



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Έλεγχος οικοτοξικότητας υδατικών εκπλυμάτων από προϊόντα καπνού»

ΓΚΙΟΚΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

Χανιά, 2022



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Έλεγχος οικοτοξικότητας υδατικών εκπλυμάτων από προϊόντα καπνού»

« Ecotoxicity assessment of aqueous leachates from tobacco products »

ΓΚΙΟΚΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΑΜ: 2015050103

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βενιέρη Δανάη (Επιβλέπουσα)

Ψυλλάκη Ελευθερία

Παναγιωτοπούλου Παρασκευή

"Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης"

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία διεξήχθη στα πλαίσια του Προπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών της σχολής Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης, και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, καθώς και στο Εργαστήριο Υδατικής Χημείας.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Δανάη Βενιέρη για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί της, και τη πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε, καθώς επίσης και τη κα. Ελευθερία Ψυλλάκη για τη καθοδήγησή της. Θερμές ευχαριστίες οφείλω στη κα. Ιωσηφίνα Γουνάκη, ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας για την αμέριστη υπομονή και τη στήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επιπλέον ευχαριστώ ιδιαίτερα τη κα. Παρασκευή Παναγιωτοπούλου για τη συμμετοχή της στην εξεταστική επιτροπή, καθώς και για το χρόνο που διέθεσε για την αξιολόγηση της εργασίας μου.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν και την υποστήριξη που μου παρείχαν στο πολυετές αυτό ταξίδι των σπουδών μου στα Χανιά, καθώς και τους φίλους που μου χάρισαν τόσο όμορφες αναμνήσεις.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο – ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Επιπτώσεις προϊόντων καπνού στο περιβάλλον.....	12
1.2 Χημικές ενώσεις που περιέχονται στο καπνό.....	14
1.2.1 Μέταλλα στα προϊόντα καπνού.....	14
1.3 Εναλλακτικοί τρόποι καπνίσματος.....	15
1.4 Συσκευές θέρμανσης καπνού.....	15
2. ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ.....	17
2.1 Στοιχεία τοξικολογίας.....	18
2.2 Οικοτοξικολογία - Περιβαλλοντική τοξικολογία.....	18
2.3 Έλεγχος οικοτοξικότητας στο περιβάλλον.....	19
2.3.1 Βιοδείκτες.....	20
2.4 Οικοτοξικότητα στο έδαφος.....	24
2.4.1 Κατηγορίες και διασπορά ρύπων.....	24
2.4.2 Επιπτώσεις ρύπων.....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	28
3.1 Υλικά και εξοπλισμός.....	28
3.1.1 Μηχανή καπνίσματος.....	29
3.2 Πειραματική διαδικασία.....	31
3.2.1 Δημιουργία υδατικών εκπλυμάτων (Leaching).....	31
3.2.2 Έλεγχος οικοτοξικότητας με βιοδείκτη <i>Vibrio fischeri</i>	33
3.2.3 Έλεγχος οικοτοξικότητας με βιοδείκτη <i>Penicillium purpurogenum</i>	35
3.2.4 Έλεγχος οικοτοξικότητας στο έδαφος.....	36

3.2.4.1 Μέθοδος καλλιέργειας για τη μέτρηση πληθυσμού βακτηρίων και μυκήτων.....	39
3.2.4.2 Ποσοτικοποίηση βακτηριακού πληθυσμού με real time PCR.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	43
4.1 Έλεγχος οικοτοξικότητας με βιοδείκτη <i>V.fischeri</i>	43
4.2. Έλεγχος οικοτοξικότητας με βιοδείκτη <i>P.purpureogenum</i>	48
4.3 Εκτίμηση οικοτοξικότητας στο έδαφος.....	52
4.3.1 Μέτρηση βακτηριακού και μυκητιακού πληθυσμού με μεθόδους καλλιέργειας.....	53
4.3.2 Ποσοτικοποίηση βακτηριακού πληθυσμού στο χώμα μέσω real time PCR.....	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κάπνισμα, και ειδικότερα το συμβατικό τσιγάρο είναι ευρέως διαδεδομένο σε ολόκληρο τον κόσμο. Τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, αλλά και ο σοβαρός αντίκτυπος που επιφέρει στο περιβάλλον η εκτεταμένη χρήση του, δημιουργούν όλο και μεγαλύτερη ανάγκη για την εύρεση νέων εναλλακτικών προϊόντων καπνού. Στη κατηγορία αυτή ανήκουν τα προϊόντα «heat not burn», τα οποία βασίζονται στη θέρμανση του καπνού σε χαμηλότερη θερμοκρασία από αυτή του ενός συμβατικού τσιγάρου. Κύριος στόχος της νέας αυτής τεχνολογίας είναι ο περιορισμός των επιβλαβών τοξικών ενώσεων που παράγονται κατά τη καύση. Ωστόσο, η επίδραση των εν λόγω προϊόντων αλλά και των παραγόμενων αποβλήτων στο περιβάλλον και γενικά στα οικοσυστήματα δεν έχει απασχολήσει ακόμη επαρκώς την επιστημονική κοινότητα.

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, εξετάστηκε η οικοτοξικότητα των υδατικών εκπλυμάτων από χρησιμοποιημένα και μη tobacco sticks, αλλά και από τα μέρη από τα οποία αυτά αποτελούνται (καπνός, φίλτρο). Για τα χρησιμοποιημένα προϊόντα καπνού έγινε χρήση της μηχανής καπνίσματος που ρυθμίστηκε βάσει συγκεκριμένου πρωτοκόλλου. Σε πρώτο στάδιο έγινε έλεγχος οικοτοξικότητας με χρήση βιοδεικτών, και συγκεκριμένα του βακτηρίου *Vibrio fischeri* και του μύκητα *Penicillium purpurogenum*. Τα αποτελέσματα όσον αφορά στο βακτήριο, έδειξαν ότι τα υδατικά εκπλύματα δε δρουν ιδιαίτερα τοξικά απέναντι σε αυτό. Η τιμή LD₅₀ εμφανίστηκε μόνο στη μικρότερη αραιώση (50%) των ολικών χρησιμοποιημένων TS και χρησιμοποιημένων και μη φίλτρων. Στην ίδια αραιώση ωστόσο, τα καπνισμένα φίλτρα επέφεραν τη μεγαλύτερη μείωση στο πληθυσμό του *V. fischeri*. Η παρουσία αχρησιμοποίητων ολικών TS δεν είχε καμία επίδραση στην ανάπτυξη του βακτηρίου, αφού η μείωση του πληθυσμού του σε όλες σχεδόν τις αραιώσεις αυτού του δείγματος, ήταν μηδενική. Η ανάπτυξη του *P. purpurogenum* παρουσία των υδατικών εκπλυμάτων από προϊόντα καπνού, μελετήθηκε σε διάστημα δυο εβδομάδων, και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι την πρώτη εβδομάδα ο μύκητας αναπτύχθηκε, αλλά η συγκέντρωση του πληθυσμού του ήταν κατά 2 Logs μικρότερη από αυτή του control. Ο αχρησιμοποίητος καπνός επέφερε τη μεγαλύτερη μείωση, ενώ το αχρησιμοποίητο φίλτρο τη μικρότερη. Στις 14 d, σημειώθηκε σημαντική αύξηση στον πληθυσμό του μύκητα με τη συγκέντρωσή του να πλησιάζει κατά πολύ αυτή του control. Ωστόσο, ο χρησιμοποιημένος καπνός περιόρισε την ανάπτυξή του, σε αντίθεση με το αχρησιμοποίητο φίλτρο που την ευνόησε ιδιαίτερα.

Στο δεύτερο στάδιο της εργασίας, έγινε έλεγχος οικοτοξικότητας σε δύο είδη χώματος από διαφορετικές περιοχές του νομού Χανίων. Ειδικότερα, εξετάστηκε η επίδραση των υδατικών εκπλυμάτων στη βακτηριακή και μυκητιακή κοινότητα των χωμάτων, σε διάστημα 60 d. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αυτοί της καλλιέργειας μυκήτων και βακτηρίων, καθώς και της real time PCR για την ποσοτικοποίηση του βακτηριακού πληθυσμού μέσω της ανίχνευσης του γονιδίου 16S rRNA. Τα

αποτελέσματα της πρώτης μεθόδου για τα βακτήρια, έδειξαν ότι ο αχρησιμοποίητος καπνός στο χώμα Α και ο αντίστοιχος χρησιμοποιημένος στο χώμα Β, συνέβαλαν στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών επιφέροντας μια μικρή αύξηση στον πληθυσμό τους. Μείωση ωστόσο, σημειώθηκε με την παρουσία ολικών χρησιμοποιημένων TS στο βακτηριακό πληθυσμό του πρώτου χώματος, ενώ παρόμοια μείωση λόγω του αχρησιμοποίητου καπνού στο δεύτερο. Οι μύκητες παρουσίασαν μικρότερη ευαισθησία απέναντι στα υδατικά εκπλύματα, σε σύγκριση με τα βακτήρια. Στο χώμα Α, δεν υπήρξε καμία τοξική επίδραση ενώ στο χώμα Β τα χρησιμοποιημένα και μη φίλτρα επέφεραν μικρή μείωση στον πληθυσμό τους. Τα αποτελέσματα της μοριακής μεθόδου για το χώμα Α έδειξαν σχετική μείωση στο βακτηριακό πληθυσμό παρουσία των εκπλυμάτων, με εξαίρεση αυτών του αχρησιμοποίητου καπνού και των ολικών χρησιμοποιημένων TS, όπου παρατηρήθηκε αύξηση. Όσον αφορά στα βακτήρια του χώματος Β, η real time PCR κατέδειξε τα υδατικά εκπλύματα μη τοξικά προς αυτά, με τα περισσότερα να ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Συνοψίζοντας, και από τα τρία σκέλη της εργασίας συμπεραίνουμε πως τα βακτήρια είναι περισσότερο ευάλωτα στα υδατικά εκπλύματα των προϊόντων καπνού που εξετάστηκαν. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα σχετικά με την τοξικότητα των συγκεκριμένων προϊόντων σε οργανισμούς του υδάτινου και χερσαίου οικοσυστήματος, καθώς το ερώτημα για το περιβαλλοντικό τους αντίκτυπο παραμένει αναπάντητο.

ABSTRACT

Smoking and conventional cigarettes are widespread throughout the world. The high mortality rates, but also the serious environmental impact of this widespread use, raise the need to explore new tobacco alternatives or substitutes. This category includes "heat not burn" products, which are based on heating the tobacco to a lower temperature than that of a conventional cigarette. The main objective of this new technology is to reduce the harmful toxic compounds produced during combustion. However, the impact of these products and the waste produced on the microbial community in ecosystems has not yet been sufficiently addressed by the scientific community.

In the context, the main objective of this thesis was to evaluate the ecotoxicity of leachates from used and unused heated tobacco sticks, as well as from the parts of which they are composed (tobacco, filter). Regarding the used tobacco products, a cigarette-smoking machine was used, which was adjusted according to a specific protocol. As a first step, ecotoxicity testing was carried out using biomarkers, namely the bacterium *Vibrio fischeri* and the fungus *Penicillium purpurogenum*. The results concerning the bacterium showed that the leachates are not acute toxic towards *V. fischeri*. The LD₅₀ was recorded only at the lowest dilution of leachates (50%) concerning total used TS, used and unused filters. At the same dilution, however, the smoked filters led to the greatest reduction of *V. fischeri* population. The presence of total unused TS had no effect on the growth of the bacterium, since the population reduction in almost all dilutions of this sample reached zero levels. The behavior of *P. purpurogenum* in the presence of leachates of tobacco products was studied over a period of two weeks, and the results showed that in the first week the fungus grew, but its concentration was 2 Logs lower than that of the control sample. The unused tobacco resulted in the greatest reduction of the fungus, while the lowest one occurred when the unused filter was tested. After 14 days, there was a significant increase in the population of the fungus with its concentration being very close to that of the control. However, the used tobacco limited its growth, in contrast to the unused filter which favored it greatly.

In the second part of this study, ecotoxicity testing was carried out on two types of soil from different areas in Chania. In particular, the effect of leachates on the bacterial and fungal community of the soils was examined over a period of 60 days. The methods used were those of fungal and bacterial culture and real time PCR to quantify the bacterial population through the detection of the 16S rRNA gene. The results of the first method showed that the unused tobacco in soil A and the used tobacco in soil B had no significant effect on the bacterial population. However, a decrease was observed in the first soil and in the presence of total used TS, while a similar decrease was observed due to the unused tobacco in the second soil. Fungi showed less sensitivity to the leachates compared to the bacteria. In soil A, there was no toxic effect, while in soil B, the used and unused filters caused a slight reduction of their population. The results of the molecular method for soil A showed a decrease in the bacterial population in the

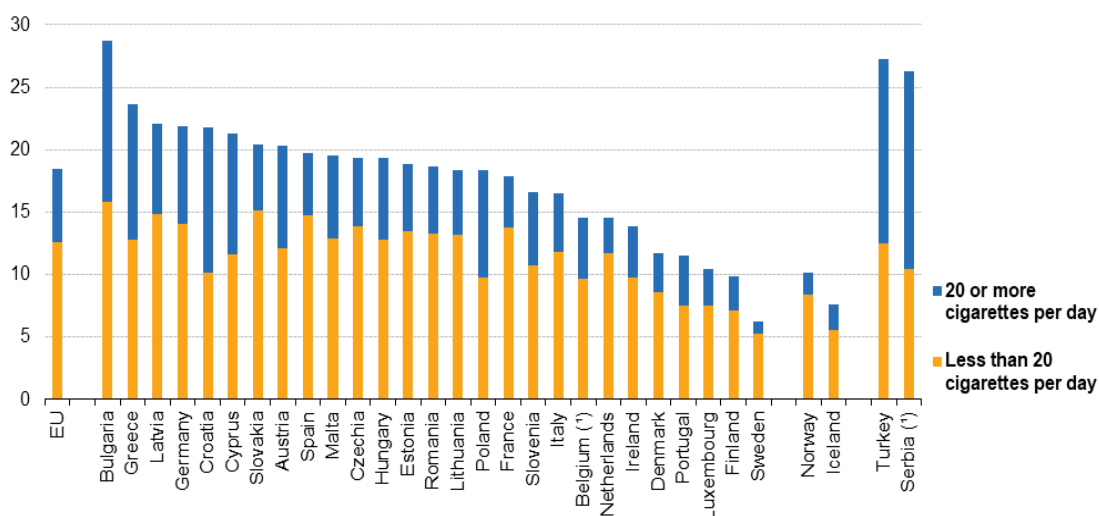
presence of the leachates, with the exception of unused tobacco and total used TS, which led to an increase. Regarding the bacteria in soil B, real time PCR showed the leachates to be non-toxic. Furthermore, most of the leachates favored the growth of microorganisms.

Concluding, the bacteria seem to be more susceptible than the fungi, regarding their response to the leachates of the tobacco products tested. However, further research is required on the toxicity of these products to organisms of aquatic and terrestrial ecosystems, as the question of their environmental impact remains unanswered.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κάπνισμα έχει μια πολύ μακρά ιστορία και είναι βαθιά ριζωμένο σε πολλούς πολιτισμούς του κόσμου. Το πιο δημοφιλές προϊόν καπνού είναι τα συμβατικά τσιγάρα, η κατανάλωση των οποίων έφτασε τα 5,7 τρισεκατομμύρια τεμάχια το 2016 (Tobacco Atlas, 2016). Οι βλαβερές συνέπειες του καπνίσματος τόσο στους ενεργούς όσο και στους παθητικούς καπνιστές είναι γνωστές και αποτελούν ζήτημα δημόσιας υγείας.

Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), το κάπνισμα σκοτώνει πάνω από 8 εκατομμύρια ανθρώπους κάθε χρόνο. Περισσότεροι από 7 εκατομμύρια από αυτούς τους θανάτους είναι αποτέλεσμα της άμεσης χρήσης προϊόντων καπνού, ενώ περίπου 1,2 εκατομμύρια είναι αποτέλεσμα της έκθεσης των μη καπνιστών στο παθητικό κάπνισμα. Πάνω από το 80% των 1,3 δισεκατομμυρίων καπνιστών παγκοσμίως ζουν σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος. Το 2020, το 22,3% του παγκόσμιου πληθυσμού έκανε χρήση καπνού, το 36,7% του συνόλου των ανδρών και το 7,8% των γυναικών (World Health Organization, 2017).



Εικόνα 1. Ποσοστό καπνιστών ηλικίας 15 ετών και άνω σε καθημερινή βάση το έτος 2019 (World Health Organization, 2022)

Σύμφωνα με την **Εικόνα 1**, το 2019 το 5,9 % του πληθυσμού της ΕΕ, ηλικίας 15 ετών και άνω κατανάλωνε τουλάχιστον 20 τσιγάρα ημερησίως ενώ το 12,6 % κατανάλωνε λιγότερα από 20 τσιγάρα ημερησίως. Μεταξύ των κρατών μελών της ΕΕ, μόνο στην Κροατία οι «μανιακοί καπνιστές» αποτελούσαν την πλειοψηφία των καθημερινών καπνιστών- τέτοιου είδους καπνιστές αποτελούσαν επίσης την πλειοψηφία στην Τουρκία και τη Σερβία. Αντίθετα, στην Ολλανδία και τη Σουηδία, λιγότεροι από ένας στους πέντε καθημερινούς καπνιστές ήταν «μανιακοί καπνιστές»

1.1 Επιπτώσεις προϊόντων καπνού στο περιβάλλον

Από την παραγωγή έως την κατανάλωση, τα προϊόντα καπνού δεν αποτελούν κίνδυνο μόνο για τη δημόσια υγεία, αλλά και για το περιβάλλον. Εκτός από τις εκατομμύρια ανθρώπινες ζωές που χάνονται κάθε χρόνο από την καπνοβιομηχανία, χάνουμε επίσης 600 εκατομμύρια δέντρα, 200 χιλιάδες εκτάρια γης και 22 δισεκατομμύρια τόνους νερού, ενώ παράλληλα, 84 εκατομμύρια τόνοι διοξειδίου του άνθρακα απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα (Arendtm, 2022).



Εικόνα 2. Τα αποτσίγαρα ως αποτέλεσμα κακής διαχείρισης του περιβάλλοντος (Istockphoto.com, 2022)

Τα αποτσίγαρα (cigarette butts, CBs), αποτελούν ένα από τα πλέον διαδεδομένα και πολυάριθμα απορρίμματα στο κόσμο. Συγκεκριμένα, θεωρώντας ως μέσο βάρους ενός χρησιμοποιημένου τσιγάρου τα 310mg, παράγονται σχεδόν 2 εκατομμύρια τόνοι από αυτά τα απορρίμματα ετησίως (Slaughter et al., 2011). Εντοπίζονται κυρίως σε αστικές περιοχές με το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών, αν όχι όλο, να καταλήγει στα οικοσυστήματα. Εκτιμάται ότι τα τσιγάρα περιέχουν πάνω από 5000 ενώσεις. Μεταξύ αυτών, τουλάχιστον οι 150 θεωρούνται ιδιαίτερα τοξικές, εκ των οποίων 44 βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες. Όταν καίγονται, πολλές από τις χημικές ουσίες που υπάρχουν στα τσιγάρα παράγουν νέες ενώσεις (Moriwaki et al., 2009, Novotny et al., 2009). Οι ενώσεις με το υψηλότερο τοξικό δυναμικό συγκεντρώνονται κυρίως στα υπολείμματα του καπνού και στο φίλτρο (Iskander, 1986, Slaughter et al., 2011, Barnes, 2011). Συνεπώς, οι ενώσεις αυτές αφού εκλυθούν στο έδαφος μπορούν να προκαλέσουν ρύπανση και με τη μεταφορά τους στο υδάτινο περιβάλλον ενδέχεται να αποτελέσουν

απειλή για τους οργανισμούς που ζουν σε αυτό. Ωστόσο, το πρόβλημα δε περιορίζεται μόνο στις τοξικές ενώσεις που απελευθερώνονται από τα υπολείμματα του τσιγάρου.

Η οξική κυτταρίνη, από την οποία κατασκευάζονται τα φίλτρα των τσιγάρων, είναι ένα συνθετικό πολυμερές που παρασκευάζεται από κυτταρίνη (φυσικό πολυμερές φυτικής προέλευσης). Η κυτταρίνη βιοαποικοδομείται εύκολα από οργανισμούς που χρησιμοποιούν το ένζυμο κυτταρινάση. Λόγω της τροποποίησης του πολυμερούς με χημικές διεργασίες, το παραγόμενο προϊόν είναι φωτοδιασπώμενο, αλλά έχει περιορισμένη δυνατότητα βιοαποικοδόμησης (Araújo and Costa, 2019).

Επιπλέον, οι Chevalier et al. απέδειξαν ότι τα CBs είναι η πηγή των νανοσωματιδίων που διαπερνούν εύκολα το περιβάλλον. Αυτά τα νανοσωματίδια μπορούν να είναι φορείς μαζικά προσροφημένων τοξικών ειδών και να τα μεταφέρουν σε μεγάλη απόσταση (Chevalier et al., 2018)



Εικόνα 3. Κύκλος ζωής προϊόντων καπνού και το αντίκτυπό του στο περιβάλλον (Townnews.com, 2022)

Για να κατανοήσουμε πλήρως τον αντίκτυπο που έχει η παραγωγή καπνού στο περιβάλλον, δεν αρκεί μόνο να εξετάσουμε τα απορρίμματα και τη ρύπανση που προκύπτουν από την εκτεταμένη χρήση των καταναλωτών. Είναι αναγκαίο να εξετάσουμε ακόμη την καλλιέργεια και την παραγωγή προϊόντων καπνού. Από την καλλιέργεια έως την παραγωγή, τη διανομή, τη χρήση των προϊόντων και τα απόβλητα μετά την κατανάλωσή τους, οι δραστηριότητες που σχετίζονται με τον καπνό αποτελούν σοβαρή απειλή για το περιβάλλον.

Οι πόροι και η γη που απαιτούνται για την καλλιέργεια του καπνού βασίζονται στη χρήση σπάνιων εδαφών και στην αποψίλωση των δασών. Σύμφωνα με έρευνα, η

παγκόσμια παραγωγή έξι τρισεκατομμυρίων τσιγάρων το 2014 χρησιμοποίησε 4 εκατομμύρια εκτάρια καλλιεργήσιμης γης. Ακόμη, η καύση ξύλου απαιτείται για τη μέθοδο ωρίμανσης του καπνού, με αποτέλεσμα περίπου 50 εκατομμύρια δέντρα να κόβονται ετησίως για το σκοπό αυτό. Η καλλιέργεια του καπνού έχει άμεσο επακόλουθο την υποβάθμιση του εδάφους. Η φύτευση μιας μονοκαλλιέργειας καθιστά απαραίτητη τη χρήση φυτοφαρμάκων και ζιζανιοκτόνων που επιδρούν αρνητικά στη γονιμότητα του εδάφους, δυσχεραίνοντας έτσι την ανάπτυξη των φυτών. Έτσι, η υποβάθμιση του εδάφους με τη σειρά της, εμποδίζει τη διατήρηση της βιοποικιλότητας. Έπειτα από την καλλιέργεια και την ωρίμανση του καπνού, ακολουθεί η παραγωγή και διανομή των προϊόντων, διαδικασίες εξίσου επιβλαβείς κυρίως μέσω των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα. Μάλιστα, η παραγωγή του καπνού και των συναφών προϊόντων του χρησιμοποιεί σημαντική ποσότητα πόρων, όπως νερό, ξύλο και καύσιμα άνθρακα, συχνά με μη βιώσιμο τρόπο (tobaccotactics.org).

1.2 Χημικές ενώσεις που περιέχονται στο καπνό

Ο καπνός αποτελεί ένα πολύπλοκο και δυναμικό χημικό μείγμα. Οι ερευνητές έχουν υπολογίσει ότι περιέχει περισσότερες από 7 χιλιάδες χημικές ενώσεις από πολλές διαφορετικές κατηγορίες. Συνεπώς, ο καπνός μπορεί να αποτελέσει σημαντική πηγή γνωστών τοξικών ενώσεων, όπως οι νιτροζαμίνες, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), τα φυτοφάρμακα, ετεροκυκλικές και αρωματικές αμίνες, και μέταλλα (Pinto et al., 2017).

1.2.1 Μέταλλα στα προϊόντα καπνού

Μεταξύ των χιλιάδων επιβλαβών και τοξικών ενώσεων που βρίσκονται στο καπνό, τα μέταλλα φαίνεται να συμβάλλουν σημαντικά στη συνολική επικινδυνότητα. Όλα τα φυτά απαιτούν διάφορα θρεπτικά συστατικά για τη διατήρηση των φυσιολογικών τους λειτουργιών, τα οποία και λαμβάνουν από το έδαφος. Ωστόσο, τόσο τα απαραίτητα, όσο και τα τοξικά στοιχεία μπορούν να εισέλθουν και να συσσωρευτούν στους φυτικούς ιστούς (Krämer, 2010, Pinto and Ferreira, 2015).

Το φυτό *Nicotiana tabacum*, από το οποίο παράγεται ο καπνός του τσιγάρου, έχει την ικανότητα να απορροφά ιόντα μετάλλων από το έδαφος, τα οποία μέσω του ριζικού συστήματος, τελικά μεταφέρονται και συσσωρεύονται στα φύλλα του. Ως αποτέλεσμα, τα παραγόμενα προϊόντα καπνού μπορεί να είναι εμπλουτισμένα σε μέταλλα, ενώ η επακόλουθη κατανάλωση και απόρριψή τους δύναται να αποτελέσει πηγή ρύπανσης του περιβάλλοντος. Στα στοιχεία αυτά περιλαμβάνονται τα μέταλλα κάδμιο, χρώμιο, μόλυβδος, υδράργυρος, νικέλιο και ψευδάργυρος, καθώς και το μεταλλοειδές αρσενικό.

1.3 Εναλλακτικοί τρόποι καπνίσματος

Αν και τα συμβατικά τσιγάρα παραμένουν τα πιο διαδεδομένα προϊόντα καπνού παγκοσμίως, η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών λύσεων γίνεται όλο και μεγαλύτερη. Τα τελευταία χρόνια, τα ηλεκτρονικά τσιγάρα (electronic cigarettes, EC) έχουν σημειώσει σημαντική απήχηση ιδιαίτερα από καπνιστές νεότερων ηλικιών. Πρόκειται για νέες ηλεκτρικές συσκευές θέρμανσης των οποίων η λειτουργία βασίζεται στην εξάτμιση ενός υγρού διαλύματος νικοτίνης σε μίγμα προπυλενογλυκόλης και γλυκερίνης. Οι συσκευές αυτές αποτελούνται από εξαρτήματα όπως η μπαταρία, το δοχείο υγρού και ο ατμοποιητής, όταν απορριφθούν ταξινομούνται ως απόβλητα ηλεκτρικού και ηλεκτρονικού εξοπλισμού, αλλά και ορισμένα από αυτά, λόγω του υγρού διαλύματος που περιέχουν, ως τοξικά απόβλητα. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι μέχρι σήμερα δεν έχουν πραγματοποιηθεί ενδελεχείς έρευνες σχετικά με την επίδραση των απορριμμάτων που προέρχονται από τα ηλεκτρονικά τσιγάρα, σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα.

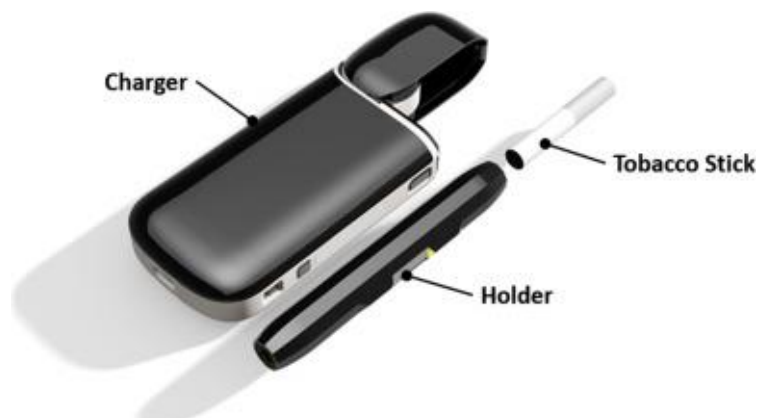
Ως συνέχεια των ηλεκτρονικών τσιγάρων, εισήχθησαν στην αγορά τα συστήματα θέρμανσης καπνού (Tobacco Heating System, THS) που λειτουργούν σύμφωνα με μια διαδικασία που ονομάστηκε «Heat not Burn». Βασίζονται ουσιαστικά στη θέρμανση του καπνού και όχι στην καύση του. Είναι πλέον ευρέως διαδεδομένα ως προς τη χρήση τους και διατίθενται σε μεγάλη ποικιλία στην αγορά. Ο τρόπος με τον οποίον αυτά λειτουργούν, καθώς και τα μέρη από τα οποία αποτελούνται, θα αναλυθούν περαιτέρω στη συνέχεια.

1.4 Συσκευές θέρμανσης καπνού

Πρόκειται για ένα υβριδικό προϊόν μεταξύ του συμβατικού και του ηλεκτρονικού τσιγάρου και υποστηρίζεται ότι είναι μειωμένου κινδύνου προϊόν, συγκριτικά πάντα με τα υπόλοιπα είδη. Το τσιγάρο αυτό μοιάζει πολύ με έναν ατμοποιητή δεύτερης γενιάς, διαφέρει όμως πολύ από τα σύγχρονα ηλεκτρονικά τσιγάρα ως προς τον τρόπο λειτουργίας του.

Η συσκευή θέρμανσης αποτελείται από δυο βασικά μέρη, τη ράβδο καπνού (tobacco stick) και τη συσκευή, η οποία περιλαμβάνει τη βάση στην οποία τοποθετείται η ράβδος και το φορτιστή (**Εικόνα 4**). Είναι εξοπλισμένο με τέτοιο τρόπο, ώστε να θερμαίνει τον ειδικά παρασκευασμένο και ανάμεικτο καπνό, τόσο όσο για να απελευθερώσει έναν αρωματικό ατμό που περιέχει νικοτίνη, χωρίς όμως να τον καίει. Η βάση τους είναι εξοπλισμένη με ειδικά ελεγχόμενο θερμαντήρα προκειμένου να θερμαίνει τη ράβδο καπνού. Έτσι, αφού ο καταναλωτής εισάγει το προϊόν καπνού στη βάση, πιέζει το κουμπί ώστε να ενεργοποιηθεί η θέρμανση. Το σύστημα θέρμανσης της ράβδου διαθέτει μηχανισμό προστασίας από υπερθέρμανση για την αποφυγή υπερβολικής θέρμανσης, ή και πιθανής καύσης του καπνού (Ruprecht et al., 2017).

Όταν επιτευχθεί η κατάλληλη θερμοκρασία, ενεργοποιείται ο ειδικός λαμπτήρας που υπάρχει στη βάση της συσκευής.



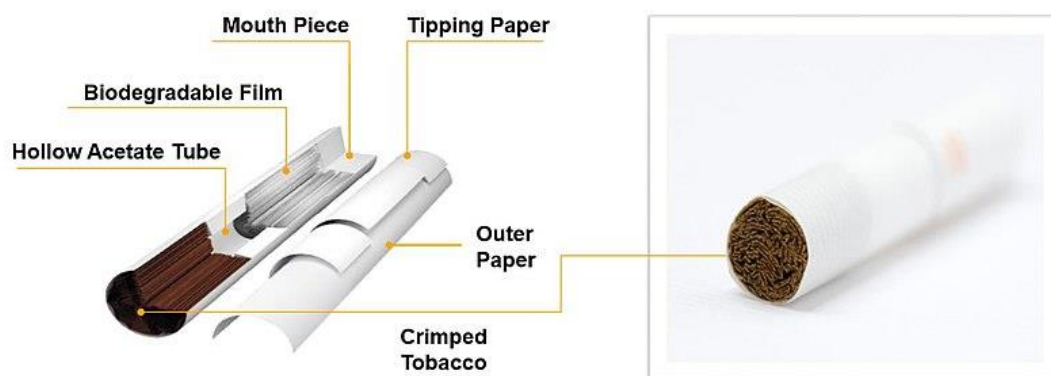
Εικόνα 4. Συσκευή θέρμανσης καπνού (Google.com, 2022)

Η βασική διαφορά μεταξύ των συμβατικών τσιγάρων και τέτοιου είδους συστημάτων, έγκειται στη διαδικασία καύσης και θέρμανσης αντίστοιχα. Ο καπνός που περιέχεται σε ένα συμβατικό τσιγάρο καίγεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 600°C παράγοντας έτσι ένα σύνολο επιβλαβών χημικών ουσιών. Αντίθετα, στη συσκευή θέρμανσης ο καπνός θερμαίνεται σε πολύ χαμηλότερες θερμοκρασίες, κάτω από 350°C , με κύρια επιδίωξη την ελαχιστοποίηση της παραγωγής τοξικών ουσιών.

Ωστόσο, υπάρχουν ακόμη κάποιες σημαντικές διαφορές που αφορούν στα επιμέρους τμήματα της ράβδου, δηλαδή τον καπνό και το φίλτρο.

Αρχικά, τα tobacco sticks περιέχουν καπνό ο οποίος αλέθεται, και με τη προσθήκη νερού, γλυκερίνης, κόμμι γκουάρ (gum guar), και ινών κυτταρίνης, ανασυντίθεται σε φύλλα τα οποία τελικά μέσω μιας διαδικασίας παίρνουν τη μορφή συμπιεσμένου καπνού. Αντίθετα, ο καπνός των συμβατικών τσιγάρων περιέχει φύλλα καπνού κομμένα σε μικρά κομμάτια (Smith et al., 2016). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί, πως τα tobacco sticks περιέχουν πολύ μικρότερες ποσότητες καπνού σε σύγκριση με τα συμβατικά.

Μια ακόμη σημαντική διαφορά παρατηρείται στα φίλτρα των δύο ειδών προϊόντων καπνού. Το τσιγάρο περιέχει ένα μόνο φίλτρο, κατασκευασμένο από οξική κυτταρίνη, σε αντίθεση με τη ράβδο καπνού που περιέχει δύο ξεχωριστά και ανεξάρτητα μεταξύ τους. Ένα φίλτρο πολυμερούς μεμβράνης για τη ψύξη του αερολύματος (polymer-film filter), και ένα επιστόμιο φίλτρο οξικής κυτταρίνης χαμηλής πυκνότητας, σαν προσομοίωση του συμβατικού τσιγάρου. Επιπλέον, ένας κοίλος σωλήνας λειτουργεί ως διαχωριστικό του καπνού από το πολυμερές φίλτρο (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5. Τα μέρη ενός tobacco stick (Vape-testing.com, 2022)

Λόγω της ομοιότητας των συστημάτων θέρμανσης καπνού και των συμβατικών τσιγάρων, υπάρχει ανησυχία ότι η εκτεταμένη χρήση των heat-not-burn προϊόντων είναι δυνατόν να επιφέρει εξίσου επιβλαβείς περιβαλλοντικές επιπτώσεις σε υδρόβιους και χερσαίους μικροοργανισμούς.

2. ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Η **τοξικολογία** (toxicology) αναπτύχθηκε ως επιστημονικό πεδίο, με κυρίαρχο στόχο τη μελέτη επίδρασης τοξικών χημικών ουσιών σε τρόφιμα, φυτά και ζώα και των δυσμενών επιπτώσεων που προκάλεσαν στην ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, τον 20^ο αιώνα παρατηρήθηκε σημαντική ανάπτυξη και εξέλιξη μεθόδων δίνοντας έτσι τη δυνατότητα στην επιστημονική κοινότητα να διερευνήσει βαθύτερα τα αίτια της τοξικότητας, τις τοξικές δόσεις και τις τοξικές μεταβολικές επιδράσεις σε διάφορα όργανα. Η τοξικολογία σύντομα αποκτά επιμέρους κλάδους, όπως κλινική τοξικολογία, βιομηχανική, περιβαλλοντική, φαρμακευτική τοξικολογία.

Ο τομέας της τοξικολογίας, συμπεριλαμβανομένης τόσο της περιβαλλοντικής τοξικολογίας, όσο και της οικοτοξικολογίας που θα οριστεί παρακάτω, περιλαμβάνει τη κατανόηση των διαφόρων ειδών επιδράσεων που προκαλούνται από χημικές ουσίες, τις βιοχημικές και φυσιολογικές διεργασίες που είναι υπεύθυνες για αυτές τις επιπτώσεις, καθώς και την ευαισθησία διαφορετικών τύπων οργανισμών κατόπιν έκθεσης σε αυτές τις ουσίες.

2.1 Στοιχεία τοξικολογίας

Μια τοξική ουσία εκτιμάται σε δόση ή συγκέντρωση αυτής. Συγκεκριμένα, για τους χερσαίους οργανισμούς η δόση μετριέται πάντα σε mg τοξικής ουσίας/kg βάρους του οργανισμού, ενώ για υδρόβιους οργανισμούς το κριτήριο για την τοξικότητα μιας ουσίας είναι η συγκέντρωσή της στο νερό σε mg/L ή $\mu\text{g/L}$ της ουσίας. Μια δόση ή συγκέντρωση συνήθως θεωρείται τοξική όταν προκαλεί το θάνατο ορισμένων οργανισμών. Ωστόσο, σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτή που προκαλεί τον θάνατο είναι δυνατό να προκαλέσει κάποια βλάβη στον οργανισμό. Συνεπώς, ως τοξική δόση ή συγκέντρωση ορίζεται εκείνη που προκαλεί αναστολή σε κάποια φυσιολογική λειτουργία ενός οργανισμού (π.χ. αναστολή στην ικανότητα αναπαραγωγής) (Κούγκολος, 2007).

Οι επικρατέστεροι και ευρέως χρησιμοποιούμενοι τοξικολογικοί όροι είναι οι εξής:

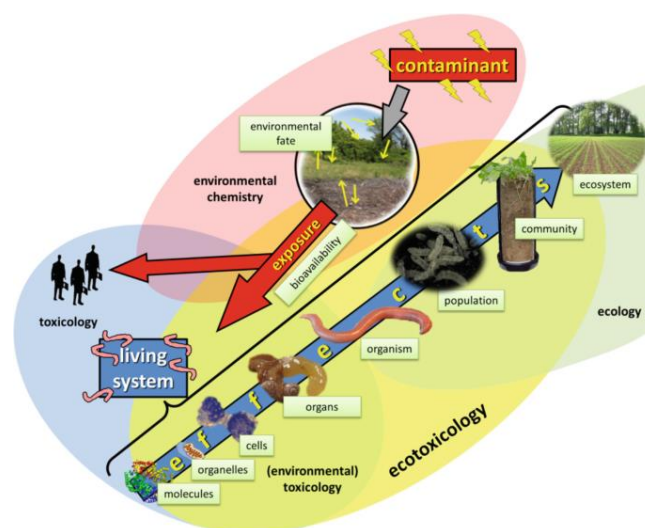
- LD_{50} (Lethal Dose): δόση της χημικής ουσίας που προκαλεί το θάνατο στο 50% του πληθυσμού που εκτίθεται σε αυτή.
- ED_{50} (Effective Dose): δόση της χημικής ουσίας που προκαλεί κάποιο αποτέλεσμα (π.χ. αναισθησία), στο 50% του πληθυσμού που εκτίθεται σε αυτή.
- LT_{50} (Lethal Time): χρόνος που απαιτείται για το θάνατο του 50% του πληθυσμού που εκτίθεται στην ουσία.
- LC_{50} (Lethal Concentration): συγκέντρωση της χημικής ουσίας που προκαλεί το θάνατο στο 50% του πληθυσμού που εκτίθεται σε αυτή.
- EC_{50} (Effective Concentration) ή IC_{50} (Inhibition Concentration): συγκέντρωση της χημικής ουσίας που μειώνει ή αναχαιτίζει κατά 50% τη μετρούμενη παράμετρο.

2.2 Οικοτοξικολογία – Περιβαλλοντική τοξικολογία

Η **οικοτοξικολογία**, αποτελεί ένα νέο πολυεπιστημονικό πεδίο που ενσωματώνει βιολογικές πληροφορίες, οικολογικούς όρους και τοξικολογικές πτυχές της περιβαλλοντικής ρύπανσης στα οικοσυστήματα. Ως επιστήμη, καλύπτει θεμελιώδη έρευνα σχετικά με τις επιπτώσεις των τοξικών χημικών ουσιών σε πληθυσμούς, κοινότητες χερσαίων και θαλάσσιων οικοσυστημάτων. Η οικοτοξικότητα ως αντικείμενο μελέτης του τομέα της οικοτοξικολογίας, αναφέρεται στην ικανότητα μιας ένωσης ή οποιουδήποτε φυσικού παράγοντα να προκαλεί βλαβερή επίδραση τόσο

ευρύτερα στο περιβάλλον, όσο και στους οργανισμούς όπως ψάρια, έντομα, μικροοργανισμούς, φυτά.

Η **περιβαλλοντική τοξικολογία** μελετά την έκθεση, τις τοξικοκινητικές και τοξικοδυναμικές μεταβολές, καθώς και τις αρνητικές επιπτώσεις των επικίνδυνων χημικών παραγόντων σε ζωντανούς οργανισμούς στα περιβαλλοντικά διαμερίσματα (Βλαχογιάννης & Βαλβανίδης, 2010).



Εικόνα 6. Η οικοτοξικολογία ως πολυσύνθετο επιστημονικό πεδίο (Chapman, 2002)

Συχνά, συγχέεται ο τομέας της οικοτοξικολογίας με αυτόν της περιβαλλοντικής τοξικολογίας, υπάρχουν όμως ορισμένες σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Για την τελευταία, τα ζητήματα που κυριαρχούν είναι κατά βάση εργαστηριακά (συλλογή, καλλιέργεια, δοκιμές), παρά οικολογικά (σημασία στη λειτουργία της τροφικής αλυσίδας/κοινότητας). Ακόμη, οι δοκιμές που πραγματοποιούν οι περιβαλλοντικοί τοξικολόγοι αφορούν μεμονωμένα είδη και όχι συνδυασμένα. Η δοκιμή συνδυασμένων ειδών μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη τοξικότητα συγκριτικά με τη δοκιμή μεμονωμένων ειδών (Chapman, 2002).

2.3 Έλεγχος οικοτοξικότητας στο περιβάλλον

Η έντονη εκβιομηχάνιση και χρήση χημικών ουσιών στη γεωργία, έχουν συμβάλει στην απελευθέρωση πολλών τοξικών ενώσεων στο νερό, τον αέρα και το έδαφος, γεγονός που προκαλεί σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα (Jaffrezic-Renault and Dzyadevnych, 2008). Η έκθεση των ζωντανών οργανισμών σε τοξικά επίπεδα ρύπων δύναται να προκαλέσει ασθένειες σε ανθρώπους και ζώα. Ακόμη, οι τοξικές χημικές

ουσίες μπορούν να τροποποιήσουν τους ρυθμούς των φυσικών βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνουν τη μακροπρόθεσμη αναστολή της ανάπτυξης, της αναπαραγωγής και της μετανάστευσης των ειδών. Έτσι, η παρακολούθηση και η ανίχνευση τοξικών χημικών καθίσταται σημαντική για την ασφάλεια των ανθρώπων και των ζώντων οργανισμών στη γη.

Η σοβαρότητα της περιβαλλοντικής ρύπανσης έχει οδηγήσει σε έναν αυξανόμενο αριθμό πρωτοβουλιών και επιστημονικών δραστηριοτήτων όσον αφορά την αξιολόγηση της ρύπανσης των υδάτων, του αέρα και του εδάφους. Οι μέθοδοι εκτίμησης της τοξικότητας χημικών ουσιών σε περιβαλλοντικά δείγματα, μπορούν να διακριθούν σε δυο ομάδες.

Η πρώτη, περιλαμβάνει φυσικές ή χημικές αναλύσεις βάσει των οποίων οι ρύποι προσδιορίζονται και ποσοτικοποιούνται (π.χ. αέρια ή υγρή χρωματογραφία, φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης). Αξίζει να αναφερθεί πως οι συγκεκριμένες αναλύσεις εμφανίζουν αρκετά μειονεκτήματα παρά τη σημαντική ευαισθησία και ακρίβεια στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ρύπων σε περιβαλλοντικά δείγματα,. Για παράδειγμα, πρόκειται για τεχνικές χρονοβόρες που δεν εκτελούνται εύκολα εκτός του εργαστηριακού χώρου και προαπαιτούν ακριβό εξοπλισμό καθώς και εξειδικευμένο προσωπικό.

Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει βιοδοκιμές και βιοδείκτες. Στην περίπτωση αυτή, δεν γίνεται σαφής προσδιορισμός των τοξικών ουσιών, αλλά οι μετρήσεις επιτρέπουν την αξιολόγηση της τοξικότητας των περιβαλλοντικών δειγμάτων προς τους οργανισμούς-στόχους. Οι τεχνικές αυτές είναι πολύ χρήσιμες για την αξιολόγηση του κινδύνου που σχετίζεται με δείγματα νερού που έχει υποστεί ρύπανση και βασίζονται σε αλλαγές στη φυσιολογική απόκριση των ζωντανών οργανισμών. Έχουν πολλά πλεονεκτήματα όπως η απλότητα, η ευαισθησία και το μικρό κόστος (Hassan et al., 2016).

Οι βιοδοκιμές (bioassays) αναφέρονται στα πειράματα της οικοτοξικολογίας και υδατικής τοξικολογίας, όπου έμβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την εκτίμηση της τοξικότητας χημικών ουσιών ή μιγμάτων στα οικοσυστήματα. Είναι σημαντικό να γίνονται πειράματα με περισσότερους από έναν οργανισμούς, οι οποίοι είναι αντιπροσωπευτικοί των κρίκων της τροφικής αλυσίδας.

2.3.1 Βιοδείκτες

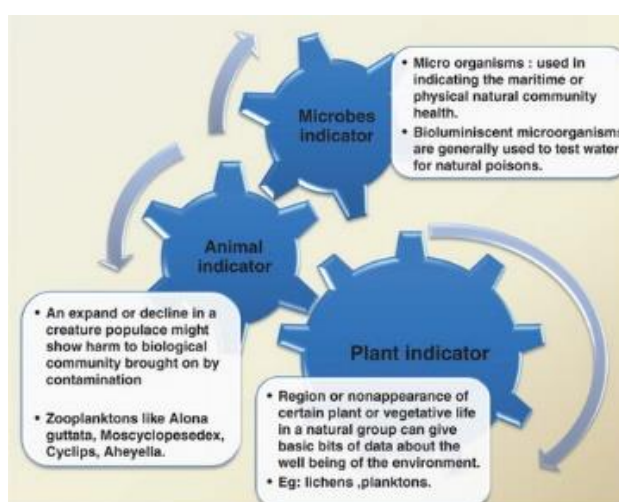
Ως **βιοδείκτες** (bioindicators) μπορούν να χαρακτηριστούν οι ζωντανοί οργανισμοί, δηλαδή φυτά, ζώα ή/και μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ποιότητας του περιβάλλοντος και του τρόπου με τον οποίο αυτή μεταβάλλεται με τη πάροδο του χρόνου. Οι αλλαγές στο περιβάλλον συχνά αποδίδονται είτε σε ανθρωπογενείς δραστηριότητες, είτε σε φυσικούς στρεσογόνους παράγοντες, αν και οι ανθρωπογενείς στρεσογόνοι παράγοντες αποτελούν το επίκεντρο της έρευνας για τους βιοδείκτες. Η ευρεία ανάπτυξη και εφαρμογή των βιοδεικτών ξεκίνησε από τη

δεκαετία του 1960 και με το πέρας των χρόνων έχει σημειωθεί σημαντική εξέλιξη όσον αφορά το εύρος τους.

Έτσι, είναι πλέον δυνατή η μελέτη και η αξιολόγηση όλων των οικοσυστημάτων (χερσαίου και υδάτινου) με τη χρήση όλων των μεγάλων ταξινομικών ομάδων.

Στο πλαίσιο αυτό, υπάρχουν τρεις κύριες λειτουργίες των βιοδεικτών:

- Παρακολούθηση του περιβάλλοντος (φυσικές ή/και χημικές αλλαγές)
- Παρακολούθηση των οικολογικών διεργασιών
- Παρακολούθηση της βιοποικιλότητας



Εικόνα 7. Είδη βιοδεικτών (Slidesharecdn.com, 2022)

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των βιοδεικτών είναι η ικανότητά τους να αναδεικνύουν τις έμμεσες βιοτικές επιδράσεις των ρύπων, τη στιγμή που πολλές φυσικές ή χημικές έρευνες δεν είναι σε θέση να το κάνουν. Οι επιστήμονες συμφωνούν στο ότι οι ζωντανοί οργανισμοί αποτελούν τον καλύτερο προγνωστικό παράγοντα για το πώς θα αντιδράσουν τα οικοσυστήματα σε τυχόν εισβολή ή εμφάνιση ενός στρεσογόνου παράγοντα.

Δείκτες φυτά

Τα άφθονα φυτικά είδη, όπως ανώτερα φυτά, λειχήνες και πλαγκτόν, αποτελούν ευαίσθητα εργαλεία για τη πρόβλεψη και την αναγνώριση των περιβαλλοντικών πιέσεων. Τα περισσότερα από αυτά, παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση του μολυσμένου οικοσυστήματος, καθώς είναι ακίνητα και επιτυγχάνουν εύκολα ισορροπία στο φυσικό τους περιβάλλον. Το φυτοπλαγκτόν έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε παρατηρήσεις ρύπανσης των υδάτινων οικοσυστημάτων. Η ομάδα αυτή βιοδεικτών είναι επίσης γνωστή και ως μικροφύκη, περιέχουν χλωροφύλλη, παρόμοια με τα χερσαία φυτά, και επομένως απαιτούν το φως της ημέρας προκειμένου να ζήσουν

και να αναπτυχθούν (Zaghloul et al., 2020). Οι λειχήνες είναι μικροοργανισμοί αποτελούμενοι από φύκη, μύκητες καθώς και από βρυόφυτα και εμφανίζονται ως επί το πλείστον ως φλοιώδεις συνεχείς κηλίδες θαμνωδών φυτών σε βράχους και κορμούς δέντρων. Χρησιμοποιούνται ευρέως ως βιοδείκτες λόγω της αποτελεσματικότητάς τους στην εκτίμηση της οικολογικής ρύπανσης δασικών οικοσυστημάτων, και ιδιαίτερα της ρύπανσης που οφείλεται στην αύξηση των επιπέδων διοξειδίου του θείου ή αζώτου.

Δείκτες ζώα

Μια αύξηση ή μείωση ενός ζωικού πληθυσμού, υποδηλώνει πάντα επιβλαβείς αλλαγές που οφείλονται στη ρύπανση του δεδομένου οικοσυστήματος. Οι αλλαγές στους πληθυσμούς των ζώων αναφέρονται συχνά στη σχέση μεταξύ ζωικών πληθυσμών και πηγών τροφίμων. Εκτός από τον έλεγχο του μεγέθους και του αριθμού συγκεκριμένων ειδών, οι ζωικοί δείκτες συμβάλλουν στην ανίχνευση της ποσότητας τοξινών στους ζωικούς ιστούς (Burger, 2006). Οι γαιοσκώληκες, τα μακρο-ασπόνδυλα καθώς και τα έντομα αποτελούν παραδείγματα τέτοιων δεικτών.

Μικροβιακοί δείκτες

Στους θαλάσσιους και παράκτιους οικοτόπους, οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται συχνά για τον έλεγχο της ρύπανσης των οικοσυστημάτων, καθώς έχουν γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης και ανταποκρίνονται ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα ρύπανσης. Λόγω της αφθονίας τους σε ποικίλα οικοσυστήματα, είναι άμεσα και έμμεσα διαθέσιμοι για την ανίχνευση ρύπων.

Οι βακτηριακοί δείκτες, είναι ομάδες ή είδη βακτηρίων των οποίων η παρουσία σε ένα οικοσύστημα, πάνω από καθορισμένα όρια, υποδηλώνει την επαφή τους με τους ρύπους. Μάλιστα, όταν εκτίθενται σε ορισμένους ρύπους, όπως το κάδμιο ή το βενζόλιο, ορισμένα βακτήρια εκκρίνουν νέες πρωτεΐνες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως έγκαιρη προειδοποίηση για εντοπισμό αλλαγών σε επίπεδα ρύπανσης σε ένα δεδομένο οικοσύστημα (Zaghloul et al., 2020).

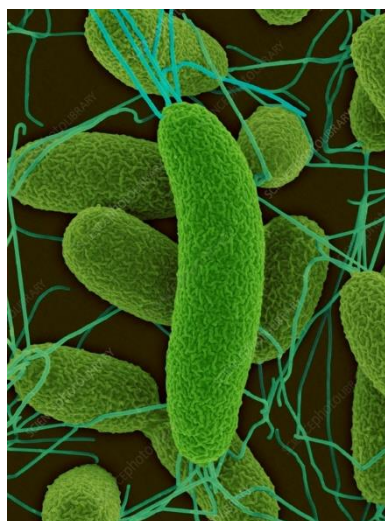
Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της χρήσης των βακτηριακών δεικτών καθορίζεται από τη σχέση που αναπτύσσουν με τους ρύπους, καθώς και από το είδος και το εύρος των ερωτημάτων που θέτει ο εκάστοτε ερευνητής (Zaghloul et al., 2020). Οι δοκιμές τοξικότητας με τη χρήση βακτηριακών δεικτών μπορούν να διαχωριστούν σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με την παράμετρο που εξετάζεται κάθε φορά. Συγκεκριμένα, αφορούν στην αύξηση πληθυσμού, στην κατανάλωση υποστρώματος, στην αναπνοή, αλλά και στη φωταύγεια ή αναστολή βιοφωταύγειας. Η συνεχώς αυξανόμενη προτίμηση των βακτηριακών αναλύσεων βασίζεται στο γεγονός ότι τα βακτήρια

αποτελούν αναπόσπαστο μέρος του οικοσυστήματος και οι τεχνικές που εφαρμόζονται είναι σχετικά γρήγορες και απλές.

Ένας από τους ευρέως διαδεδομένους και χρησιμοποιούμενους μικροβιακούς δείκτες για τον έλεγχο οικοτοξικότητας είναι το *Vibrio fischeri*. Πρόκειται για ένα θαλάσσιο, αρνητικό κατά Gram, και μη παθογόνο βακτήριο, που εντοπίζεται κυρίως σε εύκρατα και υποτροπικά νερά. Μπορεί να αναπτυχθεί σε μια πλαγκτονική κατάσταση ελεύθερης διαβίωσης, ή και σε μια συμβιωτική σχέση με ορισμένα ψάρια και καλαμάρια (Scheerer, Gomez and Lloyd, 2006). Χαρακτηριστική του ιδιότητα είναι να εκπέμπει βιοφωταύγεια και μια από τις πλέον διαδεδομένες μεθόδους ταχείας και αποτελεσματικής εκτίμησης της τοξικότητας είναι ο προσδιορισμός αναστολής βιοφωταύγειας με τη χρήση του συγκεκριμένου βακτηρίου.



(a)



(b)

Εικόνα 8. (a) Καλλιέργεια (b) Βιοφωταύγεια του βακτηρίου *V.fischeri* (Sciencephoto.com, 2022)

Οι μύκητες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις βιολογικές διεργασίες πολλών οικοσυστημάτων (Wong et al., 1998), καθώς λειτουργούν ως αποικοδομητές της οργανικής ύλης αλλά και ως πηγές τροφής για τους ανώτερους οργανισμούς. Ωστόσο, οι μύκητες εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι περιβαλλοντικές μεταβλητές μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση και τη λειτουργία της κοινότητας των μυκήτων (Bai et al., 2018).

2.4 Οικοτοξικότητα στο έδαφος

Το έδαφος αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους πόρους μας, καθώς συμβάλλει σημαντικά σε πολλές οικολογικές λειτουργίες όπως είναι η αποθήκευση και διήθηση νερού και θρεπτικών ουσιών, ο μετασχηματισμός χημικών ενώσεων και θρεπτικών ουσιών, η παραγωγή βιομάζας και η αποθήκευση άνθρακα.

Πρόκειται για ένα από τα πιο περίπλοκα και ποικιλόμορφα οικοσυστήματα της γης, καθώς πέρα από το ότι τροφοδοτεί την ανάπτυξη των φυτών, αποτελεί βίοτοπο για μια τεράστια ποικιλία ζώων (σπονδυλωτών και ασπόνδυλων), αλλά και ταξινομικών ομάδων μικροοργανισμών. Μάλιστα, εκτιμάται ότι το έδαφος φιλοξενεί το ένα τέταρτο της περιγραφόμενης βιοποικιλότητας. Αν και οι οργανισμοί μπορούν να εμφανιστούν σε όλα τα προφίλ του εδάφους, η βιολογική δραστηριότητα είναι ιδιαίτερα συγκεντρωμένη στα πιο επιφανειακά στρώματα, κυρίως στα 30cm του εδάφους, όπου και βρίσκονται οι υψηλότερες συγκεντρώσεις οργανικού υλικού (Alves and Cardoso, 2016).

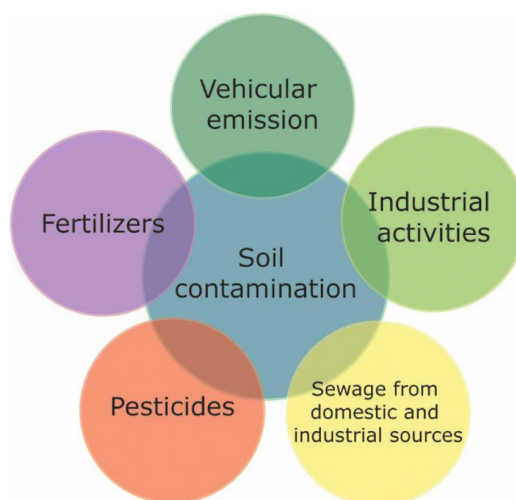
2.4.1 Κατηγορίες και διασπορά ρύπων

Είναι σημαντικό να συνειδητοποιήσουμε ότι όλα τα εδάφη, περιέχουν ουσίες που είναι επιβλαβείς ή τοξικές για τους ανθρώπους και για άλλα έμβια όντα. Πρόκειται για μέταλλα, ανόργανα ιόντα και άλατα (π.χ. ανθρακικά, φωσφορικά, νιτρικά, θειικά), αλλά και οργανικές ενώσεις (λιπίδια, πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, PAHs, υδρογονάνθρακες, DNA, αλκοόλες) που σχηματίζονται κυρίως μέσω της μικροβιακής δραστηριότητας και της αποσύνθεσης ζωικών και φυτικών οργανισμών. Ωστόσο, η συγκέντρωση τέτοιων ενώσεων σε έδαφος που δεν έχει υποστεί ρύπανση είναι αρκετά χαμηλή, ώστε να μην αποτελούν απειλή για το οικοσύστημα.

Η ρύπανση του εδάφους περιγράφεται ως η επιβάρυνσή του με τοξικές χημικές ουσίες ή άλλους ρυπογόνους παράγοντες, σε επίπεδο τέτοιο ώστε να μειώνεται η ποιότητά του και να καθίσταται πλέον μη βιώσιμο για τους ζωντανούς οργανισμούς. Μέρος αυτών των ενώσεων, εισέρχονται στο έδαφος μέσω φυσικών διεργασιών, όπως για παράδειγμα μέσω της βροχόπτωσης, του ανέμου ή άλλων τύπων διαταραχών του εδάφους. Ωστόσο, η ρύπανση του εδάφους δεν προέρχεται μόνο από φυσικά αίτια, όπως αυτά προαναφέρθηκαν.

Η εκθετική αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού, καθώς και η ανάπτυξη των βιομηχανικών, γεωργικών και υγειονομικών δραστηριοτήτων που απαιτούνται για τη στήριξη της ευημερίας τους, έχουν οδηγήσει σε ανάλογη αύξηση της παραγωγής και χρήσης χημικών ουσιών, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως αναδυόμενοι ρύποι. Οι ουσίες αυτές προέρχονται από βιομηχανικά και αστικά απόβλητα, φυτοφάρμακα, γεωργικές πρακτικές και η εκτεταμένη εισροή τους στο έδαφος μπορεί να αποτελέσει σοβαρό

κίνδυνο για τους οργανισμούς που ζουν σε αυτό, αλλά και για τη γονιμότητα και άλλα χαρακτηριστικά του εδάφους.



Εικόνα 9. Ανθρωπογενείς πηγές ρύπανσης του εδάφους (Intechopen.com, 2022)

Η ρύπανση του εδάφους, των επιφανειακών και υπογείων υδάτινων πόρων, μπορεί να προέλθει από σημειακές ή διάχυτες πηγές. Οι σημειακές πηγές σχετίζονται με διακριτές τοποθεσίες, που εντοπίζονται εύκολα από ένα μόνο σημείο απόρριψης, όπως νοσοκομεία, βιομηχανικές και αστικές περιοχές, αστικά λύματα, χώροι υγειονομικής ταφής απορριμμάτων. Από την άλλη πλευρά, οι διάχυτες πηγές αναφέρονται σε περιοχές όπου δεν υπάρχουν προφανείς μεμονωμένες πηγές απόρριψης, όπως γεωργικές εκτάσεις και εκτεταμένες περιοχές εκτροφής βοοειδών, ατμοσφαιρική απόθεση βιομηχανικών ρύπων ή καυσαερίων και σωματιδίων από οχήματα, χώροι απόρριψης και ανακύκλωσης ηλεκτρονικών αποβλήτων, λίπανση με ιλύ από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Gomes et al., 2017).

Οι κύριες οδοί των ρύπων στο έδαφος είναι οι άμεσες, όπως η σκόπιμη διάθεση, τα στραγγίσματα των χώρων υγειονομικής ταφής, η διαρροή λυμάτων, η εκτροφή βοοειδών. Οι έμμεσες, περιλαμβάνουν τις ατμοσφαιρικές αέριες μάζες που διανύουν μεγάλες αποστάσεις επηρεάζοντας τη πλειονότητα φυτών και ζώων με ξηρή και υγρή εναπόθεση των ρύπων στις επιφάνειες των φυτών, ή απευθείας στο έδαφος, όπου μπορούν και συσσωρεύονται (Gomes et al., 2017). Οι οργανικοί ρύποι συσσωρεύονται πιο αποτελεσματικά σε εδάφη με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία, όπου και μπορούν να παραμείνουν για χρόνια, ή να μετακινηθούν σε μεγάλες ή μικρές αποστάσεις ως μέρος αερίων ή/και στερεών σωματιδίων μέσω της ατμόσφαιρας (Fabietti et al., 2009). Οι υποδοχείς των ρύπων στο έδαφος είναι η μικροχλωρίδα, που περιλαμβάνει βακτήρια και μύκητες, τα φυτά, και η εδαφική πανίδα, δηλαδή τα πρωτόζωα και τα ασπόνδυλα (νηματοειδή, γαιοσκώληκες).

2.4.2 Επιπτώσεις ρύπων

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους εκτελούν πολλές ζωτικές διεργασίες και συμμετέχουν στη διατήρηση της υγείας και της ποιότητας του εδάφους. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εναλλαγή της οργανικής ύλης, στην απελευθέρωση θρεπτικών ουσιών και στη σταθεροποίηση της δομής του εδάφους και διασφαλίζουν τη γονιμότητά του. Οι διάφορες ουσίες που αποτίθενται στην επιφάνεια του εδάφους ακολουθούν την οδό της διήθησης, προσρόφησης ή καθίζησης (Donkova and Kaloyanova, n.d.). Η παρουσία σημαντικών συγκεντρώσεων διαφόρων χημικών ουσιών (φυτοφάρμακα, βαρέα μέταλλα, πολυκυκλικοί υδατάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια και φουράνια, διοξίνες, προϊόντα πετρελαίου κ.λπ.) μπορεί να καταστρέψει τη μικροβιακή χλωρίδα, να καταστείλει ή να θανατώσει ορισμένες ποικιλίες μικροοργανισμών και να ενεργοποιήσει την ανάπτυξη άλλων, γεγονός που θα οδηγήσει σε αλλαγή της ανθεκτικότητας του εδαφικού οικοσυστήματος στο σύνολό του. Η γρήγορη απόκριση και η ευαισθησία των μικροοργανισμών στους ρύπους συμβάλλουν στο γεγονός ότι οι μικροβιακές παράμετροι θεωρούνται χρήσιμοι δείκτες για την αξιολόγηση της γονιμότητας και της ποιοτικής κατάστασης του εδάφους.

Ωστόσο, ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν και να αποτοξινώνουν επιβλαβείς οργανικές και ανόργανες ενώσεις που συσσωρεύονται στο έδαφος ως ρύποι, προερχόμενοι από διάφορες δραστηριότητες (π.χ. γεωργικές πρακτικές). Συμβάλλουν έτσι στη βιοεξυγίανση, ωφελώντας την υγεία του εδάφους και των φυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο - ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της οικοτοξικότητας υδατικών εκπλυμάτων από χρησιμοποιημένα και μη προϊόντα καπνού. Τα προϊόντα αυτά αφορούν στα νέα tobacco sticks, και εξετάστηκαν ολόκληρα αλλά και ξεχωριστά ο καπνός και το φίλτρο από τα οποία αποτελούνται. Έτσι, στο πλαίσιο της εκτίμησης της επίδρασης των συγκεκριμένων προϊόντων καπνού στο περιβάλλον, πραγματοποιήθηκαν τα εξής:

- Έλεγχος οικοτοξικότητας με χρήση των βιοδεικτών *Vibrio fischeri* και *Penicillium purpurogenum*
- Έλεγχος οικοτοξικότητας σε δύο είδη χώματος με μεθόδους καλλιέργειας μυκήτων και βακτηρίων
- Απομόνωση γενετικού υλικού από τα χώματα που περιέχουν τα υδατικά εκπλύματα προϊόντων καπνού με σκοπό τη ποσοτικοποίηση βακτηριακού πληθυσμού σε αυτά, μέσω αντίχυνσης του γονιδίου 16S rRNA.

3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- ❖ Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific Heraeus)
- ❖ Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa)
- ❖ Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης (Elvem K103)
- ❖ Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu)
- ❖ Φυγόκεντρος - Centrifuge 5418R (Eppendorf)
- ❖ Ζυγός ακριβείας (Adventurer OHAUS Balance)
- ❖ Ζυγός (KERN 440-21A)
- ❖ Microplate Reader (LT-4000)
- ❖ StepOnePlus -Real Time PCR System (Applied Biosystems)
- ❖ Υδατόλουτρο (GFL)
- ❖ Φωτόμετρο (Biophotometer Eppendorf)
- ❖ NucleoSpin Soil DNA extraction Kit (Macherey-Nagel)
- ❖ MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems)
- ❖ SYBR Green qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS)
- ❖ Μηχανή καπνίσματος από την εταιρεία Burghart (Wedel ,Germany)
- ❖ Ράβδος θέρμανσης IQOS™ 2.4 Plus από τη Philip Morris Products (Neuchatel, Switzerland)
- ❖ IQOS sticks με αλουμίνιο (HEETS Red Label, TSAL)
- ❖ Συσκευή διήθησης κενού (Pall, German Laboratory)
- ❖ Φίλτρα πορώδους 0,45μm (Membrane Solutions)
- ❖ Shaker orbital

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΥΛΙΚΑ

- ❖ Αποστειρωμένα τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm
- ❖ Πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (microplate)

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- ❖ Nutrient Agar (NEOGEN Culture Media)
- ❖ Nutrient Broth 'E' (NEOGEN LAB M)
- ❖ Malt Extract Agar (NEOGEN Culture Media)
- ❖ Malt Extract Broth (NEOGEN Culture Media Acumedia LAB M)
- ❖ Agar (SIGMA-ALDRICH)
- ❖ Peptone (NEOGEN LAB M)

ΧΗΜΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- ❖ Potassium Phosphate Monobasic (SIGMA-ALDRICH)
- ❖ D-(+)-Glucose (SIGMA-Life Science)
- ❖ Rose Bengal (SIGMA)
- ❖ Magnesium Sulfate Heptahydrate (SIGMA-ALDRICH)

3.1.1 Μηχανή καπνίσματος

Για την προετοιμασία των χρησιμοποιημένων προϊόντων καπνού έγινε χρήση της μηχανής καπνίσματος από τη Burghart (Wedel, Germany) (**Εικόνα 10**), η οποία ήταν τοποθετημένη μέσα σε απαγωγό, προκειμένου να μην εισέλθει ποσότητα καπνού που παράχθηκε κατά τη διαδικασία στον εργαστηριακό χώρο. Η μηχανή αυτή αποτελείται από μια μόνο θύρα στην οποία μπορεί να εισάγεται ένα προϊόν κάθε φορά και για την έναρξη της διαδικασίας ήταν απαραίτητο να ρυθμιστεί αναλόγως με το είδος του τσιγάρου που χρησιμοποιούταν. Συγκεκριμένα, για τα Tobacco Sticks που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, η συσκευή ρυθμίστηκε βάσει του προτύπου υγείας του Καναδά (Health Canada Intense, HCI). Οι χαρακτηριστικές παράμετροι σύμφωνα με το πρότυπο, παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 1. Ρυθμίσεις της μηχανής καπνίσματος

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	Πρότυπο Υγείας του Καναδά (HCD)
Puff Volume	35mL
Puff Duration	2s
Puff Period	30s



Εικόνα 10. Μηχανή καπνίσματος

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

3.2.1 Δημιουργία υδατικών εκπλυμάτων (leaching)

Για τη παρασκευή των υδατικών εκπλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν Tobacco Sticks (HEETS Red Label) χρησιμοποιημένα και αχρησιμοποίητα. Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη ολόκληρου του προϊόντος καπνού, αλλά και των μερών από τα οποία αυτό αποτελείται. Έτσι, πρώτο στάδιο της διαδικασίας αποτέλεσε ο διαχωρισμός των TS σε φίλτρο και καπνό. Η αναλογία για χρησιμοποιημένα και μη, ολόκληρα TS, αλλά και για τα μέρη τους αντίστοιχα, ήταν 3 από το κάθε είδος σε 25mL απιονισμένου νερού. Αφού τα δείγματα τοποθετούνταν σε πλαστικά φιαλίδια (falcons) μαζί με την ποσότητα του νερού, αφήνονταν στη μηχανή ανάδευσης Shaker Orbital για 24 h, ώστε να πραγματοποιηθεί η έκπλυση σε θερμοκρασία δωματίου και σε ταχύτητα 180rpm (**Εικόνα 3**). Μετά το πέρας των 24 h γινόταν η διήθηση των δειγμάτων με χρήση της συσκευής διήθησης υπό κενό (**Εικόνα 4**). Οι αναλογίες για τη δημιουργία των υδατικών εκπλυμάτων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**.

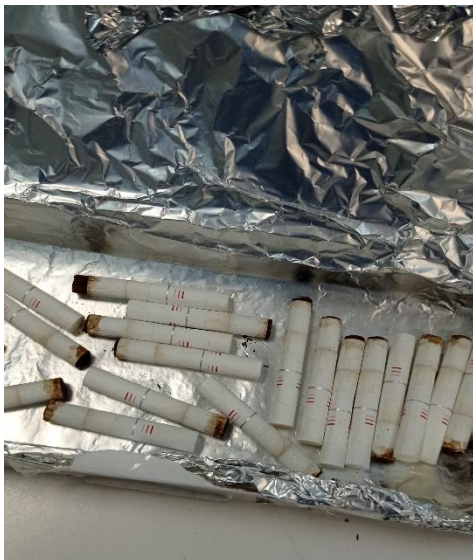
Πίνακας 2. Αναλογίες για τη δημιουργία εκπλυμάτων για κάθε είδος δείγματος

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ	ΟΓΚΟΣ H ₂ O (mL)
WHOLE UNSMOKED	3	25
WHOLE SMOKED	3	25
TOBACCO UNSMOKED	3	25
TOBACCO SMOKED	3	25
FILTER UNSMOKED	3	25
FILTER SMOKED	3	25

Τα υδατικά εκπλύματα που δημιουργήθηκαν, και η κωδικοποίησή τους ανάλογα με το είδος τους φαίνονται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3. Κωδικοποίηση δειγμάτων

WHOLE UNSMOKED	USW
WHOLE SMOKED	SW
TOBACCO UNSMOKED	UST
TOBACCO SMOKED	ST
FILTER UNSMOKED	USF
FILTER SMOKED	SF



Εικόνα 11. Total tobacco sticks used



Εικόνα 13. Δείγματα μετά από διήθηση



Εικόνα 12. Ανάδευση δειγμάτων για 24h

Στο πλαίσιο μιας έρευνας που διεξήχθη στο εργαστήριο Υδατικής Χημείας της κ. Ψυλλάκη, τα υδατικά εκχυλίσματα καπνού εξετάστηκαν ως προς τη περιεκτικότητά τους σε μέταλλα. Συγκεκριμένα, έγινε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των μετάλλων που υπάρχουν σε χρησιμοποιημένα και μη προϊόντα καπνού, τα οποία μπορούν να ελευθερωθούν εφόσον απορριφθούν στο περιβάλλον. Τα υδατικά εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν με τον ίδιο τρόπο και τις ίδιες αναλογίες με τη παρούσα διπλωματική εργασία, και ενδεικτικά οι τιμές μετάλλων που ανιχνεύτηκαν σε αυτά των ολικών χρησιμοποιημένων tobacco sticks, παρουσιάζονται στο **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4. Βιοδιαθέσιμη συγκέντρωση μετάλλων στα ολικά χρησιμοποιημένα tobacco sticks

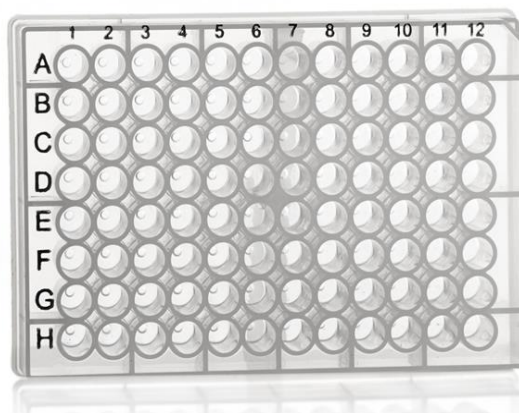
ΜΕΤΑΛΛΑ	Βιοδιαθέσιμη συγκέντρωση (µg/L)
Al	1427,67 ± 2,52
Cr	2,23 ± 0,06
Ni	11,93 ± 0,06
Cu	16,53 ± 0,38
Zn	225,37 ± 1,35
As	< DL
Se	14,14 ± 0,07
Cd	0,30 ± 0,00
Ba	208 ± 0,80
Hg	< DL
Pb	< DL

3.2.2 Έλεγχος οικοτοξικότητας με βιοδείκτη *Vibrio fischeri*

Δημιουργία εναιωρήματος

Η μέθοδος διεξήχθη σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (**Εικόνα 14**). Πριν τη πλήρωσή της, και αφού είχε γίνει ανακαλλιέργεια του βακτηρίου που θέλαμε να ελέγξουμε, δημιουργήθηκε εναιώρημα του μικροοργανισμού. Έπειτα, έγινε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης αυτού σε φασματοφωτόμετρο στα 600nm, ώστε να μη ξεπερνάει το 0,1, αφού είναι γνωστό ότι η τιμή αυτή, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αποικιών της τάξης 10⁸ CFUs/mL (κλίμακα Mcfarland). Τέλος, έγινε αραιώση ώστε η

ποσότητα του τελικού εναιωρήματος που θα τοποθετούνταν στο microplate να είχε συγκέντρωση 10^5 CFUs/mL.



Εικόνα 14. Πλάκα μικροτιτλοποίησης (Azenta.com, 2022)

Προετοιμασία του plate

Η διαδικασία ξεκίνησε με τη διανομή 100μL Nutrient Broth και στις 96 θέσεις. Στη συνέχεια, στη σειρά A, τοποθετήθηκαν 100μL της ουσίας 1 (Δ1) στη 1^η έως και τη 4^η στήλη, 100μL της ουσίας 2 (Δ2) στη 5^η έως και την 8^η στήλη, και 100μL της ουσίας 3 (Δ3) στην 9^η έως και τη 12^η στήλη. Και για τα 6 δείγματα που εξετάστηκαν, χρησιμοποιήθηκαν δυο microplates. Έπειτα από καλή ανάδευση, με τη χρήση της πολυκάναλης πιπέτας, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις μέχρι τη τελευταία σειρά του plate (H) και κάθε φορά διανέμονταν 100μL από τη μια γραμμή στην επόμενη, επιτυγχάνοντας έτσι αραιώση $1 \div 2$. Έτσι, στη σειρά A υπήρχε 50% του δείγματος και στην τελευταία σειρά (G) υπήρχε 0,78% του δείγματος. Από τη τελευταία σειρά αφαιρούνταν πάντα 100μL. Τέλος, έγινε η προσθήκη 5μL εναιωρήματος στις στήλες 1-3, 5-7 και 9-11, δηλαδή σε τρεις στήλες για κάθε δείγμα κάθε φορά, ώστε να υπάρχει επαναληψιμότητα. Στη τελευταία σειρά στη 1^η έως και την 9^η στήλη τοποθετείτο μόνο Broth, ως control για τον εντοπισμό τυχόν επιμόλυνσης ενώ τα τρία τελευταία πηγαδάκια της τελευταίας σειράς του plate εμβολιάζονταν μόνο με το εναιώρημα για να ελέγχεται κάθε φορά η ανάπτυξη του βακτηρίου.

Μετά την ολοκλήρωση του plate ακολούθησε επώαση στους 30°C για 18-24 h και στη συνέχεια έγινε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας με τη χρήση του φωτόμετρου ανάγνωσης μικροπλακών Microplate Reader (LT-4000).



Εικόνα 15. Προετοιμασία microplate

3.2.3 Έλεγχος οικοτοξικότητας με βιοδείκτη *Penicillium purpurogenum*

Αρχικά έγινε ανακαλλιέργεια του μύκητα *P.purpurogenum* σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Malt Extract Agar και στη συνέχεια η επώασή του σε θερμοκρασία δωματίου για 3-4 d. Μετά το πέρας των ημερών, σε μπουκάλι τοποθετήθηκαν 20mL θρεπτικού υλικού Malt Extract Broth και με κρίκο εμβολιασμού προστέθηκε επαρκής ποσότητα από την ανακαλλιέργεια του μύκητα. Έπειτα από καλή ανάδευση, έγινε ισομερής διαχωρισμός της ποσότητας του υγρού σε επτά μπουκάλια, εκ των οποίων τα έξι περιείχαν 20mL κάθε δείγματος αντίστοιχα (αραίωση 1:2). Το μπουκάλι χωρίς δείγμα λειτούργησε ως control και περιείχε 20mL αποστειρωμένο νερό.

Το πείραμα διήρκησε συνολικά δύο εβδομάδες (14 d) και πραγματοποιήθηκε μια σειρά από δειγματοληψίες σε χρόνο 0, χρόνο 7 και χρόνο 14 d. Ως χρόνος 0 θεωρείται ο χρόνος που δεν έχει υπάρξει ακόμη κάποια επίδραση της ουσίας στο μύκητα. Είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη, καθώς με τον τρόπο αυτό γίνεται γνωστός ο αρχικός αριθμός αποικιών/mL διαλύματος και έτσι στη συνέχεια γίνεται σύγκριση με τους υπόλοιπους χρόνους.

Στη κάθε δειγματοληψία ήταν απαραίτητο να δημιουργηθούν οι κατάλληλες αραιώσεις του κάθε δείγματος ξεχωριστά. Έτσι, με αποστειρωμένες πιπέτες των 10mL για τη κάθε αραιώση προστέθηκαν 9mL αποστειρωμένου νερού και 1mL πυκνού διαλύματος από το κάθε μπουκάλι. Στη συνέχεια με τη μέθοδο των δεκαδικών αραιώσεων δημιουργήθηκαν αντίστοιχα και οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις.

Έπειτα, ακολούθησε η επίστρωση τρυβλίων Petri με κρίκους εμβολιασμού. Τα τρυβλία περιείχαν θρεπτικό υλικό Malt Extract Agar και η ποσότητα της κάθε αραιώσης που τοποθετούνταν σε αυτά ήταν 100μL. Τέλος, τα τρυβλία αφήνονταν στο χώρο του εργαστηρίου για 3-4 d και ακολουθούσε η καταμέτρηση των αποικιών του μύκητα σε CFUs/mL διαλύματος.



(a)



(b)



(c)

Εικόνα 16(a-c). Ενδεικτικές αποικίες *P. Purpureogenum*

3.2.4 Έλεγχος οικοτοξικότητας στο έδαφος

Για τη διεξαγωγή του πειράματος συλλέχθηκαν ποσότητες από δύο είδη χώματος, ένα από το Πολυτεχνείο Κρήτης, στη περιοχή Ακρωτήρι Χανίων, και ένα από τη περιοχή της Αγίας Χανίων.

Πίνακας 4. Είδη χώματος

ΧΩΜΑ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΛΛΟΓΗΣ
A	Ακρωτήρι
B	Αγιά

Η συλλογή του χώματος A πραγματοποιήθηκε στις 13/12/21 και του χώματος B στις 5/5/22.

Προσδιορισμός υγρασίας χώματος

Η υγρασία αποτελεί παράγοντα ζωτικής σημασίας για το έδαφος, καθώς είναι απαραίτητη τόσο για την επιβίωση των μικροοργανισμών που ζουν σε αυτό, όσο και για τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών.

Οι μετρήσεις και τα αποτελέσματα του πειράματος αναφέρονται σε ποσότητες ξηρού χώματος, επομένως κρίθηκε απαραίτητος ο υπολογισμός του δείκτη υγρασίας του κάθε χώματος.

Έτσι, αφού πρώτα τα χώματα κοσκινίστηκαν προκειμένου να είναι απαλλαγμένα από τυχόν αδρανή υλικά, φύλλα ή ρίζες, ζυγίστηκε ενδεικτικά μικρή ποσότητα από το καθένα, και παρέμειναν στο κλίβανο σε θερμοκρασία 105°C για 24 h. Μετά το πέρας των 24 h, οι ποσότητες αυτές ζυγίστηκαν εκ νέου και έτσι υπολογίστηκε ο συντελεστής υγρασίας (θ_g) για κάθε χώμα αντίστοιχα. Ο μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και τα αποτελέσματα, παρουσιάζονται παρακάτω:

$$\theta_g = \frac{m-d}{d}$$

- m: μάζα νωπού χώματος
- d: μάζα χώματος έπειτα από ξήρανση στους 105°C

Πίνακας 5. Υπολογισμός συντελεστή υγρασίας Θ_g

	Μάζα χώματος πριν τη ξήρανση (g)	Μάζα χώματος μετά τη ξήρανση (g)	Συντελεστής υγρασίας (Θ)
ΧΩΜΑ Α	35,917	30,533	0,176
ΧΩΜΑ Β	9,995	8,280	0,207

Πειραματική Διαδικασία

Σε πλαστικά δοχεία προστέθηκαν 100g χώματος για κάθε δείγμα, και ένα επιπλέον που χρησιμοποιήθηκε για control. Στη συνέχεια, η κάθε ποσότητα χώματος εμποτίστηκε με 20mL δείγματος αντιστοίχως, ενώ το δοχείο χωρίς δείγμα περιείχε 20mL αποστειρωμένο νερό. Τα δοχεία παρέμειναν στο χώρο του εργαστηρίου σε θερμοκρασία δωματίου καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης του πειράματος, και εμποτίζονταν με μικρή ποσότητα νερού στα διαστήματα μεταξύ των δειγματοληψιών.

Το πείραμα διήρκησε δυο μήνες (60 d) και δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε χρόνο 0, χρόνο 30 και 60 d.



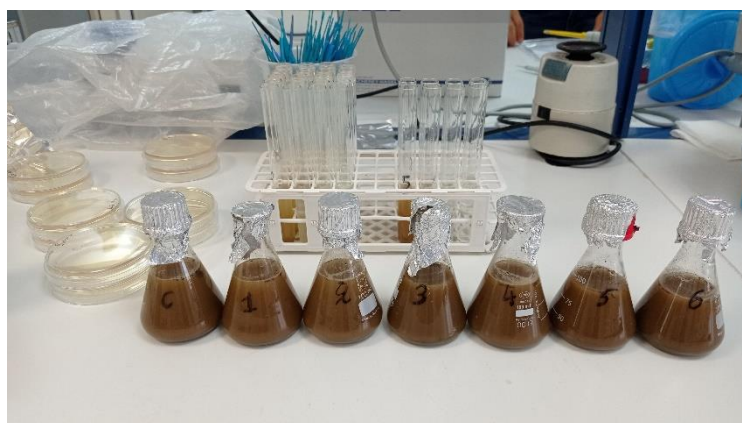
Εικόνα 17. Δοχεία που φυλάσσονταν τα χώματα με το κάθε δείγμα

3.2.4.1 Μέθοδος καλλιέργειας για τη μέτρηση πληθυσμού βακτηρίων και μυκήτων

Η μέθοδος καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση πληθυσμού των μικροοργανισμών ήταν παρόμοια και στα βακτήρια και στους μύκητες. Απαραίτητη για τη διαδικασία ήταν η καλή ανάμειξη του κάθε δείγματος με το χρώμα για την όσο το δυνατό καλύτερη απορρόφησή του. Παρακάτω, ακολουθούν αναλυτικά τα βήματα:

- ❖ Ζύγιση 10g χρώματος από κάθε δοχείο
- ❖ Διάλυση των 10g σε 95mL αποστειρωμένου νερού και καλή ανάδευση
- ❖ Μεταφορά 1mL του διαλύματος σε 9mL αποστειρωμένου νερού

Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε έως ότου φτάσουμε στην επιθυμητή κάθε φορά αραιώση, σύμφωνα με τη μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων.



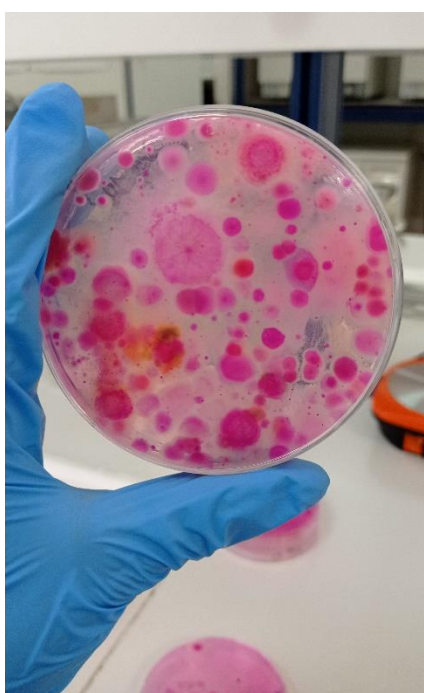
Εικόνα 18. Διάλυση του χρώματος σε κωνικές φιάλες

Στη συνέχεια, όσον αφορά τη καλλιέργεια βακτηρίων, έγινε επίστρωση ποσότητας 100μL από κάθε αραιώση σε τρυβλία Petri που περιείχαν θρεπτικό υλικό Nutrient Agar. Τα τρυβλία παρέμειναν στο θάλαμο επώασης στους 37°C για 24 h, μετά το πέρας των οποίων έγινε η καταμέτρηση των αποικιών σε CFUs/100μL.

Η καλλιέργεια μυκήτων ουσιαστικά διαφέρει ως προς τον τρόπο επίστρωσης. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος που ακολουθήθηκε εδώ ήταν αυτή της ενσωμάτωσης (pour plate technique), κατά την οποία έγινε τοποθέτηση 1mL διαλύματος σε αποστειρωμένα τρυβλία, και ανάμιξή του με συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό που παρασκευάστηκε και

περιείχε τη χρωστική Rose Bengal. Στο μίγμα έγινε επίσης προσθήκη του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη με σκοπό τη παρεμπόδιση ανάπτυξης βακτηρίων. Τέλος, τα τρυβλία παρέμειναν για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα από 4-6 περίπου d έγινε η καταμέτρηση των αποικιών σε CFUs/mL.

Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι οι μύκητες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα ορισμένες φορές να προκύπτουν δυσκολίες ως προς τη ταυτοποίησή τους αλλά και το διαχωρισμό τους από τα βακτήρια.



(a)



(b)

Εικόνα 19. Καταμέτρηση αποικιών σε καλλιέργειες (a) μυκήτων και (b) βακτηρίων

3.2.4.2 Ποσοτικοποίηση βακτηριακού πληθυσμού με real time PCR

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η βασική τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) στηρίζεται στην *in vitro* ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με την εφαρμογή διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα

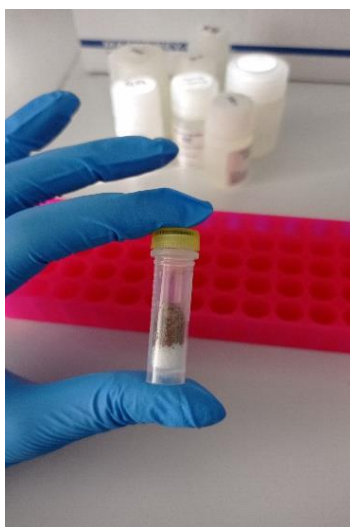
τρισεκατομμύριο φορές, προκειμένου να γίνει περαιτέρω μελέτη του με διάφορες μεθόδους. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA
- Υβριδισμός των εκκινητών, κατά τον οποίο αυτοί προσδένονται στο μονόκλωνο DNA
- Επιμήκυνση της αντίδρασης, κατά την οποία η DNA πολυμεράση επιμηκώνει τις αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'-3' χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον DNA-στόχο όπου έχουν προσδεθεί οι εκκινητές.

PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η Real-Time PCR, σε αντίθεση με τη συμβατική, επιτρέπει τη ποσοτικοποίηση του DNA μέσα σε ένα μεγάλο δυναμικό εύρος. Για το ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιείται η αναλογική σχέση του πρώτου κύκλου στον οποίο το προϊόν ενίσχυσης είναι σε ανιχνεύσιμη ποσότητα, με τον αρχικό αριθμό των αντιγράφων του νουκλεϊκού στόχου.

Στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε μια qPCR για όλα τα δείγματα, και για τα δύο χρώματα, σε αρχικό και τελικό χρόνο (0 και 60 d), προκειμένου να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί ο συνολικός βακτηριακός πληθυσμός, βάσει ποσοτικοποίησης του γονιδίου 16S rRNA.



Εικόνα 20. Διαδικασία απομόνωσης γενετικού υλικού

Απαραίτητο βήμα πριν τη πραγματοποίηση της qPCR ήταν η απομόνωση του γενετικού υλικού από κάθε δείγμα, για την οποία χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin Soil DNA Extraction Kit. Έπειτα, με τη χρήση της μεθόδου SYBR Green έγινε η qPCR.

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη PCR, οι κύκλοι καθώς και οι αλληλουχίες των εκκινητών, παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6. Αλληλουχία εκκινητών RT-PCR

Γονίδιο στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Προϊόν PCR (bp)	Βιβλιογραφία
16S rRNA	8-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	(Dupont et al., 2013)
	1492-R	GGTTACCTTGTACGACTT		

Πίνακας 7. Περιεχόμενα αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA

Μείγμα PCR	Συγκέντρωση
Mastermix	1X
Primer F	500nM
Primer R	500nM
DNA	2μL

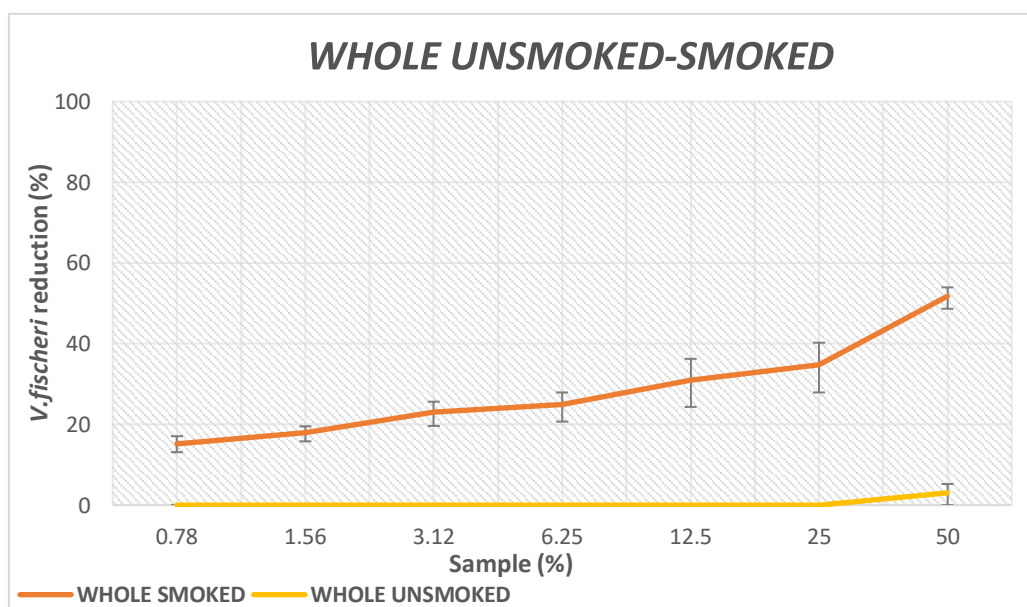
Πίνακας 8. Κύκλοι αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA

Θερμοκρασία	Χρόνος	30 cycles
95	4min	
95	1min	
55	30s	
72	30s	
95	15s	Melt curve stage
60	1min	
95	15s	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Έλεγχος οικοτοξικότητας με βιοδείκτη *Vibrio fischeri*

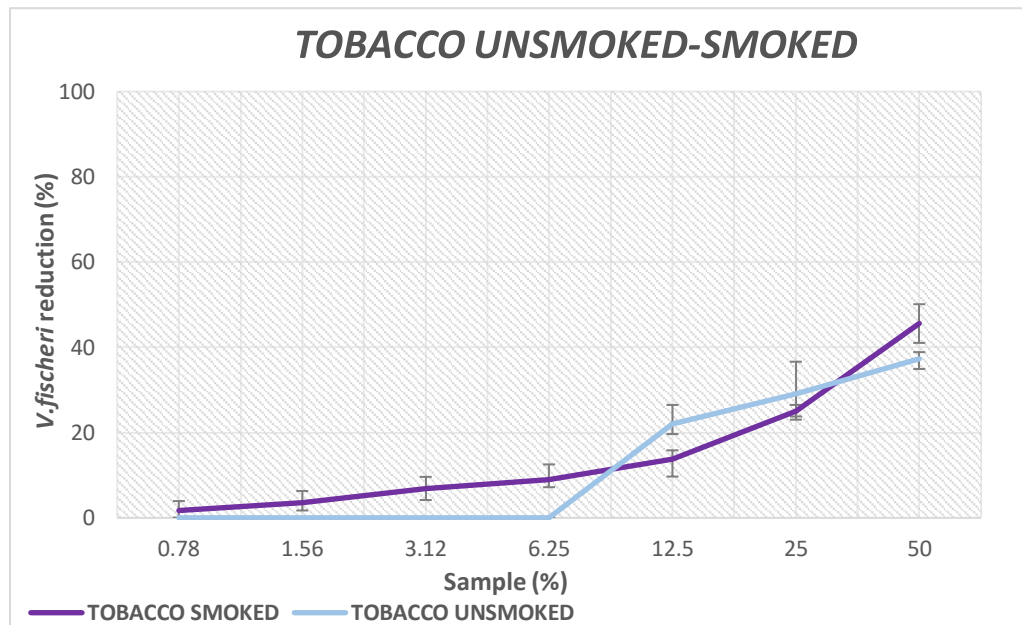
Το πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας αφορά στον έλεγχο των υδατικών εκπλύματων από προϊόντα καπνού, ως προς την οικοτοξικότητά τους με χρήση του βιοδείκτη *Vibrio fischeri*. Για τον προσδιορισμό της υπολογίστηκε η τιμή LD₅₀ (mean Lethal Dose for 50% mortality), που αφορά στον προσδιορισμό της δόσης του δείγματος (εκπλύματος), η οποία οδηγεί σε θάνατο 50% του πληθυσμού του μικροοργανισμού. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για όλα τα δείγματα, και τα αποτελέσματα για καθένα ξεχωριστά απεικονίζονται στα παρακάτω γραφήματα:



Γράφημα 1. Ποσοστιαία μείωση πληθυσμού *V.fischeri* παρουσία των δειγμάτων USW (WHOLE UNSMOKED) και SW (WHOLE SMOKED)

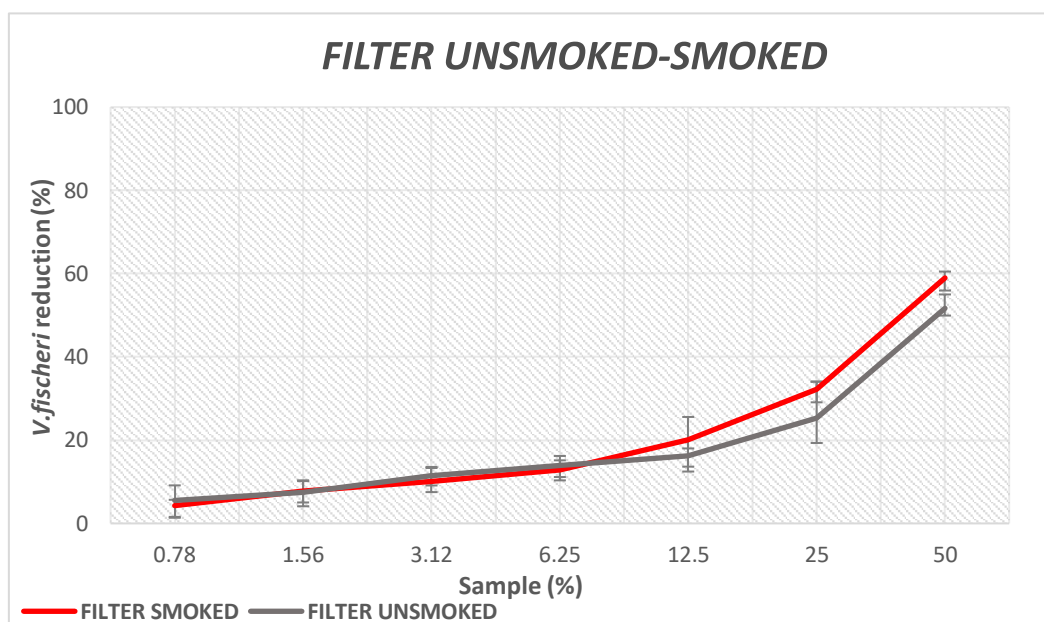
Στο **Γράφημα 1**, απεικονίζεται η συμπεριφορά του *V. fischeri* απέναντι στα δείγματα που προέρχονται από τα αχρησιμοποίητα (USW), και τα χρησιμοποιημένα (SW) ολόκληρα προϊόντα καπνού. Είναι εμφανής η διαφορετική επίδραση που έχει η κάθε ουσία ξεχωριστά στο πληθυσμό του βακτηρίου. Συγκεκριμένα, όσον αφορά το USW, φαίνεται να μην αναστέλλει καθόλου την ανάπτυξη του βακτηρίου, καθώς σε όλες τις αραιώσεις η μείωση του πληθυσμού του είναι μηδενική, εκτός από τη μικρότερη αραιώση (50% της ουσίας), όπου προκαλείται μια πολύ μικρή μείωση της τάξης του 3%. Αντίθετα, το SW, από τη μικρότερη έως και τη μεγαλύτερη αραιώσή του, επιφέρει μια μείωση στο πληθυσμό του *V.fischeri*. Ειδικότερα, ακόμα και στη μεγαλύτερη αραιώση (0,78% του δείγματος), το δείγμα φαίνεται να επιδρά στον μικροοργανισμό,

προκαλώντας μια μικρή μείωση της τάξης του 16%. Σε μικρότερες αραιώσεις, η μείωση του βακτηριακού πληθυσμού αυξάνεται σταδιακά σε μικρό βαθμό. Παρουσία 50% του δείγματος ο πληθυσμός μειώνεται κατά 50%. Έτσι, το LD₅₀ αντιστοιχεί σε αραιώση 50% του SW.



Γράφημα 2. Ποσοστιαία μείωση πληθυσμού *V.fischeri* παρουσία των δειγμάτων UST (TOBACCO UNSMOKED) και ST (TOBACCO SMOKED)

Στο **Γράφημα 2**, φαίνεται η επίδραση που ασκεί μεμονωμένα ο αχρησιμοποίητος (UST) και ο χρησιμοποιημένος (ST) καπνός αντίστοιχα, στο πληθυσμό του *V. fischeri*. Στις μεγαλύτερες αραιώσεις του UST, και συγκεκριμένα παρουσία 0,78%-6,25% του δείγματος, είναι προφανές ότι δεν παρατηρείται κάποια τοξικότητα ως προς την επιβίωση του βακτηρίου, καθώς η μείωση του πληθυσμού του στις τιμές αυτές είναι μηδενική. Ωστόσο, στα ίδια ποσοστά αραιώσης, φαίνεται πως το ST προκαλεί θανάτωση του μικροοργανισμού περίπου κατά 9%. Στη μικρότερη αραιώση και των δυο δειγμάτων παρατηρείται η μέγιστη μείωση του πληθυσμού, που δεν αγγίζει όμως το ποσοστό 50%.

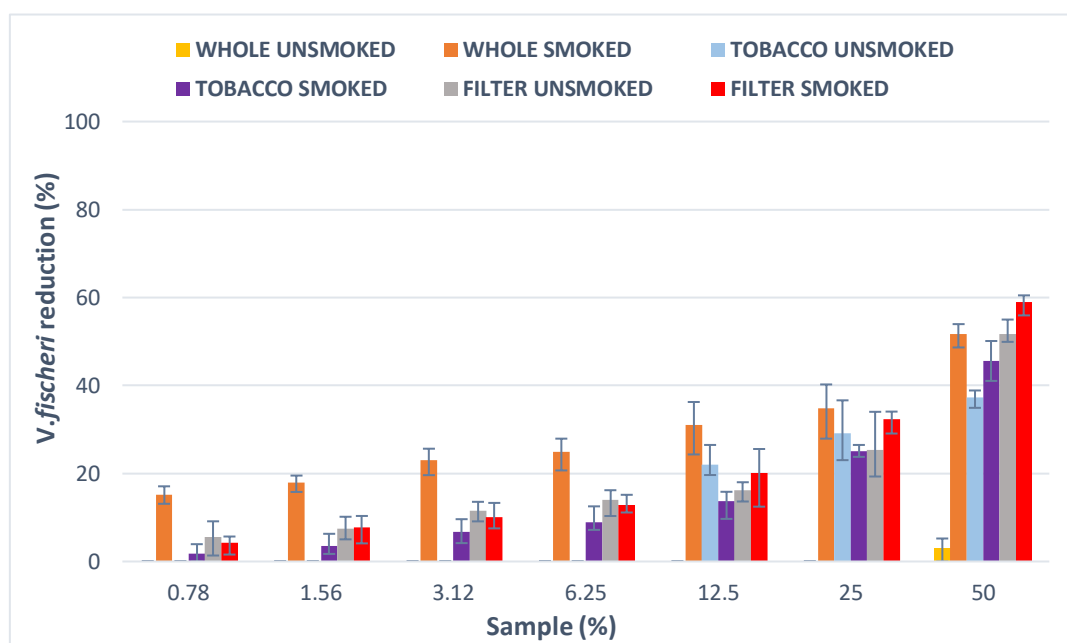


Γράφημα 3. Ποσοστιαία μείωση πληθυσμού *V. fischeri* παρουσία των δειγμάτων USF (FILTER UNSMOKED) και SF (FILTER SMOKED)

Στο **Γράφημα 3**, απεικονίζεται η συμπεριφορά του *V. fischeri* απέναντι στα USF και SF που αφορούν μεμονωμένα τα φίλτρα από αχρησιμοποίητα και χρησιμοποιημένα TS αντίστοιχα. Όπως φαίνεται, και τα δυο είδη φίλτρων, χρησιμοποιημένα ή μη, ασκούν την ίδια επίδραση στον μικροοργανισμό χωρίς να εμφανίζουν κάποια ιδιαίτερη διαφοροποίηση. Όσον αφορά τα USF, η ουσία δρα τοξικά απέναντι στο βακτήριο στη μικρότερη αραιώση της 50%, κατά την οποία θανατώνεται το 52% του πληθυσμού (LD₅₀). Ωστόσο, και σε μεγαλύτερες ακόμη αραιώσεις της ίδιας ουσίας παρατηρείται μια σχετική μείωση, με τη μεγαλύτερη αραιώση να οδηγεί σε θανάτωση 6% του πληθυσμού. Αντίστοιχα και για τα SF, φαίνεται πως και αυτή η ουσία δρα τοξικά, αφού ακόμη και σε μεγαλύτερες αραιώσεις προκαλείται μείωση στο πληθυσμό του *V. fischeri*. Η μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται κατά τη μικρότερη αραιώση της ουσίας 50%, στην οποία και αντιστοιχεί η τιμή LD₅₀.

Συμπερασματικά από τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτει ότι τα συγκεκριμένα προϊόντα καπνού που μελετήθηκαν δεν προκαλούν κάποια ιδιαίτερη τοξικότητα προς το βακτήριο *V. fischeri* που χρησιμοποιήθηκε ως βιοδείκτης. Όπως φαίνεται και από το συγκεντρωτικό **Γράφημα 4**, τα μεγαλύτερα ποσοστά θανάτου του μικροοργανισμού παρατηρούνται κατά τη μικρότερη αραιώση του κάθε δείγματος, με τα χρησιμοποιημένα φίλτρα να προκαλούν τη μέγιστη μείωση στον βακτηριακό πληθυσμό από όλα τα υπόλοιπα δείγματα, της τάξης του 58%. Ακολουθούν τα ολόκληρα χρησιμοποιημένα TS, τα αχρησιμοποίητα φίλτρα, ο χρησιμοποιημένος και αχρησιμοποίητος καπνός, και τέλος τα ολόκληρα αχρησιμοποίητα tobacco sticks (USW<UST<ST<USF<SW<SF). Ωστόσο, οι Warne et al (2012) σε αντίστοιχη έρευνα για συμβατικά προϊόντα καπνού, διαπίστωσαν προοδευτική αύξηση της τοξικότητας

από USF, SF σε SW. Στη προκειμένη περίπτωση φάνηκε πως ο υπολειμματικός καπνός από τα χρησιμοποιημένα τσιγάρα συνεισέφερε έως ένα βαθμό τοξικότητας σημαντικά μεγαλύτερο από αυτόν που προσδίδουν οι χημικές ουσίες που εκλύονται από το ίδιο το καπνισμένο φίλτρο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα υπολείμματα αυτά του καπνού που παραμένουν στο τσιγάρο περιέχουν πρόσθετα τοξικά προϊόντα καύσης. Στην περίπτωση των TS που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία αυτό φαίνεται να μη συμβαίνει, καθώς η λειτουργία τους βασίζεται στη θέρμανση και όχι στην καύση του καπνού, με κύριο σκοπό την ελαχιστοποίηση παραγόμενων τοξικών ενώσεων. Έτσι, ο καπνός που απομένει σε ένα χρησιμοποιημένο tobacco stick φαίνεται να μη συμβάλλει στην τοξικότητα του βακτηρίου. Αυτό άλλωστε γίνεται αντιληπτό και από το **Γράφημα 4**, όπου στη μικρότερη αραιώση των δειγμάτων 50% ο χρησιμοποιημένος καπνός προκαλεί τη μικρότερη μείωση πληθυσμού *V. fischeri* συγκριτικά με τα αντίστοιχα φίλτρα και τα ολικά TS.



Γράφημα 4. Ποσοστιαία μείωση πληθυσμού *V.fischeri* παρουσία του κάθε δείγματος

Για κάθε είδος δείγματος είναι εμφανής η διαφορά στη συμπεριφορά του βακτηρίου απέναντι στα αχρησιμοποιητά και χρησιμοποιημένα προϊόντα, με αξιοσημείωτη αυτή που αφορά στα ολικά TS. Μεταξύ καπνισμένων και μη δειγμάτων, φαίνεται πως τα πρώτα επιφέρουν μεγαλύτερα ποσοστά θανάτωσης στον πληθυσμό του βακτηρίου, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι παρά την απουσία καύσης κατά τη χρήση αυτών των προϊόντων καπνού, εξακολουθούν να εκλύονται τοξικές ουσίες καθιστώντας τα έτσι επιβλαβή για τους υδρόβιους μικροοργανισμούς. Οι χημικές ουσίες στα καπνισμένα και μη προϊόντα καπνού μπορεί όχι μόνο να συμβάλλουν διαφορετικά στην τοξικότητα, αλλά και να έχουν διαφορετική τύχη ή/και δυνατότητα βιοσυσσώρευσης στο περιβάλλον (Slaughter et al., 2011). Σε έρευνα των Micevska et

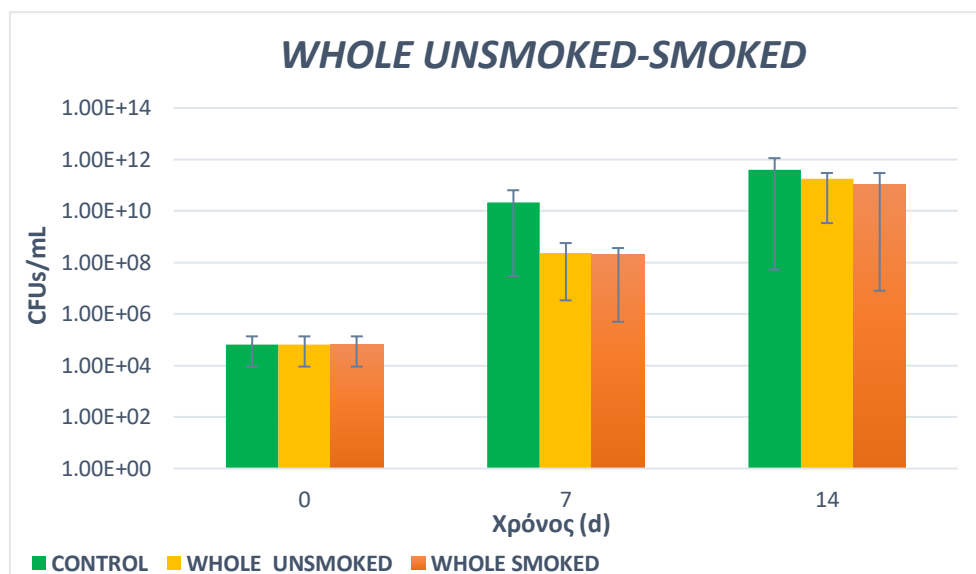
al (2006) για τα συμβατικά τσιγάρα, αποδείχθηκε ότι τα ολικά καπνισμένα ήταν τοξικά για το βακτήριο *V. fischeri* σε συγκέντρωση 0,48mg τσιγάρου/L, καθώς επίσης και ότι τα καπνισμένα φίλτρα ήταν πιο τοξικά από τα αντίστοιχα μη καπνισμένα. Οι Baran et al (2020) σε δοκιμή που διεξήγαγαν σχετικά με την αξιολόγηση της τοξικής επίδρασης των ολικών καπνισμένων TS, απέδειξαν μεγάλη αναστολή στην ανάπτυξη των βακτηρίων *Delftia acidovorans* και *Staphylococcus warneri*. Ωστόσο, σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε με τη μελέτη διαφορετικών βακτηριακών ειδών, αποδείχθηκε ότι τα καπνισμένα φίλτρα μείωσαν δραματικά τη σχετική αφθονία των φυλών Bacteroidetes και Cyanobacteria, ενώ τα μέλη των φυλών Gammaproteobacteria, Firmicutes και Thermotogae εμπλουτίστηκαν από τα καπνισμένα φίλτρα στα θαλάσσια ιζήματα (Quéméneur et al., 2020).

Οι Micevska et al (2006) διεξήγαγαν επίσης αξιολογήσεις προσδιορισμού της τοξικότητας (TIEs) στα εκπλύματα από καπνισμένα τσιγάρα και διαπίστωσαν ότι η νικοτίνη και η αιθυλοφαινόλη μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση της τοξικότητας που παρατηρήθηκε στα θαλάσσια βακτήρια. Η νικοτίνη αποτελεί μια από τις κύριες χημικές ουσίες που περιέχονται στο καπνό του τσιγάρου, ενώ η αιθυλοφαινόλη χρησιμοποιείται ως αρωματικός παράγοντας καπνού και συνεπώς υπάρχει στο καπνό του τσιγάρου. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχει μεγάλη ικανότητα βιοσυσσώρευσης σε υδρόβιους οργανισμούς (Slaughter et al., 2011). Ωστόσο, σύμφωνα με μελέτη των Oropesa et al (2017) σχετικά με πιθανή τοξικότητα της νικοτίνης σε υδρόβιους οργανισμούς διαφορετικών τροφικών επιπέδων, προέκυψε ότι η συγκέντρωση της ουσίας αυτής 0,5-1000μg/L δεν ήταν οξεία τοξική για το *V. fischeri*. Αντιθέτως, παρουσίασε τοξικότητα για το *Pseudokirchneriella subcapitata* και *Daphnia magna* (Oropesa, Floro and Palma, 2017). Αξίζει να αναφερθεί πως ένα συμβατικό τσιγάρο αποδίδει 2,1mg νικοτίνης, ενώ ένα tobacco stick 1,4mg (Goniewicz, 2019). Συνεπώς, η εκλυόμενη από το χρησιμοποιημένο καπνό ποσότητα νικοτίνης που θα μπορούσε να δράσει τοξικά στους υδρόβιους οργανισμούς, θα είναι αντίστοιχα μικρότερη συγκριτικά με αυτή από ένα συμβατικό τσιγάρο.

4.2 Έλεγχος οικοτοξικότητας με βιοδείκτη *Penicillium purpurogenum*

Σε αυτό το μέρος της εργασίας εκτιμήθηκε η οικοτοξικότητα των υδατικών εκπλυμάτων από προϊόντα καπνού με χρήση του μύκητα *P. purpurogenum* ως βιοδείκτη. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ανάπτυξή του ή η αναστολή αυτής, υπό την επίδραση των εκπλυμάτων που προέρχονταν από ολόκληρα χρησιμοποιημένα και μη tobacco sticks, αλλά και από το καπνό και το φίλτρο ξεχωριστά. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε για 14 d με ενδιάμεσο χρόνο τις 7 d και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα γραφήματα που ακολουθούν.

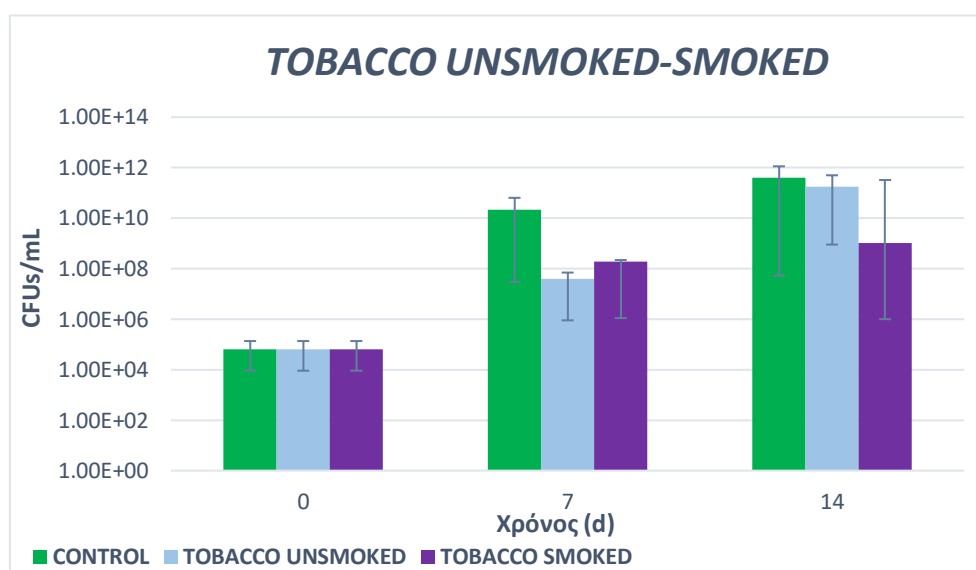
Ο μύκητας που εξετάστηκε ανήκει στο γένος ασκομυκήτων *Penicillium* και αντιπροσωπεύει κοινούς μύκητες εδάφους σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις και δασικά εδάφη.



Γράφημα 5. Επίδραση USW (WHOLE UNSMOKED) και SW (WHOLE SMOKED) σε πληθυσμό *P. purpurogenum* μετά το πέρας 14 d (Control: Δείγμα που περιέχει μόνο τον μύκητα)

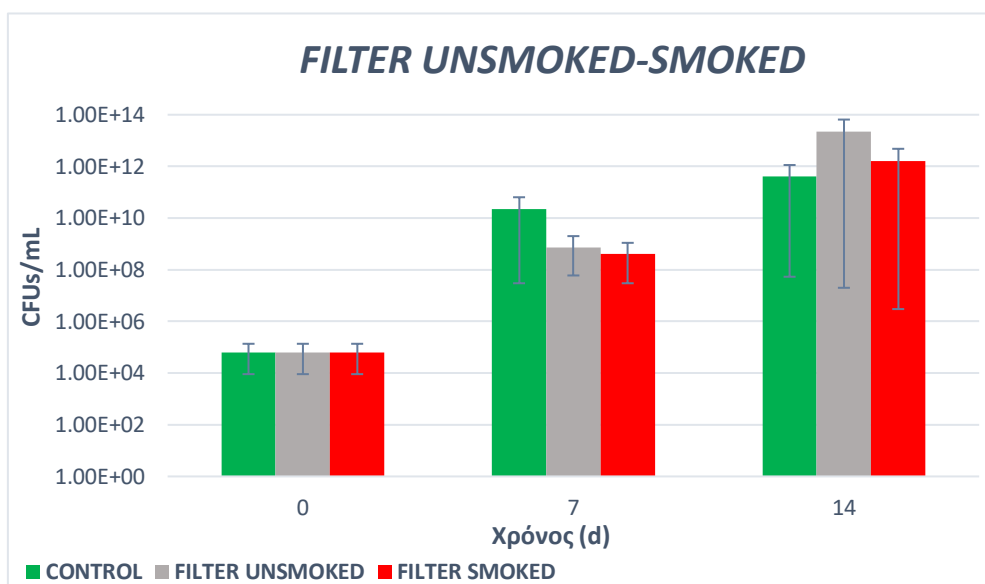
Στο **Γράφημα 5**, απεικονίζεται η επίδραση των αχρησιμοποίητων και χρησιμοποιημένων ολόκληρων tobacco sticks στο πληθυσμό του μύκητα *P. purpurogenum* σε 7 και 14 d. Όπως φαίνεται, σε διάστημα μιας εβδομάδας τα εκπλύματα από USW και SW προκαλούν την ίδια μείωση στο πληθυσμό του μύκητα, της τάξης των 2 Logs, σε σχέση πάντα με το δείγμα ελέγχου (control), το οποίο αντιστοιχεί στην πορεία ανάπτυξής του όταν δεν έρχεται σε επαφή με αυτά. Ωστόσο, μετά το πέρας των δυο εβδομάδων φαίνεται πως ο μικροοργανισμός έχει αρχίσει να προσαρμόζεται στις συνθήκες αυτές αφού και στις δυο περιπτώσεις αναπτύσσεται

κανονικά. Μάλιστα, στις 14 d φαίνεται να μην υπάρχει κάποια σημαντική τοξική επίδραση των ουσιών στο μύκητα, καθώς η συγκέντρωση του πληθυσμού τη χρονική αυτή στιγμή παρουσία των εκπλυμάτων, κυμαίνεται στα ίδια σχεδόν επίπεδα με την αντίστοιχη συγκέντρωσή του υπό συνθήκες απουσίας αυτών. Έτσι, παρατηρείται πως παρόλο που τις πρώτες μέρες τα USW και SW φαίνεται να δρουν τοξικά απέναντι στο *P. purpurogenum*, προκαλώντας μια μείωση του πληθυσμού του δυο τάξεων μεγέθους, με την πάροδο του χρόνου ο μύκητας προσαρμόζεται στην παρουσία τους και εξακολουθεί να αναπτύσσεται.



Γράφημα 6. Επίδραση UST (TOBACCO UNSMOKED) και ST (TOBACCO SMOKED) σε πληθυσμό *P. purpurogenum* μετά το πέρας 14 d (Control: Δείγμα που περιέχει μόνο τον μύκητα)

Σύμφωνα με το **Γράφημα 6**, φαίνεται πως σε γενικές γραμμές ο καπνός από αχρησιμοποίητα και χρησιμοποιημένα tobacco sticks δρα τοξικά απέναντι στο *P. purpurogenum* καθ' όλη την περίοδο επαφής του με αυτόν. Ειδικότερα, όσον αφορά στο UST, στις 7 d προκαλεί μια μείωση μυκητιακού πληθυσμού περίπου τρεις τάξεις μεγέθους. Ωστόσο, στις δυο εβδομάδες ο μικροοργανισμός φαίνεται να έχει ξεπεράσει το στρες από την επίδραση της συγκεκριμένης ουσίας και να αναπτύσσεται κανονικά προσεγγίζοντας κατά πολύ τα επίπεδα συγκέντρωσης σε κανονικές συνθήκες. Αντιθέτως, ο ST επιδρά τοξικά στο μύκητα και στις 7 αλλά και στις 14 d, επιφέροντας και στις δυο αυτές χρονικές στιγμές μείωση πληθυσμού κατά 2 Logs. Τελικά, προκύπτει ότι ο χρησιμοποιημένος καπνός παρουσιάζει μεγαλύτερη τοξικότητα ως προς το συγκεκριμένο μύκητα, συγκριτικά με τον αχρησιμοποίητο.

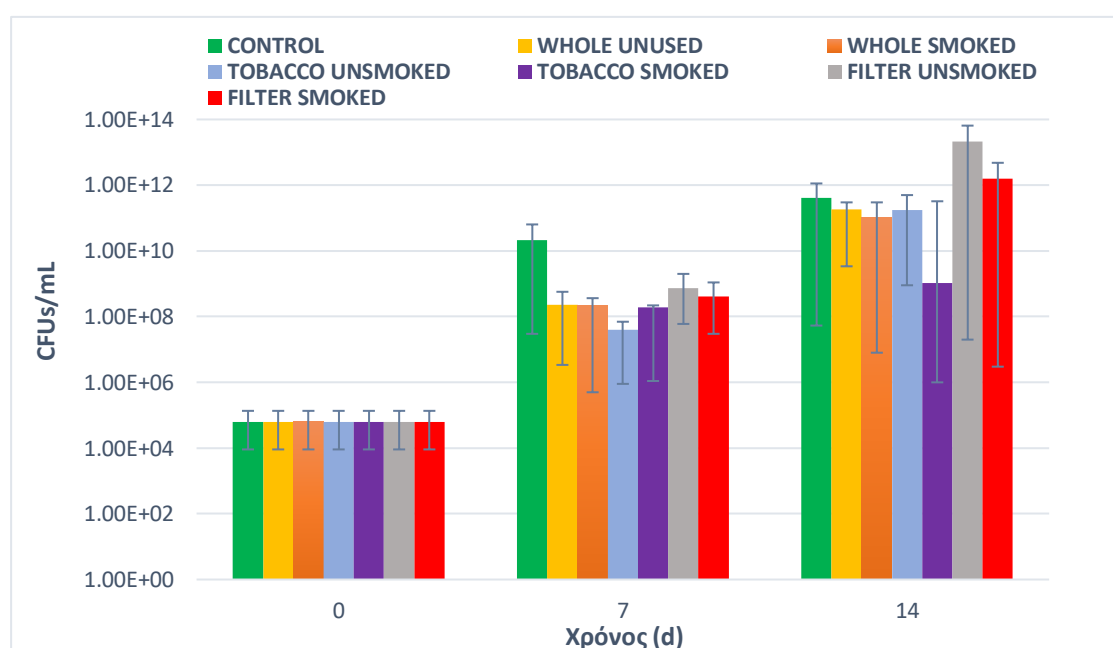


Γράφημα 7. Επίδραση USF (FILTER UNSMOKED) και SF (FILTER SMOKED) σε πληθυσμό *P. purpurogenum* μετά το πέρας 14 d (Control: Δείγμα που περιέχει μόνο τον μύκητα)

Στο **Γράφημα 7**, παρουσιάζεται η συμπεριφορά του *P. purpurogenum* απέναντι στα υδατικά εκπλύματα που προέρχονται από τα αχρησιμοποίητα και χρησιμοποιημένα φίλτρα των tobacco sticks. Όπως φαίνεται, στις 7 d τα USF και SF εμφανίζουν μια τοξικότητα ως προς τον μύκητα, προκαλώντας μείωση του πληθυσμού του κατά δυο τάξεις μεγέθους. Μάλιστα, μεταξύ των δυο αυτών δειγμάτων, ο μικροοργανισμός φαίνεται να παρουσιάζει μια μεγαλύτερη ευαισθησία απέναντι στα χρησιμοποιημένα φίλτρα, ωστόσο όχι ιδιαίτερα αισθητή συγκριτικά με τα αχρησιμοποίητα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η επίδραση των συγκεκριμένων εκπλυμάτων στον μύκητα μετά το πέρας των δυο εβδομάδων. Όπως προκύπτει από το γράφημα, ο μύκητας ενδέχεται να ευνοείται από τη παρουσία USF και SF, ιδίως των πρώτων, αφού παρουσιάζει αύξηση του πληθυσμού του κατά 2 Logs. Αντίστοιχα, τα χρησιμοποιημένα φίλτρα φαίνεται να μη δρουν καθόλου τοξικά κατά του μικροοργανισμού, αυξάνοντας μάλιστα τον πληθυσμό του κατά μια τάξη μεγέθους λιγότερο απ' ό,τι τα αχρησιμοποίητα.

Τα παραπάνω συμπεράσματα φαίνονται και πιο συνοπτικά στο **Γράφημα 8**. Σαν μια πρώτη γενική παρατήρηση, θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα υδατικά εκπλύματα από προϊόντα καπνού φαίνεται να επιδρούν τοξικά στο *P. purpurogenum* κυρίως την πρώτη εβδομάδα, προκαλώντας μείωση του μυκητιακού πληθυσμού έως και 3 Logs. Ειδικότερα, τη μεγαλύτερη τοξικότητα παρουσιάζει ο αχρησιμοποίητος καπνός, ενώ η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα του μύκητα παρατηρείται κατά την παρουσία των αχρησιμοποίητων φίλτρων. Στις 14 d, ο μικροοργανισμός φαίνεται να έχει προσαρμοστεί πλέον στις συνθήκες παρουσία των εκπλυμάτων, ακολουθώντας μια πορεία ανάπτυξης παρόμοια με αυτήν που θα ακολουθούσε υπό κανονικές συνθήκες.

Ωστόσο, στην περίπτωση του χρησιμοποιημένου καπνού ο μύκητας εξακολουθεί να εμφανίζει μια ευαισθησία με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του πληθυσμού του να μειώνεται κατά δυο τάξεις μεγέθους. Αντίθετα, τα αχρησιμοποίητα και τα χρησιμοποιημένα φίλτρα φαίνεται πως ευνοούν ιδιαίτερα την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Τελικά, μετά το πέρας των δυο εβδομάδων, ο χρησιμοποιημένος καπνός επιφέρει τη μεγαλύτερη τοξικότητα. Ακολουθούν τα ολόκληρα καπνισμένα TS, ο αχρησιμοποίητος καπνός, και τα ολόκληρα αχρησιμοποίητα TS (USW<UST<SW<ST). Τα φίλτρα δεν δρουν τοξικά απέναντι στον μύκητα, προκαλώντας μάλιστα αύξηση στη συγκέντρωση του πληθυσμού του έως και δυο τάξεις μεγέθους.



Γράφημα 8. Επίδραση κάθε δείγματος σε πληθυσμό *P.purpureogenum* μετά το πέρας 14 d (Control: Δείγμα που περιέχει μόνο τον μύκητα)

Οι Bartolomeu Medeiros et al (2021) στην προσπάθειά τους να αναδείξουν τη χρήση νηματοειδών μυκήτων ως εναλλακτική λύση για μελλοντική διαδικασία βιοεξυγίανσης εδαφών που έχουν υποστεί ρύπανση, μελέτησαν τη συμπεριφορά τους κατά την παρουσία υδατικού εκπλύματος καπνού. Ένα στέλεχος μύκητα από τα 38 που εξετάστηκαν συνολικά, παρουσίασε αναστολή στην ανάπτυξή του μετά από 7 ημέρες καλλιέργειας σε μέσο που περιείχε εκχύλισμα καπνού. Τα υπόλοιπα στελέχη σημείωσαν ικανοποιητική ανάπτυξη. Το εκχύλισμα καπνού που προστέθηκε στις καλλιέργειες περιείχε τρεις τουλάχιστον ρύπους σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπως η νικοτίνη, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), και τα βαρέα μέταλλα. Ωστόσο, στην παρούσα διπλωματική εργασία δεν έγινε κάποια ανάλυση του

δείγματος, και έτσι δεν μπορούμε να βασιστούμε με ακρίβεια στην επίδραση των ουσιών αυτών στον μύκητα που εξετάστηκε.

Το φίλτρο ψύξης, γνωστό και ως φίλτρο PLA, είναι κατασκευασμένο από πολυγαλακτικό οξύ, ένα πλαστικό βιολογικής προέλευσης που προέρχεται από καλαμπόκι. Δεδομένου ότι η βάση του PLA συνήθως κατασκευάζεται από άμυλο φυτού, όπως το καλαμπόκι, που έχει υποστεί ζύμωση, μπορεί να συμπεριληφθεί στα βιοπλαστικά. Το επιστόμιο φίλτρο είναι κατασκευασμένο από οξική κυτταρίνη, ένα βιοπλαστικό που παράγεται από κυτταρίνη χαρτοπολτού.

Ωστόσο, δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής κάποια έρευνα σχετικά με το πώς η σύσταση αυτή των φίλτρων θα μπορούσε να ωφελήσει την ανάπτυξη των μυκήτων, και ιδιαιτέρως του γένους *Penicillium*. Σύμφωνα με τους Petre et al, ο υψηλός βαθμός υποκατάστασης του οξικού άλατος εμποδίζει την κυτταρίνη του απορριπτόμενου φίλτρου να αποκτήσει πρόσβαση στους μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες κ.λπ.) του περιβάλλοντος για βιολογική αποσύνθεση. Επιπλέον, οι Carollo και Grospierto (2004) κατέληξαν στο ότι οι μικροοργανισμοί στο περιβάλλον δεν δέχονται την οξική κυτταρίνη ως πηγή τροφής. Αντίθετα, άλλοι υποστήριξαν πως η ρύπανση από φίλτρα τσιγάρων θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη ολόκληρων κυττάρων μυκήτων και μεταβολισμό αυτών.

4.3 Εκτίμηση οικοτοξικότητας στο έδαφος

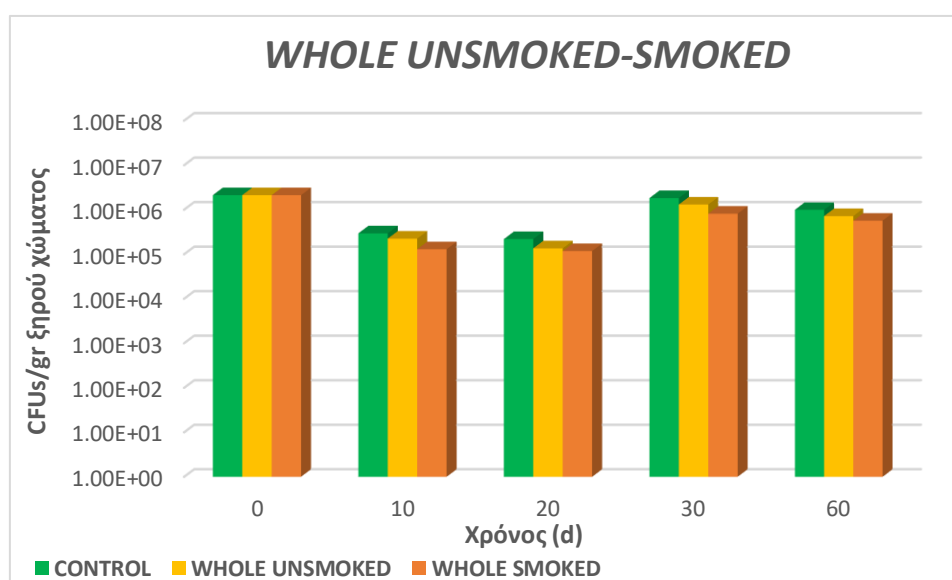
Στο τρίτο και τελευταίο μέρος της εργασίας έγινε έλεγχος οικοτοξικότητας των υδατικών εκπλυμάτων από προϊόντα καπνού σε δύο είδη χώματος από διαφορετικές περιοχές του νομού Χανίων.

Το χώμα Α συλλέχθηκε από τη περιοχή του Πολυτεχνείου Κρήτης στο Ακρωτήρι. Πρόκειται για αμμώδες χονδρόκοκκο έδαφος με ανοιχτό καφέ χρώμα και σχετικά χαμηλή υγρασία. Το χώμα Β συλλέχθηκε από καλλιεργημένη έκταση στη περιοχή της Αγίας και σε αντίθεση με το πρώτο αντιπροσωπεύει ένα λεπτόκοκκο αργιλώδες έδαφος με σκούρο χρώμα και μεγαλύτερη υγρασία. Τα δυο αυτά είδη χώματος συλλέχθηκαν ενδεικτικά από διαφορετικές περιοχές με σκοπό την εκτίμηση οικοτοξικότητας των υδατικών εκπλυμάτων σε αυτά.

Εξετάστηκε κατά πόσο τα εκχυλίσματα από ολόκληρα tobacco sticks, αλλά και από το κάθε μέρος τους ξεχωριστά, επηρέασαν τη βακτηριακή και μυκητιακή κοινότητα σε διάστημα δυο μηνών (60 d). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αυτές της καλλιέργειας για τη μέτρηση πληθυσμού βακτηρίων και μυκήτων, αλλά και η μοριακή μέθοδος της real time PCR με σκοπό τη ποσοτικοποίηση βακτηριακού πληθυσμού στα δυο είδη χώματος. Τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων θα παρουσιαστούν στις παρακάτω ενότητες.

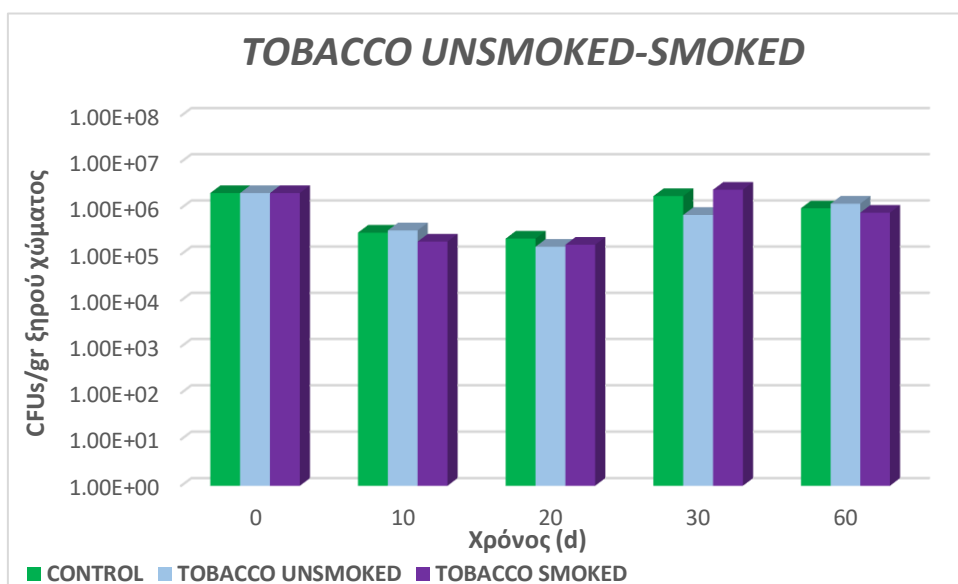
4.3.1 Μέτρηση μυκητιακού και βακτηριακού πληθυσμού με μεθόδους καλλιέργειας

Αρχικά, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στην επίδραση των υδατικών εκπλυμάτων στον πληθυσμό των **βακτηρίων** στο χώμα Α (περιοχή Ακρωτηρίου).

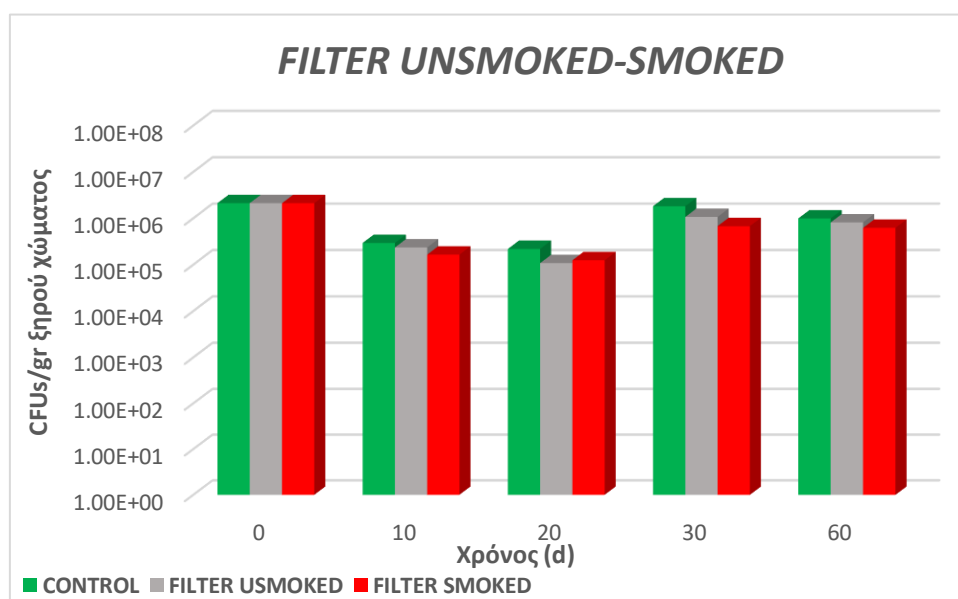


Γράφημα 9. Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος Α σε διάστημα 0-60 d παρουσία των USW (WHOLE UNSMOKED) και SW (WHOLE SMOKED) (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό

Στο **Γράφημα 9** απεικονίζεται η ανάπτυξη του συνολικού βακτηριακού πληθυσμού στο χώμα Α, που είναι εμποτισμένο με τα υδατικά εκπλύματα από ολικά αχρησιμοποίητα και χρησιμοποιημένα TS, κατά τη χρονική περίοδο των δυο μηνών. Η συσχέτιση γίνεται και πάλι με το Control, που αντιστοιχεί στο βακτηριακό πληθυσμό του χώματος υπό κανονικές συνθήκες, δηλαδή απουσία των δειγμάτων που εξετάζονται. Όπως προκύπτει από το παραπάνω γράφημα, φαίνεται πως τα USW και SW δεν ασκούν κάποια ιδιαίτερη επίδραση στη βακτηριακή κοινότητα. Η συγκέντρωση του πληθυσμού μετά το πέρας των δυο μηνών, αλλά και κατά τους ενδιάμεσους χρόνους, κυμαίνεται στα ίδια περίπου επίπεδα με αυτήν του control. Συγκεκριμένα, σε 10, 20, 30 και 60 d παρατηρείται μια μικρή και όχι αισθητή μείωση του πληθυσμού. Ωστόσο, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι σε όλους αυτούς τους χρόνους, τα εκπλύματα από τα χρησιμοποιημένα tobacco sticks επιφέρουν τη μεγαλύτερη μείωση σε σχέση με τα αχρησιμοποίητα.



Γράφημα 10. Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος Α σε διάστημα 0-60 d παρουσία UST (TOBACCO UNSMOKED) και ST (TOBACCO SMOKED) (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό)

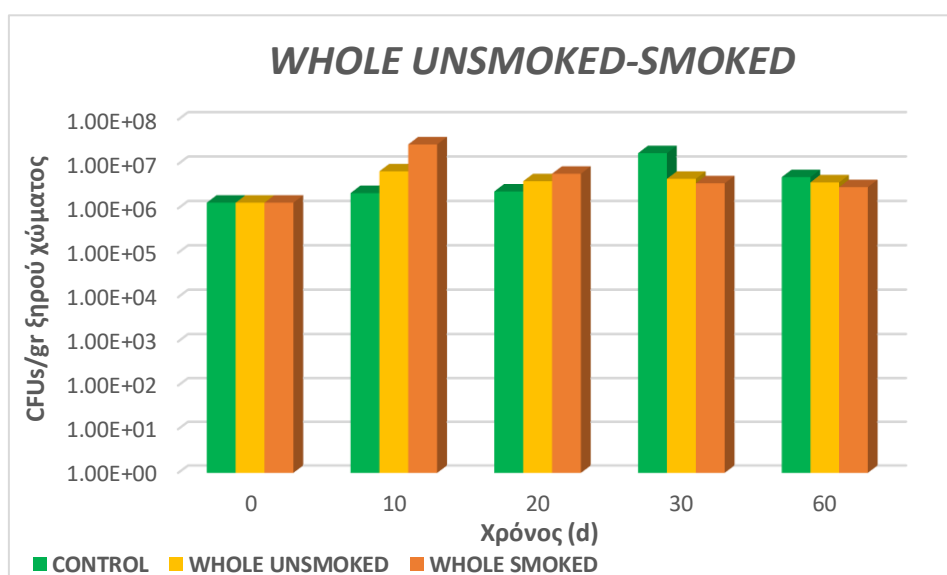


Γράφημα 11. Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος Α σε διάστημα 0-60 d παρουσία των USF (FILTER UNSMOKED) και SF (FILTER SMOKED) (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό)

Στο **Γράφημα 10** φαίνεται η επίδραση του αχρησιμοποίητου και χρησιμοποιημένου καπνού από tobacco sticks στο βακτηριακό πληθυσμό του χώματος Α κατά το διάστημα δυο μηνών. Μπορεί εύκολα να διαπιστώσει κανείς ότι τα εκχυλίσματα

καπνού δε παρουσιάζουν κάποια τοξικότητα στους μικροοργανισμούς του χώματος, αφού η συγκέντρωση του πληθυσμού τους στο εμποτισμένο με αυτά χώμα μετά το πέρας των 60 d, είναι ίδιας τάξης μεγέθους με αυτή του control. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζουν και τα φίλτρα των TS. Όπως διακρίνεται στο **Γράφημα 11**, παρά την προσθήκη των εκπλυμάτων από USF και SF, ο βακτηριακός πληθυσμός φαίνεται να ακολουθεί το ίδιο μοτίβο ανάπτυξης, ή και μείωσης, με το αντίστοιχο υπό κανονικές συνθήκες, απουσία των δειγμάτων. Ωστόσο, και στις δυο περιπτώσεις φίλτρων και καπνού, παρατηρείται μια μεγαλύτερη ευαισθησία των βακτηρίων απέναντι στα χρησιμοποιημένα προϊόντα, όχι όμως αρκετά σημαντική ώστε να τα καθιστά τοξικά προς αυτά.

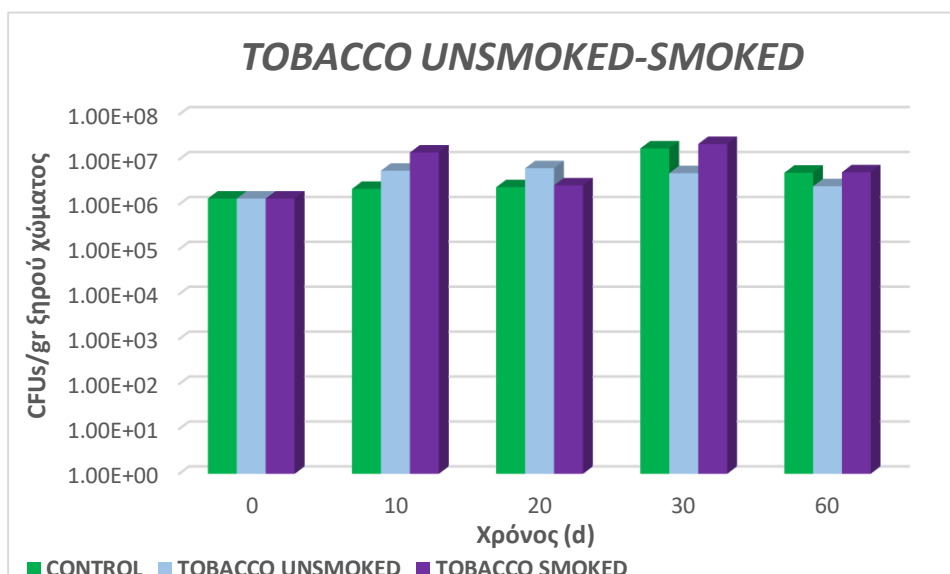
Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του **βακτηριακού** πληθυσμού στο χώμα B (περιοχή Αγιάς) ύστερα από χρονικό διάστημα 60 d όπου ήταν εμποτισμένο με τα υδατικά εκχυλίσματα.



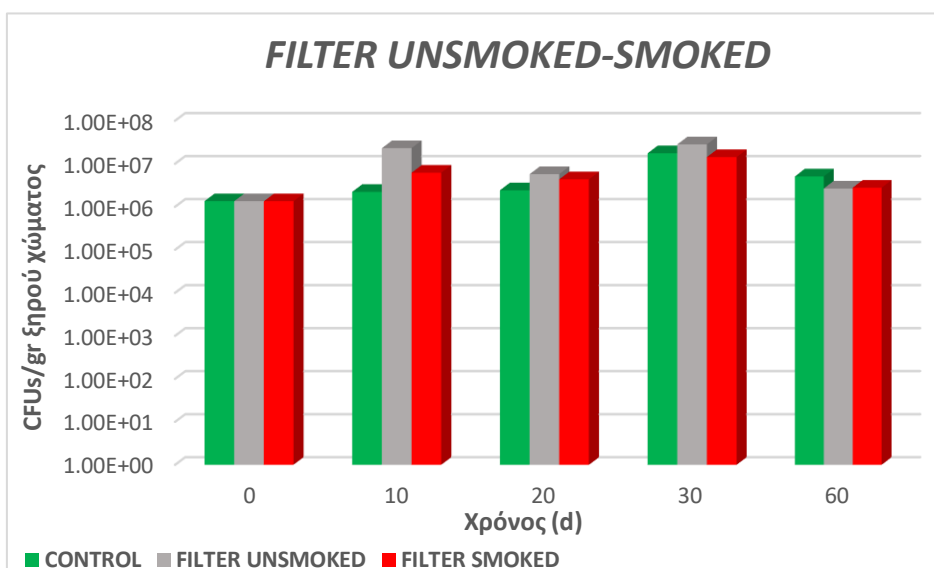
Γράφημα 12. Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος B σε διάστημα 0-60 d παρουσία των USW (WHOLE UNSMOKED) και SW (WHOLE SMOKED) (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό

Στο **Γράφημα 12** φαίνεται ο πληθυσμός των βακτηρίων στο χώμα B που έχει εμποτιστεί με τα υδατικά εκπλύματα αχρησιμοποίητων και χρησιμοποιημένων ολικών tobacco sticks, σε διάστημα δυο μηνών. Συγκεκριμένα, τα USW και SW δεν δρουν τοξικά τις πρώτες 20 d απέναντι στα βακτήρια, καθώς αυτά φαίνεται να αναπτύσσονται κανονικά κατά τη χρονική αυτή περίοδο, παρουσιάζοντας μάλιστα μια μικρή αύξηση σε σχέση με το control. Ωστόσο, μετά από ένα μήνα παρατηρείται μια μείωση βακτηριακού πληθυσμού κατά μια τάξη μεγέθους, τόσο στο χώμα που περιέχει έκπλυμα από USW, όσο και SW. Μια ελαφρώς μεγαλύτερη μείωση προκαλείται από τα χρησιμοποιημένα ολικά TS. Αντίστοιχα αποτελέσματα βλέπουμε και κατά τον

επόμενο μήνα, όπου πάλι υπάρχει μια μείωση στη συγκέντρωση του βακτηριακού πληθυσμού και στις δυο περιπτώσεις παρουσίας των εκπλυμάτων.



Γράφημα 13. Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος B σε διάστημα 0-60 d παρουσία των UST (TOBACCO UNSMOKED) και ST (TOBACCO SMOKED) (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό

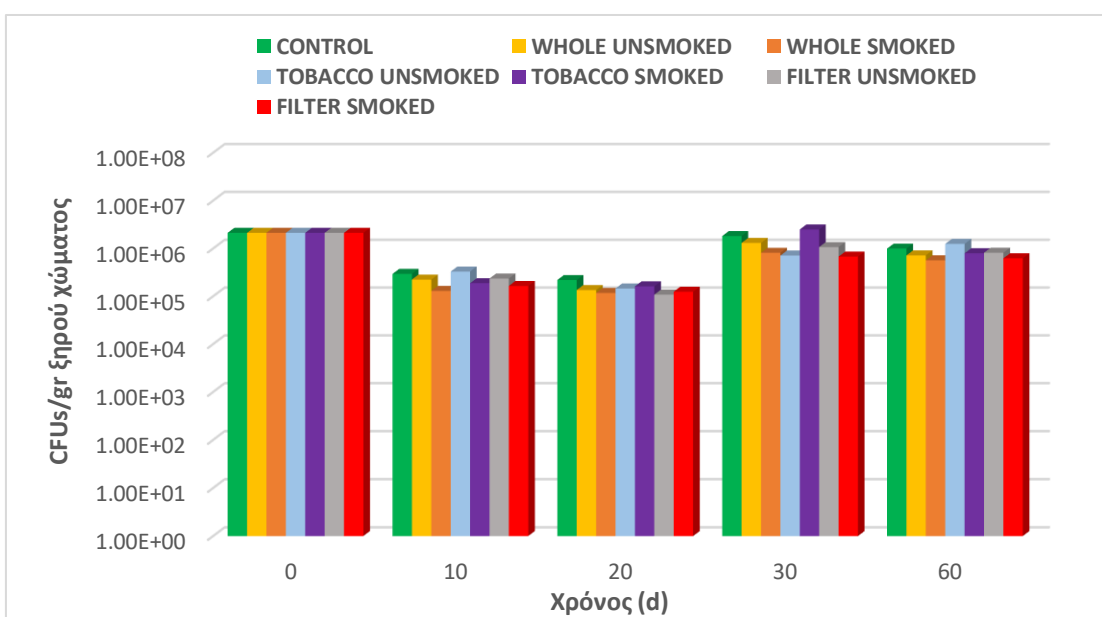


Γράφημα 14. Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος B σε διάστημα 0-60 d παρουσία των USF (FILTER UNSMOKED) και SF (FILTER SMOKED) (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό

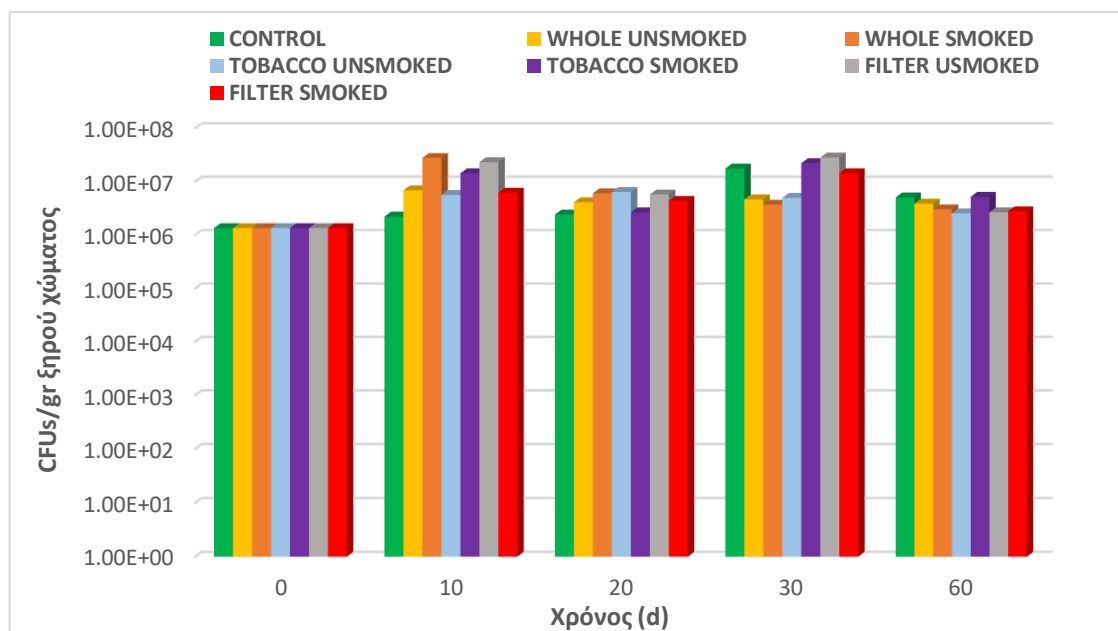
Στο **Γράφημα 13** απεικονίζεται ο πληθυσμός βακτηρίων κατά τη διάρκεια δυο μηνών, υπό την επίδραση του αχρησιμοποίητου και χρησιμοποιημένου καπνού. Όσον αφορά στην παρουσία υδατικών εκπλυμάτων αχρησιμοποίητου καπνού στο χώμα, φαίνεται

πως αυτά ευνοούν την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε διάστημα 20 d καθώς παρατηρείται μια μικρή αύξηση του πληθυσμού τους, όχι όμως αισθητή. Στο ίδιο χρονικό διάστημα, η συγκέντρωση βακτηριακού πληθυσμού στο χώμα που δε περιέχει καπνό, παραμένει σχεδόν σταθερή. Ωστόσο, στις 30 και τελικά στις 60 d, παρουσιάζεται μια μικρή μείωση πληθυσμού σε σχέση με το control. Όπως προκύπτει από το Γράφημα 13, η μεταβολή της συγκέντρωσης βακτηριακού πληθυσμού στο χώμα με τον χρησιμοποιημένο καπνό, δεν ακολουθεί κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο καθώς παρουσιάζει διάφορες διακυμάνσεις. Τελικά, μετά το πέρας δυο μηνών, το υδατικό έκπλυμα ST φαίνεται να αυξάνει σε μικρό βαθμό το πληθυσμό των βακτηρίων σε σχέση με το control.

Παρόμοια είναι και η επίδραση των φίλτρων στον βακτηριακό πληθυσμό του χώματος. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με το **Γράφημα 14** το υδατικό εκχύλισμα από αχρησιμοποίητα φίλτρα φαίνεται να επιφέρει μια μικρή αύξηση τη συγκέντρωσης κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα, ελαφρώς μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται στο control. Ωστόσο, στις 60 d τα βακτήρια στο εμποτισμένο με USF χώμα μειώνονται σε σχέση με αυτά του χώματος ελέγχου όπου εμφανίζουν μια μικρή αύξηση. Αντίστοιχη είναι η συμπεριφορά των μικροοργανισμών κατά την παρουσία χρησιμοποιημένων φίλτρων. Η συγκέντρωση πληθυσμού έπειτα από δυο μήνες κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με τη συγκέντρωση στο χώμα που περιέχει τα αχρησιμοποίητα φίλτρα. Τέλος, στο διάστημα 0-30 d η βακτηριακή ανάπτυξη στο χώμα που περιέχει SF είναι μεγαλύτερη από αυτή του control, αλλά μικρότερη από την αντίστοιχη στο χώμα με τα USF.



Γράφημα 15. Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος Α σε διάστημα 0-60 d παρουσία των δειγμάτων (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό



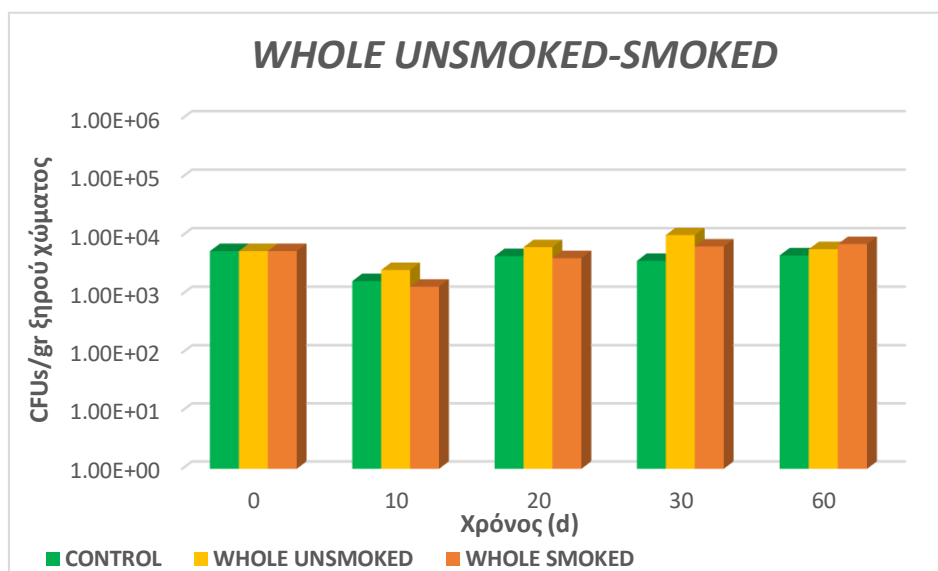
Γράφημα 16. Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χόματος B σε διάστημα 0-60 d παρουσία των δειγμάτων (0,2mL/gr ξηρού χόματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό

Στα παραπάνω γραφήματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα σχετικά με την ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού υπό την παρουσία του κάθε υδατικού εκπλύματος στο χώμα A και χώμα B, για διάστημα δυο μηνών. Αρχικά, διαπιστώνουμε ότι το χώμα B φαίνεται να ευνοεί περισσότερο την ανάπτυξη των βακτηρίων. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στο χώμα B που δεν περιέχει κάποιο υδατικό έκπλυμα, παρουσιάζει μια μικρή αύξηση με την πάροδο του χρόνου, σε αντίθεση με το πληθυσμό του χώματος A όπου βλέπουμε να υπάρχει μια σχετική μείωση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις ιδιότητες του χώματος, αφού καθένα από αυτά αντιπροσωπεύει διαφορετικό τύπο εδάφους. Ιδιότητες όπως η εδαφική υγρασία, η θερμοκρασία, το pH, το πορώδες ή η έκθεση στον ήλιο μπορούν να επηρεάσουν άμεσα ή έμμεσα τον πληθυσμό και την ένταση της δραστηριότητας των μικροοργανισμών του εδάφους. Στην προκειμένη περίπτωση των χωμάτων που εξετάστηκαν, το χώμα B είχε μεγαλύτερο συντελεστή υγρασίας και λιγότερο πετρώδη σύσταση σε σχέση με το χώμα A. Αυτό ενδεχομένως να συνέβαλε στις ευνοϊκότερες συνθήκες για την ανάπτυξή τους.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 15**, ο βακτηριακός πληθυσμός των χωμάτων που περιέχουν εκπλύματα από προϊόντα καπνού, φαίνεται να παρουσιάζει μείωση σε διάστημα δυο μηνών, μεγαλύτερη σε σχέση με το control. Στη περίπτωση ωστόσο του αχρησιμοποίητου καπνού η συγκέντρωση βακτηρίων στις 60 d φαίνεται να παραμένει σχεδόν αμετάβλητη σε σχέση με την αρχική της τιμή, αλλά ελαφρώς μεγαλύτερη από αυτή του control. Έτσι, φαίνεται πως το έκπλυμα του αχρησιμοποίητου καπνού ευνοεί

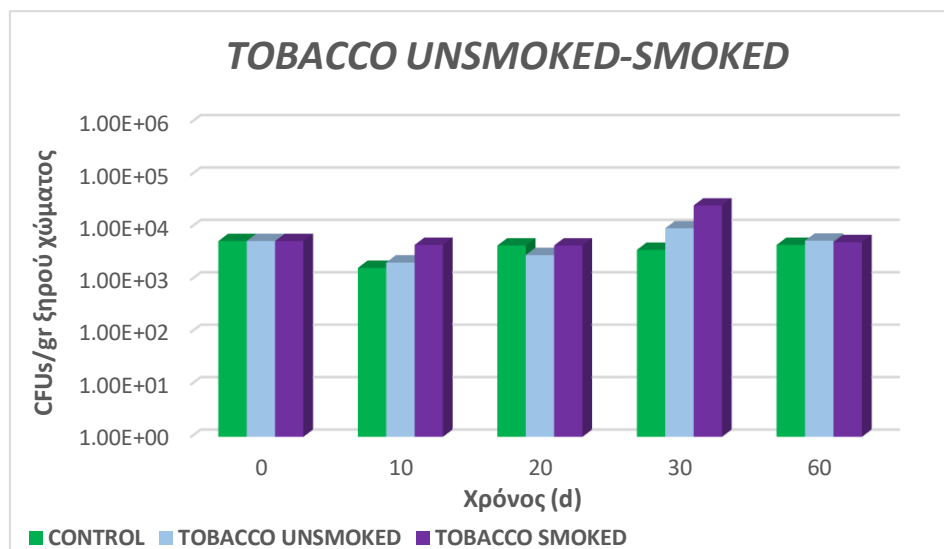
σε μικρό βαθμό τα βακτήρια σε αντίθεση με αυτό των ολικών χρησιμοποιημένων TS που προκαλεί τη μεγαλύτερη μείωση στο πληθυσμό τους.

Όπως φαίνεται από το **Γράφημα 16**, μετά το πέρας των 60 d ο βακτηριακός πληθυσμός των χωμάτων που έχουν εμποτιστεί με τα υδατικά εκπλύματα παρουσιάζει μικρή αύξηση, όμως μικρότερη σε σχέση με το control. Ο χρησιμοποιημένος καπνός ωστόσο φαίνεται να αυξάνει τον πληθυσμό των βακτηρίων, καθώς η συγκέντρωση στην περίπτωση αυτή είναι μεγαλύτερη από αυτή του control. Ακόμη, στις 60 d ο αχρησιμοποίητος καπνός προκαλεί τη μεγαλύτερη μείωση. Αξίζει να αναφερθεί ότι το διάστημα πριν τις 60 d, παρατηρήθηκαν πολλές διακυμάνσεις στη συμπεριφορά των μικροοργανισμών, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε περιβαλλοντικές συνθήκες. Παρακάτω, παρουσιάζεται η συμπεριφορά του πληθυσμού των **μυκήτων** στο χόμα Α απέναντι στα δείγματα των ολικών χρησιμοποιημένων και μη, καπνού και φίλτρων αντίστοιχα κατά τη διάρκεια δυο μηνών.

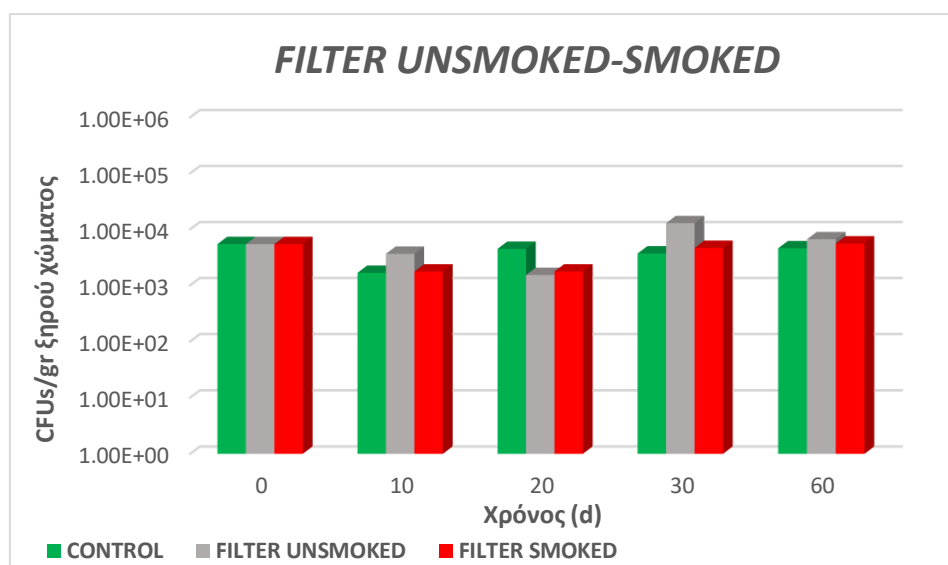


Γράφημα 17. Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος Α σε διάστημα 0-60 d παρουσία των USW (WHOLE UNSMOKED) και SW (WHOLE SMOKED) (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χόμα εμποτισμένο μόνο με νερό

Στο **Γράφημα 17** απεικονίζεται η επίδραση υδατικών εκπλυμάτων από ολικά αχρησιμοποίητα και χρησιμοποιημένα tobacco sticks στον πληθυσμό των μυκήτων κατά το διάστημα 60 d. Ειδικότερα, βλέπουμε πως μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, παρατηρείται μικρή μείωση της συγκέντρωσης των μυκήτων σε κανονικές συνθήκες, ενώ σε συνθήκες παρουσίας των USW και SW η συγκέντρωση αυτή αυξάνεται. Αξίζει να σημειωθεί πως σε όλους τους ενδιαμέσους χρόνους πριν τους δυο μήνες, ο μυκητιακός πληθυσμός του χώματος που περιέχει έκπλυμα από αχρησιμοποίητα ολικά TS εμφανίζεται πάντα αυξημένος σε σχέση με τον αντίστοιχο στη περίπτωση των χρησιμοποιημένων, αλλά και του control.



Γράφημα 18. Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χόματος Α σε διάστημα 0-60 d παρουσία των UST (TOBACCO UNSMOKED) και ST (TOBACCO SMOKED) (0,2mL/gr ξηρού χόματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό



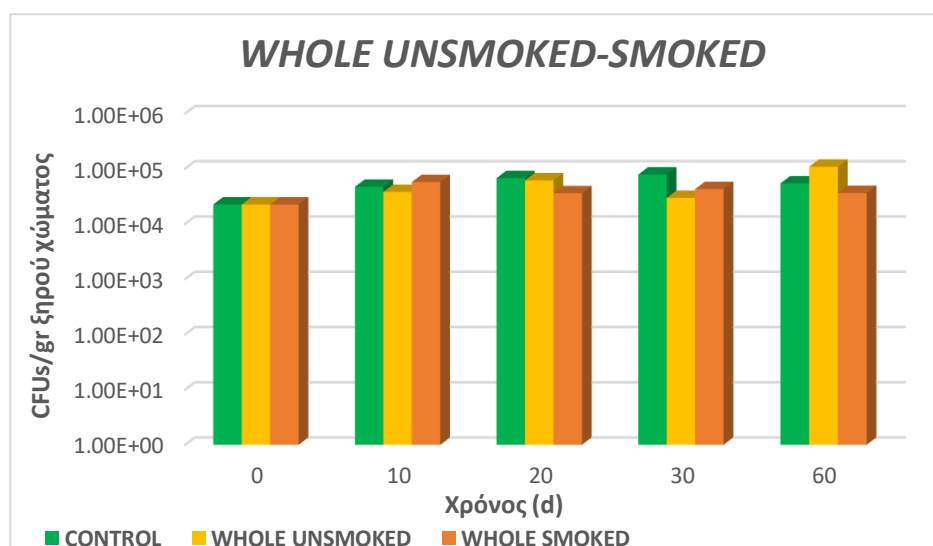
Γράφημα 19. Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χόματος Α σε διάστημα 0-60 d παρουσία των USF (FILTER UNSMOKED) και SF (FILTER SMOKED) (0,2mL/gr ξηρού χόματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό

Στα παραπάνω γραφήματα φαίνεται η επίδραση του χρησιμοποιημένου και μη καπνού αλλά και των φίλτρων αντίστοιχα στον πληθυσμό των μυκήτων του χόματος Α. Σύμφωνα με το **Γράφημα 18**, με την πάροδο των δυο μηνών βλέπουμε ότι υπάρχει μια μικρή μείωση του πληθυσμού στο control. Αντίθετα, στο ίδιο αυτό διάστημα η συγκέντρωση των μυκήτων στο χώμα που περιέχει UST φαίνεται να αυξάνεται ελαφρώς. Η αύξηση αυτή είναι πιο έντονη στις 30 d, ενώ η συγκέντρωση στο control

μειώνεται και πάλι σε μικρό βαθμό. Τέλος, στις 60 d φαίνεται πως ο αχρησιμοποίητος αλλά και χρησιμοποιημένος καπνός εμφανίζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από το control, με τον πρώτο να υπερτερεί.

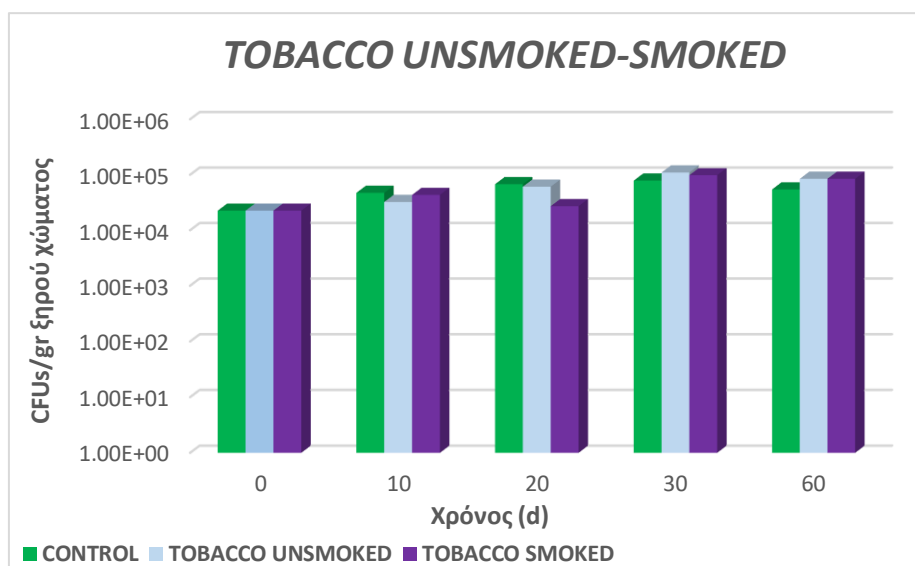
Στο **Γράφημα 19** απεικονίζεται η συμπεριφορά των μυκήτων υπό την παρουσία αχρησιμοποίητων και χρησιμοποιημένων φίλτρων. Όπως διακρίνεται, η επίδραση αυτών των υδατικών εκπλυμάτων στους μύκητες φαίνεται να είναι παρόμοια με αυτή του καπνού. Ειδικότερα, μετά τους δυο μήνες και ενώ ο πληθυσμός των μυκήτων στο control μειώνεται, φαίνεται πως τα φίλτρα και ιδιαίτερα τα αχρησιμοποιήτα δρουν ωφέλιμα για τους μικροοργανισμούς προκαλώντας μια μικρή αύξηση στη συγκέντρωσή τους.

Στη συνέχεια ακολουθούν τα αποτελέσματα σχετικά με τον πληθυσμό των **μυκήτων** στο χόμα B, παρουσία των υδατικών εκπλυμάτων σε χρονικό διάστημα 60 d.

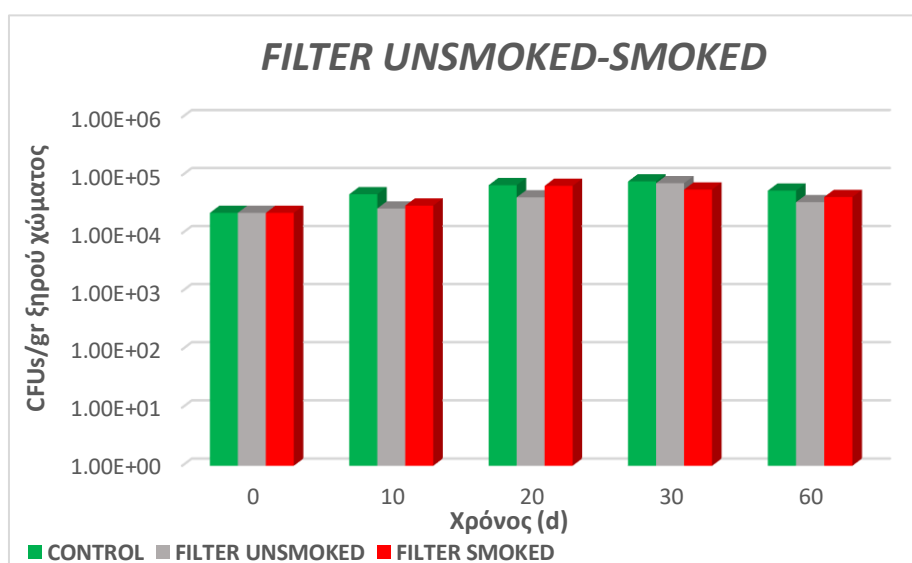


Γράφημα 21. Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος B σε διάστημα 0-60 d παρουσία των USW (WHOLE UNSMOKED) και SW (WHOLE SMOKED) (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χόμα εμποτισμένο μόνο με νερό

Στο **Γράφημα 21** φαίνεται η επίδραση των υδατικών εκπλυμάτων από ολικά αχρησιμοποίητα και χρησιμοποιημένα tobacco sticks στον μυκητιακό πληθυσμό του χώματος B. Όσον αφορά στη συγκέντρωση μυκήτων στο control, παρουσιάζει μια μικρή αύξηση με την πάροδο των δυο μηνών. Αντίστοιχη αύξηση ωστόσο παρατηρείται και στο χόμα που περιέχει USW και SW, με τα πρώτα να ευνοούν ακόμη περισσότερο την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Στις 60 d ο πληθυσμός μυκήτων στο χόμα με τα αχρησιμοποίητα TS υπερτερεί έναντι του πληθυσμού στο control, ενώ τα χρησιμοποιημένα TS καθίστανται τοξικά για τους μύκητες, επιφέροντας μείωση της συγκέντρωσής τους.



Γράφημα 22. Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος B σε διάστημα 0-60d παρουσία των UST (TOBACCO UNSMOKED και ST (TOBACCO SMOKED) (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό



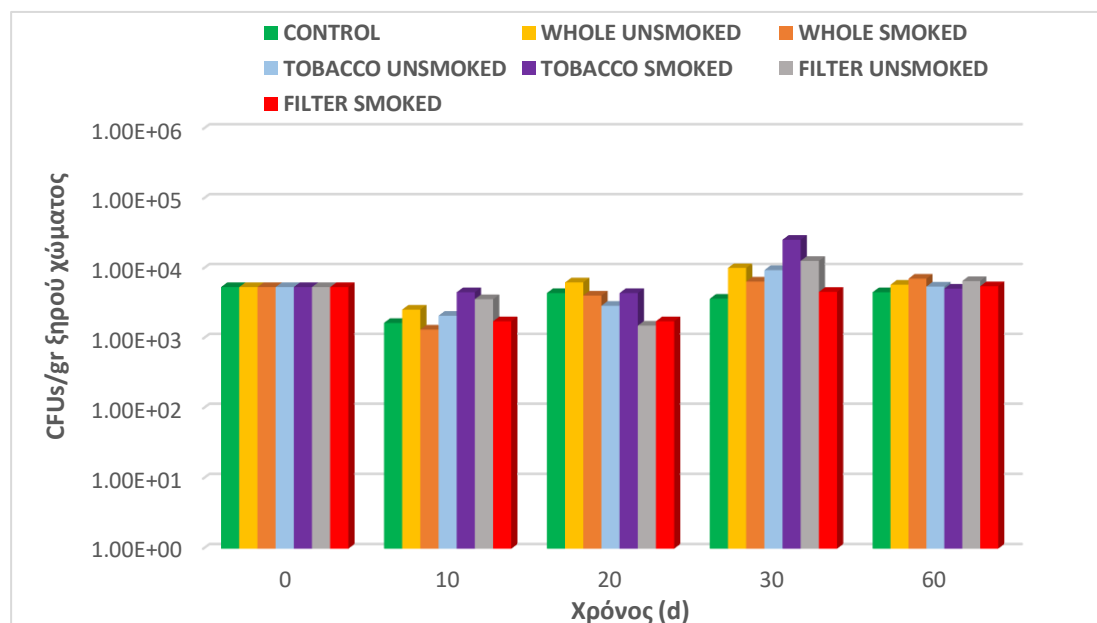
Γράφημα 23. Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος B σε διάστημα 0-60 d παρουσία των USF (FILTER UNSMOKED) και SF (FILTER SMOKED) (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό

Στο **Γράφημα 22** φαίνεται η επίδραση του καπνού στους μύκητες του χώματος B μέσα σε διάστημα 60 d. Αρχικά, ο πληθυσμός τους φαίνεται να σημειώνει αύξηση υπό κανονικές συνθήκες, δηλαδή στο χώμα που δε περιέχει κάποιο υδατικό έκπλυμα. Στους δυο μήνες φαίνεται ότι η παρουσία καπνού, αχρησιμοποίητου και χρησιμοποιημένου

συνέβαλε εξίσου θετικά στην ανάπτυξη των μυκήτων, αφού παρουσιάζεται μεγαλύτερη αύξηση στη συγκέντρωσή τους συγκριτικά με αυτή του control. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι ο καπνός και στις δυο μορφές του δεν επέφερε καμία τοξικότητα στη κοινότητα των μυκήτων κατά το χρονικό αυτό διάστημα.

Όσον αφορά στην επίδραση των φίλτρων στον μυκητιακό πληθυσμό του χώματος B, από το **Γράφημα 23** διαπιστώνουμε ότι με την πάροδο των δυο μηνών υπάρχει μια μείωση του πληθυσμού σε σχέση με το control. Έτσι, φαίνεται πως η παρουσία χρησιμοποιημένων και μη φίλτρων περιορίζει σε ένα μικρό βαθμό την ανάπτυξη των μυκήτων, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι τα καθιστά ιδιαίτερα τοξικά.

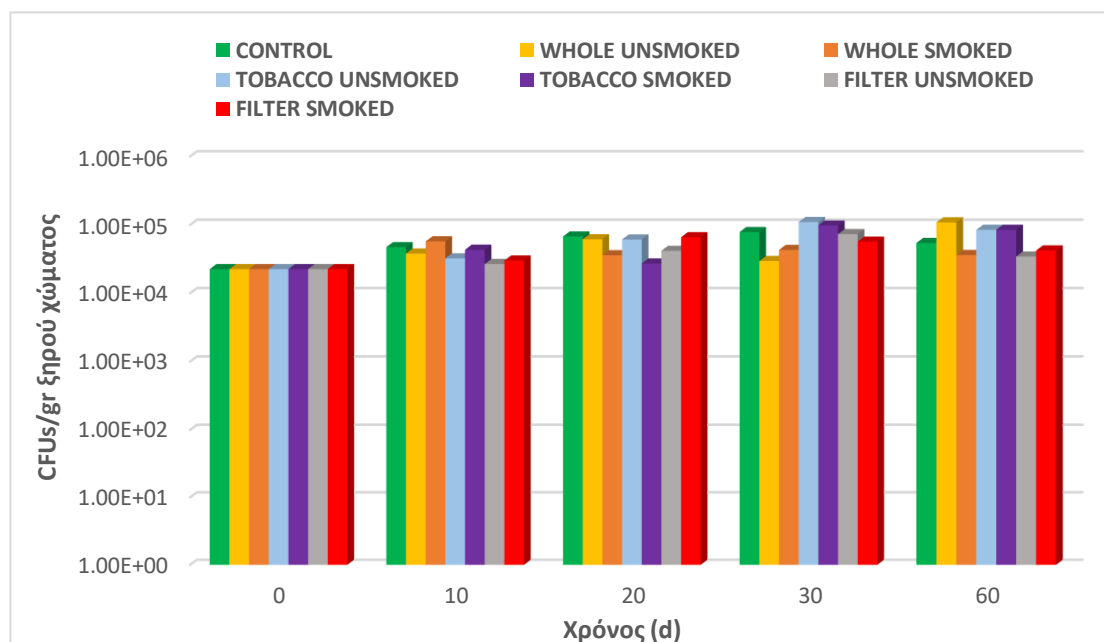
Παρακάτω παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά διαγράμματα που αφορούν στην επίδραση των υδατικών εκπλυμάτων στον πληθυσμό των μυκήτων του χώματος B.



Γράφημα 24. Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος A σε διάστημα 0-60 d παρουσία των δειγμάτων (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό

Από το **Γράφημα 24** είναι εμφανές ότι μετά το πέρας των δυο μηνών φαίνεται πως δεν υπάρχει καμία τοξική επίδραση των υδατικών εκπλυμάτων στον πληθυσμό των μυκήτων. Μάλιστα, ενδέχεται να ωφελούν σε μικρό βαθμό την ανάπτυξή τους καθώς η συγκέντρωση του πληθυσμού τους σημειώνει μια μικρή αύξηση με την παρουσία των εν λόγω εκπλυμάτων. Τα ολικά χρησιμοποιημένα TS και τα αχρησιμοποίητα φίλτρα επιφέρουν τη μεγαλύτερη αύξηση. Αντίθετα, σύμφωνα με το **Γράφημα 25**, στην περίπτωση του δεύτερου χώματος φαίνεται πως το φίλτρο επιφέρει μείωση στο

πληθυσμό των μυκήτων. Ωστόσο, ο καπνός χρησιμοποιημένος ή μη, καθώς και τα ολικά αχρησιμοποίητα TS επιδρούν θετικά προκαλώντας αύξηση της συγκέντρωσής τους.



Γράφημα 25. Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος B σε διάστημα 0-60 d παρουσία των δειγμάτων (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό

Συγκρίνοντας με τα αντίστοιχα συγκεντρωτικά γραφήματα των βακτηρίων, μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι και για τις δύο ομάδες μικροοργανισμών, το χώμα B φαίνεται να ευνοεί περισσότερο την ανάπτυξή τους. Στην περίπτωση των μυκήτων αυτό γίνεται αντιληπτό από το γεγονός ότι η συγκέντρωση του πληθυσμού τους στο χώμα B υπό κανονικές συνθήκες είναι κατά μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από αυτή στο χώμα A. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί πως η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στο ότι η συλλογή του κάθε είδους χώματος, καθώς και η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικούς μήνες, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Συνολικά, όσον αφορά στην επίδραση των υδατικών εκπλυμάτων στους πληθυσμούς βακτηρίων και μυκήτων του εδάφους, διαπιστώθηκε ότι τα φίλτρα αναστέλλουν σε μικρό βαθμό την ανάπτυξή τους, ενώ αντίθετα ο καπνός την ευνοεί. Ακόμη, συμπεραίνουμε ότι οι μύκητες φαίνεται να παρουσιάζουν μικρότερη ευαισθησία απέναντι στις συγκεκριμένες αυτές ουσίες, σε αντίθεση με τα βακτήρια.

Η μικροβιακή βιοαποικοδόμηση των χημικών ουσιών που προέρχονται από απόβλητα καπνού μπορεί να επηρεάσει την τύχη και τον περιβαλλοντικό κίνδυνο των εν λόγω χημικών ουσιών. Ωστόσο, η βιοαποικοδόμηση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες,

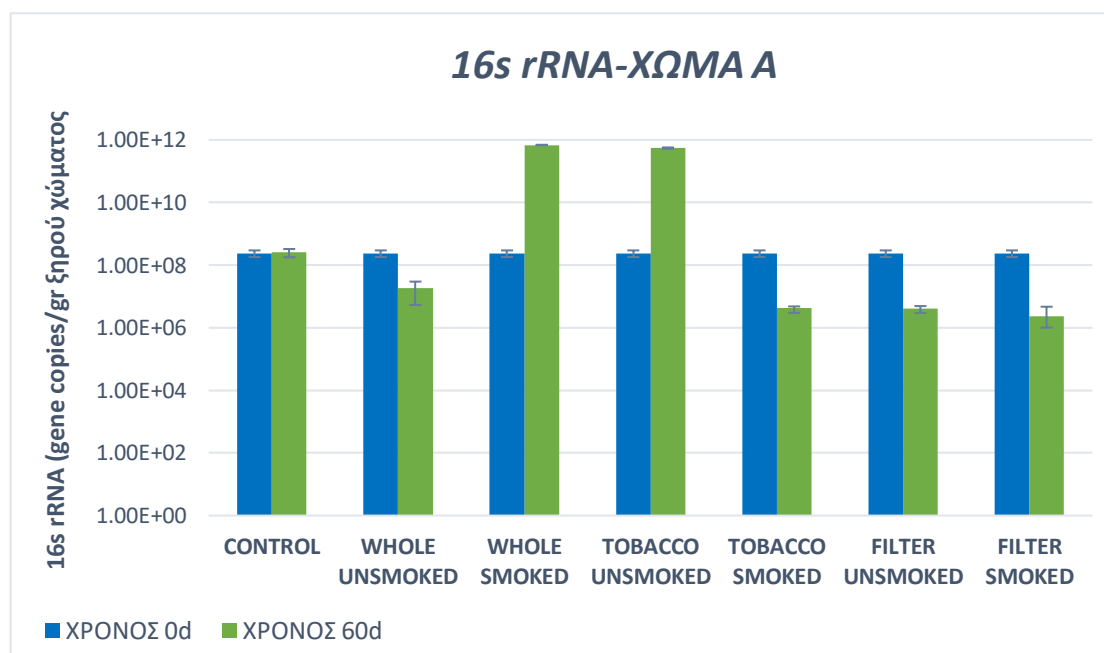
συμπεριλαμβανομένου του εάν οι χημικές ουσίες που υφίστανται αποικοδόμηση είναι τοξικές για τους μικροοργανισμούς (Beutel et al., 2021). Η νικοτίνη, ένα από τα κύρια συστατικά του καπνού είναι γνωστό ότι είναι τοξική για τους ανώτερους οργανισμούς, καθώς επίσης και αντιμικροβιακή. Σε έρευνά τους, οι Ruan και Liu (2015) χρησιμοποίησαν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για να εξετάσουν τη μεταβολή της δομής της μικροβιακής κοινότητας σε δείγματα ιζήματος που είχαν υποστεί ρύπανση με νικοτίνη, ανάλογα με τη συγκέντρωση αυτής και το χρόνο έκθεσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανάπτυξη ορισμένων βακτηριακών ειδών στα δείγματα ιζήματος που περιείχαν νικοτίνη παρεμποδίστηκε κατά τη διάρκεια της έκθεσης. Ορισμένα βακτήρια μειώθηκαν σε ποικιλομορφία ειδών και σε ποσότητα με την αύξηση της συγκέντρωσης νικοτίνης ή του χρόνου έκθεσης, ενώ άλλα βακτήρια εμπλουτίστηκαν υπό την επίδραση της νικοτίνης (Ruan and Liu, 2015). Ωστόσο, πολλοί μικροοργανισμοί συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων και των μυκήτων, έχουν την ικανότητα να μεταβολίσουν τη νικοτίνη. Για παράδειγμα, σε έδαφος που έχει υποστεί ρύπανση από απόβλητα καπνού, ο εμβολιασμός με ένα βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* που αποικοδομεί τη νικοτίνη οδήγησε στον πολλαπλασιασμό αυτών των πληθυσμών κατά τη διάρκεια της βιοαποικοδόμησης (Wang et al., 2012). Έτσι λοιπόν οι μικροοργανισμοί με συγκεκριμένα ένζυμα και βιοχημικές οδούς, μετά τη μεταβολική μετατροπή, αξιοποιούν τη νικοτίνη ως μοναδική πηγή άνθρακα, αζώτου και ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Έχουν αναφερθεί διάφορες οδοί αποικοδόμησης της νικοτίνης, όπως η οδός απομεθυλίωσης σε μύκητες, η οδός πυριδίνης σε θετικά κατά Gram βακτήρια, η οδός πυρρολιδίνης και η παραλλαγή των οδών πυριδίνης και πυρρολιδίνης σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Gurusamy and Natarajan, 2013). Παρ' όλα αυτά οι περισσότερες έρευνες σχετικά με τη νικοτίνη έχουν επικεντρωθεί σε μεμονωμένους τύπους βακτηρίων που την αποικοδομούν, ενώ λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει τη πραγματική επίδραση αυτής στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

Τα μέταλλα που περιέχονται στα υδατικά εκπλύματα των ολικών χρησιμοποιημένων TS φάνηκε πως δεν έδρασαν ανασταλτικά στην ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων του εδάφους. Σύμφωνα με το **Πίνακα 4**, το αλουμίνιο παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ ακολουθούν ο ψευδάργυρος και το βάριο. Έρευνα των Purwanti et al (2018) έδειξε ότι το βακτήριο *Vibrio alginolyticus* έδειξε υψηλή αντοχή σε μολυσμένο με αλουμίνιο έδαφος έως 50 mg/L, ενώ συγκέντρωση 100 έως 350 mg/L θα μπορούσε να αναστείλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Η συγκέντρωση αλουμινίου που ανιχνεύθηκε στα υδατικά εκπλύματα των χρησιμοποιημένων TS ήταν 1,427 mg/L, με αποτέλεσμα να μη το καθιστά τοξικό στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

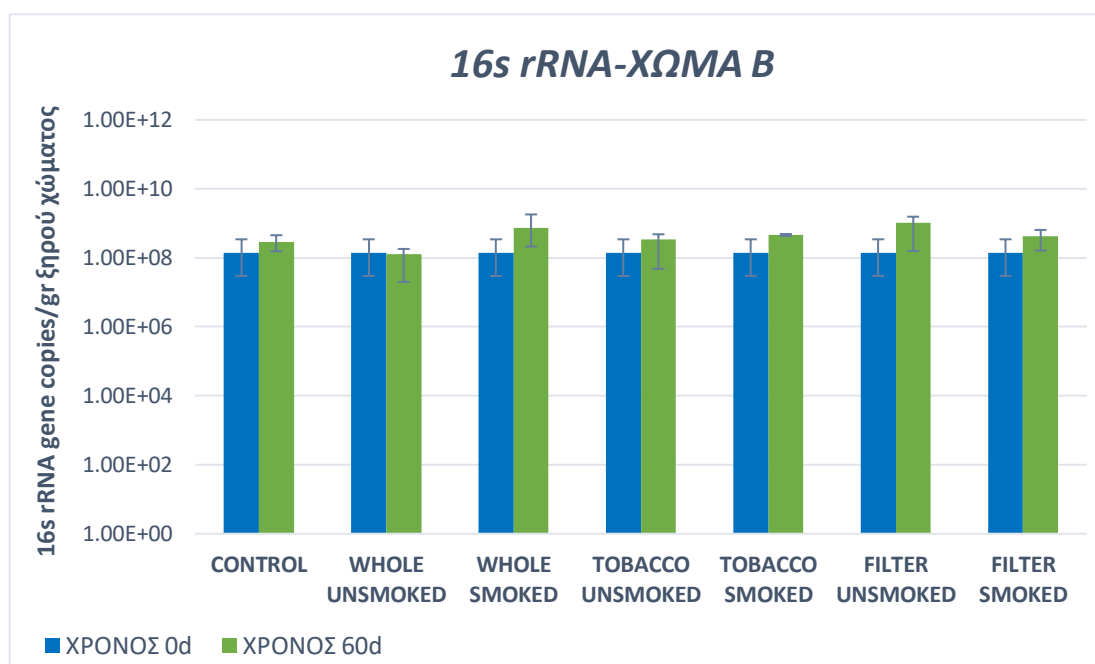
4.3.2 Ποσοτικοποίηση βακτηριακού πληθυσμού στο χώμα μέσω real time PCR

Η εκτενής φαινοτυπική και γενετική ποικιλομορφία που συναντάται στις κοινότητες βακτηρίων και μυκήτων του εδάφους, τις καθιστά μια από τις πιο δύσκολες κοινότητες για μελέτη (Øvreås et al., 1998). Εκτιμάται ότι περίπου το 1% του βακτηριακού πληθυσμού του εδάφους μπορεί να καλλιεργηθεί με τις συνήθεις εργαστηριακές πρακτικές. Δεν είναι γνωστό εάν αυτό το 1% είναι αντιπροσωπευτικό του βακτηριακού πληθυσμού (Torsvik et al., 1998). Πολλά είδη μυκήτων αντίστοιχα ενδέχεται να διαφύγουν της καλλιέργειας στο εργαστήριο. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για τη μελέτη αυτών των οργανισμών συμπεριλαμβανομένων των μοριακών, όπως είναι η PCR.

Έτσι, σε τελικό στάδιο αφού πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενετικού υλικού από τα δυο είδη χώματος που ήταν εμποτισμένα με τα υδατικά εκπλύματα, καθώς επίσης και από τα χώματα που χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο, έγινε ποσοτικοποίηση βακτηριακού πληθυσμού μέσω της μοριακής μεθόδου real time PCR. Η ποσοτικοποίηση έγινε με ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA που αντιστοιχεί στο ριβωσομικό βακτηριακό γενετικό υλικό. Τα αποτελέσματα για τα δυο χώματα παρουσιάζονται στη συνέχεια.



Γράφημα 26. Συγκέντρωση γονιδίου 16S rRNA (gene copies/gr ξηρού χώματος) στο χώμα Α παρουσία υδατικών εκπλυμάτων σε 0 και 60 d (0,2mL/gr ξηρού χώματος) (Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό)



Γράφημα 27. Συγκέντρωση γονιδίου 16S rRNA (gene copies/gr ξηρού χώματος) στο χώμα Β παρουσία υδατικών εκπλυμάτων σε 0 και 60 d (0,2mL/gr ξηρού χώματος) Control: Χώμα εμποτισμένο μόνο με νερό

Στα παραπάνω γραφήματα απεικονίζεται η αρχική και τελική συγκέντρωση του συνολικού βακτηριακού γενετικού υλικού που ανιχνεύθηκε στα δυο είδη χώματος που περιείχαν τα υδατικά εκπλύματα. Εξετάστηκε και η αντίστοιχη τελική συγκέντρωση των χωμάτων ελέγχου (control), ώστε να υπάρξει σύγκριση.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 26** η παρουσία των περισσότερων δειγμάτων φαίνεται να προκαλεί μείωση στο πληθυσμό των βακτηρίων του χώματος Α. Βλέπουμε πως στις 60 d η συγκέντρωση του γονιδίου στα εμποτισμένα με τα εκπλύματα χώματα, είναι μειωμένη κατά μια έως δυο τάξεις μεγέθους σε σχέση με αυτή του control. Εξάιρεση αποτελεί η περίπτωση των ολικών χρησιμοποιημένων tobacco sticks και του αχρησιμοποίητου καπνού, όπου παρουσιάζεται σχετικά μεγάλη αύξηση έως και τρεις τάξεις μεγέθους. Σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αντίστοιχα που προέκυψαν μέσω των μεθόδων καλλιέργειας, αφού και στις δυο μεθόδους τα περισσότερα υδατικά εκπλύματα επέφεραν μείωση στο βακτηριακό πληθυσμό. Ο αχρησιμοποίητος καπνός ωστόσο, και στις δυο περιπτώσεις φάνηκε να ευνοεί την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Από το **Γράφημα 27** συμπεραίνουμε ότι τα υδατικά εκπλύματα από προϊόντα καπνού δεν δρουν τοξικά απέναντι στη βακτηριακή κοινότητα του χώματος Β, εκτός από αυτό των ολικών αχρησιμοποίητων tobacco sticks το οποίο προκαλεί μια μικρή μείωση στο πληθυσμό τους. Τα υπόλοιπα είδη εκπλυμάτων φαίνεται να ευνοούν μάλιστα τα βακτήρια, καθώς παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του γονιδίου σε διάστημα

δυο μηνών, σε σχέση με αυτή του control. Μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται κατά την παρουσία αχρησιμοποίητου φίλτρου και ολικών χρησιμοποιημένων TS. Στην περίπτωση του χόματος B υπάρχει μια μικρή απόκλιση στα αποτελέσματα σε σύγκριση με αυτά της μεθόδου καλλιέργειας. Ωστόσο, πρέπει να επισημανθεί ότι δεν είναι εφικτή η πλήρης συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δυο μεθόδων, καθώς όπως προαναφέρθηκε η real time PCR ανιχνεύει πολύ μεγαλύτερο ποσοστό βακτηρίων του εδάφους σε σχέση με τη μέθοδο καλλιέργειας του εργαστηρίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Το κάπνισμα αποτελεί πλέον μια από τις επικρατέστερες εθιστικές συνήθειες παγκοσμίως, προσβάλλοντας σημαντικά όχι μόνο την ανθρώπινη υγεία αλλά και το περιβάλλον. Τα υπολείμματα των τσιγάρων που απορρίπτονται καθημερινά αποτελούν σοβαρή απειλή για τα χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα, θέτοντας σε κίνδυνο τους ζωντανούς οργανισμούς που ζουν σε αυτά. Σε μια προσπάθεια ελαχιστοποίησης του προβλήματος που αφορά τόσο στην ανθρώπινη υγεία, όσο και στην περιβαλλοντική ρύπανση, η καπνοβιομηχανίες έχουν εισαγάγει στην αγορά τα νέα προϊόντα θέρμανσης καπνού. Κύρια επιδίωξή τους είναι ο περιορισμός, όσο είναι δυνατόν, των παραγόμενων επιβλαβών ενώσεων που προέρχονται από τη καύση των συμβατικών τσιγάρων. Ωστόσο, η έρευνα που έχει διεξαχθεί σχετικά με τον αντίκτυπο της χρήσης τέτοιου είδους προϊόντων στο περιβάλλον είναι αρκετά περιορισμένη.

Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε έλεγχος της οικοτοξικότητας υδατικών εκπλυμάτων που προέρχονται από χρησιμοποιημένα και μη tobacco sticks, αλλά και από τον καπνό και το φίλτρο που τα αποτελούν. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω:

❖ Έλεγχος οικοτοξικότητας με χρήση του βιοδείκτη *Vibrio fischeri*

Όσον αφορά στο βακτήριο *V.fischeri*, συμπεραίνεται ότι τα υδατικά εκχυλίσματα δε δρουν οξεία τοξικά σε αυτό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης του πληθυσμού του αντιστοιχούσαν στη μικρότερη αραίωση των δειγμάτων, με τα χρησιμοποιημένα φίλτρα να επιφέρουν το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας, της τάξης του 58%. Οι υπόλοιπες τιμές σε αυτή την αραίωση κυμαίνονταν από 37-51%. Ωστόσο, τα ολόκληρα χρησιμοποιημένα tobacco sticks και στη μεγαλύτερη ακόμη αραίωσή τους προκάλεσαν μια μικρή μείωση στο πληθυσμό του βακτηρίου, περίπου 15%, ενώ τα αντίστοιχα αχρησιμοποίητα φαίνεται πως δεν επέφεραν καμία τοξικότητα, αφού σε όλες τις αραιώσεις η μείωση ήταν μηδενική. Θα ήταν σημαντικό να λάβουμε υπόψιν πως από τη στιγμή που τα προϊόντα καπνού και υπολείμματα αυτών θα απορριφθούν στο περιβάλλον, είναι προφανές ότι θα υποστούν πολύ μεγαλύτερες αραιώσεις από αυτές που εξετάστηκαν στη συγκεκριμένη εργασία.

❖ Έλεγχος οικοτοξικότητας με χρήση του βιοδείκτη *Penicillium purpurogenum*

Αναφορικά με τον μύκητα *P.purpurogenum*, τα υδατικά εκπλύματα είχαν διαφορετική επίδραση. Την πρώτη εβδομάδα τα αποτελέσματα έδειξαν μια σημαντική μείωση στον πληθυσμό του, της τάξης των 2 έως και 3 Logs. Ωστόσο, μετά το πέρας των δυο εβδομάδων η μείωση αυτή ελαχιστοποιήθηκε σε μεγάλο βαθμό, εκτός από την περίπτωση του χρησιμοποιημένου καπνού ο οποίος εξακολούθησε να δρα τοξικά

απέναντι στο μικροοργανισμό. Η παρουσία των φίλτρων αντιθέτως φάνηκε να ευνοεί την ανάπτυξή του, επιφέροντας μια αύξηση στη συγκέντρωση του πληθυσμού του.

❖ Έλεγχος οικοτοξικότητας στα δυο είδη χώματος

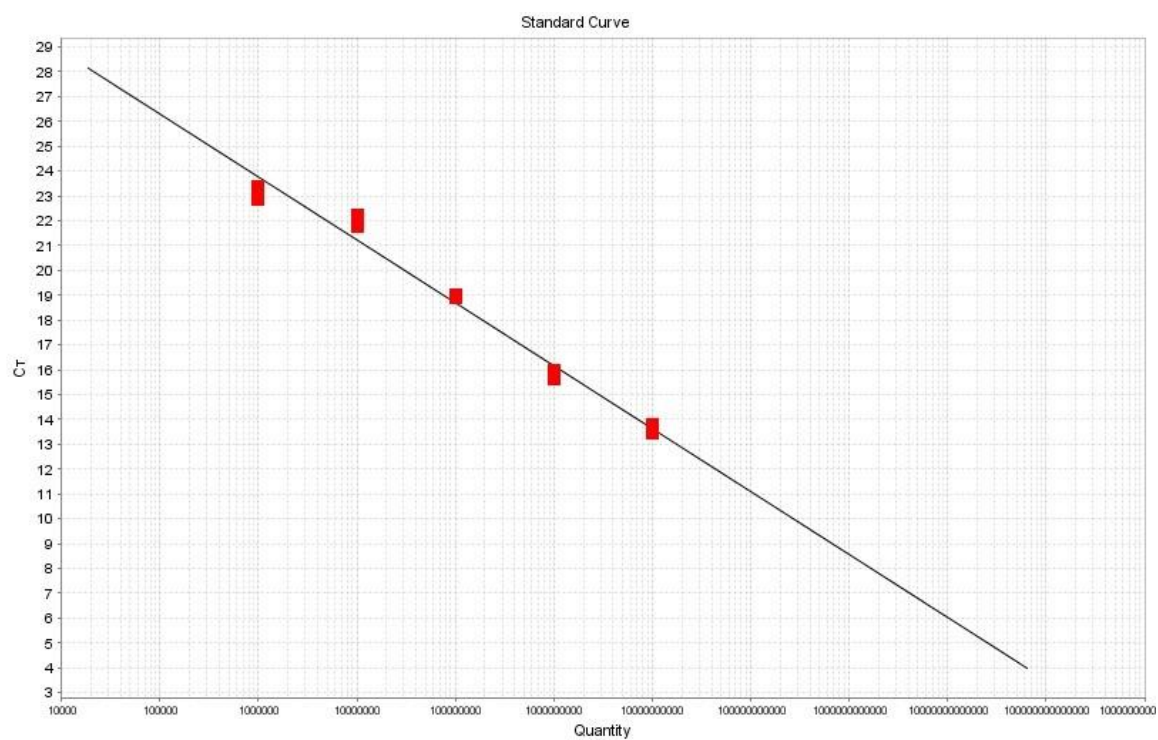
Όσον αφορά στη βακτηριακή κοινότητα των δύο χωμάτων, και στις δυο περιπτώσεις οι μικροοργανισμοί είχαν παρόμοια συμπεριφορά παρουσία των υδατικών εκπλυμάτων, μετά από 60 d. Το έκπλυμα καπνού και στα δυο είδη χώματος συνέβαλε στην ανάπτυξη των βακτηρίων προκαλώντας μικρή αύξηση στον πληθυσμό τους. Ειδικότερα, ο αχρησιμοποίητος για το χώμα Α, ενώ ο χρησιμοποιημένος για το χώμα Β. Αντίθετα, μεγαλύτερη μείωση στο βακτηριακό πληθυσμό του πρώτου χώματος επέφεραν τα ολικά χρησιμοποιημένα TS, ενώ στου δεύτερου ο αχρησιμοποίητος καπνός. Ωστόσο, οι μειώσεις που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια των δυο μηνών δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικές, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα υδατικά εκπλύματα δεν καθίστανται οξεία τοξικά για τα βακτήρια. Η μυκητιακή κοινότητα παρουσίασε μικρότερη ευαισθησία απέναντι στις ουσίες, σε σύγκριση με τη βακτηριακή. Ειδικότερα, όσον αφορά στο χώμα Α, δεν σημειώθηκε καμία τοξικότητα ως προς τους μύκητες, ενώ ο πληθυσμός τους στο χώμα Β παρουσίασε μείωση με την παρουσία χρησιμοποιημένων και μη φίλτρων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη real time PCR, μέσω της ανίχνευσης του γονιδίου 16S rRNA, ταυτίστηκαν σε μεγάλο βαθμό με αυτά της μεθόδου καλλιέργειας βακτηρίων. Ωστόσο, κάποιες αποκλίσεις οφείλονταν στο γεγονός ότι μεγάλος αριθμός βακτηρίων του εδάφους δεν καλλιεργείται με τις κλασσικές μεθόδους.

Τα προϊόντα καπνού «heat not burn» ως μια νέα άφιξη στο χώρο της καπνοβιομηχανίας, δε βρίσκονται ακόμη στο επίκεντρο μελέτης της επιστημονικής κοινότητας. Ωστόσο, η εκτεταμένη τους χρήση καθιστά αναγκαία τη διεξαγωγή έρευνας σχετικά με τις επιπτώσεις τους στο περιβάλλον, και πιο συγκεκριμένα στους οργανισμούς που ζουν σε αυτό. Ειδικότερα, απαιτούνται μελέτες με διαφορετικά είδη μικροοργανισμών για την αξιολόγηση των επιπτώσεων των HnBs, τόσο σε θαλάσσια όσο και σε χερσαία οικοσυστήματα. Ο έλεγχος τοξικότητας με έναν πρότυπο μικροβιακό οργανισμό, όπως για παράδειγμα ο *V. fischeri* που χρησιμοποιήθηκε και στη συγκεκριμένα εργασία, δεν θα μπορούσε να προβλέψει την τοξικότητα στα άλλα μικροβιακά είδη που βρίσκονται στο περιβάλλον. Ακόμη, προτείνονται έρευνες σχετικά με τον έλεγχο οικοτοξικότητας με χρήση βιοδεικτών που ανήκουν σε διαφορετικά τροφικά επίπεδα. Κλείνοντας, κρίνεται αναγκαία η εκτενέστερη διενέργεια οικοτοξικολογικής έρευνας που αφορά στη χημική σύσταση υδατικών εκπλυμάτων τέτοιου είδους προϊόντων καπνού, καθώς και η σύγκριση με αυτά των συμβατικών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 11. Έλεγχος καθαρότητας γενετικού υλικού δειγμάτων

ΔΕΙΓΜΑ	R	DNA concentration (ng/μL)
C ₀ ΧΩΜΑ Α	1,83	46,5
C ₆₀ ΧΩΜΑ Α	1,86	105,1
WHOLE SMOKED ΧΩΜΑ Α	1,88	57,8
WHOLE UNSMOKED ΧΩΜΑ Α	1,85	53,2
TOBACCO UNSMOKED ΧΩΜΑ Α	1,54	32,7
TOBACCO SMOKED ΧΩΜΑ Α	1,81	38,5
FILTER SMOKED ΧΩΜΑ Α	1,83	60,1
FILTER UNSMOKED ΧΩΜΑ Α	1,83	67,4
C ₀ ΧΩΜΑ Β	1,42	82
C ₆₀ ΧΩΜΑ Β	1,61	57,4
WHOLE SMOKED ΧΩΜΑ Β	1,80	57,7
WHOLE UNSMOKED ΧΩΜΑ Β	1,79	46,2
TOBACCO UNSMOKED ΧΩΜΑ Β	1,88	105
FILTER SMOKED ΧΩΜΑ Β	1,64	85
FILTER UNSMOKED ΧΩΜΑ Β	1,66	69,8



Εικόνα 21. Πρότυπη καμπύλη RT-PCR γονιδίου 16S rRNA (Slope: -2.531, R^2 : 0.982)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Adams, S.M., Giesy, J.P., Tremblay, L.A. and Eason, C.T. (2001). The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology. *Biomarkers*, 6(1), pp.1–6. doi:10.1080/135475001452724.
- Akhbarizadeh, R., Dobaradaran, S., Parhizgar, G., Schmidt, T.C. and Mallaki, R. (2021). Potentially toxic elements leachates from cigarette butts into different types of water: A threat for aquatic environments and ecosystems? *Environmental Research*, 202, p.111706. doi:10.1016/j.envres.2021.111706.
- Alberti, S., Sotiropoulou, M., Fernández, E., Solomou, N., Ferretti, M. and Psillakis, E. (2021). UV-254 degradation of nicotine in natural waters and leachates produced from cigarette butts and heat-not-burn tobacco products. *Environmental Research*, 194, p.110695. doi:10.1016/j.envres.2020.110695.
- Alves, P.R.L. and Cardoso, E.J.B.N. (2016). Overview of the Standard Methods for Soil Ecotoxicology Testing. *Invertebrates - Experimental Models in Toxicity Screening*. doi:10.5772/62228.
- Araújo, M.C.B. and Costa, M.F. (2019). A critical review of the issue of cigarette butt pollution in coastal environments. *Environmental Research*, [online] 172, pp.137–149. doi:10.1016/j.envres.2019.02.005.
- Bai, Y., Wang, Q., Liao, K., Jian, Z., Zhao, C. and Qu, J. (2018). Fungal Community as a Bioindicator to Reflect Anthropogenic Activities in a River Ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.03152.
- Baran, W., Madej-Knysak, D., Sobczak, A. and Adamek, E. (2020). The influence of waste from electronic cigarettes, conventional cigarettes and heat-not-burn tobacco products on microorganisms. *Journal of Hazardous Materials*, 385, p.121591. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121591.
- Bartell, S.M. (2006). Biomarkers, Bioindicators, and Ecological Risk Assessment—A Brief Review and Evaluation. *Environmental Bioindicators*, 1(1), pp.60–73. doi:10.1080/15555270591004920.

- Bartolomeu Medeiros, W., Bail, J., Zambrano Passarini, M.R. and Bonugli-Santos, R.C. (2021). Toxicity treatment of tobacco wastes using experimental design by filamentous fungi. *Heliyon*, [online] 7(2), p.e06144. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06144.
- Beutel, M.W., Harmon, T.C., Novotny, T.E., Mock, J., Gilmore, M.E., Hart, S.C., Traina, S., Duttagupta, S., Brooks, A., Jerde, C.L., Hoh, E., Van De Werfhorst, L.C., Butsic, V., Wartenberg, A.C. and Holden, P.A. (2021). A Review of Environmental Pollution from the Use and Disposal of Cigarettes and Electronic Cigarettes: Contaminants, Sources, and Impacts. *Sustainability*, 13(23), p.12994. doi:10.3390/su132312994.
- Burger, J. (2006). Bioindicators: Types, Development, and Use in Ecological Assessment and Research. *Environmental Bioindicators*, 1(1), pp.22–39. doi:10.1080/15555270590966483.
- Chapman, P.M. (2002). Integrating toxicology and ecology: putting the ‘eco’ into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, 44(1), pp.7–15. doi:10.1016/s0025-326x(01)00253-3.
- Chevalier, Q., El Hadri, H., Petitjean, P., Bouhnik-Le Coz, M., Reynaud, S., Grassl, B. and Gigault, J. (2018). Nano-litter from cigarette butts: Environmental implications and urgent consideration. *Chemosphere*, 194, pp.125–130. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.11.158.
- Dobaradaran, S., Soleimani, F., Akhbarizadeh, R., Schmidt, T.C., Marzban, M. and BasirianJahromi, R. (2021). Environmental fate of cigarette butts and their toxicity in aquatic organisms: A comprehensive systematic review. *Environmental Research*, 195, p.110881. doi:10.1016/j.envres.2021.110881.
- Donkova, R. and Kaloyanova, N. (n.d.). The Impact of Soil Pollutants on Soil Microbial Activity. *Soil Chemical Pollution, Risk Assessment, Remediation and Security*, pp.73–93. doi:10.1007/978-1-4020-8257-3_6.
- Dupont, S., Carré-Mlouka, A., Descarrega, F., Ereskovsky, A., Longeon, A., Mouray, E., Florent, I. and Bourguet-Kondracki, M.L. (2013). Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge *Phorbas tenacior* (Porifera, Demospongiae). *Letters in Applied Microbiology*, 58(1), pp.42–52. doi:10.1111/lam.12154.

- Fabietti, G., Biasioli, M., Barberis, R. and Ajmone-Marsan, F. (2009). Soil contamination by organic and inorganic pollutants at the regional scale: the case of Piedmont, Italy. *Journal of Soils and Sediments*, 10(2), pp.290–300. doi:10.1007/s11368-009-0114-9.
- Gabrielson, J., Kühn, I., Colque-Navarro, P., Hart, M., Iversen, A., McKenzie, D. and Möllby, R. (2003). Microplate-based microbial assay for risk assessment and (eco)toxic fingerprinting of chemicals. *Analytica Chimica Acta*, [online] 485(1), pp.121–130. doi:10.1016/S0003-2670(03)00404-5.
- Gill, H., Rogers, K., Rehman, B., Moynihan, J. and Bergey, E.A. (2018). Cigarette butts may have low toxicity to soil-dwelling invertebrates: Evidence from a land snail. *Science of The Total Environment*, 628-629, pp.556–561. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.02.080.
- Gomes, A.R., Justino, C., Rocha-Santos, T., Freitas, A.C., Duarte, A.C. and Pereira, R. (2017). Review of the ecotoxicological effects of emerging contaminants to soil biota. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 52(10), pp.992–1007. doi:10.1080/10934529.2017.1328946.
- Goniewicz, M. (2019a). IBS11.01 Electronic Cigarettes and Heat-Not-Burn Tobacco Products — How Are They Different. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(10), p.S101. doi:10.1016/j.jtho.2019.08.221.
- Green, D.S., Boots, B., Da Silva Carvalho, J. and Starkey, T. (2019). Cigarette butts have adverse effects on initial growth of perennial ryegrass (gramineae: *Lolium perenne* L.) and white clover (leguminosae: *Trifolium repens* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [online] 182, p.109418. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109418.
- Gurusamy, R. and Natarajan, S. (2013). Current Status on Biochemistry and Molecular Biology of Microbial Degradation of Nicotine. *The Scientific World Journal*, 2013, pp.1–15. doi:10.1155/2013/125385.
- Hassan, S.H.A., Van Ginkel, S.W., Hussein, M.A.M., Abskharon, R. and Oh, S.-E. (2016). Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors. *Environment International*, 92-93, pp.106–118. doi:10.1016/j.envint.2016.03.003.
- Jaffrezic-Renault, N. and Dzyadevych, S. (2008). Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring. *Sensors*, 8(4), pp.2569–2588. doi:10.3390/s8042569.

- Koroleva, E., Mqulwa, A.Z., Norris-Jones, S., Reed, S., Tambe, Z., Visagie, A. and Jacobs, K. (2021). Impact of cigarette butts on bacterial community structure in soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(25), pp.33030–33040. doi:10.1007/s11356-021-13152-w.
- Koutela, N., Fernández, E., Saru, M.-L. and Psillakis, E. (2020). 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, p.136700. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136700.
- Krämer, U. (2010). Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), pp.517–534. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112156.
- Kurmus, H. and Mohajerani, A. (2020). The toxicity and valorization options of cigarette butts. *Waste Management*, 104, pp.104–118. doi:10.1016/j.wasman.2020.01.011.
- Lee, W. and Lee, C.C. (2015). Developmental toxicity of cigarette butts – An underdeveloped issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [online] 113, pp.362–368. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.12.018.
- Nogueira Cardoso, E.J.B. and Lopes Alves, P.R. (2012). Soil Ecotoxicology. *Ecotoxicology*. doi:10.5772/28447.
- Novotny, T., Lum, K., Smith, E., Wang, V. and Barnes, R. (2009). Cigarettes Butts and the Case for an Environmental Policy on Hazardous Cigarette Waste. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(5), pp.1691–1705. doi:10.3390/ijerph6051691.
- Oropesa, A.L., Floro, A.M. and Palma, P. (2017). Toxic potential of the emerging contaminant nicotine to the aquatic ecosystem. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(20), pp.16605–16616. doi:10.1007/s11356-017-9084-4.
- Øvreås, L., Jensen, S., Daae, F.L. and Torsvik, V. (1998). Microbial Community Changes in a Perturbed Agricultural Soil Investigated by Molecular and Physiological Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), pp.2739–2742. doi:10.1128/aem.64.7.2739-2742.1998.
- Parmar, T.K., Rawtani, D. and Agrawal, Y.K. (2016). Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science*, 9(2), pp.110–118. doi:10.1080/21553769.2016.1162753.

- Parvez, S., Venkataraman, C. and Mukherji, S. (2006). A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*, 32(2), pp.265–268. doi:10.1016/j.envint.2005.08.022.
- Pinto, E., Cruz, M., Ramos, P., Santos, A. and Almeida, A. (2017a). Metals transfer from tobacco to cigarette smoke: Evidences in smokers' lung tissue. *Journal of Hazardous Materials*, 325, pp.31–35. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.11.069.
- Pinto, E. and Ferreira, I.M.P.L.V.O. (2015). Cation transporters/channels in plants: Tools for nutrient biofortification. *Journal of Plant Physiology*, 179, pp.64–82. doi:10.1016/j.jplph.2015.02.010.
- Quéméneur, M., Chifflet, S., Akrou, F., Bellaaj-Zouari, A. and Belhassen, M. (2020). Impact of cigarette butts on microbial diversity and dissolved trace metals in coastal marine sediment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 240, p.106785. doi:10.1016/j.ecss.2020.106785.
- Ruan, A. and Liu, C. (2015). Analysis of effect of nicotine on microbial community structure in sediment using PCR-DGGE fingerprinting. *Water Science and Engineering*, 8(4), pp.309–314. doi:10.1016/j.wse.2015.11.003.
- 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. and 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), pp.674–684. doi:10.1080/02786826.2017.1300231.
- Schaller, J.-P., Keller, D., Poget, L., Pratte, P., Kaelin, E., McHugh, D., Cudazzo, G., Smart, D., Tricker, A.R., Gautier, L., Yerly, M., Reis Pires, R., Le Bouhellec, S., Ghosh, D., Hofer, I., Garcia, E., Vanscheeuwijck, P. and Maeder, S. (2016). Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 2: Chemical composition, genotoxicity, cytotoxicity, and physical properties of the aerosol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81, pp.S27–S47. doi:10.1016/j.yrtph.2016.10.001.
- Scheerer, S., Gomez, F. and Lloyd, D. (2006). Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of

photoemission. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), pp.321–329.

doi:10.1016/j.mimet.2006.04.010.

- Slaughter, E., Gersberg, R.M., Watanabe, K., Rudolph, J., Stransky, C. and Novotny, T.E. (2011). Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. *Tobacco Control*, [online] 20(Supplement 1), pp.i25–i29. doi:10.1136/tc.2010.040170.
- Smith, M.R., Clark, B., Lüdicke, F., Schaller, J.-P., Vanscheeuwijck, P., Hoeng, J. and 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, pp.S17–S26. doi:10.1016/j.yrtph.2016.07.006.
- Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.-A. and Øvreås, L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64(1), pp.53–62. doi:10.1016/s0168-1656(98)00103-5.
- Wang, X., Tang, L., Yao, Y., Wang, H., Min, H. and Lu, Z. (2012). Bioremediation of the tobacco waste-contaminated soil by *Pseudomonas* sp. HF-1: nicotine degradation and microbial community analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(13), pp.6077–6088. doi:10.1007/s00253-012-4433-1.
- Wong, M.K.M., Goh, T.-K., Hodgkiss, I.J., Hyde, K.D., Ranghoo, V.M., Tsui, C.K.M., Ho, W.-H., Wong, W.S.W. and Yuen, T.-K. (1998). Role of fungi in freshwater ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, 7(9), pp.1187–1206. doi:10.1023/a:1008883716975.
- Zaghloul, A., Saber, M., Gadow, S. and Awad, F. (2020). Biological indicators for pollution detection in terrestrial and aquatic ecosystems. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1). doi:10.1186/s42269-020-00385-x.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΗ

- Arendtm (2022). *Environmental Disaster: Tobacco farming, production, use and disposal*. [online] ASH > Action on Smoking & Health. Available at: <https://ash.org/environmental-disaster-tobacco-farming-production-use-and-disposal/> [Accessed 13 Oct. 2022].
- Azenta.com. (2022). [online] Available at: <https://www.azenta.com/sites/default/files/web-media->

library/products/consumables-instruments/pcr-microplate-solutions/storage-plates/96w-round-deep-storage-plate-mag-sep/4ti-0125_front.jpg [Accessed 16 Oct. 2022].

- ec.europa.eu. (n.d.). *Tobacco consumption statistics*. [online] Available at: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Tobacco_consumption_statistics#Level_of_cigarette_consumption.
- Istockphoto.com. (2022). [online] Available at: <https://media.istockphoto.com/photos/cigarette-butts-from-the-beach-picture-id1363051887?k=20&m=1363051887&s=612x612&w=0&h=B6XVYQ-bzLz7YQ0uofFt1Z2KIEFrptH6gsBlOzAbsY=> [Accessed 16 Oct. 2022].
- Κυριαζής, Δ., Καμπούρης, Μ., Πουλάς, Κ., Πατρινός, Γ., Μοριακής Βιολογίας Και Ανοσολογίας, Ε., Φαρμακευτικής, Τ., Υγείας, Ε., Πατρών, Π., Πάτρας, Ρ., Ανοσολογίας, Ε., Μικροβιολογίας, Τ., Pasteur, I. and Υποβλήθηκε, Α. (2013). *Molecular techniques for the detection and characterization of microorganisms* Λέξεις ευρετηρίου Μικροβιολογία Μοριακή διάγνωση. [online] Available at: <https://www.mednet.gr/archives/2014-1/pdf/23.pdf> [Accessed 18 May 2020].
- Sciencephoto.com. (2022). [online] Available at: <https://media.sciencephoto.com/image/c0321743/800wm> [Accessed 16 Oct. 2022].
- Slidesharecdn.com. (2022). [online] Available at: <https://image.slidesharecdn.com/4-191022170811/85/pollution-indicators-bioindicators-5-320.jpg?cb=1662237478> [Accessed 16 Oct. 2022].
- tobaccotactics.org. (n.d.). *Tobacco and the Environment - TobaccoTactics*. [online] Available at: <https://tobaccotactics.org/wiki/tobacco-and-the-environment/>.
- Townnews.com. (2022). [online] Available at: <https://bloximages.newyork1.vip.townnews.com/northcentralpa.com/content/tncms/assets/v3/editorial/0/8f/08ff3394-e5bb-11ec-a0ff-a353167e09d1/629e3421677b5.image.jpg> [Accessed 16 Oct. 2022].
- Vape-testing.com. (2022). [online] Available at: <https://vape-testing.com/wp-content/uploads/2020/11/heated-tobaaco-product-structure.jpg> [Accessed 16 Oct. 2022].

- World Health Organization (2022). *Tobacco*. [online] Who.int. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>.
- www.linkedin.com. (n.d.). *Bioindicators of Air Pollution*. [online] Available at: <https://www.linkedin.com/pulse/bioindicators-air-pollution-kinza-irshad> [Accessed 5 Oct. 2022].