

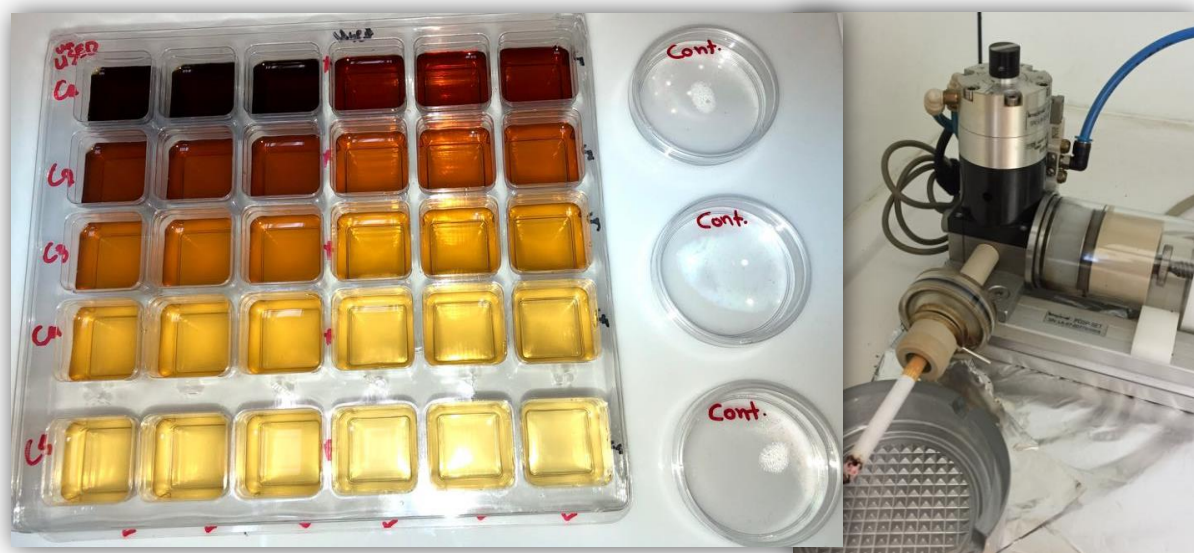


Πολυτεχνείο Κρήτης  
Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος  
Προπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

---

## ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΠΛΥΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΠΝΟΥ

---



Διπλωματική Εργασία της

**Βασιλικής Δημητρίου**  
**A.E.M. 2014050103**

**Εξεταστική Επιτροπή**  
**Δανάη Βενιέρη (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)**  
**Ελευθερία Ψυλλάκη(Συνεπιβλέπουσα Καθηγήτρια)**  
**Απόστολος Γιαννής**

Χανιά, Φεβρουάριος 2020

## **Ευχαριστίες**

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του προγράμματος προπτυχιακών σπουδών της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης και τα πειράματα έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας καθώς και στο Εργαστήριο Υδατικής Χημείας.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Βενιέρη Δανάη καθώς και την κα. Ψυλλάκη Ελευθερία για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, την άψογη συνεργασία μας και την πολύτιμη καθοδήγηση τους καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Ακόμη ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στην κα. Γουνάκη Ιωσηφίνα η οποία υπήρξε δίπλα μου με ανεξάντλητη επιμονή και υπομονή καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επιπλέον, ευχαριστώ πολύ τον κ.Γιαννή Απόστολο, για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για την αξιολόγηση της εργασίας καθώς και για την παρουσία του.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου Σταυρούλα και Χρήστο που μου συμπαραστάθηκαν σε όλες τις επιλογές μου, με βοήθησαν τόσο οικονομικά και ψυχολογικά, με στήριξαν με όλη τη σημασία της λέξης σε όλα τα φοιτητικά μου χρόνια και που έχουν θεμελιώσει τις ηθικές αξίες μου ως άνθρωπο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου σε αυτό το όμορφο ταξίδι των φοιτητικών χρόνων υπήρξαν δίπλα μου και με στήριξαν ο καθένας με το δικό του τρόπο και κατάφερα να ολοκληρώσω αυτό το πολυετές ταξίδι.

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες .....	1
Περίληψη .....	6
Abstract .....	8
Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή .....	10
1.1 Γενικά στοιχεία για τον καπνό και το τσιγάρο .....	10
1.2 Σύστημα θέρμανσης καπνού IQOS.....	11
1.3 Επιπτώσεις από τα υπολείμματα των τσιγάρων .....	14
1.4 Επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό .....	15
1.5 Επιπτώσεις στα ύδατα και στο περιβάλλον .....	16
Κεφάλαιο 2 Βιοδείκτες .....	18
2.1 Εισαγωγή στους Βιοδείκτες .....	18
2.2 Τύποι βιοδεικτών και οι χρήσεις τους .....	18
2.3 Βιοδοκιμές .....	20
2.4 <i>Vibrio fischeri</i> .....	21
2.5 <i>Daphnia magna</i> .....	22
2.6 Κατηγορίες τοξικότητας και τοξικολογικοί όροι .....	24
Κεφάλαιο 3 Σκοπός της εργασίας .....	26
Κεφάλαιο 4 Πειραματική Διαδικασία .....	27
4.1 Επιστημονικός εξοπλισμός.....	27
4.1.1 Μηχανή Καπνίσματος.....	27
4.1.2 Υλικά, όργανα και συσκευές .....	28
4.2 Πειραματική Διαδικασία για τη δημιουργία υδατικών εκπλυμάτων από προϊόντα καπνού .....	29
4.3 <i>Vibrio fischeri</i> .....	32
4.3.1 Ενεργοποίηση <i>V. fischeri</i> .....	32
4.3.2 Προετοιμασία εναιωρήματος.....	32
4.3.3 Πειραματική διαδικασία .....	33
4.3.4 Φωτομέτρηση .....	34
4.4 <i>Daphnia magna</i> .....	35
4.4.1 Προετοιμασία πρότυπου διαλύματος γλυκού νερού(standard freshwater) ...	35
4.4.2 Εκκόλαψη των αυγών.....	36
4.4.3 Προετοιμασία των δειγμάτων.....	36
4.4.4 Μεταφορά των δειγμάτων και των <i>D. magna</i> στο πλατό βιοδοκιμής.....	37
4.4.5 Καταμέτρηση και καταγραφή των ζωντανών οργανισμών <i>D. magna</i> .....	38

Κεφάλαιο 5 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	39
5.1 Αποτελέσματα <i>V. fischeri</i> .....	39
5.1.1 Χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποιητά συμβατικά τσιγάρα (used-unused CC) .....	39
5.1.2 Χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποιητά tobacco sticks (used-unused TSAL).....	42
5.2 Αποτελέσματα <i>D. magna</i> .....	44
5.2.1 Χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποιητά συμβατικά τσιγάρα (unused-used CC) .....	44
5.2.2 Χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποιητά tobacco sticks (used-unused TSAL).....	47
5.2.3 Νικοτίνη .....	49
Κεφάλαιο 6 Συμπεράσματα .....	52
6.1 Μελλοντικές προτάσεις.....	54
Βιβλιογραφία .....	55

### **Περιεχόμενα Πινάκων**

Πίνακας 1: Παράμετροι για κάθε τύπο προτύπου .....	28
Πίνακας 2:Συντομογραφίες δειγμάτων για την ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	39
Πίνακας 3: Αποτελέσματα CFUs/ mL για το control και το δείγμα Used CC1 .....	39
Πίνακας 4: Αποτελέσματα CFUs/mL για το control και το δείγμα Used CC3 .....	40
Πίνακας 5 Αποτελέσματα CFUs/mL για το control και το δείγμα Unused CC3.....	40
Πίνακας 6 Ποσοστό μείωσης του πληθυσμού <i>V. fischeri</i> ανάλογα με το κάθε δείγμα χρησιμοποιημένου και μη συμβατικού τσιγάρου .....	40
Πίνακας 7: Αποτελέσματα CFUs/mL για το control και το δείγμα Used TSAL1 .....	42
Πίνακας 8:Ποσοστό μείωσης του πληθυσμού <i>V. fischeri</i> ανάλογα με το κάθε δείγμα χρησιμοποιημένων και μη tobacco sticks. ....	42

### **Περιεχόμενα Εικόνων**

Εικόνα 1:Διάγραμμα κατανάλωσης τσιγάρων ανα ημέρα για κάθε Ευρωπαϊκή χώρα	11
Εικόνα 2:Διαφορετικές εκδόσεις IQOS	12
Εικόνα 3 Σύστημα IQOS, φορτιστής τσέπης(charger), ράβδος θέρμανσης(holder)και tobacco stick	13
Εικόνα 4:Αποτσίγαρο στην παραλία	14
Εικόνα 5:Τα μέρη από τα οποία αποτελείται ένα συμβατικό τσιγάρο	15
Εικόνα 6:Καλλιέργεια <i>V. fischeri</i> από μικροσκόπιο στο σκοτάδι	22
Εικόνα 7:Θηλυκιά <i>D. magna</i> με αυγά στο εσωτερικό της	23
Εικόνα 8: Μηχανή καπνίσματος από τη Burghart	27
Εικόνα 9: Δείγματα υδατικών εκπλυμάτων από αχρησιμοποιήτα συμβατικά τσιγάρα	30
Εικόνα 10: Χρησιμοποιημένα τσιγάρα έως 3 mm από το φίλτρο	31
Εικόνα 11: Διαδικασία ανάδευσης των δειγμάτων σε 180 rpm	31
Εικόνα 12: Διαδικασία διήθησης των δειγμάτων μετά το πέρας της έκπλυσης με τη βοήθεια συσκευής διήθησης.	32
Εικόνα 13:Μέθοδος δεκαδικών αραιώσεων	33
Εικόνα 14 Υλικά για τον προσδιορισμό της τοξικότητας με το Daphtoxkit.F Magna	35
Εικόνα 15:Πλατώ βιοδοκιμής με τις κατάλληλες αραιώσεις σε δύο διαφορετικά δείγματα χρησιμοποιημένα και μη tobacco sticks και τρυβλία-control	38

### **Περιεχόμενα Διαγραμμάτων**

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα μείωσης του πληθυσμού του βακτηρίου <i>V. Fischeri</i> (%) για τα χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποιήτα συμβατικά τσιγάρα	41
Διάγραμμα 2:Διάγραμμα μείωσης του πληθυσμού του βακτηρίου <i>V. fischeri</i> (%) για τα χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποιήτα tobacco sticks.	43
Διάγραμμα 3: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού <i>D. magna</i> μετά από 24h σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα χρησιμοποιημένα συμβατικά τσιγάρα	44

Διάγραμμα 4: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού D. magna μετά από 48h σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα αχρησιμοποίητα συμβατικά τσιγάρα	45
Διάγραμμα 5: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού D. magna μετά από 24h σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα χρησιμοποιημένα συμβατικά τσιγάρα	45
Διάγραμμα 6: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού D. magna μετά από 48h σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα χρησιμοποιημένα συμβατικά τσιγάρα	46
Διάγραμμα 7: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού D. magna μετά από 24h ώρες σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποίητα tobacco sticks	47
Διάγραμμα 8: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού D. magna μετά από 48h σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα χρησιμοποιημένα tobacco sticks	48
Διάγραμμα 9: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού D. magna μετά από 48h σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα αχρησιμοποίητα tobacco sticks	48
Διάγραμμα 10: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού D. magna μετά από 24 και 48h σε σχέση με τη συγκέντρωση υδατικού διαλύματος νικοτίνης	49

## Περίληψη

Τα υπολείμματα των τσιγάρων (αποτσιγάρα) και άλλα απορρίμματα προϊόντων καπνού είναι τα πιο συνηθισμένα αντικείμενα που συλλέγονται στους καθαρισμούς πόλεων, παραλιών και σκουπιδιών παγκοσμίως. Συχνά βρίσκονται πεταμένα σε παραλίες, δρόμους και εισέρχονται στους υδάτινους αποδέκτες μέσω των αποχετεύσεων δημιουργώντας πρόβλημα στους οργανισμούς. Η επίγνωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και των τοξικών χημικών συστατικών που μπορούν να απομακρυνθούν από το τσιγάρο και να γίνουν βιοδιαθέσιμες στη υδρόβια ζωή κατά την έκθεσή τους στο νερό από τους καπνιστές είναι ελλιπής. Τα αποτσιγάρα περιέχουν όλες τις τοξίνες, τη νικοτίνη και τα καρκινογόνα συστατικά που βρίσκονται στον καπνό μαζί με το μη βιοδιασπώμενο φίλτρο. Μελέτες τοξικότητας έχουν δείξει ότι οι ενώσεις που εκπέμπονται από τα τσιγάρα σε αλμυρό και σε γλυκό νερό είναι τοξικές για τους υδρόβιους οργανισμούς. Επίσης καθώς τα δύο τρίτα όλων των καπνισμένων τσιγάρων (τρισεκατομμύρια αποτσιγάρα παγκοσμίως) απορρίπτονται στο περιβάλλον κάθε χρόνο, είναι σημαντικό να εξεταστεί η πιθανή τοξικότητα αυτών των αποβλήτων. Η παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζει την τοξικότητα υδατικών εκπλυμάτων από χρησιμοποιημένα και μη προϊόντα καπνού καθώς και υδατικού διαλύματος νικοτίνης. Τα είδη που εξετάστηκαν ήταν συμβατικά τσιγάρα καπνού (conventional cigarettes, CC) και προϊόντα καπνού που δεν καίγονται (tobacco sticks) με αλουμίνιο σε υπερκάθαρο νερό. Για τα χρησιμοποιημένα προϊόντα καπνού χρησιμοποιήθηκε μηχανή καπνίσματος που ήταν ρυθμισμένη ανάλογα με το δείγμα σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο. Στο πρώτο στάδιο έγιναν βιοδοκιμές με το βακτήριο *Vibrio fischeri* που ανήκει στο τροφικό επίπεδο των αποικοδομητών για τα χρησιμοποιημένα και μη προϊόντα καπνού. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα δείγματα χρησιμοποιημένων και μη συμβατικών τσιγάρων προκαλούν μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου 75-100% ενώ τα χρησιμοποιημένα tobacco sticks 50-75% μείωση και θεωρούνται τοξικά. Αντίθετα τα αχρησιμοποιημένα tobacco sticks επιτρέπουν την κανονική ανάπτυξη του βακτηρίου καθώς η μείωση ήταν μηδενική. Στο δεύτερο στάδιο έγινε μελέτη της τοξικότητας με τον οργανισμό *Daphnia magna* που ανήκει στο τροφικό επίπεδο των καταναλωτών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα πιο τοξικά δείγματα είναι τα χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποιημένα συμβατικά τσιγάρα καθώς και τα αχρησιμοποιημένα tobacco sticks αφού προκάλεσαν το θάνατο όλων των

οργανισμών. Το δείγμα των χρησιμοποιημένων tobacco sticks ήταν λιγότερο τοξικό καθώς το ποσοστό επιβίωσης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις κυμαίνεται μεταξύ 50-70%. Τέλος το διάλυμα νικοτίνης σε υπερκάθαρο νερό δεν επηρεάζει σχεδόν καθόλου την επιβίωση των οργανισμών και δεν καθίσταται τοξικό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας η *D. magna* ήταν πολύ περισσότερο ευαίσθητη σε σύγκριση με το *V. fischeri* υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, κυρίως όταν ελέγχθηκαν τα συμβατικά τσιγάρα. Γενικά, οι ανώτεροι οργανισμοί εμφανίζονται περισσότερο ευάλωτοι στην τοξικότητα που αναπτύσσεται εξαιτίας προϊόντων καπνού, γεγονός που προκαλεί ανησυχία για την προστασία της δημόσιας υγείας.



## **Abstract**

Cigarette butts and other tobacco product wastes are the most common items picked up in environmental trash beach and urban cleanups worldwide.

They are often thrown away on beaches and roads and they are dispersed through sewer systems and streams into the oceans. Up until now, there is minimum awareness regarding the environmental impacts and toxic chemicals that can be removed from the cigarette and become bioavailable to aquatic life, when exposed to water by smokers. Cigarettes butts contain all the toxins, nicotine and carcinogenic ingredients found in tobacco along with the non-biodegradable filter. Toxicity studies have shown that compounds emitted by cigarettes in salt and fresh water are toxic to aquatic organisms. Also, as two-thirds of all smoked cigarettes (numbered in the trillions of cigarettes worldwide) are discharged into the environment each year, it is important to consider the potential toxicity of these wastes. The present work examines the toxicity of water leachates from used and unused tobacco products as well as aqueous nicotine solution. The items which were examined were conventional cigarettes (CC) and non-burned aluminum tobacco sticks in ultra-pure water. The used tobacco products were obtained from an analytical cigarette-smoking machine that operated according to a standardized protocol. In the first stage, bioassays were performed using the bacterial species *Vibrio fischeri*, which belongs to the trophic level of decomposers. Bioassays took place with used and non-used tobacco products. The results showed that samples of used and unused conventional cigarettes cause a 75-100% reduction of the bacterial population, while used tobacco sticks 50-75% decrease and are considered toxic. On the other hand, unused tobacco sticks allow normal growth of the bacterium as the reduction level reached zero values. In the second stage toxicity was studied with *Daphnia magna*, which belongs to the trophic level of consumers. The results showed that the most toxic samples were used and unused conventional cigarettes as well as unused tobacco sticks since they caused the death of all organisms. The sample of used tobacco sticks was less toxic as the survival rate at the respective concentrations varied between 50-70%. Finally, the nicotine solution in ultra-pure water had almost no effect on the survival of the organisms. According to the present results *D. magna* seemed to be highly more sensitive than *V. fischeri* under the current experimental conditions, especially when

conventional cigarettes were tested. Generally, higher organisms are more vulnerable to the toxicity induced by tobacco products, raising many concerns about public health protection.

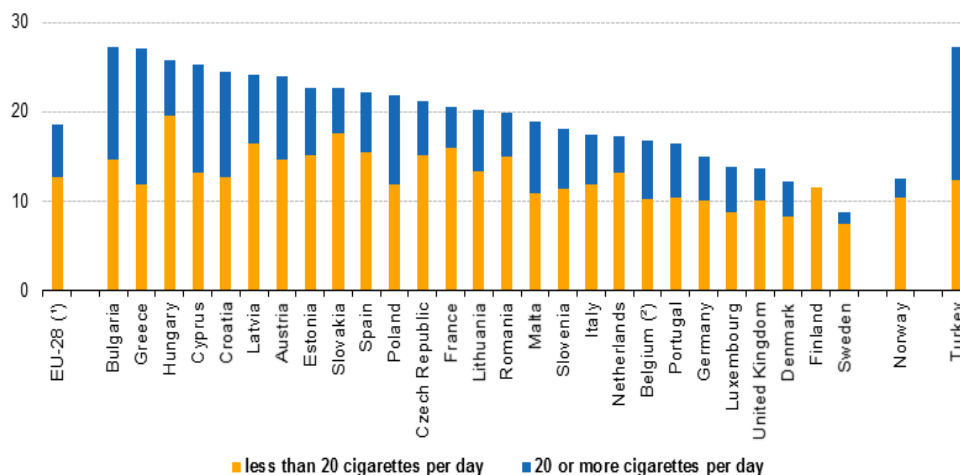
# Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή

## 1.1 Γενικά στοιχεία για τον καπνό και το τσιγάρο

Ο καπνός είναι ένα φυτό που καλλιεργείται για τα φύλλα του, τα οποία ξηραίνονται και ζυμώνονται πριν τοποθετηθούν σε προϊόντα καπνού. Ο καπνός περιέχει νικοτίνη, ένα συστατικό που μπορεί να οδηγήσει σε εθισμό και γι' αυτό τόσοι πολλοί άνθρωποι που χρησιμοποιούν προϊόντα καπνού δυσκολεύονται να σταματήσουν μετά από χρόνια χρήση. Υπάρχουν επίσης πολλές άλλες δυνητικά επιβλαβείς χημικές ουσίες που βρίσκονται στο καπνό ή δημιουργούνται από την καύση του (National Institute for Drug Abuse, 2019).

Η χρήση καπνού, καθώς και η έκθεση σε παθητικό καπνό, αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές αιτίες θανάτου και αναπηρίας παγκοσμίως. Το κάπνισμα είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για πολλές μη-μεταδοτικές ασθένειες όπως ο καρκίνος, οι αναπνευστικές νόσοι, η στεφανιαία νόσος και το εγκεφαλικό επεισόδιο. Σύμφωνα με εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) ο καπνός σκοτώνει περισσότερα από 8 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως κάθε χρόνο, όπου περίπου 1,2 εκατομμύρια είναι το αποτέλεσμα του παθητικού καπνίσματος (έκθεση σε παθητικό κάπνισμα). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση περίπου 0,7 εκατομμύρια θάνατοι ετησίως σχετίζονται με τη χρήση καπνού (Pinkas et al., 2019).

Ο Ευρωπαϊκός Στατιστικός οδηγός (Eurostat Statistics Explained) επικεντρώνεται στο επίπεδο κατανάλωσης τσιγάρου, διαχωρίζοντας τους καπνιστές που καταναλώνουν κατά μέσο όρο 20 τσιγάρα ή περισσότερο ημερησίως ως «μανιώδεις καπνιστές» και «καθημερινοί καπνιστές» με χαμηλότερο επίπεδο κατανάλωσης τσιγάρων λιγότερα από 20 τσιγάρα την ημέρα.



Εικόνα 1: Διάγραμμα κατανάλωσης τσιγάρων ανα ημέρα για κάθε Ευρωπαϊκή χώρα

[https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Tobacco\\_consumption\\_statistics](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Tobacco_consumption_statistics)

Το 2014, το 5,9% του πληθυσμού ηλικίας άνω των 15 ετών κατανάλωσε τουλάχιστον 20 τσιγάρα την ημέρα και περίπου 12,6% κατανάλωσε λιγότερο από 20. Οι «μανιώδεις καπνιστές» αποτελούσαν την πλειοψηφία των καθημερινών καπνιστών στην Ελλάδα και στην Τουρκία, ενώ στη Σουηδία ήταν 14% και στη Φινλανδία όλοι οι καπνιστές ημερησίως κατανάλωναν λιγότερα από 20 τσιγάρα την ημέρα (βλ. Εικόνα 1). Οι «καθημερινοί καπνιστές» τσιγάρων αντιπροσώπευαν ένα παρόμοιο ποσοστό του συνολικού ενήλικου πληθυσμού στα περισσότερα κράτη μέλη της ΕΕ, από 7,5% στη Σουηδία, 8,3% στη Δανία και 8,8% στο Λουξεμβούργο έως 16,5% στη Λετονία, 17,6% Σλοβακία και 19,6% στην Ουγγαρία.

Το 2014, σχεδόν 1 στους 7 ενήλικες στην Ελλάδα ανήκε στους «μανιώδεις καπνιστές» (Eurostat, 2014).

## 1.2 Σύστημα θέρμανσης καπνού IQOS

Η εταιρεία Philip Morris International (PMI) δημιούργησε έναν νέο προϊόν καπνού και το ονόμασε IQOS (I Quit Ordinary Smoking) τα αρχικά του οποίου σημαίνουν παραιτούμαι από το συνηθισμένο τρόπο καπνίσματος. Από το Μάιο του 2018, το IQOS έχει πωληθεί σε περισσότερες από 37 χώρες, συμπεριλαμβανομένων των: Ιαπωνία, Ηνωμένο Βασίλειο, Καναδά και Ελλάδα (St Helen et al., 2018).

Η ιδέα της θέρμανσης του καπνού (αντί να καίγεται) υπάρχει εδώ και πάνω από δύο δεκαετίες, αλλά χρειάστηκαν αρκετά χρόνια έρευνας για να δημιουργηθεί ένα προϊόν που να είναι αποδεκτό από τους ενήλικες καταναλωτές. Περίπου 8,8 εκατομμύρια καταναλωτές έχουν ήδη επιλέξει να αλλάξουν τα συμβατικά σιγάρα σε αυτό το προϊόν, το σύστημα θέρμανσης καπνού IQOS.

Το IQOS θερμαίνει τον καπνό απελευθερώνοντας νικοτίνη και την αυθεντική γεύση του καπνού χωρίς να τον καίει. Αυτό είναι το βασικό σημείο, διότι ο καπνός σε ένα τσιγάρο καίει σε θερμοκρασίες πάνω από 600°C, δημιουργώντας υψηλά επίπεδα επιβλαβών χημικών ουσιών. Ενώ το IQOS θερμαίνει τον καπνό σε πολύ χαμηλότερες θερμοκρασίες, μέχρι 350°C, χωρίς καύση, φωτιά και τέφρα. Επειδή ο καπνός θερμαίνεται και δεν καίγεται, τα επίπεδα επιβλαβών χημικών ουσιών μειώνονται σημαντικά σε σύγκριση με τον καπνό τσιγάρων.

Το IQOS είναι ένα σύστημα θέρμανσης καπνού που διατίθεται σε δύο εκδόσεις. Το πρώτο έχει τρία βασικά στοιχεία, μια μονάδα θέρμανσης καπνού (που ονομάζεται HEETS ή Heat Sticks) , μια θήκη και ένα φορτιστή. Το δεύτερο είναι ένα ολοκληρωμένο προϊόν που συνδυάζει τη θήκη και το φορτιστή και επιτρέπει πολλαπλές χρήσεις χωρίς επαναφόρτιση της μπαταρίας.

(<https://www.pmi.com/smoke-free-products/iqos-our-tobacco-heating-system>)



*Εικόνα 2: Διαφορετικές εκδόσεις IQOS*

<https://gr.iqos.com/el/proionta/anakalypse-iqos/ti-einai>



*Εικόνα 3 Σύστημα IQOS, φορτιστής τσέπης(charger), ράβδος θέρμανσης(holder)και tobacco stick*

<https://www.cspdailynews.com/tobacco/dissecting-heat-not-burn#page=2>

Το σύστημα θέρμανσης καπνού IQOS αποτελείται από 2 μέρη: τη ράβδο καπνού HEETS και την IQOS συσκευή, που περιλαμβάνει την βάση και το φορτιστή. Η τεχνολογία Heat Control του IQOS είναι μια ειδικά σχεδιασμένη τεχνολογία που ελέγχει τη θερμοκρασία της λεπίδας του IQOS να μην υπερβεί τους 350°C. Η λεπίδα θέρμανσης είναι κατασκευασμένη με κεραμική επίστρωση από πλατίνα χρυσό και ασήμι. Η θέρμανση του καπνού διαρκεί για περίπου 6 λεπτά και επιτρέπει τη λήψη έως και 14 εισπνοών στη διάρκεια αυτού του χρόνου με συνέπεια την απόλαυση της αυθεντικής γεύσης καπνού, χωρίς καύση (Selection, 2019) (Smith et al., 2016).

Για να χρησιμοποιήσει το IQOS, ένας καταναλωτής εισάγει το tobacco stick στη συσκευή θέρμανσης. Ο καταναλωτής πατάει το κουμπί για να ενεργοποιήσει τη ράβδο ώστε να θερμανθεί το tobacco stick. Η συσκευή διαθέτει μηχανισμό προστασίας από υπερθέρμανση για να αποτρέψει την υπερβολική θέρμανση (και πιθανή καύση) του καπνού. Όταν είναι έτοιμο για χρήση το λαμπάκι που υπάρχει στη ράβδο θέρμανσης ενεργοποιείται και παραμένει αναμμένο συνεχόμενα (Ruprecht et al., 2017).

Το IQOS και το συμβατικό τσιγάρο έχουν σημαντικές διαφορές στον καπνό και το φίλτρο που περιέχεται στο καθένα ξεχωριστά. Τα συμβατικά τσιγάρα περιέχουν φύλλα

καπνού κομμένα σε μικρά κομμάτια ενώ στα tobacco sticks ο καπνός αλέθεται και γίνεται με προσθήκη νερού, γλυκερίνης, guar gum και ίνες κυτταρίνης και έπειτα πρέπει να ανασυσταθεί σε φύλλα (castleaves) ώστε να έρθουν σε μορφή συμπιεσμένου καπνού. Το tobacco stick περιέχει πολύ μικρότερες ποσότητες καπνού σε σύγκριση με ένα συμβατικό τσιγάρο. Τέλος έχουν σημαντικές διαφορές και στο φίλτρο γιατί το καθένα δημιουργείται από διαφορετικά υλικά σε σχέση με το άλλο (Smith et al., 2016).

### 1.3 Επιπτώσεις από τα υπολείμματα των τσιγάρων

Τα υπολείμματα των τσιγάρων, απορρίμματα προϊόντων καπνού (Tobacco Product Waste-TPW) που περιέχουν τοξικές και χημικές ουσίες αποτελούν το κύριο αντικείμενο που συλλέγεται κατά τον καθαρισμό του περιβάλλοντος σε ολόκληρο τον πλανήτη. Υπάρχουν περίπου 766.571 τόνοι αποτσίγαρων που βρίσκονται ετησίως στο περιβάλλον. Είναι συνηθισμένο φαινόμενο να απορρίπτονται τα αποτσίγαρα στο περιβάλλον λόγω του νόμου που έχει θεσπιστεί για την απαγόρευση του καπνίσματος σε κλειστούς χώρους, γεγονός που ωθεί τους καπνιστές σε εξωτερικούς χώρους (Granados et al., 2019).

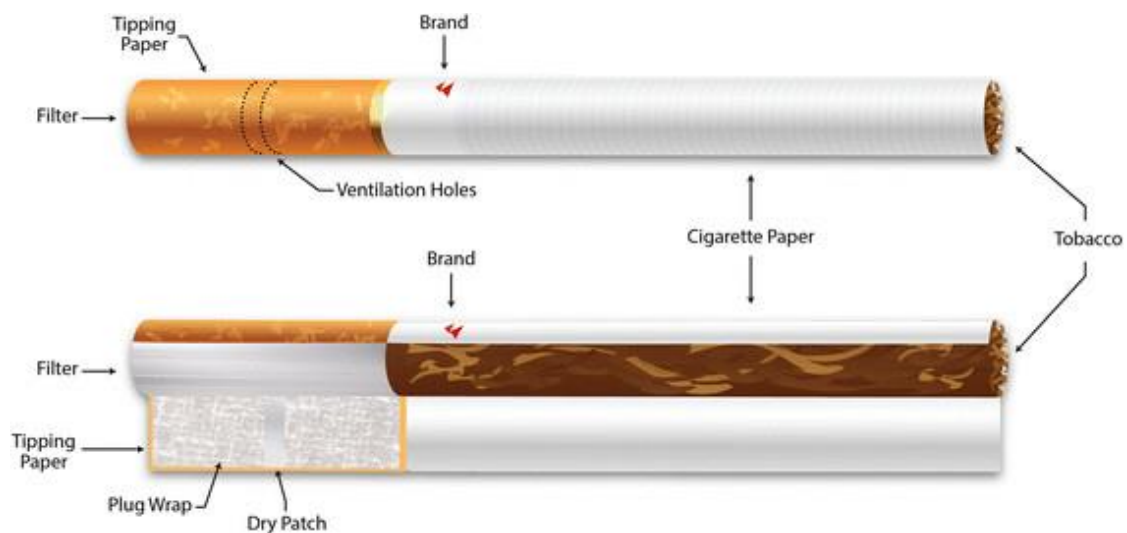


*Εικόνα 4:Αποτσίγαρα στην παραλία*

<https://www.istockphoto.com/photo/close-up-picture-of-cigarette-butts-stuck-in-sand-on-a-beach-gm1141415108-305783353>

Τα φίλτρα των τσιγάρων είναι κατασκευασμένα από χαρτί και οξική κυτταρίνη, η οποία είναι ένα σχεδόν μη βιοδιασπώμενο πλαστικό που συλλέγει χημικές ουσίες που παράγονται από το κάπνισμα. Ο πυρήνας των περισσότερων φίλτρων, το μέρος που μοιάζει με λευκό βαμβάκι, είναι στην πραγματικότητα μια μορφή πλαστικού που ονομάζεται οξική κυτταρίνη. Από μόνη της, η οξική κυτταρίνη αποικοδομείται πολύ αργά στο περιβάλλον. Ανάλογα με τις συνθήκες της περιοχής, το φίλτρο του τσιγάρου που απορρίπτεται, μπορεί να χρειαστεί 18 μήνες έως 10 χρόνια για να αποσυντεθεί.

Το χειρότερο όμως είναι ότι τα χρησιμοποιημένα φίλτρα τσιγάρων είναι γεμάτα από τοξίνες, οι οποίες μπορούν να διέλθουν στο έδαφος και στα ύδατα, καταστρέφοντας ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή μαζί τους. Ακόμα όσα φίλτρα απορρίπτονται με κομμάτια καπνού στο εσωτερικό τους μπορεί να προκαλέσουν περαιτέρω ρύπανση του περιβάλλοντος διότι η νικοτίνη είναι μια δηλητηριώδης ουσία (Martin, 2020) (Granados et al., 2019).



Εικόνα 5: Τα μέρη από τα οποία αποτελείται ένα συμβατικό τσιγάρο

[https://www.researchgate.net/figure/Anatomy-of-a-Cigarette-Source-Peel-Public-Health\\_fig1\\_305519262](https://www.researchgate.net/figure/Anatomy-of-a-Cigarette-Source-Peel-Public-Health_fig1_305519262)

#### 1.4 Επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό

Η βλαβερή επίδραση του καπνίσματος τόσο σε ενεργούς όσο και σε παθητικούς



καπνιστές είναι γνωστό και αποτελεί σοβαρό ζήτημα δημόσιας υγείας. Το κάπνισμα του τσιγάρου σκοτώνει 6 εκατομμύρια ανθρώπους κάθε χρόνο (Araújo & Costa, 2019). Το κάπνισμα αποτελεί μια θανατηφόρα και εθιστική συνήθεια για την οποία οι καπνιστές συνήθως αγνοούν τις βαρυσήμαντες επιπτώσεις του. Κατά την εισπνοή του καπνού ακολουθούνται τα ίδια βήματα με αυτά της αναπνοής του οξυγόνου. Αν και η νικοτίνη είναι εθιστική, οι περισσότερες από τις σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία προέρχονται από άλλες χημικές ουσίες. Το κάπνισμα μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο του πνεύμονα, χρόνια βρογχίτιδα και εμφύσημα. Αυξάνει τον κίνδυνο καρδιακής νόσου, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε εγκεφαλικό επεισόδιο ή καρδιακή προσβολή. Ακόμα οι άνθρωποι που στέκονται ή κάθονται κοντά σε άλλους που καπνίζουν εκτίθενται σε παθητικό κάπνισμα. Η έκθεση σε παθητικό κάπνισμα μπορεί επίσης να οδηγήσει σε καρκίνο του πνεύμονα και καρδιακές παθήσεις. Μπορεί να προκαλέσει προβλήματα υγείας τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά, όπως βήχας, φλέγμα, πνευμονία και βρογχίτιδα (January, 2020). Τέλος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) καθημερινά ένας στους δέκα θανάτους αποδίδεται σε ασθένειες που οφείλονται στο κάπνισμα, ενώ έχει υπολογιστεί ότι μέχρι το 2030 η αναλογία θα μετατραπεί σε έναν προς έξι θανάτους (Araújo & Costa, 2019).

### **1.5 Επιπτώσεις στα ύδατα και στο περιβάλλον**

Τα φίλτρα προϊόντων καπνού που περιέχουν πλαστική ύλη και κατέχουν τη δεύτερη θέση μεταξύ των πλαστικών αντικειμένων μίας χρήσης που εμφανίζονται συχνότερα σε παραλίες στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Council, 2019).

Μία περιβαλλοντική συνέπεια της χρήσης προϊόντων καπνού είναι η διάθεση των αποτσίγαρων. Πάνω από πέντε τρισεκατομμύρια υπολείμματα τσιγάρων βρίσκονται στο περιβάλλον με κάθε ένα φίλτρο να μένει αναλλοίωτο στο περιβάλλον για περισσότερο από ένα χρόνο. Τα αποτσίγαρα είναι τα πιο συνηθισμένα αντικείμενα που βρίσκουμε στις παραλίες και μπορούν να προκαλέσουν κίνδυνο για τον άνθρωπο και την άγρια φύση (Porpendieck et al., 2020). Συμπαρασύρονται με το νερό της βροχής με αποτέλεσμα να καταλήγουν σε ρυάκια και ποτάμια με τελικό σταθμό τις θάλασσες και τους ωκεανούς. Πέραν του ότι και στα θαλάσσια οικοσυστήματα τα αποτσίγαρα μπορούν να καταναλωθούν ως τροφή με καταστροφικές συνέπειες για

τους θαλάσσιους οργανισμούς, αξίζει να σημειωθεί πως ο εμποτισμός του αποτσίγαρου με νερό προκαλεί σταδιακή απορροή των χημικών ουσιών και άμεση απελευθέρωση βλαβερών ουσιών. Μια πρόσφατη μελέτη που διεξάχθηκε στο Πανεπιστήμιο του Βερολίνου και σύμφωνα με την έρευνα του Green εκτιμά ότι μια γόπα μπορεί να μολύνει μέχρι και 1000 λίτρα νερού (Araújo & Costa, 2019). Ωστόσο, οι πολυάριθμες χημικές ουσίες που απαντώνται στον καπνό των τσιγάρων και παράγονται κατά την καύση του καπνού είναι πιθανό να είναι επιβλαβείς για το περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένων φυτοφαρμάκων, ζιζανιοκτόνων και εντομοκτόνων, που χρησιμοποιούνται στη γεωργική παραγωγή προϊόντων καπνού. Ο καπνός περιέχει, μεταξύ άλλων τοξικών ουσιών, νικοτίνη (χημική ουσία που χρησιμοποιείται επίσης σε φυτοφάρμακα), πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες, διάφορες καρκινογόνες νιτροζαμίνες, αμμωνία, ακεταλδεΐδη, φορμαλδεΐδη, φαινόλη, πυριδίνες, ακετόνη και βαρέα μέταλλα (κάδμιο, μόλυβδος, χρώμιο, υδράργυρος). Φυσικά η γόπα αποτελείται από νικοτίνη και πίσσα. Χωρίς να ξεχνάμε βέβαια, ότι το φίλτρο του τσιγάρου όπως έχουμε ήδη αναφέρει αποτελείται από οξική κυτταρίνη, ένα μη βιοδιασπώμενο πλαστικό υλικό (Novotny & Slaughter, 2014).

Οι χημικές ουσίες που εκλύονται από τα υπολείμματα των τσιγάρων είναι τοξικές για τους υδρόβιους οργανισμούς. Τα συστατικά αυτά επιφέρουν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας στα ψάρια και στα αμφίβια. Στα θηλαστικά προκαλεί αλλαγή στο βάρος και στη σύνθεση του σώματός τους, νευροτοξικότητα και αλλαγές συμπεριφοράς. Μια μόνο γόπα τσιγάρου μπορεί να είναι ικανή να αποδεκατίσει τον μισό πληθυσμό ψαριών που κολυμπούν σε ένα λίτρο νερό. Αυτό ανακάλυψαν οι ερευνητές του κρατικού πανεπιστημίου του Σαν Ντιέγκο, το 2011, σε μελέτη θαλάσσιων ψαριών αλλά και ψαριών του γλυκού νερού (Montalvão et al., 2019).

Τα υπολείμματα των τσιγάρων αποτελούν επίσης σημαντική απειλή για το περιβάλλον μας από την άποψη της πυρκαγιάς. Κάθε χρόνο, οι δασικές πυρκαγιές καταστρέφουν μεγάλες εκτάσεις, εξοντώνοντας την άγρια φύση και τη βλάστηση που χρειάζονται χρόνια για να επιστρέψουν (Martin, 2020).

## **Κεφάλαιο 2 Βιοδείκτες**

### **2.1 Εισαγωγή στους Βιοδείκτες**

Οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της υγείας του περιβάλλοντος και είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την ανίχνευση αλλαγών στο περιβάλλον, είτε θετικών είτε αρνητικών και των επακόλουθων επιπτώσεών τους στην ανθρώπινη κοινωνία. Υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες που διέπουν την παρουσία του βιοδείκτη στο περιβάλλον όπως η μετάδοση φωτός, νερού, θερμοκρασίας και αιωρούμενων στερεών. Μέσω της εφαρμογής των βιοδεικτών μπορούμε να προβλέψουμε τη φυσική κατάσταση μιας συγκεκριμένης περιοχής ή το επίπεδο, βαθμό μόλυνσης. Ένας βιοδείκτης μπορεί να είναι οποιοσδήποτε οργανισμός, μικρόβιο, φυτό, μύκητες ή ζώο (Parmar et al., 2016).

Ακόμα περιλαμβάνουν βιολογικές διεργασίες, είδη ή κοινότητες και χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ποιότητας του περιβάλλοντος και του τρόπου με τον οποίο αλλάζει με την πάροδο του χρόνου. Οι μεταβολές στο περιβάλλον συχνά αποδίδονται σε ανθρωπογενείς διαταραχές (π.χ. ρύπανση, αλλαγές στη χρήση γης) ή σε φυσικούς παράγοντες επιβάρυνσης (π.χ. ξηρασία) αν και οι ανθρωπογενείς παράγοντες άγχους αποτελούν την κύρια εστίαση της έρευνας για βιοδείκτες. Η ευρεία ανάπτυξη και εφαρμογή των βιοδεικτών προέκυψε κυρίως από τη δεκαετία του 1960. Με τα χρόνια, έχουμε επεκτείνει τη ποικιλία τους για να μας βοηθήσουν στη μελέτη όλων των τύπων περιβάλλοντος (δηλαδή υδάτινων και χερσαίων), χρησιμοποιώντας όλες τις μεγάλες ομάδες της τροφικής αλυσίδας (Holt, 2010).

### **2.2 Τύποι βιοδεικτών και οι χρήσεις τους**

- **Μικροβιακοί δείκτες:**

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της υγείας των υδατικών ή των χερσαίων οικοσυστημάτων. Οι μικροοργανισμοί έχουν ταχύ ρυθμό ανάπτυξης και αντιδρούν ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα μολυσματικών ουσιών και άλλων φυσικοχημικών και βιολογικών αλλαγών. Για παράδειγμα, μπορούν να

χρησιμοποιηθούν μικροβιακοί δείκτες για τη δοκιμή του νερού και βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δοκιμή νερού για περιβαλλοντικές τοξίνες. Εάν υπάρχουν τοξίνες στο νερό, ο κυτταρικός μεταβολισμός των βακτηρίων αναστέλλεται ή διακόπτεται. Αυτό επηρεάζει το ποσό του φωτός που εκπέμπεται από τα βακτήρια. Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές δοκιμές, αυτή είναι πολύ γρήγορη από πέντε έως τριάντα λεπτά για να ολοκληρωθεί. Ωστόσο, δείχνει μόνο την παρουσία μιας τοξίνης που προκαλεί την αλλαγή στον οργανισμό (MANICKAVASAGAM et al., 2019).

- **Φυτοπλαγκτόν και άλγη-φύκια:**

Η παρουσία ή η απουσία κάποιας φυτικής ή άλλης φυσικής ζωής σε ένα οικοσύστημα μπορεί να προσφέρει σημαντικές ενδείξεις για την υγεία του περιβάλλοντος. Τα φυτοπλαγκτόν έχουν χρησιμοποιηθεί ως η πιο επιτυχημένη παρατήρηση της μόλυνσης των υδάτων και αποτελούν χρήσιμο δείκτη ποιότητας των υδάτων. Είναι βαθιά ευαίσθητα στη φυσική αλλαγή και είναι οι καλύτεροι δείκτες νερού για την ποιότητα και ιδιαίτερα τις συνθήκες της λίμνης. Τον τελευταίο καιρό, λόγω της εκβιομηχάνισης και της αστικοποίησης, το πρόβλημα της μόλυνσης και της ρύπανσης των υδάτων έχει γίνει εντονότερο. Τα θαλάσσια φυτά παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την πρόβλεψη της κατάστασης του ωκεάνιου περιβάλλοντος, καθώς είναι ακίνητα και γρήγορα επιτυγχάνουν ισορροπία με το φυσικό τους περιβάλλον. Για παράδειγμα οι λειχήνες που βρίσκονται γενικά στους κορμούς των δέντρων και των πετρωμάτων αποτελούνται από φύκια και μύκητες. Αντιδρούν στις οικολογικές αλλαγές στα δάση, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στη δομή του δάσους, την ποιότητα του αέρα και το κλίμα. Η περιβαλλοντική καταπόνηση μπορεί να υποδεικνύεται από την εξαφάνιση των λειχήνων στα δάση, όπως προκαλείται από αλλαγές όπως η αύξηση του επιπέδου του διοξειδίου του θείου ( $\text{SO}_2$ ), των ρύπων θείου και αζώτου ( $\text{N}_2$ ) (MANICKAVASAGAM et al., 2019) (Parmar et al., 2016).

- **Ζώα**

Οι μεταβολές στους πληθυσμούς των ζώων ενδέχεται να υποδηλώνουν επιβλαβείς αλλαγές που προκαλούνται λόγω ρύπανσης στο οικοσύστημα. Οι μεταβολές της πυκνότητας πληθυσμού ενδέχεται να υποδηλώνουν αρνητικές επιπτώσεις στο

οικοσύστημα. Μπορεί να οφείλονται στη σχέση μεταξύ πληθυσμών και πηγών τροφίμων, εάν οι πόροι των τροφίμων γίνουν σπάνιοι και δεν μπορούν να εξασφαλίσουν την πληθυσμιακή ζήτηση θα μειωθεί η ζήτηση του εν λόγω πληθυσμού. Οι δείκτες των ζώων βοηθούν επίσης στην ανίχνευση της ποσότητας των τοξινών που υπάρχουν στους ιστούς των ζώων. Για παράδειγμα οι βάτραχοι είναι επίσης βιοδείκτες της ποιότητας του περιβάλλοντος και των αλλαγών στο περιβάλλον. Οι βάτραχοι επηρεάζονται βασικά από τις αλλαγές που συμβαίνουν στα γλυκά ύδατα και τα χερσαία ενδιαίτηματα. Ακόμα και τα ασπόνδυλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες (Parmar et al., 2016).

### **2.3 Βιοδοκιμές**

Οι βιοδοκιμές (bioassays) είναι αναλυτικοί μέθοδοι για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ή της ισχύος μιας ουσίας με την επίδρασή της στα ζωντανά κύτταρα ή τους ιστούς. Ακόμα είναι ποσοτικοί βιολογικοί προσδιορισμοί που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των παραγόντων παρατηρώντας τις επιδράσεις τους σε συστήματα ζώων ή σε συστήματα ιστοκαλλιέργειας/κυτταροκαλλιέργειας.

Ένα πείραμα βιοδοκιμής μπορεί να είναι είτε ποιοτικό είτε ποσοτικό, άμεσο ή έμμεσο. Χρησιμοποιούνται συχνά για την παρακολούθηση της ποιότητας των υδάτων και της απόρριψης των λυμάτων και των επιπτώσεών της στο περιβάλλον (History et al., 2020).

Είναι τεστ τοξικότητας που γίνονται στα πλαίσια της οικοτοξικολογίας και υδατικής τοξικολογίας, χρησιμοποιούνται έμβιοι οργανισμοί ως δείκτες για την μέτρηση τοξικότητας χημικών ουσιών.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες βιοδοκιμών οι άμεσες και οι χρόνιες. Οι άμεσες μπορούν να διαρκέσουν μέχρι 96h και η θνησιμότητα είναι το μετρήσιμο μέγεθος ενώ οι χρόνιες είναι μακροπρόθεσμα πειράματα όπου εκτός από την θνησιμότητα μετρούνται και άλλες μη θανάσιμες επιδράσεις στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των οργανισμών.

Τα κριτήρια επιλογής ενός πειράματος προσδιορισμού τοξικότητας είναι:

- Πρέπει να μην είναι χρονοβόρο και να μην κοστίζει πολύ
- Ο οργανισμός ως δείκτης πρέπει να είναι κατά το δυνατό ευαίσθητος
- Πρέπει να υπάρχει επαναληψιμότητα στα αποτελέσματα
- Πρέπει να υπάρχει δυνατότητα να γίνονται πολλά πειράματα, ώστε να μπορούν να ελεγχθεί κάθε νέα ουσία.

Τα πιο διαδεδομένα πειράματα προσδιορισμού τοξικότητας στην Υδατική Τοξικολογία είναι:

1. Το πείραμα ακινητοποίησης της *D. magna* (24 or 48h acute immobilization test), το οποίο έχει το βασικό πλεονέκτημα ότι μετρήσεις γίνονται με γυμνό οφθαλμό.
2. Το Microtox test. Είναι ένα πολύ σύντομο τεστ (15-30 λεπτά), στο οποίο μετράται η αναστολή στη βιοφωταύγεια του βακτηρίου *V. fischeri*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν την ικανότητα να εκπέμπουν βιοφωταύγεια. Το τεστ μετρά την αναστολή στην ικανότητα αυτή που προκαλείται από τοξικές ουσίες. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο μικροοργανισμός *V. fischeri* ζει στη θάλασσα. Άλλα πειράματα είναι το πείραμα της επίδρασης στην ανάπτυξη του μικροφύκου *Chlorella ellipsoidea*, τα πειράματα με ψάρια και με καλλιεργημένα κύτταρα ψαριών, τα πειράματα με τους οργανισμούς *Brahionus plicatilis* και *Artemia franciscana* (Κούγκολος, 2007).

Στην πραγματικότητα, η χρήση οργανισμών που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά τροφικά επίπεδα ή ενδιαιτήματα και έχουν διαφορετική ευαισθησία έναντι των τοξικών ουσιών, επιτρέπει την πλήρη αξιολόγηση της πιθανής τοξικότητας των μολυσματικών ουσιών (Costa et al., 2015).

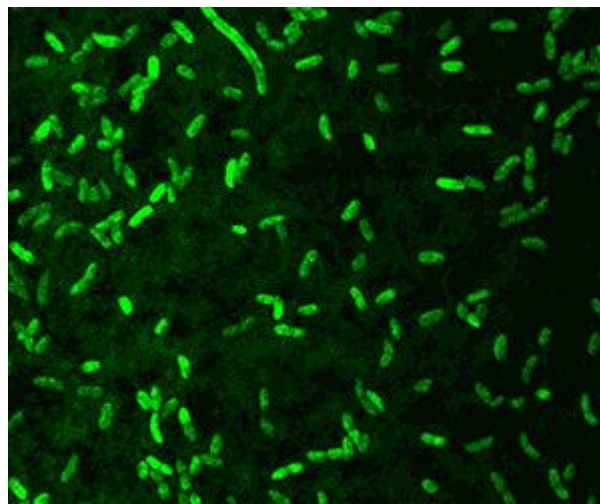
Στη συγκεκριμένη εργασία έγιναν βιοδοκιμές με το βακτήριο *V. fischeri* που ανήκει στο τροφικό επίπεδο των αποικοδομητών και με τον μικροοργανισμό *D. magna* που ανήκει στο τροφικό επίπεδο των καταναλωτών.

## 2.4 *Vibrio fischeri*

Τα βακτήρια *V. fischeri* είναι Gram-αρνητικά κινούμενα βακτήρια με χρωστική ουσία. Βρίσκονται στα περισσότερα θαλάσσια περιβάλλοντα, αλλά δεν είναι άφθονα. Δεν υπάρχει καμία ένδειξη ότι το βακτήριο προκαλεί ασθένεια σε ανθρώπους ή άλλους οργανισμούς, αλλά περιέχει ίδιου τύπου γονίδια τοξίνης που απαντώνται σε όλα τα

είδη *Vibrio*. Η πιο σημαντική του ικανότητα είναι να λάμπει στο σκοτάδι και να ζει μέσα σε διάφορους θαλάσσιους οργανισμούς (Know & Hawaiian, 2020).

Μία σημαντική μέθοδος για την ταχεία και αποτελεσματική εκτίμηση της τοξικότητας είναι ο προσδιορισμός αναστολής βιοφωταύγειας ο οποίος χρησιμοποιεί ως δοκιμαστικό είδος ένα θαλάσσιο gram αρνητικό βακτήριο, το *Aliivibrio fischeri* (πρώην *V. fischeri*). Η παραγωγή φωτός είναι άμεσα ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας του βακτηριακού πληθυσμού και οποιαδήποτε αναστολή της ενζυματικής δραστηριότητας, λόγω τοξικότητας ή κυτταρικού θανάτου προκαλεί αντίστοιχη μείωση της βιοφωταύγειας που παράγεται από την αποικία (Tests & Fischer, n.d.).



Εικόνα 6: Καλλιέργεια *V. fischeri* από μικροσκόπιο στο σκοτάδι

[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio\\_fischeri](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio_fischeri)

## 2.5 *Daphnia magna*

Η *D. magna* είναι ένας καρκινοειδής, πολυκύτταρος οργανισμός, είδος ζωοπλαγκτόν και απαντάται κυρίως σε γλυκά νερά (λίμνες, ποτάμια). Κατά τη γέννησή της έχει μήκος περίπου 0.5 mm και κατά την ενηλικίωση αποκτά μήκος περίπου 5mm. Χαρακτηριστικό του είδους είναι η εξαιρετική ευαισθησία στις οργανικές τοξικές ουσίες και στα μεταλλικά ιόντα (Hemisphere et al., 2020).

Το σώμα τους περιβάλλεται από μια διαφανή δομή που μοιάζει με κέλυφος, που αποτελείται κυρίως από χιτίνη. Λόγω του διαφανούς κελύφους του, αυτό το είδος τείνει να είναι το χρώμα της τροφής που καταναλώνει. Το κέλυφος επεκτείνεται στις ασπίδες κεφαλής, ένα σημαντικό χαρακτηριστικό αυτού του είδους. Έχουν δύο σειρές από μακριές, διπλά διακλαδισμένες κεραίες και έξι θωρακικά εξαρτήματα που συγκρατούνται στο εσωτερικό του κελύφους και βοηθούν στην παραγωγή ρεύματος νερού, μεταφέροντας τρόφιμα και οξυγόνο στο στόμα και τα βράγχια. Έχουν επίσης δύο μεγάλα νύχια, που χρησιμοποιούνται κυρίως για τον καθαρισμό του κελύφους. Έχουν ένα σύνθετο μάτι, το οποίο εμφανίζεται ως πρόσθιο σκοτεινό σημείο, και ένα απλό μάτι (Museum, 2020).

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων προσδιορισμού τοξικότητας με *D. magna*, ελέγχεται το ποσοστό των ζώων που έχουν ακινητοποιηθεί (συνήθως ακινησία σημαίνει και θάνατος) 24 και 48h μετά την έκθεσή τους σε τοξικές ουσίες. Η εκτίμηση της οξείας τοξικότητας πραγματοποιείται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (αραιώσεις) του κάθε αποβλήτου. Εφόσον μετρήσουμε τις ακινητοποιημένες μονάδες υπολογίζουμε το LC<sub>50</sub> (Lethal Concentration), δηλαδή τη συγκέντρωση του αποβλήτου που μειώνει τον πληθυσμό των *D. magna* κατά 50%.



Εικόνα 7:Θηλυκιά *D. magna* με αυγά στο εσωτερικό της

<https://www.flickr.com/photos/dullhunk/5612935010/lightbox/>



## 2.6 Κατηγορίες τοξικότητας και τοξικολογικοί όροι

Με βάση την πολυετή εμπειρία των τοξικολόγων, οι τοξικές χημικές ουσίες χωρίζονται σε 4 κατηγορίες:

1. Πολύ τοξικές: <50 mg/kg (LD<sub>50</sub> oral), <200 mg/kg (LD<sub>50</sub> dermal)
2. Μετρίως τοξικές 51-500 mg/kg (LD<sub>50</sub>oral), 200-2000 mg/kg (LD<sub>50</sub>dermal, για το δέρμα).
3. Ελαφρώς τοξικές: > 500 mg/kg(LD<sub>50</sub> oral , > 2000 mg/kg(LD<sub>50</sub> dermal) .
4. Μη τοξικές: για υψηλότερες συγκεντρώσεις του ενός γραμμαρίου ανά μονάδα βάρους (συνήθως 1 κιλό).

Τα τελευταία χρόνια έχουν επικρατήσει διάφοροι τοξικολογικοί όροι:

- LD<sub>50</sub> (mean lethal dose for 50% mortality), θανατηφόρος δόση 50%
- LC<sub>50</sub> (mean lethal concentration for 50% mortality), θανατηφόρος συγκέντρωση 50%
- EC<sub>50</sub> (effect concentration 50%, concentration that causes an effect, not death, on 50% of tested organisms), συγκέντρωση πρόκλησης αποτελέσματος σε 50% του οργανισμού-πειραματόζωου
- LED<sub>10</sub> (effective dose corresponding to the lower 95% confidence limit on a dose associated with 10% response), αποτελεσματική δόση με 95% όρια αξιοπιστίας για δόση που ανταποκρίνεται σε 10% αποτέλεσμα (θνησιμότητα)
- IC<sub>50</sub> (inhibitory concentration that reduces the normal response, growth rates of algae, bacteria and other organisms by 50%), δόση αναστολής 50%, δοκιμασία για την ανάπτυξη βακτηρίων, φίκους και άλλων οργανισμών
- NOEC (No observed effects concentration, determined by graphical or statistical methods), συγκέντρωση μη παρατηρούμενου αποτελέσματος
- NOEL (No observed effects level, parameter as a dose), επίπεδο (mg/kg) μη παρατηρούμενου αποτελέσματος (βλάβη στην υγεία οργανισμού)
- NOAEC (No observed adverse effects concentration, the effect is usually chosen for its impact upon the species tested), συγκέντρωση με μη παρατηρούμενη επίδραση σε συγκεκριμένο παράγοντα υγείας οργανισμού
- NOAEL (No observed adverse effect level), επίπεδο με μη παρατηρούμενες αρνητικές συνέπειες
- LOEC (Lowest observed effects concentration), χαμηλότερη συγκέντρωση όπου παρατηρείται αποτέλεσμα (βλάβη στον ζωντανό οργανισμό)
- LOEL (Lowest observed effects level), χαμηλότερο επίπεδο όπου παρατηρείται

- TLV (Threshold Limit Value), Οριακή Τιμή Κατωφλίου, για το εργασιακό περιβάλλον (American Conference Governmental Industrial Hygienists) (Βαλαβανίδης, 2008)

### Κεφάλαιο 3 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη και η αξιολόγηση της τοξικότητας υδατικών εκπλυμάτων από χρησιμοποιημένα και μη προϊόντα καπνού. Επίσης έγινε και μελέτη της τοξικότητας υδατικού διαλύματος νικοτίνης.

Τα προϊόντα καπνού που εξετάστηκαν ήταν συμβατικά τσιγάρα Marlboro Red Label και τα νέα προϊόντα καπνού tobacco sticks (HEETS Red Label, TSAL) από την Philip Morris Products S.A.

Η εκτίμηση τοξικότητας πραγματοποιήθηκε σε οργανισμούς δύο τροφικών επιπέδων και συγκεκριμένα των καταναλωτών και των αποικοδομητών. Γι' αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκαν δύο βιοδοκιμές-τεστ τοξικότητας, χρησιμοποιώντας τους οργανισμούς *Daphnia magna* (καταναλωτής) και *Vibrio fischeri* (αποικοδομητής – βακτήριο).

Απώτερος στόχος ήταν η εκτίμηση τοξικότητας των προϊόντων καπνού και η επίδρασή τους στο περιβάλλον.

## Κεφάλαιο 4 Πειραματική Διαδικασία

### 4.1 Επιστημονικός εξοπλισμός

#### 4.1.1 Μηχανή Καπνίσματος

Η διαδικασία για την προετοιμασία των χρησιμοποιημένων προϊόντων καπνού έγινε με τη χρήση της μηχανής καπνίσματος από τη Burghart (Wedel, Germany) (εικόνα 8). Ανάλογα με το κάθε είδος του τσιγάρου που θα χρησιμοποιούνταν η μηχανή προγραμματίστηκε κατάλληλα με διαφορετικές παραμέτρους για το συμβατικό τσιγάρο και αντίστοιχα για τα tobacco sticks. Για τα tobacco sticks (HEETS Red Label, TSAL) η μηχανή ρυθμίστηκε σύμφωνα με το πρότυπο υγείας του Καναδά (Health Canada Intense, HCI) και για την θέρμανση των tobacco sticks χρησιμοποιήθηκε η ράβδος θέρμανσης IQOS™ 2.4 Plus. Αντίστοιχα, για τα συμβατικά τσιγάρα η ρύθμιση έγινε με βάση το πρωτόκολλο ISO 3308:2012, ενώ για την ανάφλεξη των τσιγάρων χρησιμοποιήθηκε αναπτήρας χωρίς φλόγα. Επίσης στα συμβατικά τσιγάρα το επιθυμητό μήκος μετά από το ‘κάπνισμα’ του τσιγάρου από τη μηχανή πρέπει να είναι 3mm από το φίλτρο. Η μηχανή είχε μόνο μια είσοδο στην οποία μπορούσε να καπνίζεται ένα προϊόν τη φορά και βρισκόταν μέσα σε απαγωγό για να μην εισέρχεται ο καπνός στο χώρο του εργαστηρίου (Koutela et al., 2020).



Εικόνα 8: Μηχανή καπνίσματος από τη Burghart

Στον πίνακα 1 φαίνονται οι παράμετροι για κάθε τύπο προτύπου και για κάθε δείγμα αντίστοιχα.

*Πίνακας 1: Παράμετροι για κάθε τύπο προτύπου*

	<b>Πρότυπο υγείας του Καναδά Health Canada Intense, HCI</b>	<b>Πρωτόκολλο ISO 3308:2012</b>
<b>Puff volume</b>	35 mL	55 mL
<b>Puff duration</b>	2 s	2 s
<b>Puff period</b>	30 s	60 s

#### **4.1.2 Υλικά, όργανα και συσκευές**

- ❖ Συμβατικά τσιγάρα Marlboro Red Label (Conventional Cigarettes, CC)
- ❖ IQOS sticks με αλουμίνιο (HEETS Red Label, TSAL)
- ❖ Ράβδος θέρμανσης IQOS™ 2.4 Plus από τη Philip Morris Products (Neuchatel, Switzerland)
- ❖ Υπερκάθαρο νερό από σύστημα καθαρισμού ύδατος Barnstead EASY pureRF, από την εταιρεία Thermo Scientific (Dubuque, USA).
- ❖ Φίλτρα πορώδους 0,45μm από την εταιρεία Whatman (Dassel, Germany)
- ❖ Συσκευή διήθησης κενού, Pall, German Laboratory
- ❖ Shaker orbital του οίκου Heidolph, Unimax 1010 (Essex, UK)
- ❖ Αποστειρωμένα τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm
- ❖ Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific Heraeus)
- ❖ Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa)
- ❖ Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης (Elvem K103)
- ❖ Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu UVmini 1240)
- ❖ Θρεπτικό υλικό Nutrient Agar (Lab M)
- ❖ Θρεπτικό υλικό Nutrient Broth (Himedia)
- ❖ Φασματοφωτόμετρο (Ependorf, Biophotometer)

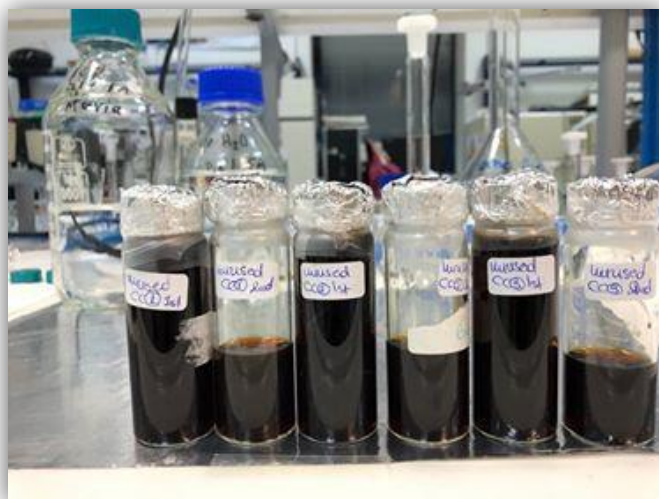
- ❖ Υλικά που περιείχε το Daphtoxkit F Magna
  - Έξι πλαστικά σωληνάρια 1 mL που καλύπτονται από αλουμινόχαρτο, που περιείχαν τα αυγά της *D. magna*
  - Συμπυκνωμένα διαλύματα άλατος: δύο σετ από 4 μικρές γυάλινες φιάλες, καθένα από τα οποία περιέχει ένα συμπυκνωμένο διάλυμα άλας
  - Τρυβλία Petri: έξι τρυβλία πολυστυρενίου Petri με διάμετρο 5 cm, για την εκκόλαψη των αυγών
  - Δοκιμαστικές πλάκες: έξι πλατό βιοδοκιμής που αποτελούνταν από 6 πηγάδια έκπλυσης και 24 πηγάδια για τοξικές ουσίες
  - Φιαλίδια με σκόνη σπιρουλίνας: έξι πλαστικά σωληνάρια 1 mL που περιέχουν μικρή ποσότητα σκόνης σπιρουλίνας
  - Ζώνες Parafilm: έξι ταινίες Parafilm για τη σφράγιση των πλακών πολλαπλών κελιών για την ελαχιστοποίηση της εξάτμισης κατά τη περίοδο επώασης
  - Μικροπιπέτες: έξι μικροπιπέτες πολυαιθυλενίου για τη μεταφορά των οργανισμών
  - Microsieve: ένα μικρό κόσκινο με πλέγμα για ξέπλυμα των αυγών

#### **4.2 Πειραματική Διαδικασία για τη δημιουργία υδατικών εκπλυμάτων από προϊόντα καπνού**

Στα πειράματα για την μελέτη της τοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα τα αχρησιμοποίητα συμβατικά τσιγάρα ενώ τα χρησιμοποιημένα ήταν μέχρι 3 mm από το φίλτρο. Τα προϊόντα καπνού που χρησιμοποιήθηκαν (tobacco sticks, συμβατικά τσιγάρα) ήταν κλεισμένα μέσα στη συσκευασία τους μέχρι τη χρήση τους. Για τα αχρησιμοποίητα συμβατικά τσιγάρα και τα tobacco sticks χρησιμοποιημένα και μη χρησιμοποιήθηκαν 12 τσιγάρα από το κάθε είδος σε 93 mL όγκου νερού. Αντίστοιχα, στα χρησιμοποιημένα συμβατικά τσιγάρα τοποθετήθηκαν 30 τσιγάρα μέσα σε 75 mL υπερκάθαρου νερού. Οι αναλογίες αυτές έγιναν ώστε ο λόγος L/S όπου L είναι το υγρό δηλαδή το υπερκάθαρο νερό και S το στερεό δηλαδή η μάζα των τσιγάρων, να παραμείνει σταθερός και να είναι περίπου 10L/kg (Council, 2019).

Στην αρχή τα προϊόντα καπνού τοποθετήθηκαν σε υπερκάθαρο νερό 93 mL ή 75 mL αντίστοιχα ανάλογα με το είδος τους. Τα προϊόντα καπνού αφήνονταν για 24h ώστε να γίνει η έκπλυση σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και σε ταχύτητα 180 rpm (εικόνα 11).

Μετά το χρονικό διάστημα των 24 h γινόταν διήθηση των δειγμάτων από τη συσκευή διήθησης κενού (εικόνα 12). Το πορώδες του φίλτρου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,45  $\mu\text{m}$ .



*Εικόνα 9: Δείγματα υδατικών εκπλυμάτων από ακρησιμοποιήτα συμβατικά τσιγάρα*



Εικόνα 10: Χρησιμοποιημένα τσιγάρα έως 3 mm από το φίλτρο



Εικόνα 11: Διαδικασία ανάδευσης των δειγμάτων σε 180 rpm





Εικόνα 12: Διαδικασία διήθησης των δειγμάτων μετά το πέρας της έκπλυσης με τη βοήθεια συσκευής διήθησης.

### 4.3 *Vibrio fischeri*

#### 4.3.1 Ενεργοποίηση *V. fischeri*

Το *V. fischeri* είναι ένα απομονωμένο στέλεχος του εργαστηρίου 'Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας' που βρισκόταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε βαθιά κατάψυξη.

Για την ενεργοποίηση του *V. fischeri* τοποθετείται η αμπούλα που βρίσκεται στην κατάψυξη στον εργαστηριακό πάγκο ώστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια με κρίκο εμβολιασμού καλλιεργείται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό Nutrient Agar και ακολουθεί επώαση στους  $30^{\circ}\text{C}$  και για χρονικό διάστημα 18-24 h.

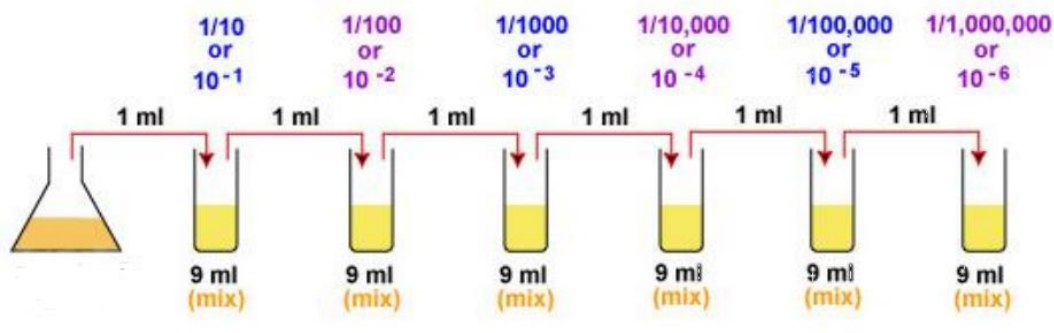
#### 4.3.2 Προετοιμασία εναιωρήματος

Το βακτηριακό εναιώρημα παρασκευάζεται σε Nutrient Broth και ακολουθεί φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσής του σύμφωνα με την κλίμακα McFarland. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται στα 600 nm, όπου η τιμή

απορρόφησης 0,1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση βακτηρίου ίση με  $10^8$  CFUs/mL. Με διαδοχικές αραιώσεις επιτυγχάνεται η επιθυμητή τελική συγκέντρωση εναιωρήματος που θα πρέπει να είναι ίση με  $10^6$  CFUs/mL.

#### 4.3.3 Πειραματική διαδικασία

Προκειμένου να αρχίσει η πειραματική διαδικασία ήταν απαραίτητο να δημιουργηθούν οι κατάλληλες αραιώσεις του κάθε δείγματος. Με αποστειρωμένες πιπέτες των 10 mL για την κάθε αραιώση τοποθετούνται 9mL Nutrient Broth και 1mL από το έκπλυμα του κάθε προϊόντος καπνού. Με τη μέθοδο των δεκαδικών αραιώσεων δημιουργούνται αντίστοιχα οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Μετά από τη δημιουργία του εναιωρήματος τοποθετούνται με μικροπιπέτα 90μL σε κάθε συγκέντρωση. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων υπάρχει ένα δείγμα control που περιέχει 9mL Broth και 90μL από το εναιώρημα του βακτηρίου *V. fischeri*. Τέλος επωάζονται για 24h στο θάλαμο επώασης στους 30°C.



Εικόνα 13: Μέθοδος δεκαδικών αραιώσεων

[https://mediasrv.aua.gr/eclass/modules/document/file.php/BIOTECH154/lab2\\_sampling.pdf](https://mediasrv.aua.gr/eclass/modules/document/file.php/BIOTECH154/lab2_sampling.pdf)

Έπειτα γίνεται η τεχνική της επίστρωσης τρυβλίων με κρίκο εμβολιασμού. Με μικροπιπέτα τοποθετούνται 300μL σε τρυβλία Petri που περιείχαν το θρεπτικό υλικό Nutrient Agar. Το τρυβλίο πρέπει να είναι σχεδόν σκεπασμένο και με απαλές κινήσεις με τον κρίκο εμβολιασμού επιστρώνεται το δείγμα στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού, περιστρέφοντας το τρυβλίο κατά 180° συνεχίζοντας με τις ίδιες κινήσεις για να ολοκληρωθεί η επίστρωση σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Αφού τοποθετηθεί το

καπάκι τα τρυβλία αφήνονται για 20 λεπτά περίπου προκειμένου να ενσωματωθεί στο θρεπτικό υλικό το δείγμα. Στη συνέχεια τοποθετούνται ανεστραμμένα στο θάλαμο επώασης για 24h και σε θερμοκρασία 30°C. Έπειτα γίνεται η εκτίμηση του πληθυσμού του βακτηρίου με τη μέθοδο μέτρησης αποικιών. Η κάθε αποικία έχει προέλθει από ένα μικροβιακό κύτταρο ή συσσωματώματα κυττάρων (colony forming units, CFUs). Μετρώντας τον αριθμό των αποικιών είναι γνωστός ο αριθμός των κυττάρων ή των CFUs από τα οποία προέκυψαν οι αποικίες.

Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία στα περισσότερα δείγματα ο αριθμός των αποικιών ήταν μεγάλος και δεν μπορούσαν να μετρηθούν. Μόνο σε ορισμένα δείγματα στα οποία έγιναν ξανά διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις μέχρι να προκύψει μετρήσιμος αριθμός αποικιών.

#### **4.3.4 Φωτομέτρηση**

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό της τοξικότητας για όλα τα δείγματα είναι η φωτομέτρηση. Ο μηδενισμός του φωτόμετρου γίνεται με Nutrient Broth και λειτουργεί στα 600 nm. Για να υπολογιστεί η απορρόφηση του μικροοργανισμού και κατά πόσο αναπτύσσεται ή όχι γίνονται κάποιες καινούργιες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Οι αραιώσεις αυτές συμπεριλαμβάνουν μόνο το δείγμα και Nutrient Broth χωρίς την παρουσία του μικροοργανισμού. Στην κυψελίδα τοποθετούνται 2mL από το κάθε δείγμα πολύ προσεκτικά για να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες και ύστερα σκουπίζοντας τα πλαϊνά τοιχώματα τοποθετούνται στην ειδική θήκη του φωτόμετρου. Ύστερα μετριέται η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων που έχουν επωαστεί μετά από 24h καθώς και του control. Επίσης, μετριέται η οπτική απορρόφηση των νέων διαδοχικών αραιώσεων χωρίς τον μικροοργανισμό. Αφαιρώντας τις τιμές των δύο απορροφήσεων και συγκρίνοντας με την απορρόφηση του control διαπιστώνεται αν αναπτύσσεται το βακτήριο *V. fischeri* και η τοξικότητα του δείγματος αντίστοιχα.

#### 4.4 *Daphnia magna*

Χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο το Daphtoxkit F Magna το οποίο περιείχε τα απαραίτητα υλικά για το τεστ τοξικότητας. Οι δοκιμές Daphtoxkit εκτελούνται σύμφωνα με τις προδιαγεγραμμένες διαδικασίες δοκιμών από εθνικούς και διεθνείς οργανισμούς (π.χ. OECD, ISO, EEC, USEPA,ASTM). Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία εκτός από τα υδατικά εκπλύματα χρησιμοποιημένων και αχρησιμοποίητων προϊόντων καπνού, χρησιμοποιήθηκε ακόμη ένα υδατικό διάλυμα νικοτίνης σε υπερκάθαρο νερό για να ελεγχθεί η τοξικότητά του.



Εικόνα 14 Υλικά για τον προσδιορισμό της τοξικότητας με το Daphtoxkit.F Magna

<https://www.biotoxicity.com/images/Toxicity%20PDF/daphtoxkitF Magna Test Presentation.pdf>

##### 4.4.1 Προετοιμασία πρότυπου διαλύματος γλυκού νερού(standard freshwater)

Για να επιτύχουμε το κατάλληλο περιβάλλον για την εκκόλαψη των αυγών, είναι αναγκαίο να παρασκευαστεί ένα διάλυμα πρότυπου γλυκού νερού, ώστε να υπάρχουν τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά και η σκληρότητα του νερού. Σε μια ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου τοποθετείται απεσταλμένο νερό και τα αντίστοιχα φιαλίδια στη σειρά που περιέχουν:

Φιαλίδιο 1:  $\text{NaHCO}_3$  (64.75 mg/l)

Φιαλίδιο 2:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( 294 mg/l)

Φιαλίδιο 3:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (123.25 mg/l)

Φιαλίδιο 4: KCl (5.75 mg/l)

Ύστερα τοποθετείται το καπάκι στην ογκομετρική φιάλη και γίνεται ανακίνηση του διαλύματος ώστε να ομογενοποιηθεί.

#### **4.4.2 Εκκόλαψη των αυγών**

Η εκκόλαψη των αυγών (ephippia) πρέπει να ξεκινήσει 3 ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής τοξικότητας. Αρχικά το περιεχόμενο του φιαλιδίου με τα αυγά αδειάζεται σε ένα μικρό κόσκινο με ειδική μεμβράνη και ελέγχεται αν έχουν μεταφερθεί όλα τα αυγά. Ύστερα ξεπλένεται καλά με νερό βρύσης για να εξαλειφθούν τα ίχνη από το τζελ που υπήρχε στο φιαλίδιο ως μέσο αποθήκευσης των αυγών. Στη συνέχεια ρίχνονται προσεκτικά τα αυγά σ' ένα τρυβλίο Petri με διάμετρο 10cm προσθέτοντας 50 mL πρότυπου διαλύματος γλυκού νερού, το οποίο έχει αεριστεί για 15 λεπτά ώστε να υπάρχει αρκετό οξυγόνο για τα νεογνά.

Εφόσον καλυφθεί το τρυβλίο Petri προορίζεται για επώαση στους 20-22°C κάτω από συνεχή φωτισμό 6000 lux για 72h. Μετά το πέρας των 72 ωρών τα νεογνά *D. magna* τροφοδοτούνται με την ειδική τροφή σπιρουλίνα η οποία ρίχνεται δύο ώρες πριν την συλλογή των νεογνών για το τεστ τοξικότητας στροβιλίζοντας απαλά το τρυβλίο ώστε να γίνει η σωστή κατανομή της τροφής. Η σπιρουλίνα βρίσκεται μέσα σ' ένα φιαλίδιο το οποίο γεμίζεται με πρότυπο γλυκό νερό και ανακινείται καλά ώστε να ομογενοποιηθεί το περιεχόμενό του.

#### **4.4.3 Προετοιμασία των δειγμάτων**

Για την παρασκευή αραιώσεων τοξικών ουσιών είναι απαραίτητο να ετοιμαστούν πέντε συγκεντρώσεις του κάθε δείγματος οι οποίες προκύπτουν από αραιώσεις 1:1 της αρχικής συγκέντρωσης του αποβλήτου. Αρχικά τοποθετούνται πέντε βαθμονομημένες φιάλες των 100mL και επισημαίνονται από C<sub>1</sub> μέχρι C<sub>5</sub>. Το C<sub>1</sub> είναι το μη αραιωμένο απόβλητο ενώ το C<sub>5</sub> με την υψηλότερη αραιώση. Μεταφέρονται 100mL του δείγματος στην πρώτη φιάλη για να έχουμε την 100% συγκέντρωση.

Ύστερα τοποθετούνται 50mL πρότυπου γλυκού νερού σε φιάλες C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> και C<sub>5</sub>. Μεταφέροντας 50mL από τη φιάλη C<sub>1</sub> στη C<sub>2</sub> και ανακινώντας καλά τη φιάλη C<sub>2</sub> Επαναλαμβάνεται αυτή τη διαδικασία για τις επόμενες αραιώσεις δηλαδή 50mL από C<sub>2</sub> σε C<sub>3</sub>, 50 mL από C<sub>3</sub> σε C<sub>4</sub> και 50mL από C<sub>4</sub> σε C<sub>5</sub>.

Τελικά έχουμε πέντε συγκεντρώσεις 100%, 50%, 25%, 12,5% και 6,25% (Operational, n.d.).

#### **4.4.4 Μεταφορά των δειγμάτων και των *D. magna* στο πλατό βιοδοκιμής**

Τα δείγματα μεταφέρονται στο ειδικό πλατό βιοδοκιμής που περιέχει το Daphtoxkit. Υπάρχουν πηγάδια περιεκτικότητας 10mL χωρισμένα έτσι ώστε κάθε σειρά να αντιστοιχεί σε μια συγκέντρωση. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε λίγο διαφορετικά το πλατό βιοδοκιμής καθώς έπρεπε να υπάρχει σύγκριση ανάμεσα στα χρησιμοποιημένα και μη προϊόντα καπνού (used-unused). Έτσι για την κάθε συγκέντρωση αντιστοιχούν τρία πηγάδια ώστε να υπάρχει καλύτερη επαναληψιμότητα, ενώ τα τυφλά δείγματα-control βρίσκονταν σε μικρά τρυβλία. Στη συνέχεια μέσα από το τρυβλίο που έχουν επωαστεί τα *D. magna* είναι αναγκαίο να μεταφερθούν με μία μικροπιπέτα 5 μικροοργανισμοί *D. magna* σε κάθε πηγάδι, οπότε σε κάθε συγκέντρωση συνολικά αντιστοιχούν 15 μικροοργανισμοί *D. magna*. Τα άτομα της *D. magna* είναι πολύ ευαίσθητα και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για να μην πεθάνουν κατά τη μεταφορά τους στο δείγμα. Καθώς ολοκληρωθεί η μεταφορά, καταγράφεται η ώρα σκεπάζεται το πλατό με parafilm και φυλάσσεται στο σκοτάδι στους 20-22°C για 24 και 48h αντίστοιχα.



Εικόνα 15: Πλατώ βιοδοκιμής με τις κατάλληλες αραιώσεις σε δύο διαφορετικά δείγματα χρησιμοποιημένα και μη tobacco sticks και τρυβλία-control

#### **4.4.5 Καταμέτρηση και καταγραφή των ζωντανών οργανισμών *D. magna***

Μετά από επώαση 24 και 48 ωρών αντίστοιχα τοποθετείται το πλατό της βιοδοκιμής είτε κάτω από το μικροσκόπιο είτε σε ένα φωτεινό τραπέζι ώστε να γίνει η μέτρηση και η καταγραφή των νεκρών οργανισμών σε κάθε πηγάδι. Ως νεκροί οργανισμοί θεωρούνται και οι ακινητοποιημένοι οργανισμοί είτε τα νεογνά που δεν μπορούν να κολυμπήσουν οι οποίοι έπειτα από ήπια ανάδευση των 15 δευτερολέπτων δεν κουνιούνται ακόμα και εάν μπορούν να κουνήσουν τις κεραίες τους (Operational, n.d.).

## Κεφάλαιο 5 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι συντομογραφίες που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 2: Συντομογραφίες δειγμάτων για την ανάλυση των αποτελεσμάτων

UNUSED CC	Αχρησιμοποίητα συμβατικά τσιγάρα	USED CC	Χρησιμοποιημένα συμβατικά τσιγάρα (3 mm από το φίλτρο)
UNUSED TSAL	Αχρησιμοποίητα tobacco sticks με αλουμίνιο	USED TSAL	Χρησιμοποιημένα tobacco sticks με αλουμίνιο

### 5.1 Αποτελέσματα *V. fischeri*

#### 5.1.1 Χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποίητα συμβατικά τσιγάρα (used-unused CC)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ο αριθμός αποικιών του control και του δείγματος **Used CC1** σε CFUs/mL εκφράζοντας τη μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου *V. Fischeri*, διότι ο αριθμός των αποικιών του δείγματος είναι αρκετά μικρότερος από του control και το δείγμα χαρακτηρίζεται τοξικό.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα μείωσης του πληθυσμού του *V. Fischeri* κατόπιν επώασης με το δείγμα Used CC1.

CFUs/mL	
Control- <i>V. fischeri</i>	$3.5 \times 10^{15}$
Used CC 1- <i>V. fischeri</i>	$1.77 \times 10^5$



Αντίστοιχα στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η απόκριση του βακτηριακού πληθυσμού *V. fischeri* για το δείγμα **Used CC3** σε σχέση με το control και το δείγμα θεωρείται τοξικό.

*Πίνακας 4: Αποτελέσματα μείωσης του πληθυσμού του V. Fischeri κατόπιν επώασης με το δείγμα Used CC3.*

CFUs/mL	
<b>Control-<i>V. fischeri</i></b>	$3.5 \times 10^{15}$
<b>Used CC 3-<i>V. fischeri</i></b>	$7.33 \times 10^6$

Για το δείγμα **Unused CC3** παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα των αποικιών του δείγματος και του control αντίστοιχα.

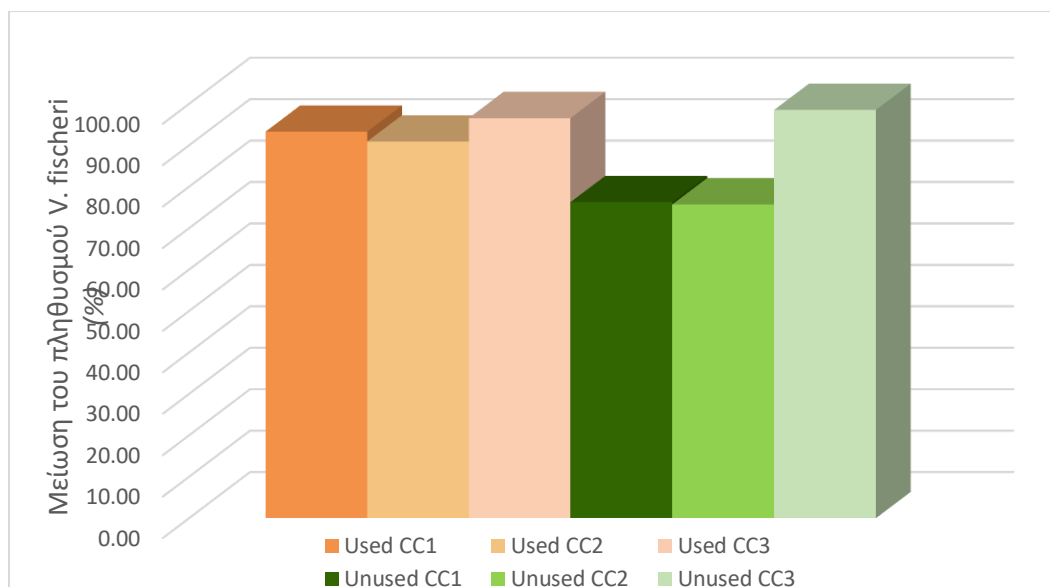
*Πίνακας 5 Αποτελέσματα μείωσης του πληθυσμού του V. Fischeri κατόπιν επώασης με το δείγμα Unused CC3.*

CFUs/mL	
<b>Control- <i>V. fischeri</i></b>	$3.5 \times 10^{15}$
<b>Unused CC 3-<i>V. fischeri</i></b>	$9.33 \times 10^7$

Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για κάθε δείγμα ανάλογα με το ποσοστό μείωσης του πληθυσμού *V. fischeri*.

*Πίνακας 6 Ποσοστό μείωσης του πληθυσμού V. fischeri ανάλογα με το κάθε δείγμα χρησιμοποιημένου και μη συμβατικού τσιγάρου*

Δείγματα χρησιμοποιημένων και αχρησιμοποίητων συμβατικών τσιγάρων	Μείωση του πληθυσμού <i>V. fischeri</i> (%)
<b>Used CC1</b>	93.25
<b>Used CC2</b>	90.89
<b>Used CC3</b>	96.54
<b>Unused CC1</b>	76.26
<b>Unused CC2</b>	75.71
<b>Unused CC3</b>	98.52



*Διάγραμμα 1: Διάγραμμα μείωσης του πληθυσμού του βακτηρίου V. fischeri (%) για τα χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποιητά συμβατικά τσιγάρα*

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η βακτηριακή μείωση του πληθυσμού *V. fischeri* για τα δείγματα των χρησιμοποιημένων και μη συμβατικών τσιγάρων. Υπάρχει σοβαρή μείωση στον πληθυσμό του βακτηρίου γύρω στο 75-100%, οπότε θεωρούνται τοξικά καθώς δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη του βακτηρίου και επιφέρουν σημαντική μείωση στον πληθυσμό του. Για το δείγμα Used CC1 η εκτίμηση των αποικιών του βακτηρίου είναι  $1.77 \times 10^5$  CFUs/mL ενώ του control  $3.5 \times 10^{15}$  CFUs/mL, έτσι φαίνεται η χαρακτηριστική μείωση του αριθμού των αποικιών του βακτηρίου. Ακόμα για τα δείγματα Used CC3 και Unused CC3 η εκτίμηση των αποικιών είναι  $7.33 \times 10^6$  CFUs/mL και  $9.33 \times 10^7$  CFUs/mL. Αντίστοιχα ο αριθμός των αποικιών είναι πολύ μικρότερος σε σχέση με τον αριθμό αποικιών του control γεγονός που υποδηλώνει τη σημαντική μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου και καθιστά τα δείγματα τοξικά. Η μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου παρουσιάζεται στο δείγμα Unused CC3 ίση με 98.52%, δηλαδή το δείγμα των αχρησιμοποιητών συμβατικών τσιγάρων και το επόμενο δείγμα με την μεγαλύτερη βακτηριακή μείωση είναι το δείγμα χρησιμοποιημένων συμβατικών τσιγάρων, Used CC3 με ποσοστό 96.54%.

### **5.1.2 Χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποίητα tobacco sticks (used-unused TSAL)**

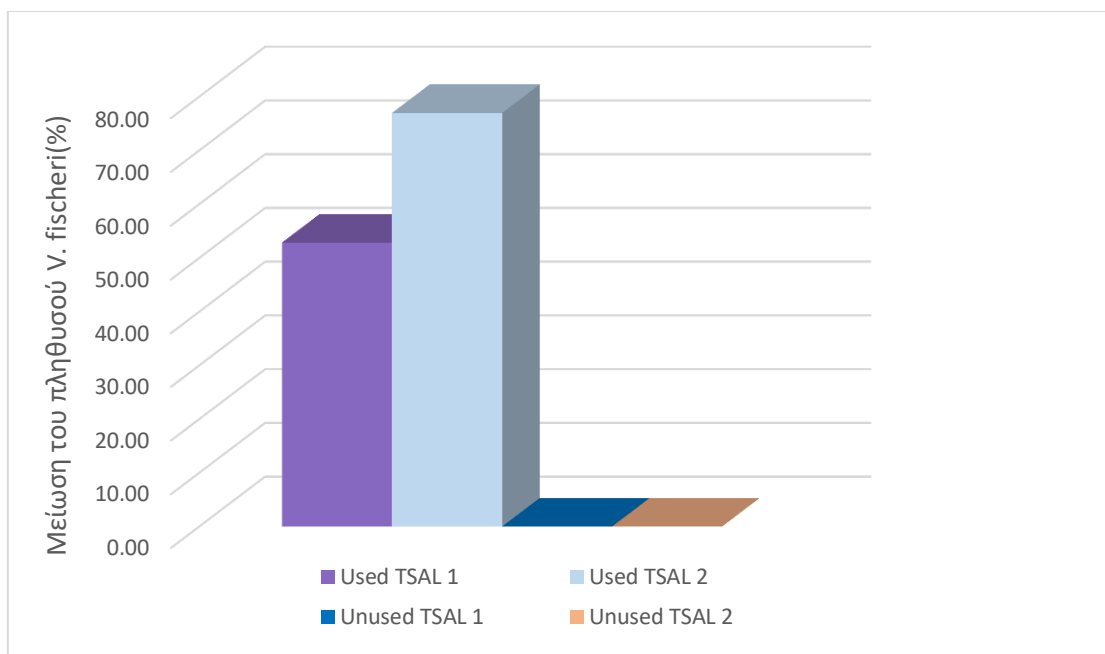
Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται ο αριθμός των αποικιών του control και του δείγματος **Used TSAL 1** σε CFUs/mL και εκφράζει τη μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου *V. fischeri* καθώς ο αριθμός των αποικιών του δείγματος είναι μικρότερος σε σχέση με το control και το δείγμα θεωρείται τοξικό.

*Πίνακας 7: Αποτελέσματα CFUs/mL για το control και το δείγμα Used TSAL 1*

CFUs/mL	
<b>Control- <i>V. fischeri</i></b>	$3.5 \times 10^{15}$
<b>Used TSAL1- <i>V. fischeri</i></b>	$1.73 \times 10^9$

*Πίνακας 8: Ποσοστό μείωσης του πληθυσμού *V. fischeri* ανάλογα με το κάθε δείγμα χρησιμοποιημένων και μη tobacco sticks.*

<b>Δείγματα χρησιμοποιημένων και αχρησιμοποίητων tobacco sticks</b>	<b>Ποσοστό μείωσης του πληθυσμού <i>V. fischeri</i> (%)</b>
<b>Used TSAL1</b>	52.85
<b>Used TSAL2</b>	72.96
<b>Unused TSAL1</b>	0.00
<b>Unused TSAL2</b>	0.00



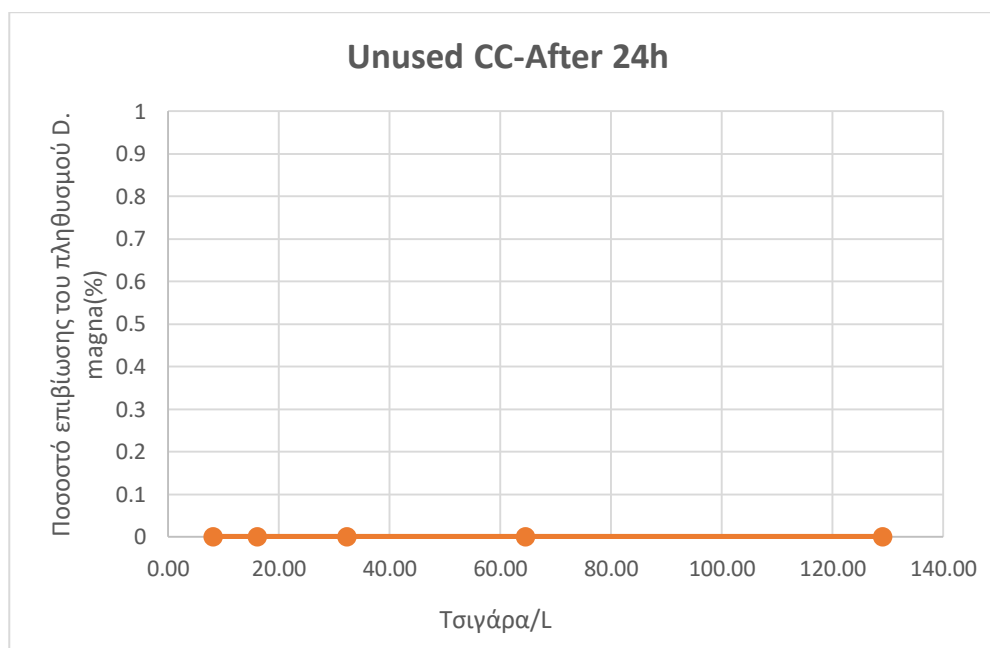
Διάγραμμα 2: Διάγραμμα μείωσης του πληθυσμού του βακτηρίου *V. fischeri* (%) για τα χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποιητά tobacco sticks.

Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζεται για τα δείγματα των χρησιμοποιημένων και μη tobacco sticks το ποσοστό μείωσης του πληθυσμού του *V. fischeri*. Για τα χρησιμοποιημένα tobacco sticks το ποσοστό κυμαίνεται από 50-75% συγκριτικά μικρότερο σε σχέση με τα συμβατικά τσιγάρα, όμως θεωρείται τοξικό. Η εκτίμηση των αποικιών του δείγματος Used TSAL1 είναι  $1.73 \times 10^9$  CFUs/mL που υποδηλώνει σχετικά μικρή μείωση στον πληθυσμό των βακτηρίων σε σχέση με του control που είναι  $3.5 \times 10^{15}$  CFUs/mL. Αντίθετα τα εκπλύματα των αχρησιμοποιητών tobacco sticks με αλουμίνιο επιτρέπουν την κανονική ανάπτυξη του βακτηρίου καθώς η μείωση του πληθυσμού είναι μηδενική και δεν θεωρούνται τοξικά.

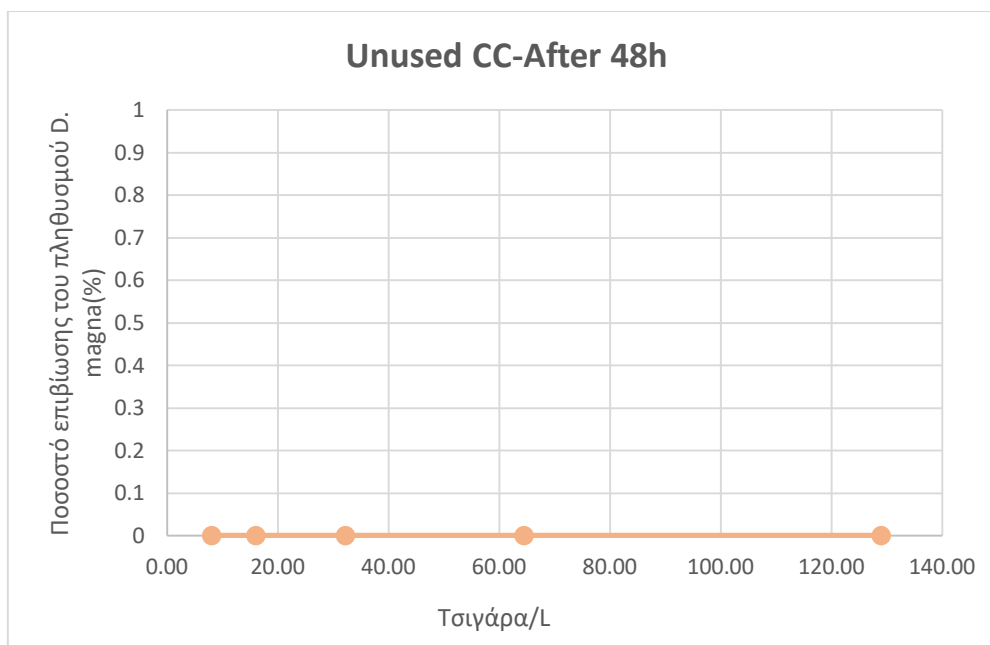
## 5.2 Αποτελέσματα *D. magna*

### 5.2.1 Χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποίητα συμβατικά τσιγάρα (unused-used CC)

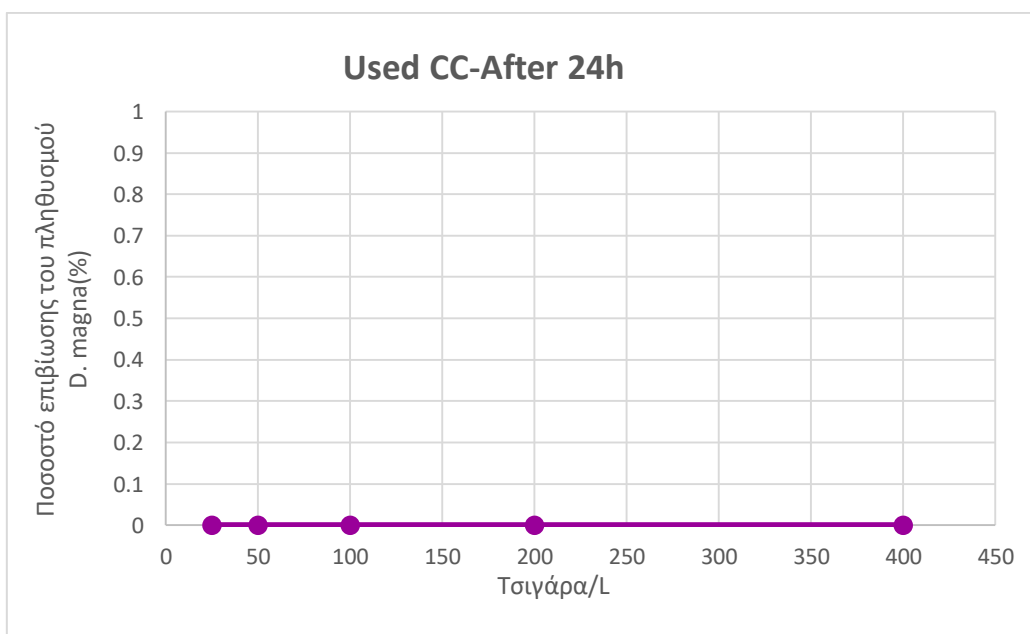
Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα επιβίωσης του πληθυσμού της *D. magna* σε σχέση με την ανάλογη συγκέντρωση του κάθε δείγματος. Ανάλογα με το πόσοι οργανισμοί επιβίωσαν μετά από 24 και 48h αντίστοιχα υπολογίστηκε το ποσοστό επιβίωσης (%) σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του κάθε δείγματος που είναι εκφρασμένη σε τσιγάρα ανά λίτρο (cigarettes butts/L).



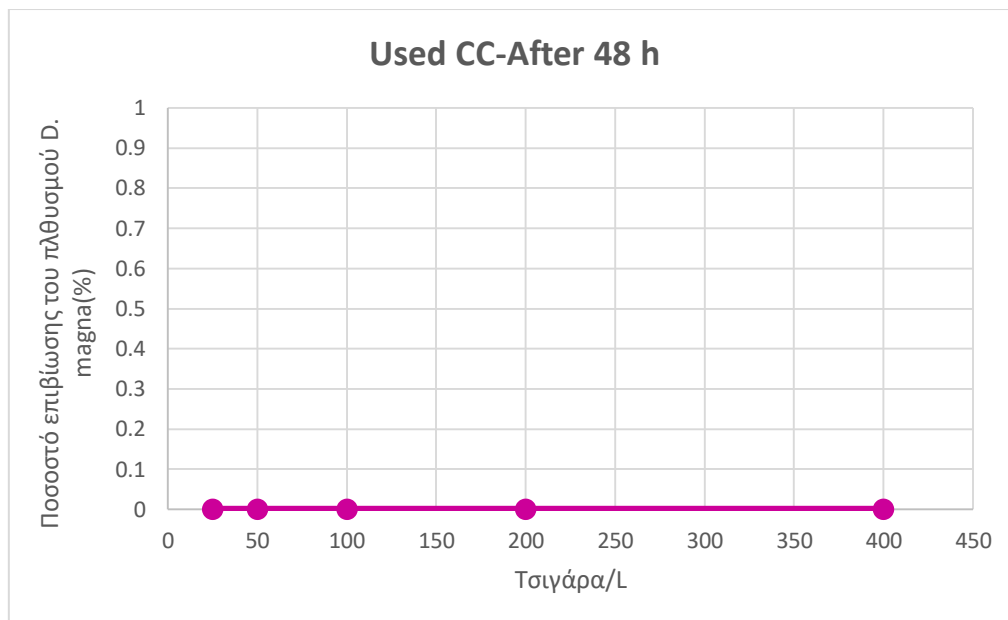
Διάγραμμα 3: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού *D. magna* μετά από 24h σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα αχρησιμοποίητα συμβατικά τσιγάρα



*Διάγραμμα 4: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού D. magna μετά από 48h σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα αχρησιμοποίητα συμβατικά τσιγάρα*



*Διάγραμμα 5: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού D. magna μετά από 24h σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα χρησιμοποιημένα συμβατικά τσιγάρα*

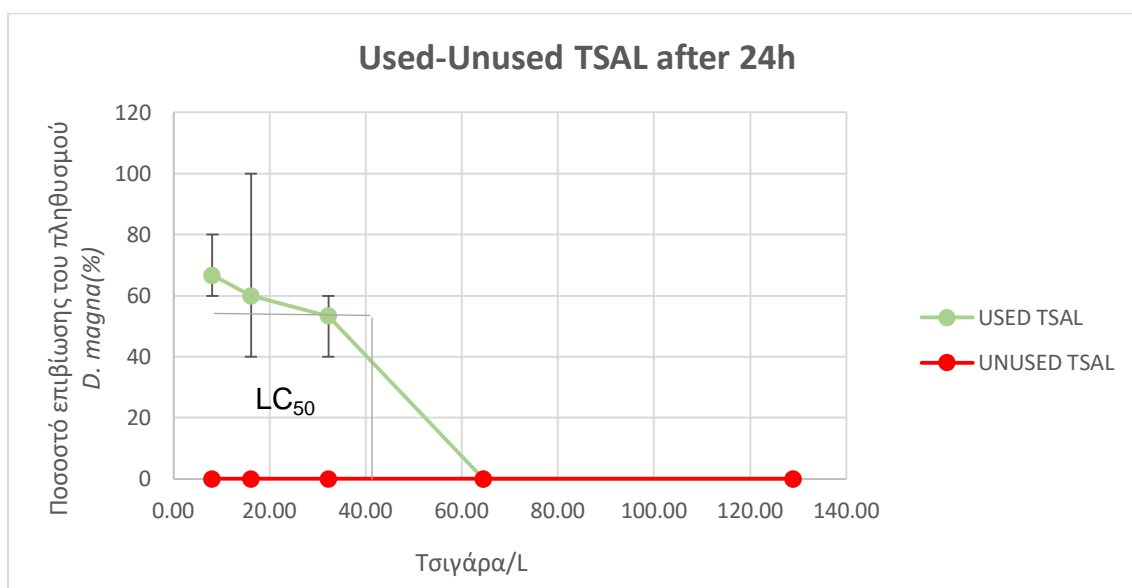


Διάγραμμα 6: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού *D. magna* μετά από 48h σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα χρησιμοποιημένα συμβατικά τσιγάρα

Στα δύο πρώτα διαγράμματα 3 και 4 φαίνεται το ποσοστό επιβίωσης του πληθυσμού *D. magna* σε σχέση με τις ανάλογες συγκεντρώσεις (τσιγάρα/L) των εκπλυμάτων των αχρησιμοποίητων συμβατικών τσιγάρων μετά από 24 και 48h. Το ποσοστό επιβίωσης είναι μηδενικό και στις δύο περιπτώσεις και τα δείγματα θεωρούνται τοξικά σε μεγάλο βαθμό.

Στα διαγράμματα 5 και 6 παρουσιάζεται αντίστοιχα το ποσοστό επιβίωσης του πληθυσμού *D. magna* σε σχέση με τις συγκεντρώσεις (τσιγάρα/L) των εκπλυμάτων των χρησιμοποιημένων συμβατικών τσιγάρων μετά από 24 και 48h. Όπως και στα δείγματα των αχρησιμοποίητων συμβατικών τσιγάρων δεν επιβίωσε κανένας μικροοργανισμός ούτε για τα δείγματα των χρησιμοποιημένων συμβατικών τσιγάρων και θεωρούνται τοξικά.

### 5.2.2 Χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποιητά tobacco sticks (used-unused TSAL)



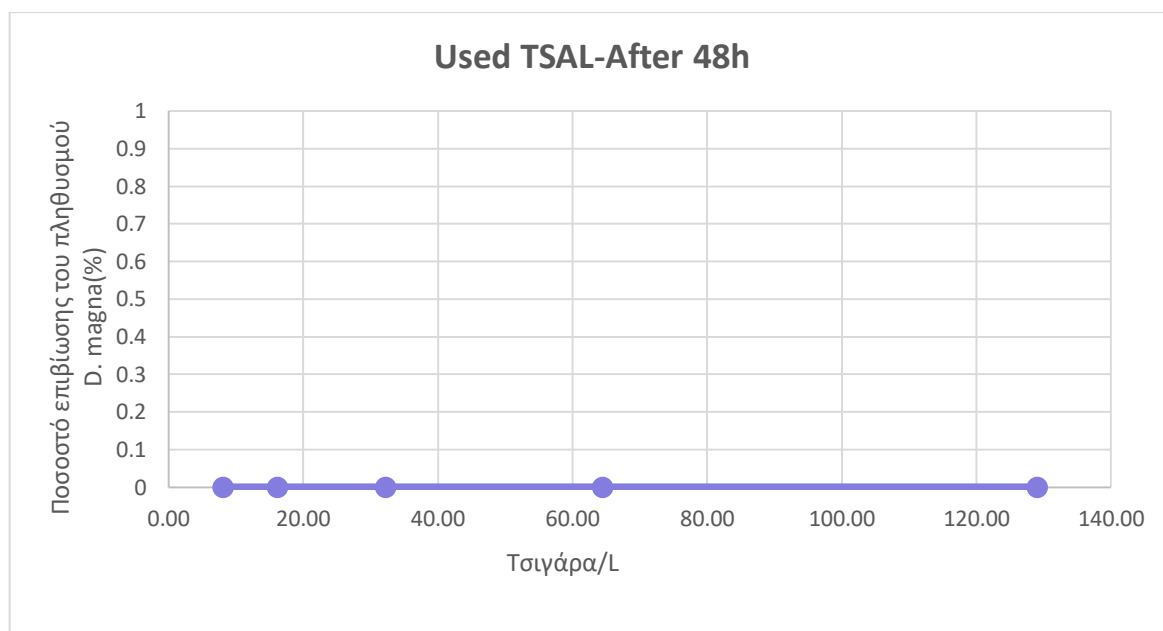
Διάγραμμα 7: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού *D. magna* μετά από 24h ώρες σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποιητά tobacco sticks

Στο διάγραμμα 7 παρουσιάζεται το ποσοστό επιβίωσης του πληθυσμού *D. magna* μετά από 24h και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των εκπλυμάτων των χρησιμοποιημένων tobacco sticks. Στις αρχικές συγκεντρώσεις 129.03 τσιγάρα/L και 64.52 τσιγάρα/L το ποσοστό επιβίωσης του πληθυσμού *D. magna* είναι μηδενικό, ενώ στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις το ποσοστό επιβίωσης είναι 50-70% και καθιστά το δείγμα λιγότερο τοξικό.

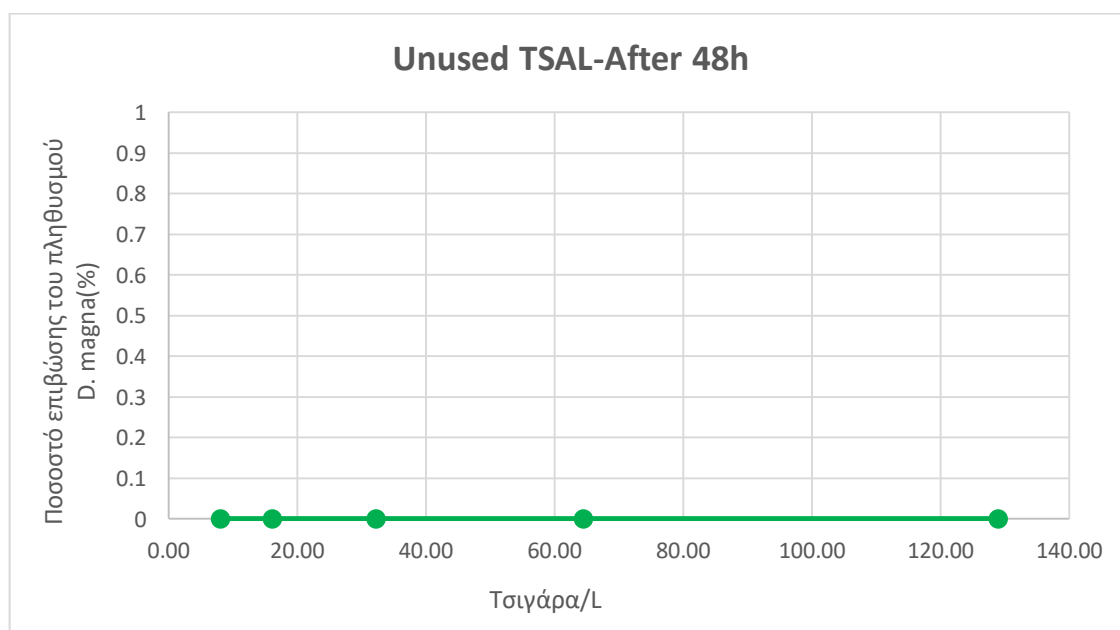
Ο δείκτης  $LC_{50}$  (Lethal Concentration) εκφράζει τη συγκέντρωση που προκαλεί το θάνατο στο 50% των οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Στο Διάγραμμα 7 φαίνεται το ποσοστό επιβίωσης του πληθυσμού είναι 50% στην αντίστοιχη συγκέντρωση των 32.26 τσιγάρα/L. Άρα αυτή είναι η συγκέντρωση που προκαλεί το θάνατο στο 50% του πληθυσμού των οργανισμών *D. magna* μετά από 24h και ο δείκτης  $LC_{50}$  είναι ίσος με 32.26 τσιγάρα/L.

Δείκτης  $LC_{50}$ =32.26 τσιγάρα/L.





Διάγραμμα 8:Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού *D. magna* μετά από 48h σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα χρησιμοποιημένα tobacco sticks

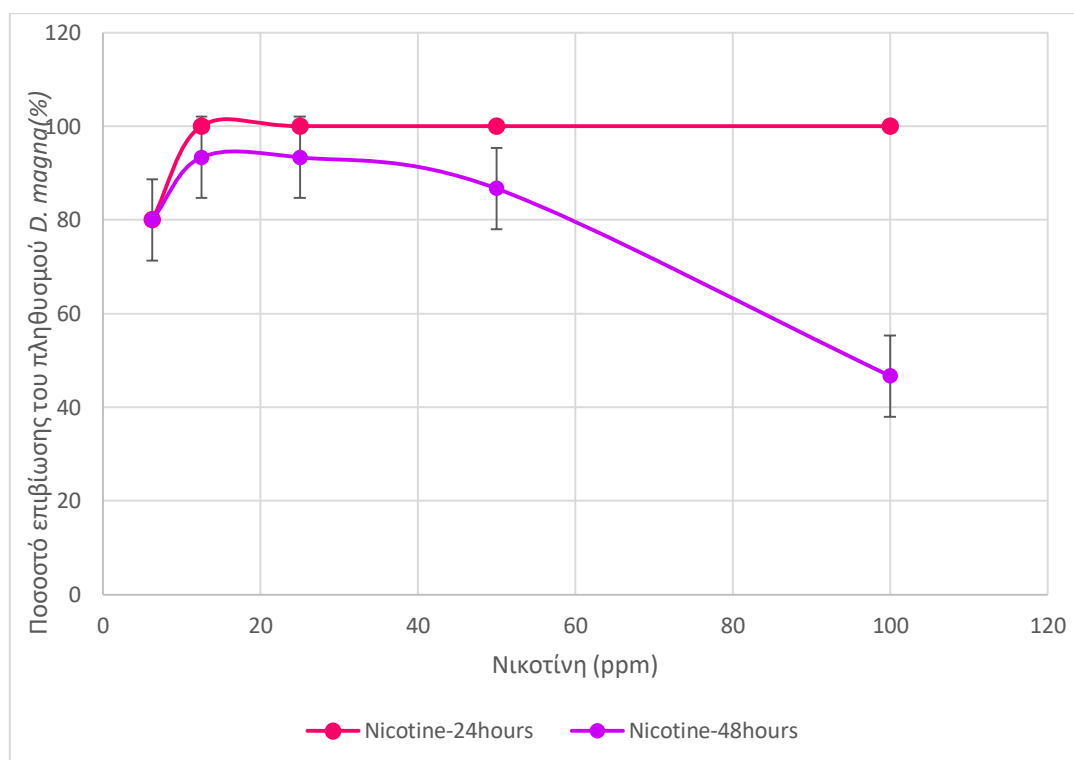


Διάγραμμα 9:Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού *D. magna* μετά από 48h σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος για τα αχρησιμοποιημένα tobacco sticks

Στα διαγράμματα 8 και 9 παρουσιάζεται η επιβίωση του πληθυσμού *D. magna* μετά από 48h σε σχέση με τις ανάλογες συγκεντρώσεις τσιγάρα/L. Το ποσοστό επιβίωσης τόσο για τα χρησιμοποιημένα όσο και για τα αχρησιμοποίητα tobacco sticks είναι μηδενικό καθώς δεν επιβίωσε κανένας μικροοργανισμός μετά το πέρας ων 48 ωρών.

### 5.2.3 Νικοτίνη

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται το ποσοστό επιβίωσης του οργανισμού *D. magna* σε σχέση με τη συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος νικοτίνης.



Διάγραμμα 10: Διάγραμμα της επιβίωσης του πληθυσμού *D. magna* μετά από 24 και 48h σε σχέση με τη συγκέντρωση υδατικού διαλύματος νικοτίνης

Στο διάγραμμα 10 παρουσιάζεται το ποσοστό επιβίωσης του πληθυσμού *D. magna* σε σχέση με τις ανάλογες συγκεντρώσεις του υδατικού διαλύματος της νικοτίνης σε m. Μετά από το πέρας των 24ωρών το ποσοστό επιβίωσης είναι 100% εκτός από τη τελευταία συγκέντρωση 6.25 ppm που είναι 80%, το δείγμα δεν θεωρείται τοξικό. Μετά από τις 48 ώρες υπάρχουν μικρές διαφορές στο ποσοστό επιβίωσης καθώς στα 100 ppm το ποσοστό είναι ίσο με 46.7% ενώ στις άλλες συγκεντρώσεις κυμαίνεται από 80-95%, που καθιστά το δείγμα ως μη τοξικό.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από προηγούμενες αναφορές από άλλες έρευνες σχετικά με τις ιδιαίτερες βλαβερές συνέπειες των καπνισμένων τσιγάρων στους οργανισμούς.

Οι Booth κ.α (2015) έδειξαν μεγάλη θανατηφόρα και υποθανατητική απόκριση στα σαλιγκάρια όταν έρχονται σε επαφή με εκχυλίσματα από καπνισμένα τσιγάρα.

Επιπλέον, οι Micevska κ.α (2006) έδειξαν την τοξική επίδραση στην *Ceriodaphnia* του γλυκού νερού και τα θαλάσσια βακτήρια *V. fischeri*. Προσδιορίστηκαν οι τιμές  $LC_{50}$  για αυτούς τους οργανισμούς ήταν 0,03-0,08 psc / L και 0,3-2,7 psc / L, αντίστοιχα. Με τη σειρά του, στη μελέτη του Parker και του Rayburn (2017) χρησιμοποιώντας έμβρυα *X. laevis*, η οικοτοξικότητα των ηλεκτρονικών τσιγάρων ήταν περίπου

10 φορές λιγότερο τοξικά από τα παραδοσιακά τσιγάρα. Αυτό το ποσοστό είναι παρόμοιο με αυτή τη μελέτη που έγινε στα πειράματά Slaughter κ.α (2011) διαπίστωσε ότι οι καπνισμένες γόπες τσιγάρων, τα καπνισμένα φίλτρα τσιγάρων και τα ακάπνιστα φίλτρα τσιγάρων

ήταν πολύ τοξικά για το *Atherinops affinis* και το *Pimephales promelas*. Ο δείκτης  $LC_{50}$  για τα εκπλύματα των καπνισμένων γοπών ήταν περίπου 1 pc / L και για τα δύο. Ενώ τα εκπλύματα από τα καπνισμένα φίλτρα των τσιγάρων ήταν λιγότερο τοξικά, με τιμές  $LC_{50}$  1,8 και 4,3 pcs / L, αντίστοιχα και για τα δύο είδη ψαριών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα ψάρια ήταν λιγότερο ευαίσθητα στα εκπλύματα των τσιγάρων από τα *Ceriodaphnia*.

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η ευαισθησία των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών στα πειράματα ήταν πολύ χαμηλότερη από αυτή των πολυκύτταρων οργανισμών και του *V. fischeri*.

Η υψηλή οικοτοξικότητα των νέων προϊόντων καπνού,όπως τα tobacco sticks που θερμαίνονται και δεν καίγονται είναι ανησυχητικό.Το φαινόμενο αυτό πιθανότατα σχετίζεται με την τοξικότητα καπνισμένου και μη καπνού. Στις μέρες μας η κατανάλωση tobacco sticks που απλά θερμαίνονται είναι πολύ χαμηλότερη από τα συμβατικά τσιγάρα. Ωστόσο, είναι πιθανό τα συστήματα θέρμανσης καπνού μαζί με τα tobacco sticks να είναι ένα σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα στο μέλλον (*Toxicity e-cig CBs TS(2).pdf*, n.d.).

Το ίδιο συνέβη και στην δική μας πειραματική διαδικασία καθώς η *D.magna* ήταν περισσότερο ευαίσθητη σε σχέση με το *V. fischeri*, κυρίως στα συμβατικά τσιγάρα.

## Κεφάλαιο 6 Συμπεράσματα

Τα υπολείμματα των προϊόντων καπνού που περιέχουν πλαστική ύλη κατέχουν τη δεύτερη θέση μεταξύ των πλαστικών αντικειμένων μίας χρήσης που εμφανίζονται συχνότερα σε παραλίες στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Council, 2019). Μετά την ενίσχυση των ρυθμιστικών μέτρων για την κατανάλωση καπνού σε δημόσιους χώρους οι καπνοβιομηχανίες ξεκίνησαν σημαντικές επενδύσεις στην ανάπτυξη εναλλακτικών τρόπων καπνίσματος και νέων προϊόντων καπνού. Ο καπνός που παράγεται από το τσιγάρο περιέχει νικοτίνη και πολλά άλλα επιβλαβή χημικά συστατικά. Οι τοξίνες που περιέχονται στο τσιγάρο και όχι η νικοτίνη είναι η αιτία των περισσότερων επιβλαβών επιπτώσεων που σχετίζονται με το κάπνισμα. Γι' αυτό λοιπόν έχουν δημιουργηθεί εναλλακτικά προϊόντα καπνού που προσφέρουν ικανοποιητική γεύση στους καταναλωτές χωρίς όμως να καίγεται ο καπνός αλλά να θερμαίνεται. Το σύστημα θέρμανσης καπνού IQOS δεν περιλαμβάνει καύση του καπνού αλλά μόνο θέρμανση μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα των επιβλαβών χημικών ουσιών και δημιουργώντας έναν γευστικό ατμό. Τα αποτσίγαρα είναι τα πιο συνηθισμένα σκουπίδια στον κόσμο. Χιλιάδες χημικές ουσίες υπάρχουν σε ένα τσιγάρο, τα υπολείμματα των οποίων μπορεί να βρεθούν στις γόπες των τσιγάρων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα χημικά στα εκπλύματα των τσιγάρων μπορεί να είναι πολύ τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς (Novotny & Slaughter, 2014).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μίας μελέτης αποκάλυψαν ότι τα απόβλητα από τα ηλεκτρονικά τσιγάρα, δηλαδή τα φυσίγγια και τα υγρά, δεν αποτελούν σημαντική απειλή. Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί ιδιαίτερα έντονο οικοτοξικό αποτέλεσμα στους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν τα εκχυλίσματα από καπνισμένα τσιγάρα και τα tobacco sticks από σύστημα θέρμανσης καπνού που δεν προκαλεί καύση του καπνού. Η υψηλή τους οικοτοξικότητα σε συνδυασμό με υψηλή προσφορά είναι ανησυχητική και μπορεί να απαιτήσει παρεμβάσεις για την προστασία του υδάτινου περιβάλλοντος. Η κατακράτηση αυτών των αποβλήτων μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στους μικροοργανισμούς των επιφανειακών υδάτων (*Toxicity e-cig CBs TS(2).pdf*, n.d.).

Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε μελέτη της τοξικότητας των υδατικών εκπλυμάτων για τα χρησιμοποιημένα και μη προϊόντα συμβατικών τσιγάρων Marlboro Red Label καθώς και για τα χρησιμοποιημένα και μη tobacco sticks με αλουμίνιο (HEETS RED) με το βακτήριο *V. fischeri* και το μικροοργανισμό *D. magna*.

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2019/904 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου του Συμβουλίου της 5<sup>ης</sup> Ιουνίου 2019 οι τεράστιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις των αποβλήτων μετά την κατανάλωση που προκύπτουν από φίλτρα προϊόντων καπνού που περιέχουν πλαστική ύλη, τα οποία απορρίπτονται απευθείας στο περιβάλλον, πρέπει να μειωθούν. Τα κράτη μέλη θα πρέπει να προωθήσουν ευρύ φάσμα μέτρων για τη μείωση των αποβλήτων μετά την κατανάλωση που προκύπτουν από φίλτρα προϊόντων καπνού που περιέχουν πλαστική ύλη (Council, 2019).

Ακόμα ένα κύριο μέλημα του κράτους είναι η ενημέρωση και η αύξηση της ευαισθητοποίησης του κοινού σχετικά με την τοξικότητα και τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις που προκαλούν τα προϊόντα καπνού όταν αφεθούν στο περιβάλλον. Θα μπορούσαν ακόμη να απαγορεύσουν την πώληση προϊόντων καπνού με μη βιοδιασπώμενα φίλτρα που επιφέρουν σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον και η απαγόρευση αυτή μπορεί να μείωση τη γενικότερη κατανάλωση τσιγάρου. Επιπλέον μια ακόμα λύση είναι ότι οι καπνοβιομηχανίες θα μπορούσαν να δημιουργήσουν ετικέτες πάνω στα πακέτα που θα περιέχουν πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα των απορριπτόμενων άκρων και ειδικές οδηγίες για την ασφαλή διάθεση του αποβλήτου. Οι ετικέτες αυτές θα συμβάλουν στην γρηγορότερη ενημέρωση των καταναλωτών και τη σωστή απόρριψη των αποβλήτων. Για τη σωστή απόρριψη των αποβλήτων οι παραγωγοί θα πρέπει να έχουν μεριμνήσει γι' αυτό και να δημιουργήσουν κατάλληλα δοχεία υποδοχής για τη συλλογή των συγκεκριμένων αποβλήτων. Τέλος τα προϊόντα καπνού αποτελούν πολύ σημαντική πηγή τοξικότητας και προκαλούν σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον και στους οργανισμούς που βρίσκονται σε αυτό οπότε η αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού κρίνεται άμεση και απαραίτητη.

## 6.1 Μελλοντικές προτάσεις

- ✓ Έλεγχος και ανάλυση της χημικής σύστασης των υδατικών εκπλυμάτων απο χρησιμοποιημένα και μη προϊόντα καπνού τόσο για τα συμβατικά τσιγάρα όσο και για τα tobacco sticks.
- ✓ Επιπλέον βιοδοκιμές με τη χρήση άλλων οργανισμών και μεθόδων, που ανήκουν σε διαφορετικά τροφικά επίπεδα, όπως άλγη ή φύκη που ανήκουν στο τροφικό επίπεδο των παραγωγών, είτε άλλα ζώα ή μικροοργανισμούς (π.χ *Artemia salina*) για την εκτίμηση της τοξικότητας των δειγμάτων.
- ✓ Μελέτη της τοξικότητας συγκεκριμένων συστατικών που περιέχονται στα συμβατικά τσιγάρα και στα tobacco sticks, όπως ο καπνός και η διαφορετική σύστασή του.
- ✓ Ευρύτερη χρήση των βιοδοκιμών απο τις καπνοβιομηχανίες για την εύρεση τοξικών συστατικών στα προϊόντα καπνού και εξάλειψη αυτών.

## **Βιβλιογραφία**

- Araújo, M. C. B., & Costa, M. F. (2019). A critical review of the issue of cigarette butt pollution in coastal environments. *Environmental Research*, 172(January), 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.005>
- Costa, E., Costa, E., Piazza, V., Moresco, R., Prato, E., Biandolino, F., & Cassin, D. (2015). *Ecotoxicological effects of sediments from Mar Piccolo, South Italy: toxicity testing with organisms from different trophic levels*. May 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5471-x>
- Council, O. F. T. H. E. (2019). 12.6.2019. 2019(March), 1–19.
- Eurostat. (2014). *Tobacco consumption statistics Statistics Explained Daily smokers of cigarettes*. 1–11. <https://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/>
- Granados, P. S., Fulton, L., Patlan, E. N., Terzyk, M., & Novotny, T. E. (2019). *Global Health Perspectives on Cigarette Butts and the Environment*.
- Hemisphere, N., Africa, S., Distribution, D. E., Reproduction, N., Parasitism, B., Model, M., External, R., Arthropoda, A., Branchiopoda, C., & Daphniidae, C. (2020). *Daphnia magna*. 1–8.
- History, P., Direct, C., & Elisa, E. (2020). *A bioassay is an analytical method to determine concentration or potency of a substance by its effect on living cells or tissues*. [1] *Bioassays are quantitative biological assays used to estimate the potency of agents by observing their effects on living* . 1–4.
- Holt, E. a. (2010). Bioindicators: using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge*, 3(10), 1–8. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.62081>
- January, R. (2020). *What is tobacco ? January*.
- Know, B., & Hawaiian, T. (2020). *Better Know a Microbe : Aliivibrio scheri*. 1–6.
- Koutela, N., Fernández, E., Saru, M., & Psillakis, E. (2020). Science of the Total Environment A comprehensive study on the leaching of metals from heated tobacco sticks and cigarettes in water and natural waters. *Science of the Total Environment*, 714, 136700. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136700>
- MANICKAVASAGAM, S., SUDHAN, C., . B., & AANAND, S. (2019). Bioindicators in Aquatic Environment and Their Significance. *Journal of Aquaculture In The Tropics*, 34(1–2), 73–79. <https://doi.org/10.32381/jat.2019.34.1-2.6>
- Martin, B. T. (2020). *How Cigarette Butts Pollute the Environment*. 1–4.
- Montalvão, M. F., Chagas, T. Q., Gabriela da Silva Alvarez, T., Mesak, C., Pereira da Costa Araújo, A., Gomes, A. R., Emmanuela de Andrade Vieira, J., Rocha, T. L., & Malafaia, G. (2019). Cigarette butt leachate as a risk factor to the health of freshwater bivalve. *Chemosphere*, 234, 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.100>
- Museum, M. (2020). *Daphnia magna*. 1–10.
- National Institute for Drug Abuse. (2019). Cigarettes and other Tobacco Products. *U.S. Department of Health & Human Services, January 2020*, 1–5. [https://d14rmgtrwzf5a.cloudfront.net/sites/default/files/drugfacts\\_cigarettes.pdf](https://d14rmgtrwzf5a.cloudfront.net/sites/default/files/drugfacts_cigarettes.pdf)
- Novotny, T. E., & Slaughter, E. (2014). Tobacco Product Waste: An Environmental Approach to Reduce Tobacco Consumption. *Current Environmental Health Reports*, 1(3), 208–216. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0016-x>
- Operational, S. (n.d.). *DAPHTOXKIT F*.
- Parmar, T. K., Rawtani, D., & Agrawal, Y. K. (2016). Bioindicators: the natural indicator of



- environmental pollution. *Frontiers in Life Science*, 9(2), 110–118.  
<https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753>
- Pinkas, J., Kaleta, D., Zgliczyński, W. S., Lusawa, A., Wrześniewska-Wal, I., Wierzbą, W., Gujski, M., & Jankowski, M. (2019). The prevalence of tobacco and E-cigarette use in Poland: A 2019 nationwide cross-sectional survey. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(23). <https://doi.org/10.3390/ijerph16234820>
- Poppendieck, D., Gong, M., & Pham, V. (2020). Influence of temperature, relative humidity, and water saturation on airborne emissions from cigarette butts. *Science of the Total Environment*, 712, 136422. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136422>
- Ruprecht, A. A., De Marco, C., Saffari, A., Pozzi, P., Mazza, R., Veronese, C., Angellotti, G., Munarini, E., Ogliari, A. C., Westerdahl, D., Hasheminassab, S., Shafer, M. M., Schauer, J. J., Repace, J., Sioutas, C., & Boffi, R. (2017). Environmental pollution and emission factors of electronic cigarettes, heat-not-burn tobacco products, and conventional cigarettes. *Aerosol Science and Technology*, 51(6), 674–684.  
<https://doi.org/10.1080/02786826.2017.1300231>
- Selection, H. T. (2019). Πώς λειτουργεί το σύστημα θέρμανσης καπνού IQOS ; Ποια είναι η εμφάνιση και η αίσθηση του IQOS ; Μπορώ να πάρω το IQOS μαζί μου σε κάθε.
- Smith, M. R., Clark, B., Lüdicke, F., Schaller, J. P., Vanscheeuwijck, P., Hoeng, J., & Peitsch, M. C. (2016). Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 1: Description of the system and the scientific assessment program. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81(2016), S17–S26. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.07.006>
- St Helen, G., Jacob, P., Nardone, N., & Benowitz, N. L. (2018). IQOS: Examination of Philip Morris International's claim of reduced exposure. *Tobacco Control*, 27, s30–s36.  
<https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2018-054321>
- Tests, T., & Fischer, V. (n.d.). *Aliivibrio scheri Toxicity Tests ( formerly Vibrio Fischeri ) Aliivibrio scheri Toxicity Tests ( formerly Vibrio Fischeri )*.  
*Toxicity e-cig CBs TS(2).pdf*. (n.d.).  
<https://www.pmi.com/smoke-free-products/iqos-our-tobacco-heating-system>

Εισαγωγή στην Περιβαλλοντική Μηχανική, Κούγκολος Γ. Αθανάσιος 2007  
 Εκδότης: Τζιόλας

Οικοτοξικολογία και Περιβαλλοντική Τοξικολογία, Αθανάσιος Βαλαβανίδης 2008  
 Εκδόσεις: Σύγχρονα Θέματα

[https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Tobacco\\_consumption\\_statistics](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Tobacco_consumption_statistics)

<https://qr.iqos.com/el/proionta/anakalypse-iqos/ti-einai>

<https://www.cspdailynews.com/tobacco/dissecting-heat-not-burn#page=2>

<https://www.istockphoto.com/photo/close-up-picture-of-cigarette-butts-stuck-in-sand-on-a-beach-gm1141415108-305783353>

[https://www.researchgate.net/figure/Anatomy-of-a-Cigarette-Source-Peel-Public-Health\\_fig1\\_305519262](https://www.researchgate.net/figure/Anatomy-of-a-Cigarette-Source-Peel-Public-Health_fig1_305519262)

[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio\\_fischer](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio_fischer)

<https://www.flickr.com/photos/dullhunk/5612935010/lightbox/>

[https://www.biotoxicity.com/images/Toxicity%20PDF/daphtoxkitF Magna Test Presentation.pdf](https://www.biotoxicity.com/images/Toxicity%20PDF/daphtoxkitF_Magna_Test_Presentation.pdf)  
[https://mediasrv.uaa.gr/eclass/modules/document/file.php/BIOTECH154/lab2\\_sampling.pdf](https://mediasrv.uaa.gr/eclass/modules/document/file.php/BIOTECH154/lab2_sampling.pdf)