0,2700
	73 %	199 %	262 %	130 %	135 %	25 %	3 %

6.5 Mikroskopiranje

Eden izmed nepogrešljivih makroskopskih parametrov pri opazovanju rasti koreninic po izpostavitvi predvideni toksični snovi sta barva in oblika korenin. Če ima korenina oteklino ali pa je nekoliko nabreknjena, je to po navadi posledica toksičnega učinka. Rjava barva korenine pomeni, da je v rastnem meristemtu korenine prišlo do celične smrti. Eden izmed znakov toksičnega vpliva so tudi ukrivljene in razklane korenine, ki so bolj ali manj zelo kratke (Firbas, 2011).

V našem primeru lahko glede na izgled koreninic potrdimo, da je prišlo do toksičnega vpliva. Koreninice, ki so bile izpostavljene najvišji koncentraciji pirokton olamina (0,003 nM), so bile zelo kratke – nekaj mm, nekatere so bile tanke, nekatere nekoliko bolj odebujene in temnejše barve, kot je razvidno s Slike 30.



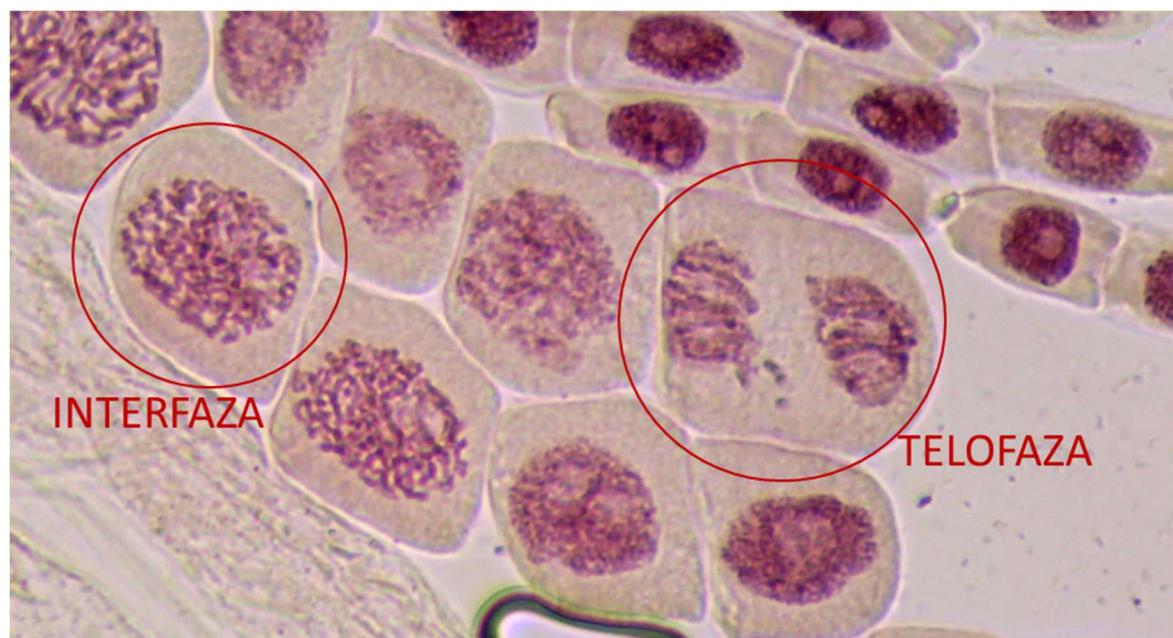
Slika 30: Čebulice, izpostavljene najvišji koncentraciji pirokton olamina (0,003 nM)

Po končanem barvanju koreninic smo jih pogledali pod mikroskopom in iskali deleče se celice. Pričakovali smo, da bo število delečih se celic naraščalo z manjšanjem koncentracije pirokton olamina. Za vsako koncentracijo smo prešteli 1000 celic in med njimi določili tiste v fazi delitve, še posebej pa smo pregledali, katere so bile v metafazi. Pri vsaki koncentraciji smo posebej izračunali še mitotski in metafazni indeks, ki sta prikazana v Preglednici 5. Naše meritve kažejo, da je bilo celic v fazi delitve oz. metafaze res najmanj v primeru izpostavitve najvišji koncentraciji pirokton olamina (C1), število celic v delitvi pa se je nato z nižanjem koncentracije pirokton olamina višalo.

Preglednica 5: Število preštetih celic v fazah mitoze, mitotski indeks, metafazni indeks

Oznaka raztopine	Število preštetih celic	Število celic v fazi mitoze	Mitotski indeks [%]	Število celic v metafazi	Metafazni indeks [%]
C1	1000	462	46,2	9	1,948
C2	1000	489	48,9	23	4,7034
C3	1000	512	51,2	14	2,7343
C4	1000	749	74,9	32	4,2723
C5	1000	755	75,5	36	4,7682
C6	1000	831	83,1	48	5,7761
K-1	1000	329	32,9	7	2,1276
K-2	1000	427	42,7	19	4,4496
K-3	1000	452	45,2	21	4,646
dH ₂ O	1000	307	30,7	3	0,9771
H ₂ O	1000	788	78,8	29	3,6802

Opažanja pod mikroskopom so prikazana na Slikah 31–33. Prikazane in označene so različne faze celične delitve.



Slika 31: Prikaz interfaze in telofaze delitve celice



Slika 32: Prikaz metafaze delitve celice



Slika 33: Prikaz citokineze delitve celic

Po preštetih celicah lahko potrdimo, da višje koncentracije negativno vplivajo na celično delitev, saj je bilo število celic, ki so bile v fazi mitoze, precej nižje kot pri koncentracijah, kjer je bila vsebnost pirokton olamina nižja.

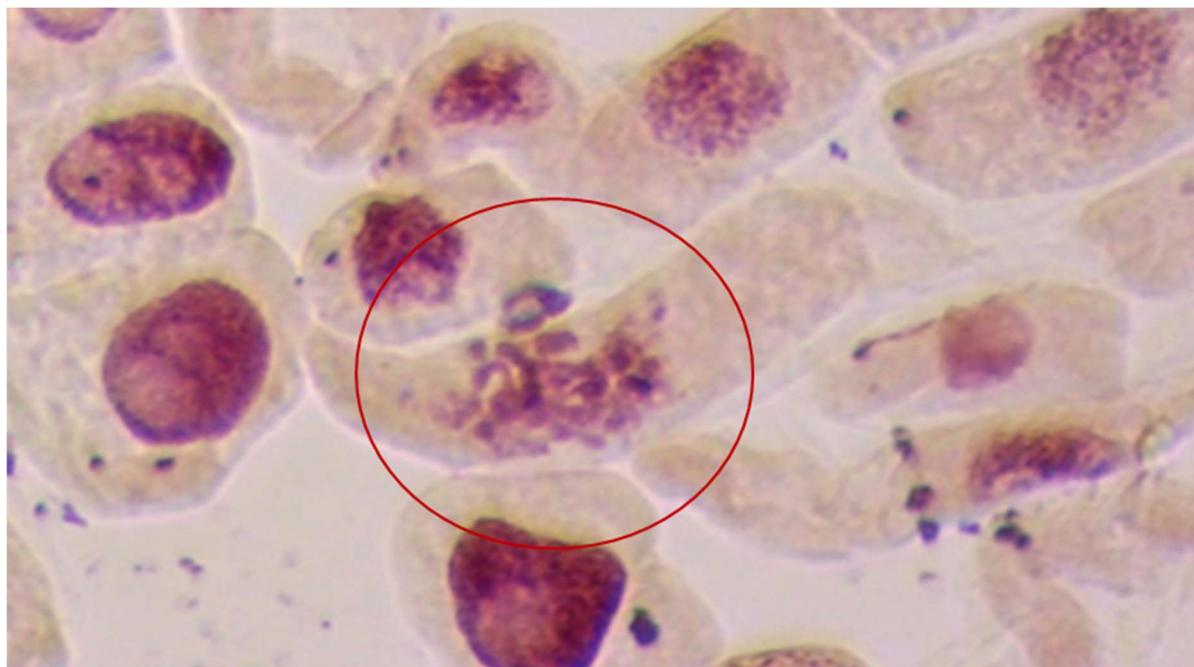
Mitotski in metafazni indeks sta bila pri najvišji koncentraciji C1 najnižja, kar pomeni majhno število delečih se celic. Oba indeksa pa sta bila najvišja pri koncentraciji C6, celo višji kot pa pri vodi iz pipe, iz česar lahko sklepamo, da sta pirokton olamin in DMSO pri majhnih koncentracijah celo prispevala k boljši delitvi celic in posledično rasti koreninic. Pri destilirani vodi pa sta bil oba indeksa najnižja, saj je tej vodi primanjkuje hranilnih snovi, mikroorganizmov, eden od razlogov pa je lahko tudi ta, da je prišlo do osmotskega stresa.

6.6 Aberacije in nepravilnosti pri celični delitvi

Izpostavljenost čebulic raztopinam pirokton olamina je privedla tudi do mnogih poškodb in nepravilnosti, ki pa morda s prostim očesom niti niso vidne, so pa vidne pod mikroskopom. Po opravljenem barvanju koreninic smo preparate pod mikroskopom fotografirali in iskali morebitne nepravilnosti. Najdene nepravilnosti v našem primeru so prikazane na spodnjih Slikah 34–37.



Slika 34: Zlepljanje v metafazi



Slika [2635](#): Hipoploidna celica



Slika [2736](#): Mitotsko združevanje v metafazi



Slika [2837](#): Anafazni fragment

7. SKLEPI

Veliko izdelkov, s katerimi ~~oublažimo~~ oz. in preprečimo nadaljnji razvoj kvasovke *Malassezia*, ki povzroča nastanek prhljaja terin razna mazila za blaženje dermatitisa, vsebujejo aktivno snov pirokton olamin. Ta se uporablja že mnoga leta in velja, da je bolj primeren za uporabo kot njegov predhodnik cinkov piriton, katerega uporaba je danes že prepovedana.

V diplomski nalogi smo preučevali kemikalijo pirokton olamin. Še posebej nas je zanimalo, ali ima ta snov kakršen-koli toksičen vpliv na žive organizme. To smo preverili s pomočjo rastlinskih biotestov. Izvedli smo čebulni test (*Allium cepa L.*) in test vrtne kreše (*Lepidium sativum*). S tem smo pridobili rezultate, ki kažejo učinke pirokton olamina na rast, razvoj in celično delitev čebule in vrtne kreše. Glede na pridobljene rezultate lahko povzamemo, da pirokton olamin:

1. Vpliva na rast koreninic pri čebuli in kalitev semen pri vrtni kreši:

Koreninice čebule in poganjki vrtne kreše, ki so bili izpostavljeni raztopinam z višjimi koncentracijami pirokton olamina, so bilje veliko krajšje, kot tistje, izpostavljenje manjšim koncentracijam. To pomeni, da je prišlo do toksičnih učinkov pirokton olamina na rastlinske celice, tako pri čebuli kot pri semenih vrtne kreše.

2. Vpliva na celično delitev:

Ko smo pod mikroskopom opazovali in šteli celice, smo ugotovili, da je bilo pri koreninicah, izpostavljenih višjim koncentracijam pirokton olamina, število delečih se celic veliko manjše, kot pri tistih, ki so bile izpostavljene njegovim nižjim koncentracijam. Manjše število delečih se celic pomeni manjšo rast in razvoj.

3. Nepravilnosti pri celični delitvi:

Po pregledu preparatov pod mikroskopom smo opazili, da je prišlo do nekaterih anomalij pri celični delitvi. Te aberacije so bile zlepjanje v metafazi, mitotsko združevanje v metafazi, do pojava anafaznih fragmentov in celo do pojava hipoploidne celice. Vse to je potencialnien pokazatelj, da ima pirokton olamin genotoksičen vpliv. Za bolj natančno opredelitev vpliva bi bilo potrebno genetske nepravilnosti še podrobnejše prešteti in jih ovrednotiti glede na število delečih se celic.

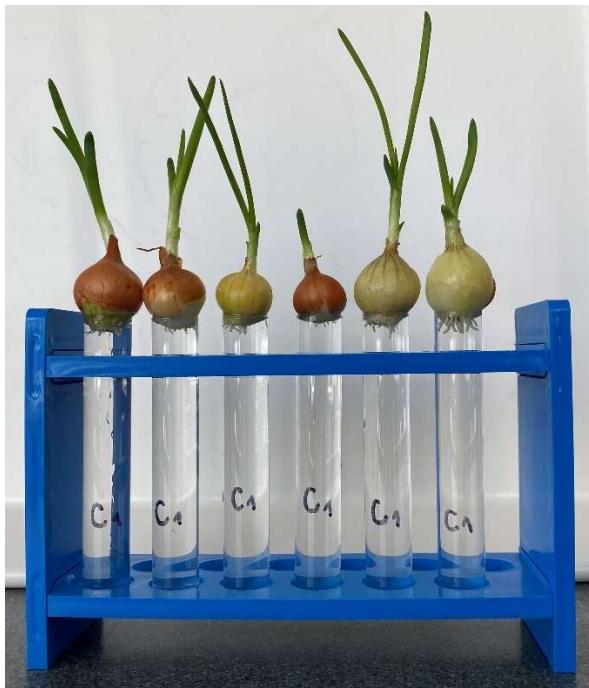
Po pregledani literaturi na tem področju, izvedenem čebulnem testu in testu vrtne kreše ter mikroskopiranju koreninic čebule, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam pirokton olamina, lahko ovrednotimo tudi na začetku postavljeni hipotezi.

Hipoteza 1: Z večanjem koncentracije pirokton olamina se veča njegova potencialna toksičnost na izbrane rastline.

Po izvedenem čebulnem testu in testu vrtne kreše lahko prvo hipotezo potrdimo. Potrdimo jo lahko zato, ker so bile dolžine koreninic čebule in poganjki semen vrtne kreše pri večjih koncentracijah res zelo majhne, kar pomeni, da je imel pirokton olamin toksičen učinek na rast in razvoj tako čebule kot tudi vrtne kreše. Če pa pogledamo rast koreninic in poganjkov pri ostalih raztopinah, kjer so bile ~~te~~ koncentracije pirokton olamina veliko manjše, so te lepo rastle. Najdaljše koreninice so bile 7. dan pri koncentraciji 0,00003 nM, kjer je bila povprečna dolžina koreninic 3 cm.



Slika 38: Čebulice, izpostavljene pozitivni kontroli po 7 dneh



Slika [2939](#): Čebulice, izpostavljene najvišji koncentraciji pirokton olamina po 7 dneh



Slika [3040](#): Čebulice, izpostavljene najnižji koncentraciji pirokton olamina po 7 dneh

Hipoteza 2: Večje koncentracije pirokton olamina imajo negativne vplive na celično delitev.

Po opravljenem čebulnem testu, fiksaciji in barvanju koreninic smo pregledali celice še pod mikroskopom, kjer smo lahko videli delitev celic, ki je s prostim očesom ni mogoče videti. Ugotovili smo, da višja kot je bila koncentracija pirokton olamina, manjše je bilo število delečih se celic. S tem spoznanjem lahko potrdimo, da ima pirokton olamin – a le pri večjih koncentracijah – negativen vpliv na celično delitev.

Pri vseh ekotoksikoloških testih, kjer se uporabi žive organizme, je potrebno ~~zraven~~ upoštevati še ostale dejavnike, ki lahko vplivajo na sam potek in končne rezultate testov. Ti dejavniki so predvsem – na primeru čebulnega testa – kakršne-koli poškodbe čebulice; preveč/premalo razvite čebulice; razne mehanske poškodbe; preveč/premalo odrezan spodnji del ipd. Zato so pri takšnih testih ključnega pomena paralelke in uporaba čim večjega števila testnih rastlin pri vsaki koncentraciji, saj lahko le tako zagotovimo natančne rezultate, ki so veliko bolj zanesljivi. Ob zaključku je potrebno poudariti tudi to, da so rezultati diplomskega eksperimenta neke vrste preliminarni rezultati, ki jih je potrebno v nadaljevanju še dodatno preveriti oz. učinke pirokton olamina preveriti še v drugih koncentracijah, mogoče ob prisotnosti manj toksičnega topila ter tudi na drugih testnih organizmih.

8. POVZETEK

Prhljaj in dermatitis sta stanji kože, ki se pogosto pojavita pri velikem delu prebivalstva. Za obe stanji je značilna srbeča koža, ki se lušči, glavni krivec za pojav takšnih stanj pa je kvasovka *Malassezia*. Rešitev takšnih bolezni predstavljajo sredstva, ki vsebujejo protiglavične učinkovine. Najpogosteje uporabljena učinkovina za to je danes pirokton olamin. Ta je prisoten v neštetih kozmetičnih izdelkih, kot so šamponi proti prhljaju, mazila, krema, losjoni.

V diplomskem delu smo želeli raziskati, ali ima ta učinkovina tudi toksičen vpliv na žive organizme, npr. rastline. V ta namen smo izvedli dva pogosto uporabljeni biotesti – čebulni test (*Allium cepa L.*) in test vrtne kreše (*Lepidium sativum*). Ta testa smo uporabili, ker je zanju značilna hitra odzivnost na spremembe, sta enostavna za izvedbo, cenovno ugodna in dostopna. Pri obeh testih smo uporabili šest različnih koncentracij pirokton olamina – C1 (0,003 nM); C2 (0,0015 nM); C3 (0,0003 nM); C4 (0,00015 nM); C5 (0,00003 nM) in C6 (0,000015 nM). Za kontrole pa smo izbrali destilirano vodo, pozitivno kontrolo K⁺ (10 % 0,1 M HCl) in tri negativne kontrole (K₁; K₂; K₃).

Iz dobljenih rezultatov testov lahko potrdimo, da ima pirokton olamin pri višjih koncentracijah – v našem primeru sta bili najvišji koncentraciji C1 in C2 (0,003 nM in 0,0015 nM) – toksičen vpliv na rast in razvoj. Pri najvišjih koncentracijah je prišlo do zmanjšane rasti koreninic čebule in poganjkov vrtne kreše.

Pri kalitvenem testu so poganjki drugi dan najbolj uspevali v raztopini s koncentracijo 0,00015 nM. Pri kalitvenem testu je zanimivo to, da so bili zadnji dan meritve poganjki najdaljši v kar visoki koncentraciji (0,0003 nM), kar pomeni, da pirokton olamin pri takšni koncentraciji še ni imel negativnega vpliva na rast. Opazili smo tudi, da so poganjki uspevali pri nižjih koncentracijah pirokton olamina, na podlagi česar lahko sklepamo, da ni imel velikega učinka na rast.

Koreninice čebule so najbolj rastle v raztopini, kjer je bila koncentracija pirokton olamina 0,00003 nM. Po treh dneh so bile meritve pri vseh koncentracijah – razen pri najvišjih dveh, višje kot kontrola. Meritve pri raztopini z najvišjima koncentracijama pa so bile za več kot polovico nižje od kontrole. Iz rezultatov, izmerjenih sedmi dan, lahko vidimo, da je rast pri najvišjih dveh koncentracijah nekoliko upadla, iz česar lahko sklepamo, da poleg visoke koncentracije tudi daljši čas izpostavljenosti vpliva na slabšo rast in razvoj. Pri vseh ostalih koncentracijah pa je se je dolžina koreninic le še podaljšala, kar bi lahko pomenilo tudi to, da pirokton olamin v manjših koncentracijah v kombinaciji z DMSO prispeva k boljši rasti.

Pri vseh meritvah moramo upoštevati tudi to, da smo kot topilo uporabili DMSO, za katerega je znana njegova toksičnost, ki lahko potencialno še dodatno pozitivno vpliva na rast in razvoj semen. Da bi dosegli natančnejše rezultate, bi bilo potrebno dodatno preveriti vpliv DMSO-ja na rast, tako da bi izvedli dodatne teste z več različnimi koncentracijami. S tem bi lahko bolj natančno ugotovili, pri kateri koncentraciji ima najmanjši vpliv na rast in razvoj.

Ob mikroskopiranju koreninic čebule pa smo še dodatno ugotovili, da je prišlo ob višjih koncentracijah pirokton olamina do zmanjšanja mitoze ter tudi do pojava nepravilnosti in aberacij pri celični delitvi. Te nepravilnosti so bile mitotsko združevanje v metafazi, zlepljanje v metafazi, prišlo je do pojava anafaznih fragmentov in celo do pojava hipoploidne celice. S tem odkritjem smo ponovno potrdili predpostavko, da ima pirokton olamin tudi potencialno genotoksičen vpliv na organizem.

Seveda bi bilo v prihodnje potrebno izvesti še veliko takšnih testov, z več ponovitvami, paralelkami in različnimi koncentracijami, da bi lahko bolj natančno določili, do katere mere koncentracije pirokton olamina res škodljivo vplivajo in pri katerih koncentracijah služi svojemu namenu in ne deluje v škodo uporabniku. Seveda pa so za bolj natančno ugotavljanje vpliva le-teh na ljudi potrebni nadaljnji testi, ki vključujejo celične kulture, mikroorganizme in kasneje tudi teste na živalih ter kasneje morda tudi klinične študije na ljudeh.

9. SUMMARY

Dandruff and dermatitis are skin conditions that frequently occur in a large portion of the population. Both conditions are characterized by itchy, flaky skin, primarily caused by the yeast *Malassezia*. Antifungal agents provide a solution for these conditions, with piroctone olamine being the most commonly used active ingredient today. It is found in numerous cosmetic products such as anti-dandruff shampoos, ointments, creams, and lotions.

In this thesis, we aimed to investigate whether this active ingredient also has toxic effects on living organisms, such as plants. To this end, we conducted two commonly used bioassays: the onion (*Allium cepa L.*) test and the garden cress (*Lepidium*) test. These tests were chosen due to their quick responsiveness to changes, ease of execution, cost-effectiveness, and accessibility. In both tests, we used six different concentrations of piroctone olamine: C1 (0.003 nM); C2 (0.0015 nM); C3 (0.0003 nM); C4 (0.00015 nM); C5 (0.00003 nM); and C6 (0.000015 nM). The controls used were distilled water, a positive control K⁺ (10% 0.1 M HCl), and three negative controls (K⁻₁, K⁻₂, K⁻₃).

From the obtained test results, we can confirm that piroctone olamine, at higher concentrations—in our case, the highest concentrations were C1 and C2 (0.003 nM and 0.0015 nM)—has a toxic impact on growth and development. At the highest concentrations, there was a noticeable reduction in the growth of onion roots and garden cress shoots.

In the germination test, the shoots thrived best on the second day in a solution with a concentration of 0.00015 nM. Interestingly, on the last day of measurement, the shoots were longest at a relatively high concentration (0.0003 nM), indicating that at this concentration, piroctone olamine no longer had a negative impact on growth. We also observed that shoots thrived at lower concentrations of piroctone olamine, suggesting it did not significantly affect growth. In all measurements, it is important to consider that we used DMSO as a solvent.

Onion roots grew best in the solution with a piroctone olamine concentration of 0.00003 nM. After three days, measurements at all concentrations—except the two highest—were higher than the control. Measurements in the solution with the highest concentrations were more than half lower than the control. From the results measured on the seventh day, we can see that growth at the two highest concentrations somewhat declined, suggesting that, besides high concentration, prolonged exposure negatively impacts growth and development.

All measurements must also consider that we used DMSO as a solvent, which is known for its toxicity and could potentially have an additional positive impact on seed growth and development. To achieve more precise results, further tests with various concentrations of DMSO would be necessary to determine the concentration with the least impact on growth and development.

Microscopic examination of onion roots revealed that higher concentrations of piroctone olamine led to reduced mitosis and the occurrence of irregularities and aberrations in cell division. These aberrations included mitotic aggregation in metaphase, clumping in metaphase, the appearance of anaphase fragments, and even the appearance of hypoploid cells. This discovery further confirmed that piroctone olamine has a genotoxic effect on organisms.

Future research should include many such tests with more repetitions, more parallels, and various concentrations to more accurately determine the extent to which piroctone olamine concentrations are truly harmful and at which concentrations it serves its purpose without harming the user. However, for a more precise determination of their impact on humans, further tests are necessary, which include cell cultures, microorganisms, and later also animal testing, and possibly clinical studies on humans

10. VIRI IN LITERATURA

1. Al-Sabti, K. (1985). Chromosomal Aberration in Onion (*ALLIUM cepa*) induced by Water Chlorination By-Products. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 34, 80–88.
2. Al-Sabti, K. (1989). *ALLIUM* test for air and water borne pollution control. Cytobios, 58, 71–78.
3. Baumgarten A, Spiegel H (2004) Phytotoxicity (Plant tolerance), HORIZONTAL – 8. Agency for Health and Food Safety, Vienna, Available online http://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/hor8_phytotoxicity.pdf
4. Bernhard JD. The itchy scalp and other pruritic curiosities. Seminars in Dermatology. 1995 Dec;14(4):326-329. DOI: 10.1016/s1085-5629(05)80056-2. PMID: 8679440.
5. Bonardi A, Gratteri P, Nocentini A. chapter 9 - Carbonic anhydrases from pathogens: fungal carbonic anhydrases and their inhibitors as potential antifungal agents. Carbonic anhydrases. Cambridge, MA, United States: Academic Press; 2019. p. 419–48.
6. Cabañes FJ. Malassezia yeasts: how many species infect humans and animals? PLoS Pathog. 2014;10(2):e1003892-e.
7. Clavaud C, Jourdain R, Bar-Hen A, Tichit M, Bouchier C, Pouradier F, et al. Dandruff is associated with disequilibrium in the proportion of the major bacterial and fungal populations colonizing the scalp. PLoS One. 2013;8(3):e58203.
8. Dawson, Thomas L (2007). *Malassezia globosa and restricta: Breakthrough Understanding of the Etiology and Treatment of Dandruff and Seborrheic Dermatitis through Whole-Genome Analysis.* , 12(2), 15–19. doi:10.1038/sj.jidsymp.5650049
9. Dessinioti C, Katsambas A (2013) Seborrheic dermatitis: etiology, risk factors, and treatments: facts and controversies. Clin Dermatol 31: 343-351.
10. Dubini F, Bellotti MG, Frangi A, Monti D, Saccomani L (2005) In vitro anti mycotic activity and nail permeation models of a piroctone olamine (octopirox) containing transungual water soluble technology. Arzneimittelforschung 55:478–483.

11. European Union (2021). Commission Implementing Regulation (EU) 2021/2078 of 25 November 2021 amending Implementing Regulation (EU) 2021/808 as regards the exceptional measure derogating in respect of the 2020/2021 wine year from certain provisions of Implementing Regulation (EU) 2018/274 and Implementing Regulation (EU) 2020/975 as regards the use of concentrated grape must for the increase of the natural alcoholic strength by volume of wine products in the Czech Republic, Germany, Poland and Slovakia. Official Journal of the European Union, L 446, 34-36. Medmrežje: https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2021.446.01.0034.01.ENG&toc=OJ%3AL%3A2021%3A446%3ATOC
12. Ferm, I., Sterner, M., & Wallengren, J. (2010). Somatic and Psychiatric Comorbidity in Patients with Chronic Pruritus. *Acta Dermato-Venereologica*, 90(4), 395–400. <https://doi.org/10.2340/00015555-0864>.
13. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*. 2013;498(7454):367–70.
14. Findley K, Oh J, Yang J et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*. 2013; 498: 367–370.
15. Firbas, P. (2004). Kako zdrava je voda. Priročnik za biološki monitoring vode. ARA založba, Ljubljana.
16. Firbas, P. (2006). Izobraževalni portal DZS Ljubljana: www.vedež.dzs.si
17. Firbas, P. (2011). Kemizacija okolja in citogenetske poškodbe. Ekslibris, Grosuplje.
18. Fiskesjo, G. (1993). TECHNICAL METHODS SECTION. *ALLIUM* test I: A 2-3 day lant test for Toxicity Assessment by Measuring the Mean Root Growth of Onions (*ALLIUM cepa* L.). *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 8, 461–470.
19. Fiskesjo, G. (1985). *ALLIUM* test of river water from Braan and Saxan before and after closure of a chemical factory. *Ambio*, 14, 2, 99–103.
20. Grant, W.F. (1999). Higher plant assays detection of chromosome aberations and gene mutations-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation research*, 488, 2, 93–118.

21. Grimshaw SG, Smith AM, Arnold DS, Xu E, Hopfroff M, Murphy B. The diversity and abundance of fungi and bacteria on the healthy and dandruff affected human scalp. PLoS One. 2019;14(12):e0225796.
22. Gupta, A.K., Batra, R., Bluhm, R., Boekhout, T. and Dawson Jr, T.L. Skin diseases associated with *Malassezia* species. J. Am. Acad. Dermatol. 51(5), 785–798 (2004).
23. Gupta AK, Madzia SE, Batra R. Etiology and management of Seborrheic dermatitis. Dermatology.2004; 208:89–93. [PubMed: 15056994]
24. Hvastja, Š. Prisotnost cinkovega piritiona v kozmetiki in ugotavljanje njegove potencialne toksičnosti. Diplomsko delo. Fakulteta za varstvo okolja, Velenje (2023).
25. Kim Y, Alpmann P, Blaum-Feder S, Krämer S, Endo T, Lu D, Carson D, Schmidt Wolf IGH (2011) Increased in vivo efficacy of lenalidomide by addition of piroctone olamine. In vivo 25:99–104
26. Koch, S. L., Shriver, M. D., & Jablonski, N. G. (2018). Variation in human hair ultrastructure among three biogeographic populations. Journal of Structural Biology, 205, 60–66.
27. Kumar, P. in Panneerselvam N. (2007). Cytogenetic studies of food preservative in *ALLIUM cepa* root meristem cells. Facta Universitatis Series: Medicine and Biology, 14, 2, 60–63.
28. Lodén, & Wessman. (2000). *The antidandruff efficacy of a shampoo containing piroctone olamine and salicylic acid in comparison to that of a zinc pyrithione shampoo*. International Journal of Cosmetic Science, 22(4), 285–289. doi:10.1046/j.1467-2494.2000.00024.x
29. Manuel F, Ranganathan S (2011) A new postulate on two stages of dandruff: a clinical perspective. Int J Trichology 3: 3–6.
30. Ma, T.H. s sod. (2005). Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, 33, 1, 45–55.
31. Narshana M et al. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2018; Vol. 9(2): 417–431. Raab W. Hautfibel- Dermatologische Pflege kompakt; 4. Auflage; Govi-Verlag 2010.

32. Pinto M. (2021): EU Prohibition of Zinc Pyrithione in Cosmetic Products. Critical catalyst. Medmrežje: <https://criticalcatalyst.com/eu-prohibition-of-zinc-pyrithione-in-cosmetic-products/>
33. Rank, J.(2003). The method of *ALLIUM* anaphase-telophase chromosome aberation assay. *Ekologija*, 1, 38–42.
34. Ragunathan I. in Panneerselvam N. (2007). Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberation in *ALLIUM cepa*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8,7, 470–475.
35. Saxena R, Mittal P, Clavaud C, Dhakan DB, Hegde P, Veeranagaiah MM, Saha S, Souverain L, Roy N, Breton L, Misra N, Sharma VK. Comparison of Healthy and Dandruff Scalp Microbiome Reveals the Role of Commensals in Scalp Health. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 Oct 4;8:346. doi: 10.3389/fcimb.2018.00346. PMID: 30338244; PMCID: PMC6180232.
36. Smaka-Kincl V., Stegner P., Lovka M., Toman, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. *Mutation Research*, 1996; 368: 171–179.
37. Schwartz, J.R., Cardin, C.M. and Dawson, T.L. Dandruff and seborrheic dermatitis. In: *Textbook of Cosmetic Dermatology* (Baran, R. and Maibach, H.I., eds), pp. 259–272. Martin Dunitz Ltd, London (2004).
38. Shuster, S. The aetiology of dandruff and the mode of action of therapeutic agents. *Br. J. Dermatol.* 111(2), 235–242 (1984).
39. Tobin, D. J. (2008). Human hair pigmentation—Biological aspects. *International Journal of Cosmetic Science*, 30(4), 233–257.
40. Tang CF, Pudney PDA, Lane ME. Investigation of piroctone olamine delivery to the skin from single, binary and ternary solvent systems. *Int J Cosmet Sci*. 2023; 00: 1–11. <https://doi.org/10.1111/ics.12935>.
41. Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih (prenovitev) (Besedilo velja za EGP); OJ L 342, 22.12.2009, p. 59–209. Medmrežje: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/ALL/?uri=celex%3A32009R1223>

42. Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis G, Iatta R, Boekhout T. Malassezia infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. PLoS Pathog. 2015;11(1):e1004523-e.
43. Xu Z, Wang Z, Yuan C, Liu X, Yang F, Wang T, et al. Dandruff is associated with the conjoined interactions between host and microorganisms. Sci Rep. 2016;6(1):24877.
44. Yopp H.J. (1986). Bioassays for Plant Hormones and Other Naturally Occurring Plant Growth Regulators v Mandava N.D. (ur.), Handbook of Natural Pesticides: Methods, Volume I: Theory, Practice, and Detection.
45. Medmrežje 1: <https://coslaw.eu/omnibus-iv-new-ingredients-banned-in-cosmetics/> (8.7.2024).
46. Medmrežje 2: Omnibus IV: new ingredients banned in cosmetics, <https://coslaw.eu/omnibus-iv-new-ingredients-banned-in-cosmetics/> (22.3.2024).
47. Medmrežje 3: <https://cosmetics.specialchem.com/inci-ingredients/piroctone-olamine> (5.4.2024).
48. Medmrežje 4: National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 50258, Piroctone Olamine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piroctone-Olamine>. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piroctone-Olamine#section=Entrez-Crosslinks> (2.7.2024).
49. Medmrežje 5: SCCNFP. Opinion of the sccnfp on piroctone olamine and its monoethanolamine salt, https://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/sccp/documents/out162_en.pdf (2.7.2024).
50. Medmrežje 6: <http://web1.chinanetsun.com/chem/jiangsu/specchemind2/images/po.pdf> (19.2.2024).
51. Medmrežje 7: Eur-Lex <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/ALL/?uri=celex%3A31976L0768> (27.8.2024).

