

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

«ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ»

**«Παρατήρηση βιοϋμενίων θαλάσσιων μικροοργανισμών σε φίλτρα
τσιγάρων.»**

Τσουμαλάκου Ευαγγελία

ΒΟΛΟΣ 2016

**«Παρατήρηση βιοϋμενίων θαλάσσιων μικροοργανισμών σε
φίλτρα τσιγάρων.»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Βερίλλης Παναγιώτης**, Επίκουρος Καθηγητής, Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας στην Ιστολογία και στους Υδρόβιους Οργανισμούς, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.
- 2. Κορμάς Κωνσταντίνος**, Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.
- 3. Μεντέ Έλενα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

Αφιερώνεται

*Στους γονείς μου,
Αντώνη και Ρούλα*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα προπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το θέμα της προπτυχιακής διατριβής ήταν «Ανάπτυξη βιοϋμενίων σε φίλτρα τσιγάρων μετά από παραμονή τους σε θαλασσινό νερό».

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Βερίλλη για την πολύτιμη βοήθειά του, την υποστήριξη και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων της εκπόνησης της προπτυχιακής μου διατριβής, τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Κορμά, καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Ελένη Μεντέ για την καλή διάθεση, το χρόνο που διέθεσαν και τις πολύτιμες συμβουλές που προσέφεραν στη διεξαγωγή των πειραμάτων και στη συγγραφή της συγκεκριμένης εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Ελένη Νικούλη για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού κατά την διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην οικογένειά μου, στον Χρήστο, στον Charlie, στην Χριστίνα καθώς και σε όλους μου τους φίλους

για την πολύτιμη βοήθειά τους για την αμέριστη συμπαράσταση και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα προπτυχιακή διατριβή διεξήχθη στα πλαίσια του Προγράμματος Προπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Σκοπός της διατριβής ήταν η παρακολούθηση της αύξησης βακτηριακών βιοϋμενίων σε χρησιμοποιημένα και μη φίλτρα τσιγάρων εμβαπτισμένα σε θαλασσίνο νερό.

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε χρησιμοποιημένα και μη φίλτρα τσιγάρων και διηθημένο θαλασσίνο νερό που συλλέχθηκε από τον Άναυρο Μαγνησίας. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε τρεις πειραματικές διατάξεις των τριών επαναλήψεων και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία των 50 ml. Οι ομάδες ETC και ET αποτελούνταν από καπνισμένα φίλτρα, εμβαπτισμένα σε θαλασσίνο νερό διηθημένο από μεμβράνη πόρου 0,2 μm και 0,8 μm αντίστοιχα. Η ομάδα ETWN περιείχε ακάπνιστα φίλτρα και θαλασσίνο νερό διηθημένο σε μεμβράνη πόρου 0,8 μm. Έπειτα από δέκα μέρες επώασης των δειγμάτων σε συνθήκες δωματίου (θερμοκρασία 20 °C και φωτοπερίοδος περίπου 12Φ:12Σ) πραγματοποιήθηκε η πρώτη δειγματοληψία. Συνολικά έγιναν εννέα δειγματοληψίες σε διάστημα 219 ημερών. Τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν με 2,5% γλουταραλδεϋδη σε αποστειρωμένο θαλασσίνο νερό (τέσσερις ώρες στους 4 °C), αφυδατώθηκαν και επιμεταλλώθηκαν. Πραγματοποιήθηκε η παρατήρησή τους σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

Σε όλες τις δειγματοληψίες παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση των βακτηρίων σε μορφή βιοϋμενίου και στις τρεις διατάξεις. Στην ομάδα ETWN εμφανίστηκε η μεγαλύτερη αύξηση ενώ η ομάδα ETC είχε συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες τη μικρότερη. Η ύπαρξη βιοϋμενίου παρουσιάστηκε την 22^η μέρα του πειράματος. Την 31^η

μέρα, παρατηρήθηκε παράπλευρη αύξηση του βιοϋμενίου και μεταξύ των ιών του φίλτρου στην ομάδα ETWN. Την 51^η και την 71^η μέρα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις προηγούμενες δειγματοληψίες. Την 103^η και την 219^η μέρα του πειράματος παρατηρήθηκε πλήρης κάλυψη των ιών του φίλτρου από βακτηριακά βιοϋμένια και στις τρεις διατάξεις. Η παρούσα εργασία έδειξε ότι είναι δυνατή η αύξηση βακτηριακού βιοϋμενίου σε χρησιμοποιημένα φίλτρα τσιγάρου μετά από πολυήμερη παραμονή τους σε θαλασσινό νερό και ότι περιεχόμενες τοξικές ουσίες του καπνού, όπως η νικοτίνη, πιθανόν να δρουν ανασταλτικά στην αύξηση αυτών των βακτηρίων.

Λέξεις κλειδιά: βακτήρια, βιοϋμένιο, θαλασσινό νερό, φίλτρα τσιγάρων, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.1 Γενικά για τα βιοϋμένια	2
1.2 Ιστορική ανασκόπηση	4
1.3 Εξωκυττάρειες πολυμερής ουσίες	5
1.4 Βακτηριακά βιοϋμένια στη θάλασσα	8
1.4.1 Διαδικασία προσκόλλησης βιοϋμενίων	9
1.5 Μόλυνση από πλαστικές ύλες, αποσίγαρα και περιβάλλον	11
1.5.1 Ουσίες του καπνού και τοξικότητα	13
1.6 Σκοπός της προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας	15
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
2.1 Διήθηση νερού	17
2.2 Προετοιμασία δειγμάτων	17
2.3 Διαδικασία επιμετάλλωσης	18
2.4 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope – SEM)	19
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	21
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	44
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	45
6. ABSTRACT	53

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά για τα βιοϋμένια

Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών επιβιώνουν και αυξάνονται και σε βιολογικές ή μη επιφάνειες δημιουργώντας πολυκυτταρικές κοινότητες ή δομές γνωστές ως βιοϋμένια. Η ακριβής χημεία ή φυσιολογία των βιοϋμενίων ποικίλει και σχετίζεται με τη φύση των μικροοργανισμών και το περιβάλλον στο οποίο διαβιώνουν. Παρόλ' αυτά, μια σημαντική ομοιότητα μεταξύ των βιοϋμενίων είναι ότι η δομική ακεραιότητά τους εξαρτάται από μία εξωτερική μεμβράνη που παράγεται από τα συστατικά των κυττάρων. Οι εξωτερικές μεμβράνες διαφέρουν όπως διαφέρουν και τα βιοϋμένια και παίζουν σημαντικό ρόλο στην οργάνωση της κοινότητας (Brandt et al. 2005). Ο σχηματισμός βιοϋμενίων από παθογόνους μικροοργανισμούς στο περιβάλλον μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση των εν λόγω παθογόνων μικροοργανισμών. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που δραστηριοποιούνται στο βιοϋμένιο προκαλούν ασθένειες μέσω της διασποράς ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων που στη συνέχεια δημιουργούν μόλυνση (Huq et al. 2008).

Το βιοϋμένιο αποτελείται από μια συνάθροιση μικροβιακών κύτταρων που περιβάλλεται από μια εξωκυτταρική πολυσακχαριδική μεμβράνη η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα αυτά. Το βιοϋμένιο μπορεί να αποτελείται από μια συνάθροιση διαφόρων ειδών μικροοργανισμών, ενώ ο σχηματισμός του είναι μια αναπτυξιακή διαδικασία που ξεκινά με την έκκριση της εξωκυτταρικής πολυσακχαριδικής μεμβράνης και οδηγεί στον σχηματισμό ενός τρισδιάστατου

βιοϋμενίου (Nadel et al. 2008). Ο σχηματισμός του βιοϋμενίου μπορεί να θεωρηθεί ως ένας μηχανισμός επιβίωσης για τα βακτήρια ενώ το βιοϋμένιο μπορεί να παρέχει προστασία από τοξικές ενώσεις, αντιβιοτικά, θερμική καταπόνηση (stress) και θήρευση (Johnson 2007). Τα βιοϋμένια μπορεί να περιλαμβάνουν επίσης μη κυτταρικά υλικά ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο έχει αναπτυχθεί το βιοϋμένιο. Τέτοια υλικά είναι ορυκτοί κρύσταλλοι, διαβρωμένα σωματίδια, σωματίδια πηλού ή ιλύος και συστατικά του αίματος. Τα υλικά αυτά μπορούν να βρεθούν και στην εξωκυτταρική μεμβράνη των βιοϋμενίων (Salta et al. 2013). Τα βιοϋμένια που αναπτύσσονται σε ιατρικές συσκευές περιέχουν συνήθως κοκκοειδείς μικροοργανισμούς συνδεδεμένους με την εξωκυτταρική μεμβράνη (Donlan 2002).

Τα βιοϋμένια στο πόσιμο νερό περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς όπως *Escherichia coli*, *Aeromonas* και *Pseudomonas* spp., που μπορούν να προκαλέσουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (September et al. 2007). Ο αριθμός των κυττάρων σε ένα βιοϋμένιο μπορεί να φθάσει τα 1.0×10^9 κύτταρα ανά συστάδα, η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις μπορεί να περιλαμβάνει μια μολυσματική δόση ενός παθογόνου μικροοργανισμού. Ωστόσο, η επιβιωσιμότητα των βακτηριακών κυττάρων και η δυνατότητα να προκαλούν ασθένειες κατά την ύπαρξη βιοϋμενίων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Alam et al. 2007). Οι οργανισμοί που σχετίζονται με το βιοϋμένιο διαφέρουν από τους πλαγκτικούς οργανισμούς ως προς τα γονίδια που μεταγράφονται. Τα βιοϋμένια που αναπτύσσονται σε υποστρώματα βυθισμένα στο νερό επίσης περιέχουν διάτομα και νηματοειδή βακτήρια (Salta et al. 2013).

1.2 Ιστορική ανασκόπηση

Το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε εκτεθειμένες επιφάνειες οδήγησε σε μελέτες και ανακαλύφθηκε ότι οι μικροοργανισμοί που συνυπάρχουν σε μια επιφάνεια, προσκολλούνται σε αυτή με ειδικούς μηχανισμούς και αναπτύσσουν βιοϋμένια. Η πρώτη παρατήρηση αυτού του φαινομένου πραγματοποιήθηκε από τον Van Leeuwenhoek με τη χρήση απλού μικροσκοπίου στις επιφάνειες των δοντιών. Οι Heukelekian & Heller (1940) παρατήρησαν για πρώτη φορά την ανάπτυξη βακτηρίων και την ενσωμάτωση σε επιφάνειες στους θαλάσσιους μικροοργανισμούς, ενώ ο Zobell (1943) παρατήρησε ότι ο αριθμός των βακτηρίων στις επιφάνειες ήταν δραματικά υψηλότερος σε σχέση με τον μέσο όρο που υπήρχε στο θαλασσινό νερό. Η μελέτη των βιοϋμενίων επεκτάθηκε από τους Jones et al. (1969) με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, εφόσον τα δείγματα μπορούσαν να παρατηρηθούν σε μεγαλύτερη μεγέθυνση. Με τη χρήση ενός ειδικού πολυσακχαρίτη - κόκκινο ρουθίνιο και σύζευξη αυτού με τετροξείδιο του οσμίου, οι ερευνητές μπόρεσαν επίσης να δείξουν ότι το υλικό της μήτρας που περιβάλλει και περικλείει τα κύτταρα σε μορφή βιοϋμενίου ήταν πολυσακχαρίτης. Αργότερα μελετήθηκε η μικροβιακή μορφολογία σε συστήματα βιομηχανικού νερού και έδειξε ότι ήταν εξαιρετικά ανθεκτικά στα απολυμαντικά, όπως το χλώριο (Characklis 1973). Από το 1978 με βάση την έρευνα των Costerton et al, οι οποίοι εξήγησαν τη λειτουργία και τη δομή των βιοϋμενίων, δόθηκε μεγαλύτερη έμφαση στη σημαντικότητα της περαιτέρω μελέτης των βιοϋμενίων στο περιβάλλον. Η έρευνα στηρίχτηκε στη χρήση του

ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης αλλά και στις πρότυπες τεχνικές μικροβιολογικής καλλιέργειας βιοϋμενίων, δίνοντας μια σαφή εικόνα για τη δομή, λειτουργία και ανάπτυξη των βιοϋμενίων (Donlan 2002).

1.3 Εξωκυττάρια πολυμερείς ουσίες

Τα βιοϋμένια αποτελούνται κυρίως από μικροβιακά κύτταρα και εξωκυττάρια πολυμερείς ουσίες (ΕΠΟ). Οι ΕΠΟ ευθύνονται για το 50% έως 90% του ολικού οργανικού άνθρακα του βιοϋμενίου (Flemming et al. 2000) και μπορούν να θεωρηθούν το κύριο υλικό της μεμβράνης του βιοϋμενίου. Οι ΕΠΟ μπορεί να διαφέρουν σε χημικές και φυσικές ιδιότητες, αλλά αποτελούνται κυρίως από πολυσακχαρίτες. Μερικοί από αυτούς τους πολυσακχαρίτες είναι ουδέτεροι ή πολυ-ανιονικοί, όπως είναι η περίπτωση για την ΕΠΟ με gram-αρνητικά βακτήρια. Η παρουσία των ουρονικών οξέων (όπως δ-γλυκουρονικό, δ-γαλακτουρονικό, και μαννουρονικό οξύ) ή πυρουβικά οξέα συνδεδεμένα με ακεταλικούς δεσμούς, ενισχύει τις ανιονικές ιδιότητες. (Sutherland 2001).

Αυτή η ιδιότητα είναι σημαντική επειδή επιτρέπει τη σύνδεση των δισθενών κατιόντων όπως το ασβέστιο και το μαγνήσιο, το οποίο έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται εγκάρσια με το στρώμα του πολυμερούς παρέχοντας μεγαλύτερη δεσμευτική ισχύ στα ώριμα βιοϋμένια (Flemming et al. 2000). Στην περίπτωση ορισμένων gram-θετικών βακτηρίων, όπως ο σταφυλόκοκκος, η χημική σύνθεση των ΕΠΟ μπορεί να είναι αρκετά διαφορετική και μπορεί να περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο κατιόντα. Άλλες ΕΠΟ μπορεί να είναι πιο

εύκολα διαλυτές στο νερό. Επίσης, οι ΕΠΟ του βιοϋμενίου γενικά δεν εμφανίζουν ομοιομορφία ως προς τη χωρική και χρονική κατανομή (Leriche et al. 2000). Η χρήση ειδικών ουσιών από σάκχαρα (λεκτίνες) βοηθούν στην αξιολόγηση της βακτηριακής αύξησης και κατ' επέκταση του βιοϋμενίου. Διαφορετικοί οργανισμοί παράγουν διαφορετικές ποσότητες των ΕΠΟ και η ποσότητα αυτών αυξάνει με την ωρίμανση του βιοϋμενίου. Οι ΕΠΟ μπορεί να συνδέονται με μεταλλικά ιόντα, δισθενή κατιόντα, άλλα και μακρομόρια (όπως πρωτεΐνες, DNA, λιπίδια, ακόμη και χουμικές ουσίες) (Flemming et al. 2000).

Η παραγωγή των ΕΠΟ είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από την κατάσταση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης, όπως η περίσσεια διαθέσιμου άνθρακα και ο περιορισμός του αζώτου, καλίου, ή φωσφόρου για τη σύνθεση των ΕΠΟ. Η αργή αύξηση βακτηρίων ενισχύει επίσης την παραγωγή των ΕΠΟ. Επειδή οι ΕΠΟ εμφανίζουν υψηλή ποσότητα ενυδάτωσης, αποτρέπουν την αφυδάτωση σε ορισμένα βιοϋμένια. Επιπλέον, οι ΕΠΟ μπορούν να συνεισφέρουν στις αντιμικροβιακές ιδιότητες αντοχής του βιοϋμενίου με την παρεμπόδιση της μεταφοράς μάζας των αντιβιοτικών μέσω αυτών, πιθανώς με απευθείας δέσμευση σε αυτές τις ουσίες (Donlan 2000).

Με βάση τους Tolker-Nielsen & Molin (2000), κάθε μικροβιακό βιοϋμένιο είναι μοναδικό ως προς την μορφή του, αν και η δομή τους είναι ίδια. Το βιοϋμένιο δεν αποτελείται από μια ενιαία και συνεχόμενη επιφάνεια. Αντίθετα, τα βιοϋμένια περιέχουν μικροαποικίες βακτηριακών κυττάρων που περιβάλλονται με ΕΠΟ και διαχωρίζονται από άλλες μικροαποικίες με ενδιάμεσα κενά (διάυλοι νερού).

Οι διάυλοι νερού επιτρέπουν τη διέλευση των θρεπτικών συστατικών, του οξυγόνου, ακόμη και αντιμικροβιακών παραγόντων. Αυτό δεν συμβαίνει μόνο στα σύνθετα βιοϋμένια αλλά και σ' αυτά που αποτελούνται από ένα είδος μικροοργανισμού. Κατά τους Stoodley et al. (1997) τα βιοϋμένια συμπεριλαμβάνουν μια λεπτή μεμβράνη που αποτελείται από μια ανομοιογενή μονοστοιβάδα κυττάρων σε ένα στρώμα από πολλές επιφάνειες πάχους που περιέχουν διαύλους νερού. Οι οργανισμοί που δημιουργούν τα βιοϋμένια επιδρούν σημαντικά στη δομή αυτών. Το πάχος των βιοϋμενίων επηρεάζεται από τον αριθμό και το είδος των οργανισμών (James et al. 1995). Μεμονωμένες καλλιέργειες βιοϋμενίων του *K. pneumoniae* ή *P. aeruginosa* σε εργαστήριο είχαν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη λεπτότερου στρώματος (15 μm και 30 μm , αντίστοιχα), ενώ βιοϋμένιο που περιείχε και τα δύο είδη ήταν πιο παχύ (40 μm). Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι το ένα είδος ενίσχυσε την σταθερότητα του άλλου (Jones et al. 1969).

Γενικότερα η αρχιτεκτονική μορφή των βιοϋμενίων παρουσιάζει ετερογένεια τόσο ως προς τον χώρο όσο και στον χρόνο, καθώς αλλάζει συνεχώς λόγω των εξωτερικών και εσωτερικών διαδικασιών που πραγματοποιούνται. Οι οργανισμοί αρχικά δημιουργούν μικροαποικίες, με την πάροδο του χρόνου οι αποικίες αναμειγνύονται, δείχνοντας την μετανάστευση των κυττάρων από μία μικροαποικία σε μία άλλη (Tolker-Nielsen et al. 2000). Η δομή των μικροαποικιών αλλάζει από συμπαγή σε μια πιο χαλαρή δομή με την πάροδο του χρόνου και τα κύτταρα στο εσωτερικό των μικροαποικιών είναι κινητικά. Στη συνέχεια αυτά διασκορπίζονται από το βιοϋμένιο με αποτέλεσμα τη διάλυση των μικροαποικιών. Η δομή των βιοϋμενίων επηρεάζεται επίσης από

την αλληλεπίδραση των σωματιδίων των αντιμικροβιακών συστατικών από τον ξενιστή ή το περιβάλλον.

1.4 Βακτηριακά βιοϋμένια στη θάλασσα

Στο θαλάσσιο περιβάλλον τα βιοϋμένια δημιουργούνται κυρίως από διάτομα και βακτήρια, που μπορούν να αποικίσουν γρήγορα σε μια περιοχή δημιουργώντας βιοϋμένια με περίπλοκη μορφή και τρισδιάστατο σχήμα. Μπορούν να αποικίσουν σε διάφορες επιφάνειες αρκεί η επιφάνεια να είναι βυθισμένη μέσα στο νερό. Τα βακτηριακά βιοϋμένια εμφανίζουν μεγάλη ανθεκτικότητα ακόμη και στη χρήση αντιβιοτικών σε σύγκριση με τους πλαγκτικούς οργανισμούς (Salta et al. 2013).

Τα βακτηριακά βιοϋμένια στο υδάτινο περιβάλλον συνδέονται με επιφάνειες ζώντων ιστών, επιφάνειες καθετήρων και σωληνώσεις βιομηχανικού ή πόσιμου νερού. Η παραγωγή του αλγινικού άλατος, ενός πολυσκαχάρη, παρουσιάζεται ως μια εξωκυττάρια μήτρα σε βιοϋμένιο *Pseudomonas aeruginosa* και προκαλείται από την επαφή των κυττάρων με μία επιφάνεια. Εργαστηριακά πειράματα δείχνουν ότι τα κύτταρα του βακτηρίου *Vibrio cholerae* σχηματίζουν μορφές βιοϋμένιου σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρά τους με αυτή την εξωπολυμερή στοιβάδα (Huq et al. 2008).

Η προσκόλληση των βακτηρίων μπορεί να γίνει ακόμη και σε χιτίνιους εξωσκελετούς μαλακόστρακων παρέχοντας θρεπτικά συστατικά. Η αφθονία ασβεστίου (Ca^{2+}) στα θαλάσσια και υφάλμυρα νερά, διαδραματίζει σημαντικό

ρόλο στη διαμόρφωση του βιοϋμενίου με άμεση σταθεροποίηση μεσοκυττάρων αλληλεπιδράσεων όπως έχει αποδειχτεί για τα είδη *Pseudomonas aeruginosa* και *Streptococcus downei* με μεσοκυττάρους σχηματισμούς, υπό την μορφή γέφυρας/συνδέσμων άλατος. Το βιοϋμένιο στο θαλασσινό νερό επίσης, μπορεί να περιλαμβάνει χρώμιο, νικέλιο, μόλυβδο, που χρησιμοποιούνται ως στοιχεία κράματος για την αντίσταση στη διάβρωση του ανοξειδωτού χάλυβα που φέρουν τα θαλάσσια πλοία. Τα βιοϋμένια που αναπτύσσονται ωστόσο στις επιφάνειες αυτές διαβρώνονται με την πάροδο του χρόνου (Lopes et al. 2006).

Τα αιωρούμενα σωματίδια και το πλαγκτόν στον Κόλπο της Βεγγάλης εποικούνται από κύτταρα *Vibrio cholerae* υπό μορφή βιοϋμενίου πλημμυρίζοντας παρακείμενες εκβολές ποταμών στην περιοχή του Μπαγκλαντές, και τελικά, εισάγοντας τα βακτήρια χολέρας σε υφάλμυρα οικοσυστήματα. Τα στελέχη O1 και O139 του *V. cholerae* επιβιώνουν όλο το χρόνο, ως επί το πλείστον σε μια μη καλλιεργήσιμη κατάσταση, μέσα σε συστάδες των βιοϋμενίων στο οικοσύστημα δίπλα στην ακτή του κόλπου της Βεγγάλης, αντιπροσωπεύοντας το ενδημικό είδος χολέρας (*V. cholerae*) στην εν λόγω γεωγραφική περιοχή (Alam et al. 2006).

1.4.1 Διαδικασία προσκόλλησης βιοϋμενίων

Η ενδιάμεση επιφάνεια μεταξύ ενός στερεού και ενός υγρού αποτελεί ένα ιδανικό περιβάλλον για την προσκόλληση και αύξηση μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα της προσκόλλησης εξαρτώνται από το μέσο της επιφάνειας που αναπτύσσεται το βιοϋμένιο. Με βάση τη έρευνα των Characklis (1973) η

έκταση της μικροβιακής εποίκισης φαίνεται να αυξάνει καθώς η τραχύτητα της επιφάνειας αυξάνεται. Αυτό συμβαίνει επειδή η διάτμηση μειώνεται, και η επιφάνεια είναι μεγαλύτερη στις σκληρότερες επιφάνειες. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας παίζουν σημαντικό ρόλο στο ρυθμό και την έκταση της προσκόλλησης.

Οι περισσότεροι ερευνητές έχουν βρει ότι οι μικροοργανισμοί αποδίδουν ταχύτερα σε υδροφοβικές, μη πολικές - φορτισμένες επιφάνειες όπως Teflon και άλλα πολυμερή παρά σε υδρόφιλα υλικά, όπως γυαλί ή μέταλλα (Pringle & Fletcher 1983). Ορισμένες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν μεταξύ της κυτταρικής επιφάνειας και του υποστρώματος, που επιτρέπουν στο κύτταρο να ξεπεράσει τις αποθητικές δυνάμεις που ενεργούν μέσα σε μια ορισμένη απόσταση από την επιφάνεια του υποστρώματος. Ένα υλικό επιφάνειας που εκτίθεται σε ένα υγρό μέσο σχεδόν αμέσως επικαλύπτεται με ένα στρώμα πολυμερούς. Το αποτέλεσμα της χημικής αυτής τροποποίησης επηρεάζει το ρυθμό και την έκταση της μικροβιακής προσκόλλησης (Loeb & Neihof 1975).

Άλλα χαρακτηριστικά του υδατικού μέσου, όπως το pH, τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών, η ιοντική ισχύς και η θερμοκρασία, παίζουν σημαντικό ρόλο στο ρυθμό της μικροβιακής προσκόλλησης σε ένα υπόστρωμα (Πιν.1.1). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι παρουσιάζεται εποχιακή επίδραση επί της βακτηριακής προσκόλλησης και επί του σχηματισμού βιουμενίων σε διαφορετικά υδατικά συστήματα (Fera et al. 1989). Η επίδραση αυτή μπορεί να οφείλεται στη θερμοκρασία του νερού ή σε άλλες μη μετρήσιμες εποχικές παραμέτρους. Έχει βρεθεί ότι αύξηση στη συγκέντρωση αρκετών κατιόντων (νάτριο, ασβέστιο, λανθάνιο, τρισθενής σίδηρος) επηρεάζει την προσκόλληση

του *Pseudomonas fluorescens* σε γυάλινες επιφάνειες, μειώνοντας τις αποθητικές δυνάμεις μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων βακτηριακών κυττάρων και των γυάλινων επιφανειών (Fletcher 1988). Επίσης, οι Cowan et al. (1991) έδειξαν ότι αύξηση στη συγκέντρωση θρεπτικού συσχετίζεται με αύξηση του αριθμού των προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων.

Πίνακας 1.1. Σημαντικές παράμετροι στην κυτταρική προσκόλληση και στον σχηματισμό του βιοϋμενίου (Donlan 2002).

Ιδιότητες του υποστρώματος	Ιδιότητες του υγρού μέσου	Ιδιότητες του κυττάρου
Υφή και τραχύτητα	Ταχύτητα ροής	Υδροφοβικότητα κυτταρικής επιφάνειας
Υδροφοβικότητα	pH	Τριχίδια
Κατάσταση μεμβράνης	Θερμοκρασία	Εκφύσεις
	Κατιόντα	Εξωκυττάρια πολυμερείς ουσίες
	Παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων	

1.5 Μόλυνση από πλαστικές ύλες, αποτσίγαρα και περιβάλλον

Τις τελευταίες δεκαετίες ολοένα και περισσότεροι ερευνητές καταδικνύουν περιβαλλοντικά προβλήματα που σχετίζονται - λαμβάνουν χώρα - σχετικά με την μόλυνση πλαστικών σε ακτογραμμές και υδάτινα οικοσυστήματα (Wilcox et al. 2016). Στη λίστα των 10 πιο συχνών απορριμμάτων που συλλέχθηκαν

κατά τη διάρκεια της ετήσιας έρευνας του Διεθνούς Οργανισμού Καθαρισμού Ακτών και Ωκεανών, τα αποτσίγαρα συγκαταλέγονται στην κορυφή της λίστας. Μία ακόμη έρευνα των Slaughter et al. (2011) δείχνει ότι περίπου 4,5 τρισεκατομμύρια τσιγάρα απορρίπτονται ως σκουπίδια ετησίως. Τα ποσοστά αυτά είναι ίσως αναμενόμενα αν αναλογιστούμε ότι υπολογίζεται πως καθημερινά καταναλώνονται 16 δισεκατομμύρια τσιγάρα παγκοσμίως.

Παράλληλα, τα αποτσίγαρα περιέχουν πληθώρα χημικών ουσιών και η τοξικότητά τους έχει τεκμηριωθεί (Lee & Lee 2015). Ένα αποτσίγαρο αποτελείται από ίνες καπνού, τέφρα και περίπου το 30% αυτού είναι φίλτρο (USDA, 2010). Μια ευρεία ποικιλία χημικών ουσιών, όπως η νικοτίνη και οι εστέρες σακχάρων, εμφανίζονται σε φύλλα καπνού, ενώ τα αποτσίγαρα περιέχουν υψηλές ποσότητες υδατοδιαλυτών τοξινών (Leffingwell 1999). Τα τσιγάρα μπορούν να περιέχουν περίπου 10% πρόσθετα στο βάρος τους και είναι γνωστό ότι αυξάνουν την τοξικότητα, η οποία επηρεάζεται από πολλούς άλλους παράγοντες (Wertz et al. 2011) όπως οι διαστάσεις των τσιγάρων, το βάρος του καπνού στο τσιγάρο, εάν το χαρτί είναι πορώδες, καθώς και ο τύπος του φίλτρου (Perfetti et al. 1998).

Επιπρόσθετα, τα αποτσίγαρα είναι ο πιο κοινός ρύπος στις αστικές περιοχές (Bator et al. 2011, Schultz et al. 2013), και αποτελούν το 22-46% των ορατών απορριμμάτων, όπως αναφέρεται σε πολυάριθμες αξιολογήσεις απορριμμάτων σε όλο τον κόσμο (Schneider et al. 2011, Seco Pon & Becherucci 2012). Οι Patel et al. (2013) παρατήρησαν ότι στις πόλεις, το 76% των τσιγάρων που καπνίζονται σε δημόσιους χώρους απορρίπτονταν στο έδαφος, αντί να απορρίπτονται σε κατάλληλα δοχεία. Τα αποτσίγαρα στη συνέχεια

μεταφέρονται από τα αστικά λύματα σε άλλα οικοσυστήματα, όπως παράκτιες περιοχές, όπου είναι σταθερά το πιο πολυάριθμο στοιχείο των απορριμμάτων που συλλέγονται (International Coastal Clean-up, 2013).

Το φίλτρο των τσιγάρων, είναι ένα υλικό που κατασκευάζεται από μη βιοδιασπώμενη οξική κυτταρίνη γεγονός που προκαλεί ανησυχία για την άγρια ζωή, καθώς τα φίλτρα μπορούν να καταποθούν από τους ζωικούς οργανισμούς (Stanley et al. 1988). Τα αποτσίγαρα που απορρίπτονται στο περιβάλλον δεν εμφανίζουν ομοιόμορφη χωρική κατανομή. Η κατανομή σχετίζεται με την τοποθεσία των υψηλότερων πωλήσεων – κατανάλωσης. Η χώρα με την μεγαλύτερη κατανάλωση και απόρριψη τσιγάρων στο περιβάλλον είναι η ΗΠΑ (Marah & Novotny 2011).

1.5.1 Ουσίες του καπνού και τοξικότητα

Τα αποτσίγαρα περιέχουν ένα μείγμα ουσιών με τοξικές επιδράσεις στους οργανισμούς, κυρίως βαρέων μετάλλων, πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων, φαινόλης αιθυλεστέρα και νικοτίνης (Micevska et al. 2006, Moriwaki et al. 2009, Moerman & Potts 2011). Η νικοτίνη είναι γνωστό ότι προκαλεί βλάβη του ήπατος στα ψάρια (Konar 1970), και επιδρά με παρόμοιο τρόπο και στα θηλαστικά (Rawls et al. 2011). Οι επιδράσεις της χρόνιας συγκέντρωσης της νικοτίνης και των μεταβολιτών της στο υδάτινο περιβάλλον δεν έχουν μελετηθεί πλήρως. Με βάση την EC50 για τη *Daphnia* των 0,2 mg L⁻¹ (Savino & Tanabe 1989), η υπολογιζόμενη προβλεπόμενη συγκέντρωση χωρίς επιπτώσεις (PNEC) για τη νικοτίνη είναι 2.4 x 10⁻³ mg L⁻¹ (Valcárcel et al.

2011). Η νικοτίνη, και ο πιο σημαντικός μεταβολίτης αυτής, η κοτινίνη, είναι ένας κοινός ρύπος, και οι ενώσεις της ανιχνεύονται ευρέως σε υδάτινους πόρους σε όλο τον κόσμο (Stuart et al. 2012).

Η νικοτίνη έχει χρησιμοποιηθεί ως εντομοκτόνο από τον 15ο αιώνα. Λόγω της τοξικότητάς της για τους υδρόβιους οργανισμούς, η εφαρμογή της έχει περιοριστεί σοβαρά στις ΗΠΑ, τον Καναδά και την Ευρώπη. Σήμερα, πραγματοποιείται απογραφή για την απελευθέρωση της νικοτίνης και των τοξικών ουσιών της στις ΗΠΑ. Η Ευρωπαϊκή Ένωση ταξινομεί τα απόβλητα καπνού ως τοξικά και επικίνδυνα όταν η περιεχόμενη νικοτίνη υπερβαίνει το 0,5 mg g⁻¹ ξηρού βάρους (Civilini et al. 1997). Το περιεχόμενο των τσιγάρων σε νικοτίνη ποικίλλει ανάλογα με την εταιρία κατασκευής και τη χώρα κατανάλωσης. Μεταξύ του 1998 και του 2005, η μέση συγκέντρωση της νικοτίνης στις ράβδους καπνού που πωλούνται από τους μεγαλύτερους κατασκευαστές αυξήθηκαν κατά 9%, από το 17,1 mg g⁻¹ στο 18,7 mg g⁻¹ στις ΗΠΑ (Connolly et al. 2007). Σε μια εκτενή μελέτη των αναδύομενων ρύπων στη Μαδρίτη η νικοτίνη ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα κατάντη των ποταμών Jarama, Manzanares, Guadarama, Henares και Tagus με συγκεντρώσεις έως 1,9 x 10⁻³ mg L⁻¹ (Valcárcel et al. 2011). Επίσης, η νικοτίνη ανιχνεύεται ακόμη και στο πόσιμο νερό σε όλο τον κόσμο. Μία διεθνής μελέτη, από τους Boleda et al. (2011) σε 30 πόλεις αναφέρει ότι η μέση συγκέντρωση της νικοτίνης στο πόσιμο νερό είναι 1,9 x 10⁻⁵ mg L⁻¹. Στη Μαδρίτη νικοτίνη ανιχνεύθηκε σε 3 από 5 δείγματα νερού της βρύσης σε επίπεδα υψηλότερα από 4 x 10⁻⁶ mg L⁻¹ φτάνοντας μέχρι 1 x 10⁻⁴ mg L⁻¹ (Valcárcel et al. 2011). Στο Μαϊάμι οι συγκεντρώσεις της νικοτίνης που παρατηρήθηκαν ήταν 3 x 10⁻³ mg L⁻¹

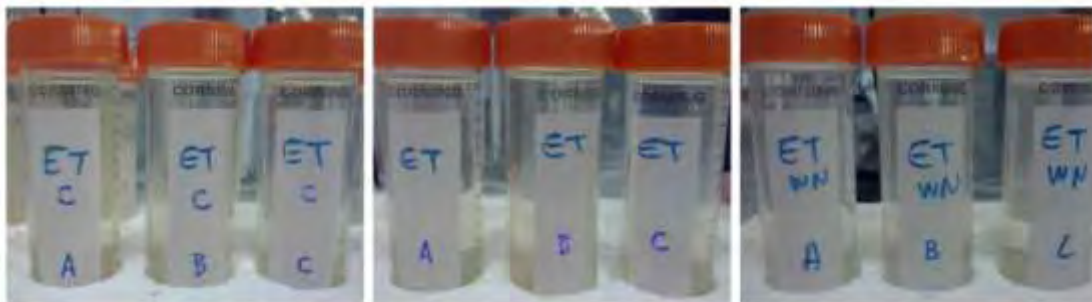
(National Research Council, 1977). Ακόμη και σε εμφιαλωμένο μεταλλικό νερό που λαμβάνεται από παρθένους υδροφόρους ορίζοντες, μακριά από ανθρωπογενείς πηγές ή περιοχές καλλιέργειας ή παραγωγής καπνού, η νικοτίνη ανιχνεύεται σε συγκεντρώσεις μέχρι $1,5 \times 10^{-5} \text{ mg L}^{-1}$ (Alonso et al. 2012). Επίσης, ένα μόνο αποτσίγαρο είναι ικανό να προκαλέσει μόλυνση σε 1000L νερό (Valcárcel et al. 2011).

1.6 Σκοπός της προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Οι βιβλιογραφικές αναφορές που σχετίζονται με το αν επηρεάζονται τα βακτηριακά βιοϋμένια από τις ουσίες που εμπεριέχονται στα αποτσίγαρα εκλείπουν. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της ανάπτυξης βακτηριακών βιοϋμενίων σε χρησιμοποιημένα και μη φίλτρα από τσιγάρα εμβαπτισμένα σε θαλασσινό νερό. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ώστε να επιβεβαιωθεί εάν οι ουσίες του καπνού επηρεάζουν την αύξηση των βακτηριακών βιοϋμενίων που αναπτύσσονται στα αποτσίγαρα. Η ανάπτυξη τέτοιων βιοϋμενίων αποτελεί πιθανή ένδειξη για την εν δυνάμει αποικοδόμηση των φίλτρων τσιγάρου στο θαλάσσιο περιβάλλον.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την περάτωση του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν χρησιμοποιημένα και μη φίλτρα τσιγάρου καθώς και διηθημένο θαλασσινό νερό που συλλέχθηκε από τον Άναυρο Μαγνησίας. Τα τσιγάρα αφού καπνίστηκαν, τους αφαιρέθηκαν τα φίλτρα και πραγματοποιήθηκε σε αυτά μια κατά μήκος τομή και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία (falcon) των 50 ml. Ομοίως και με τα μη χρησιμοποιημένα φίλτρα τσιγάρου. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε τρεις πειραματικές διατάξεις των τριών επαναλήψεων (Εικ. 2.1). Οι ομάδες ETC (Control) και ET αποτελούνταν από καπνισμένα φίλτρα, εμβαπτισμένα σε θαλασσινό νερό διηθημένο από μεμβράνη πόρου 0,2 μm και 0,8 μm αντίστοιχα. Η ομάδα ETWN (Without Nicotine – Χωρίς Νικοτίνη) περιείχε ακάπνιστα φίλτρα και θαλασσινό νερό διηθημένο σε μεμβράνη πόρου 0,8 μm . Τα δοχεία τοποθετήθηκαν σε βάσεις και ανακινούνταν μία φορά κάθε μέρα. Έπειτα από δέκα μέρες επώασης των δειγμάτων υπό κανονικές συνθήκες πίεσης (1 atm) θερμοκρασίας (20 °C) και φωτοπεριόδου (12L:12D), πραγματοποιήθηκε η πρώτη δειγματοληψία. Συνολικά έγιναν εννέα δειγματοληψίες σε διάστημα 219 ημερών.



Εικόνα 2.1. Απεικόνιση των δοχείων των τριών διατάξεων.

2.1 Διήθηση νερού

Το θαλασσινό νερό που συλλέχτηκε από τον Άναυρο Μαγνησίας στις 29-9-2014 υπέστη αρχική διήθηση από μεμβράνη πόρου 11 μm υπό κενό πίεσης 150 mm hg ώστε να αποφευχθεί τραυματισμός των βακτηριακών κυττάρων. Εν συνεχεία, διηθήθηκε από μεμβράνη πόρου 0,8 μm ώστε να εισέλθουν μόνο τα βακτήρια και να κατακρατηθούν άλλοι μικροοργανισμοί που υπήρχαν στο νερό. Μέρος αυτού τοποθετήθηκε στις διατάξεις ET και ETWN. Το υπόλοιπο νερό διηθήθηκε ξανά από μεμβράνη πόρου 0,2 μm από την οποία δεν εισέρχονται τα βακτήρια και τοποθετήθηκε στην ομάδα control δηλαδή, στην ETC.

2.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Έπειτα από 10 ημέρες πραγματοποιήθηκε η πρώτη δειγματοληψία στις 8-10-2014. Από κάθε πειραματική διάταξη λήφθηκαν 1 φίλτρο, συνολικά 3, και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα φιαλίδια (ependorf). Διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 2,5% γλουταραλδεϋδης σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό τοποθετήθηκε επίσης ώστε να επιτευχθεί το στάδιο της μονιμοποίησης. Ο σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η διατήρηση της δομής των βακτηρίων (Βερίλλης 2009). Τα φιαλίδια διατηρήθηκαν στους 4 °C για τουλάχιστον 4 ώρες.

Δημιουργήθηκαν διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθυλικής αλκοόλης και αποστειρωμένου θαλασσινού νερού σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Ακολούθησε η μέθοδος των διαδοχικών αφυδατώσεων όπου τα δείγματα εμβαπτιζόνταν στα διαλύματα 30, 50, 60, 70 και 80% για 10 λεπτά, 95% για 10 λεπτά με δύο επαναλήψεις

(20 λεπτά συνολικά) και 100% για 10 λεπτά με τρεις επαναλήψεις (30 λεπτά συνολικά). Έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά τρυβλία και αποθηκεύτηκαν προφυλαγμένα από τη σκόνη μέχρι την φυσική ξήρανση (air dry) αυτών για 24 ώρες περίπου.

2.3 Διαδικασία επιμετάλλωσης

Μετά τη ξήρανση, τα δείγματα επικολλήθηκαν σε μεταλλικές βάσεις (stubs) με τη βοήθεια αγωγίμης κολλητικής ταινίας διπλής όψεως. Εν συνεχεία, επιμεταλλώθηκαν με χρυσό στη συσκευή επιμετάλλωσης BAL-TEC 004 (Εικ. 2.2) με τη βοήθεια αερίου αργού (Ar) για 120 δευτερόλεπτα στα 40 mA. Κατά τη διαδικασία επιμετάλλωσης, τα μόρια του χρυσού εξαχνώνονται μέσα στο περιβάλλον πλάσματος του αργού (Ar) και επικάθονται στο δείγμα επικαλύπτοντάς το με ένα λεπτό στρώμα χρυσού (Βερίλλης 2009). Έπειτα από αυτή τη διαδικασία τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscope – SEM) Cambridge Stereo Scan 240.



Εικόνα 1.2. Η συσκευή επιμετάλλωσης δειγμάτων του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος.

2.4 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope – SEM)

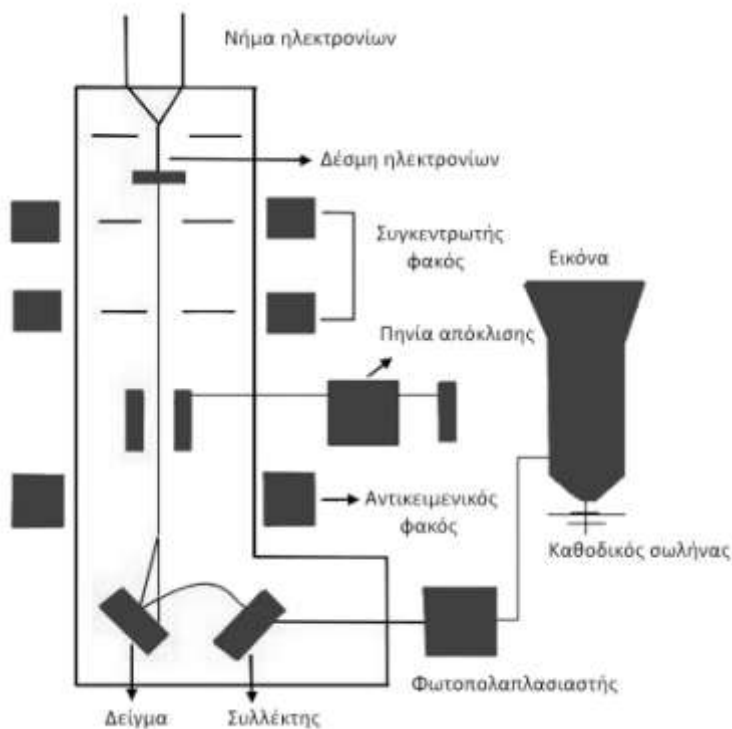
Τα δείγματα παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Cambridge Stereo Scan 240 (Εικ. 2.3). Το μικροσκόπιο είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο στην ανάλυση βιοϋμενίων. Η χρήση των σαρωτικών μικροσκοπίων είναι καθοριστική για την απεικόνιση ώριμων βιοϋμενίων σε ένα συγκεκριμένο τόπο (Mueller et al. 2007).



Εικόνα 2.2. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Cambridge Stereo Scan 240 του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος.

Η εικόνα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης σχηματίζεται από οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια καθώς και από δευτερογενή τοπικώς απελευθερούμενα ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια που παράγονται επιταχύνονται από δυναμικό έως 50KV. Η δέσμη ηλεκτρονίων διέρχεται από τον συγκεντρωτικό φακό που αποτελείται από επί

μέρους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς, με αποτέλεσμα τη λέπτυνση της. Η δέσμη αυτή σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος με αποτέλεσμα την εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων και ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή. Η δέσμη ηλεκτρονίων του καθοδικού σωλήνα σε συνδυασμό με τη γεννήτρια σαρώσεως, σαρώνει την οθόνη απεικόνισης. Η εικόνα σχηματίζεται στην οθόνη του καθοδικού σωλήνα. Επομένως, με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σαρώσεως μελετάται μόνο η επιφανειακή μορφολογία των δειγμάτων (Βερίλλης 2015). Στο Σχήμα 2.1 απεικονίζεται η λειτουργία ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.



Σχήμα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του σαρωτικού ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Βερίλλης 2015).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

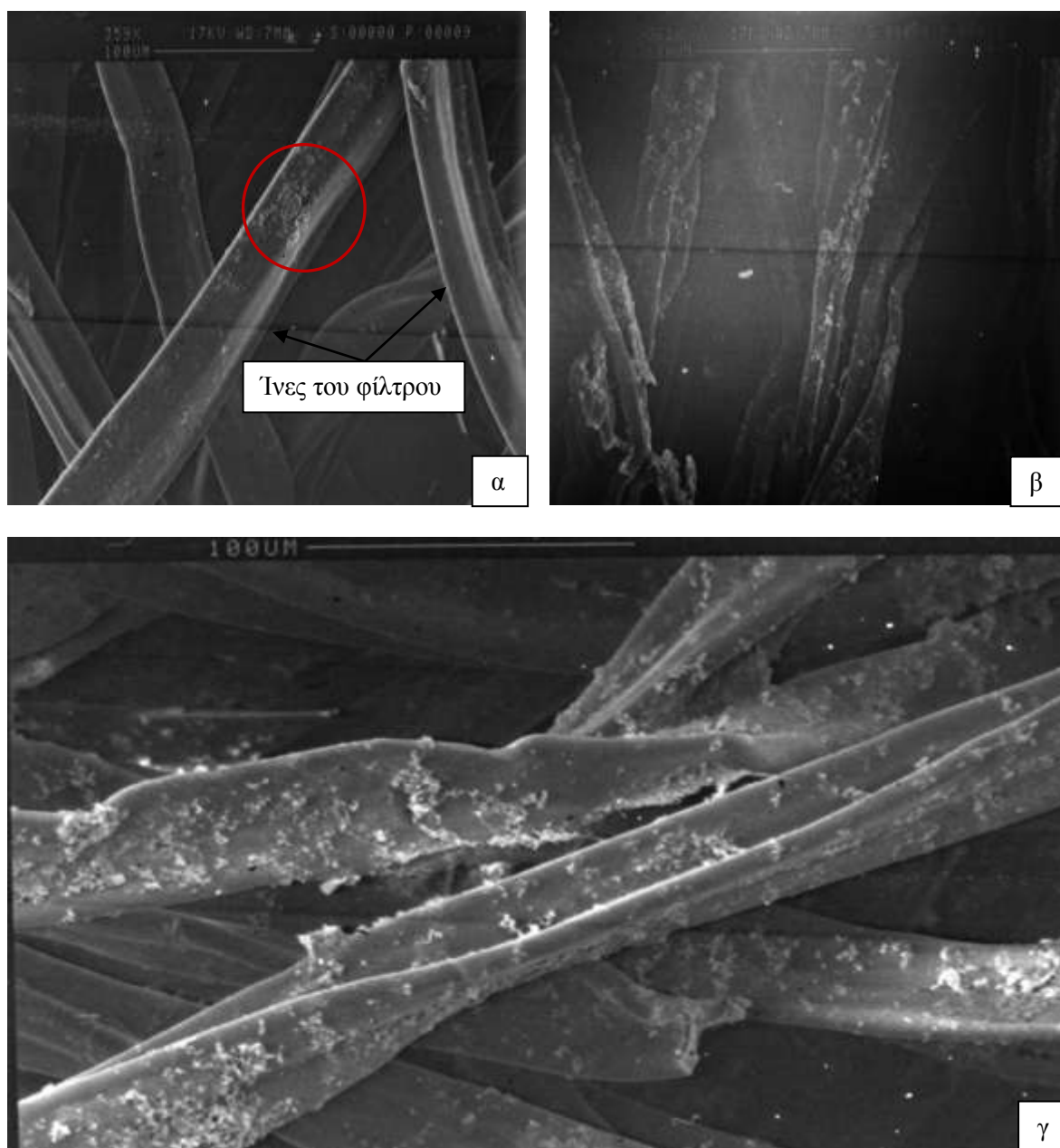
Παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση των βακτηρίων και στις τρεις διατάξεις καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στην ομάδα ETWN εμφανίστηκε η μεγαλύτερη βακτηριακή αύξηση ενώ η ομάδα ETC είχε συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες τη μικρότερη. Στην ομάδα ETC η ύπαρξη βακτηρίων μπορεί να οφείλεται στα ήδη υπάρχοντα βακτήρια από τη στοματική κοιλότητα του καπνιστή που μεταφέρθηκαν στα φίλτρα των τσιγάρων. Στις άλλες δύο ομάδες, ET και ETWN, όπου το νερό διηθήθηκε από μεμβράνη πόρου 0,8 μm, τα βακτήρια που εμφανίστηκαν προέρχονται κατά κύριο λόγο από τα βακτήρια που υπήρχαν στο θαλασσινό νερό.

Στον ακόλουθο πίνακα (Πιν. 3.1) εμφανίζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από κάθε δειγματοληψία και για τις τρεις πειραματικές διατάξεις. Τα βιοϋμένια εμφανίστηκαν και στις τρεις ομάδες ην 22^η μέρα του πειράματος. Ωριμα βιοϋμένια παρατηρήθηκαν την 31^η μέρα στις ομάδες ETC και ETWN και την 71^η μέρα στην ομάδα ETC. Επίσης, παράπλευση ανάπτυξης βιοϋμενίων παρατηρήθηκε την 103^η και 219^η μέρα στην ομάδα ETWN.

Πίνακας 3.1. Αποτελέσματα του πειράματος.

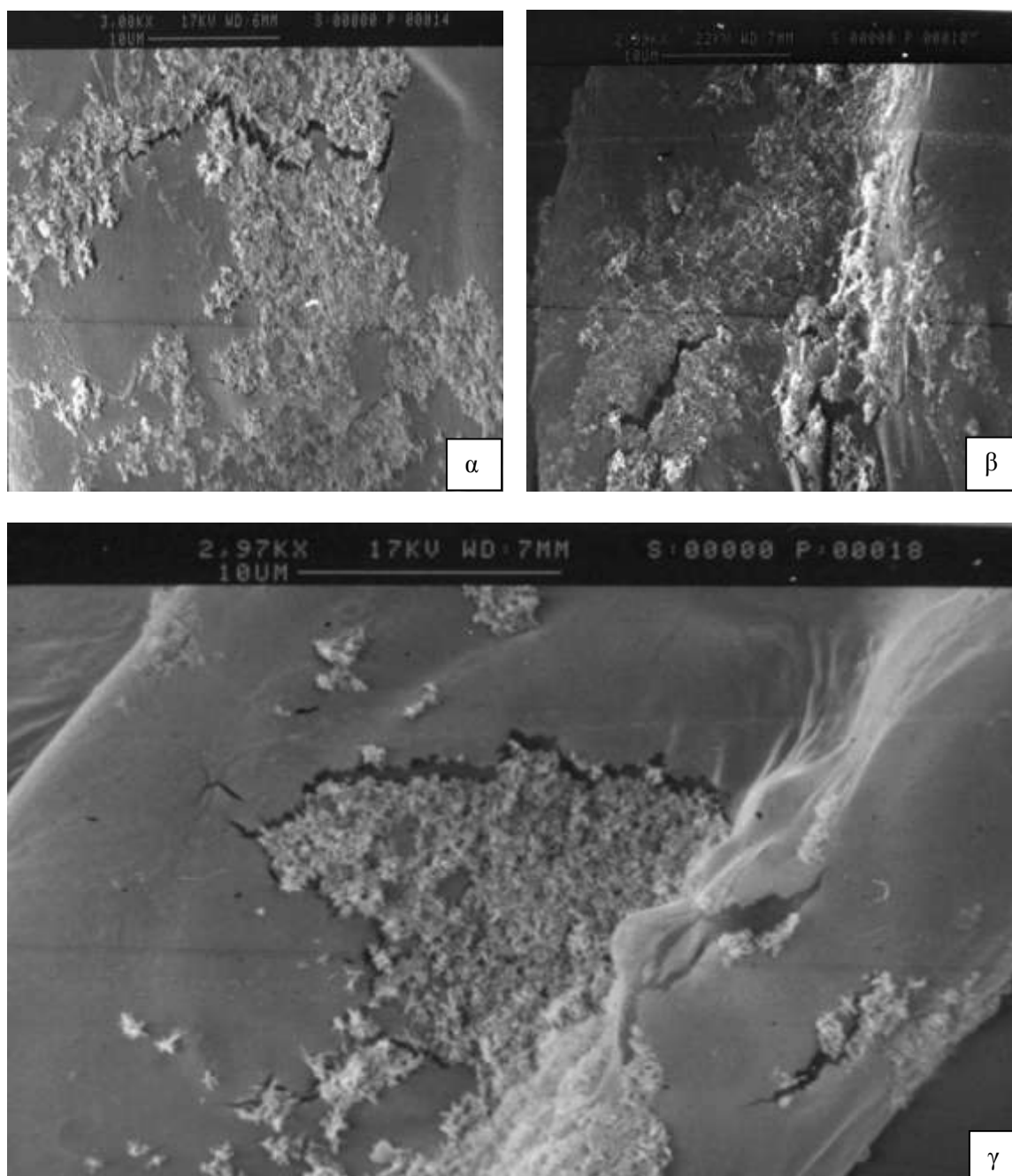
Ημέρα πειράματος	ETC	ET	ETWN
10	Ύπαρξη βακτηρίων	Ύπαρξη βακτηρίων	Ύπαρξη βακτηρίων
15	Ύπαρξη βακτηρίων	Ύπαρξη βακτηρίων	Ύπαρξη βακτηρίων
22	Βιοϋμένιο	Βιοϋμένιο	Βιοϋμένιο
31	Παράπλευρη ανάπτυξη βιοϋμενίου	Βιοϋμένιο	Παράπλευρη ανάπτυξη βιοϋμενίου
40	Βιοϋμένιο	Βιοϋμένιο	Βιοϋμένιο
51	Βιοϋμένιο	Βιοϋμένιο	Βιοϋμένιο
71	Παράπλευρη ανάπτυξη βιοϋμενίου	Αύξηση βιοϋμενίου	Αύξηση βιοϋμενίου Κρύσταλλοι
103	Αύξηση βιοϋμενίου	Παράπλευρη ανάπτυξη βιοϋμενίου	Παράπλευρη ανάπτυξη βιοϋμενίου
219	Αύξηση βιοϋμενίου	Αύξηση βιοϋμενίου	Παράπλευρη ανάπτυξη βιοϋμενίου

Κατά τη διάρκεια της πρώτης παρατήρησης των δειγμάτων δηλαδή, την 10^η μέρα παρατηρήθηκε ύπαρξη βακτηρίων και στις τρεις πειραματικές διατάξεις (Εικ. 3.1). Περισσότερα βακτήρια παρατηρήθηκαν στην ομάδα ETWN και λιγότερα στην ομάδα ETC.



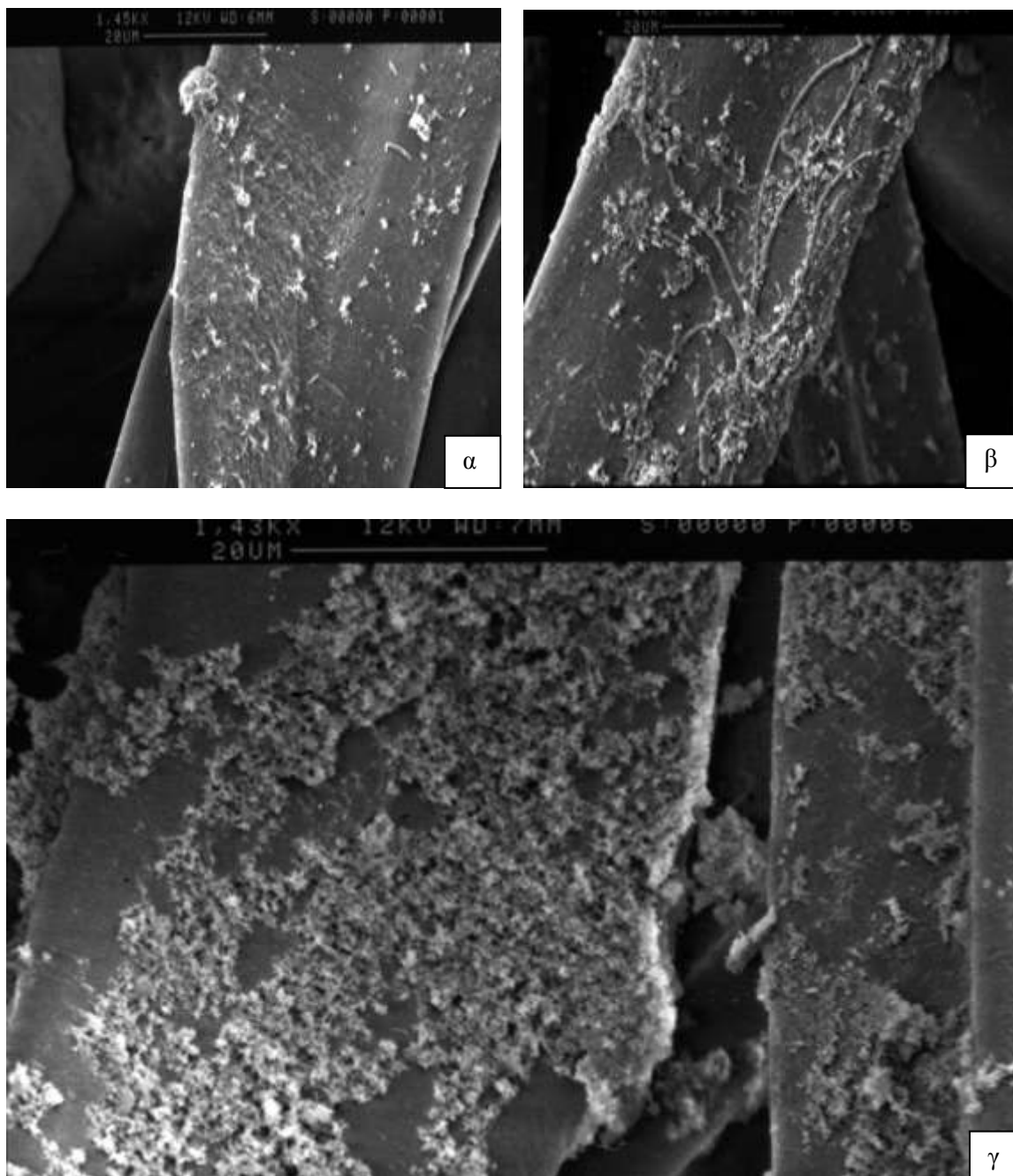
Εικόνα 3.1. Απεικόνιση βακτηρίων την 10^η ημέρα. α) Διάταξη ETC, κλίμακα μπάρας: 100 μm, β) Διάταξη ET, κλίμακα μπάρας: 100 μm, γ) Διάταξη ETWN, κλίμακα μπάρας: 100 μm.

Τη 15^η μέρα δεν εμφανίστηκαν σημαντικές αλλαγές σε σχέση με την πρώτη δειγματοληψία. Σποραδική ύπαρξη βακτηρίων εμφανίστηκε σε όλες τις διατάξεις (Εικ. 3.2). Σε σχέση με τις τρεις ομάδες αυτή που εμφάνισε τα περισσότερα βακτήρια ήταν η ETWN (Εικόνα 3.2.γ).



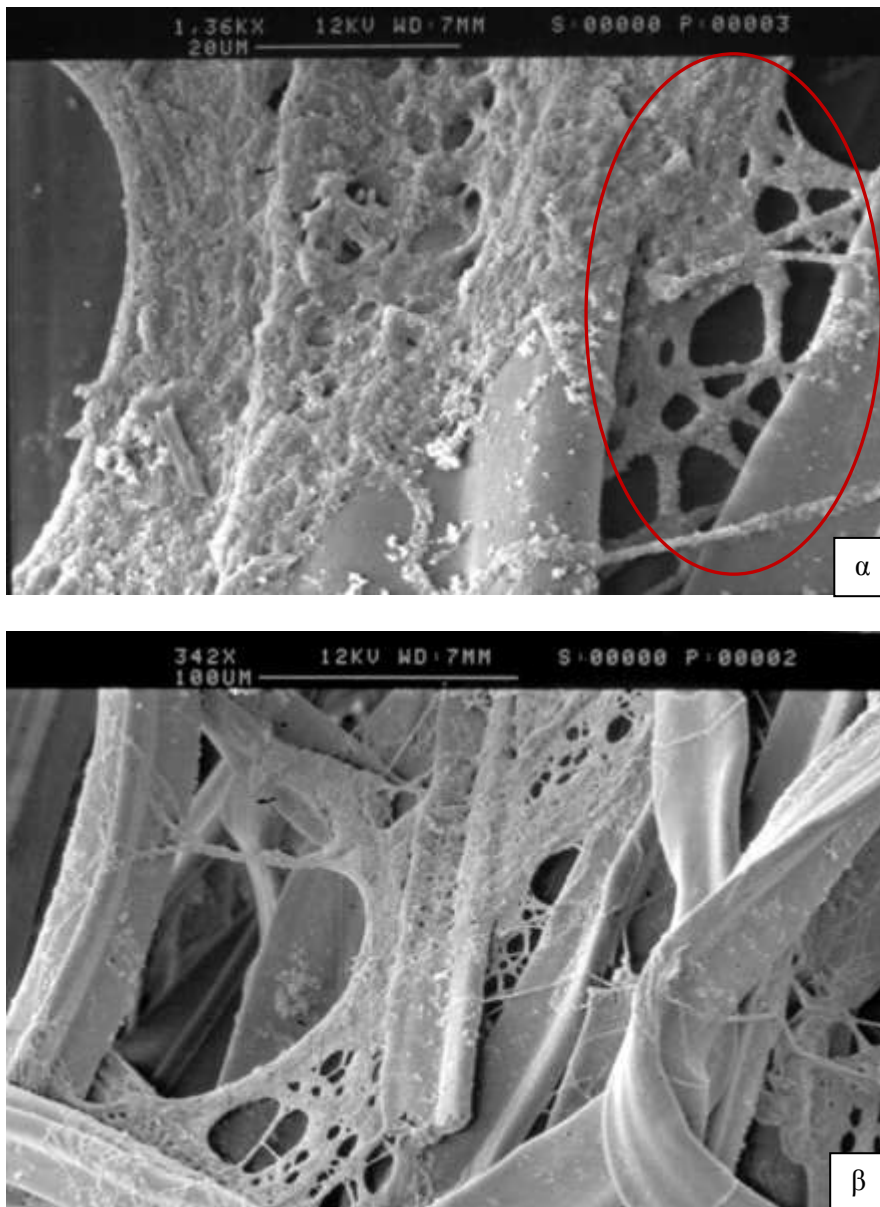
Εικόνα 3.2. Απεικόνιση βακτηρίων την 15^η μέρα. α) Διάταξη ETC, κλίμακα μπάρας: 10 μm, β) Διάταξη ET, κλίμακα μπάρας: 10 μm, γ) Διάταξη ETWN, κλίμακα μπάρας: 10 μm.

Το βιοϋμένιο παρουσιάστηκε την 22^η μέρα του πειράματος και στις τρεις πειραματικές διατάξεις (Εικ. 3.3). Πιο έντονο ήταν στην διάταξη ETWN ενώ λιγότερο στην διάταξη ETC.

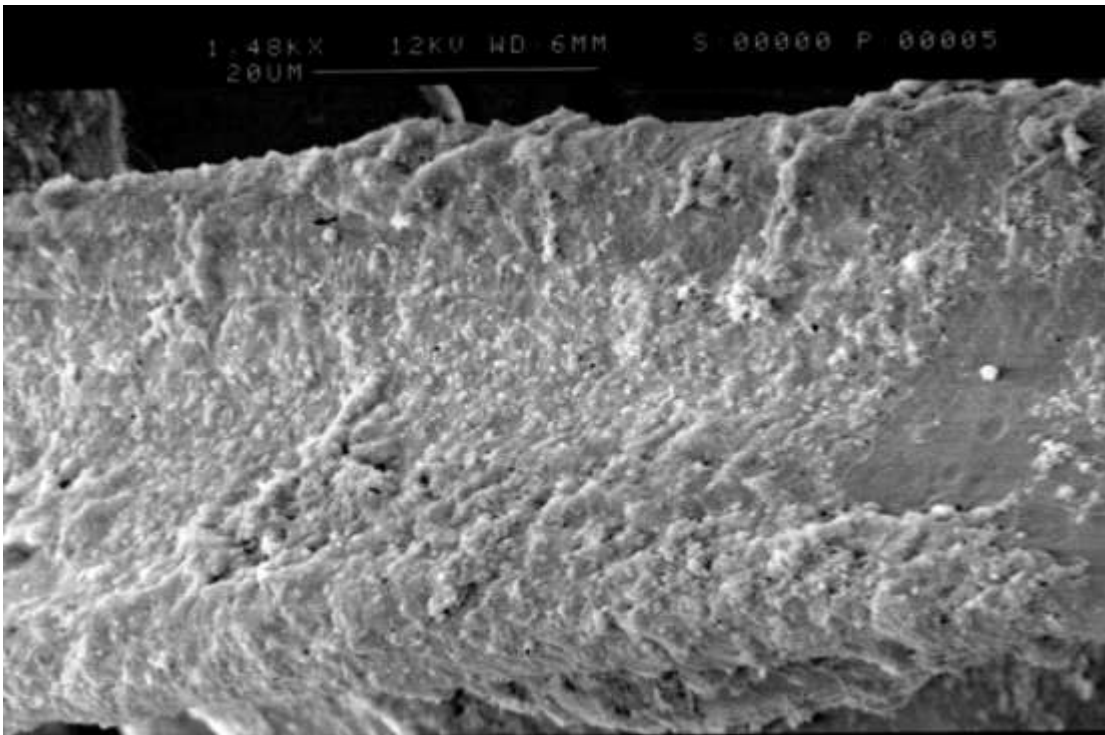


Εικόνα 3.3. Απεικόνιση βιοϋμενίων την 22η μέρα, σε κλίμακα μπάρας: 20 μm.

α) Διάταξη ETC, β) Διάταξη ET, γ) Διάταξη ETWN.

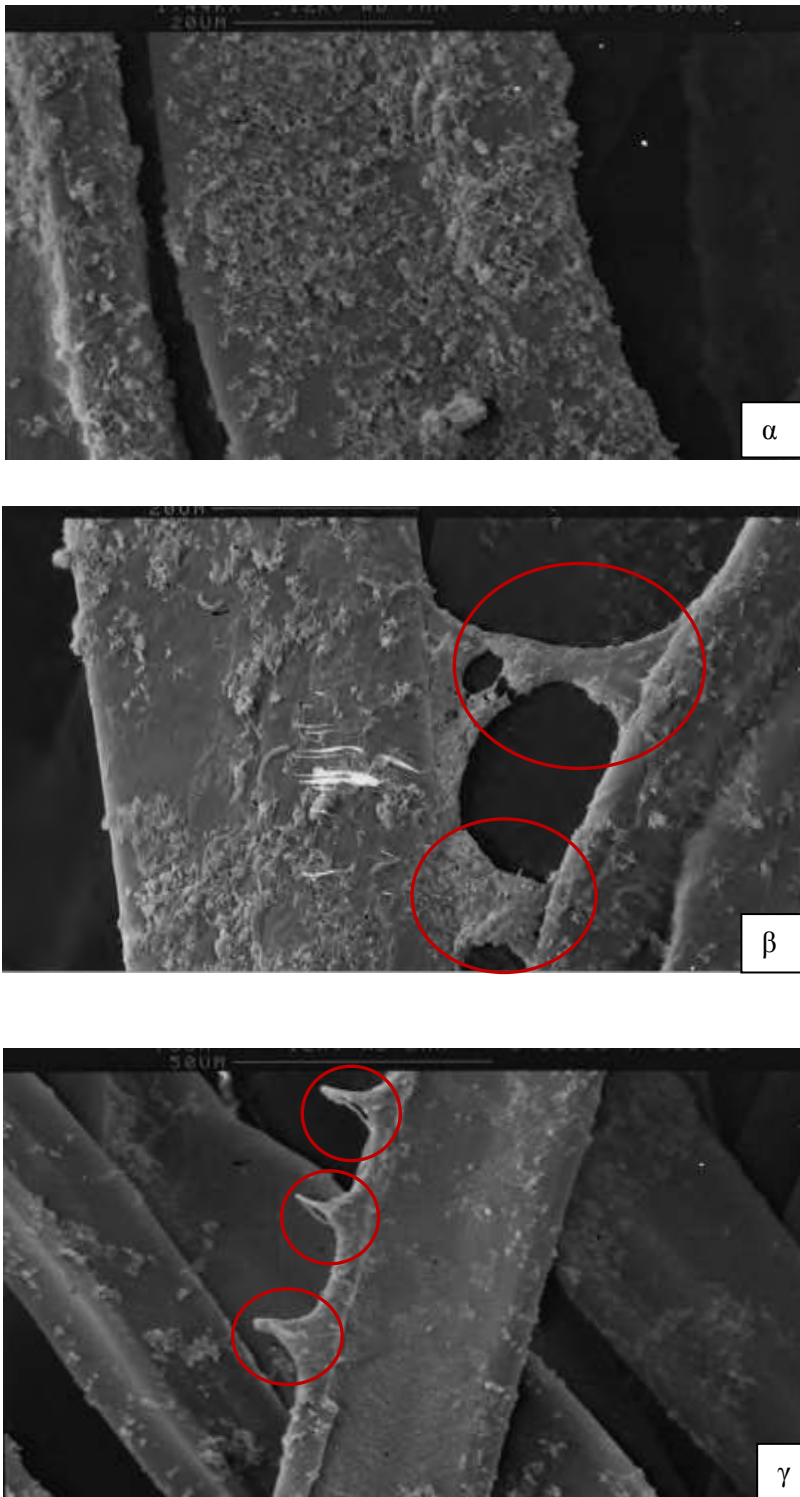


Εικόνα 3.4. Απεικόνιση βιομενίων στη διάταξη ETC την 31^η μέρα. α) Παράπλευρη ανάπτυξη βιομενίου, κλίμακα μπάρας: 20 μm, β) Παράπλευρη ανάπτυξη βιομενίου, κλίμακα μπάρας: 100 μm.



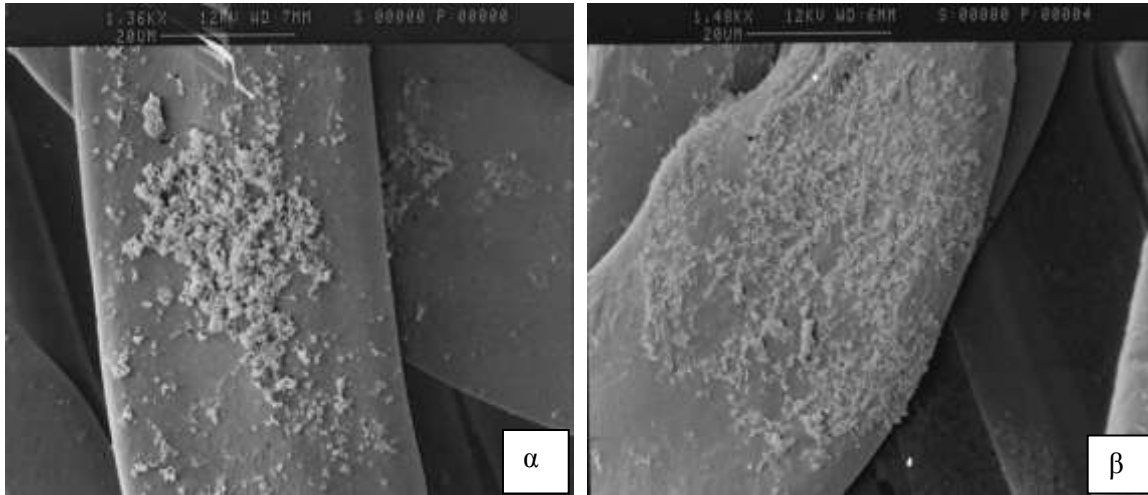
Εικόνα 3.5. Απεικόνιση βιομενίου στη διάταξη ET την 31^η μέρα, κλίμακα μπάρας: 20μm.

Την 31η μέρα, παρατηρήθηκε ώριμο βιοϋμένιο στην ομάδα ETC (Εικ. 3.4), ενώ λιγότερο ώριμο βιοϋμένιο στην ET (Εικ. 3.5). Παράπλευρη ανάπτυξη του βιοϋμένιου και μεταξύ των ινών του φίλτρου παρατηρήθηκε και στην ομάδα ETWN (Εικ. 3.6). Η ομάδα ETWN εμφάνισε την μεγαλύτερη βακτηριακή αύξηση συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες και σε σχέση με τη δειγματοληψία της 22ης ημέρας.

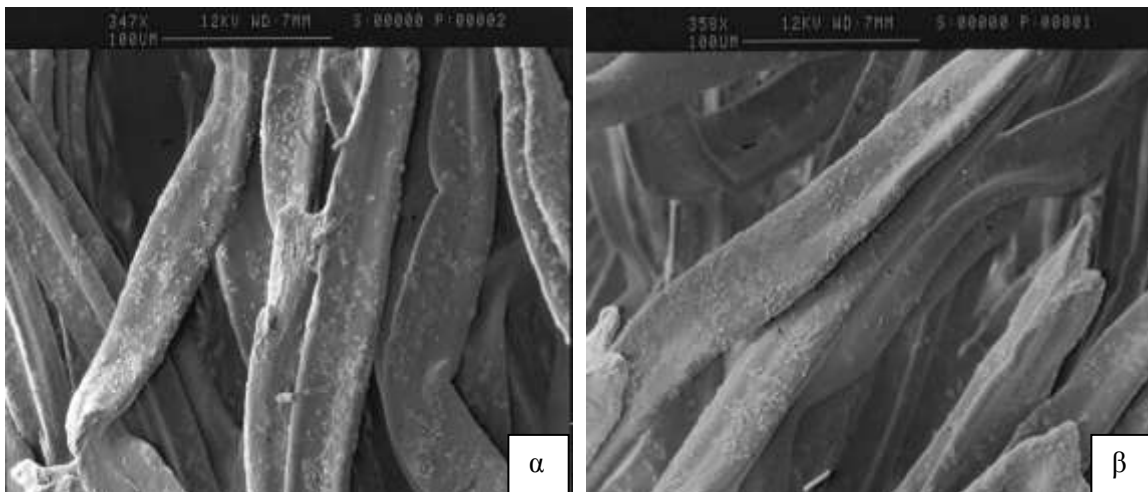


Εικόνα 3.6. Απεικόνιση βιομενίων της ομάδας ETWN την 31^η μέρα του πειράματος. α) Βιοϋμένιο, κλίμακα μπάρας: 20 μm, β) Παράπλευρη ανάπτυξη βιοϋμένιου, κλίμακα μπάρας: 20 μm, γ) Αύξηση πέρα των ινών του φίλτρου, κλίμακα μπάρας: 50 μm.

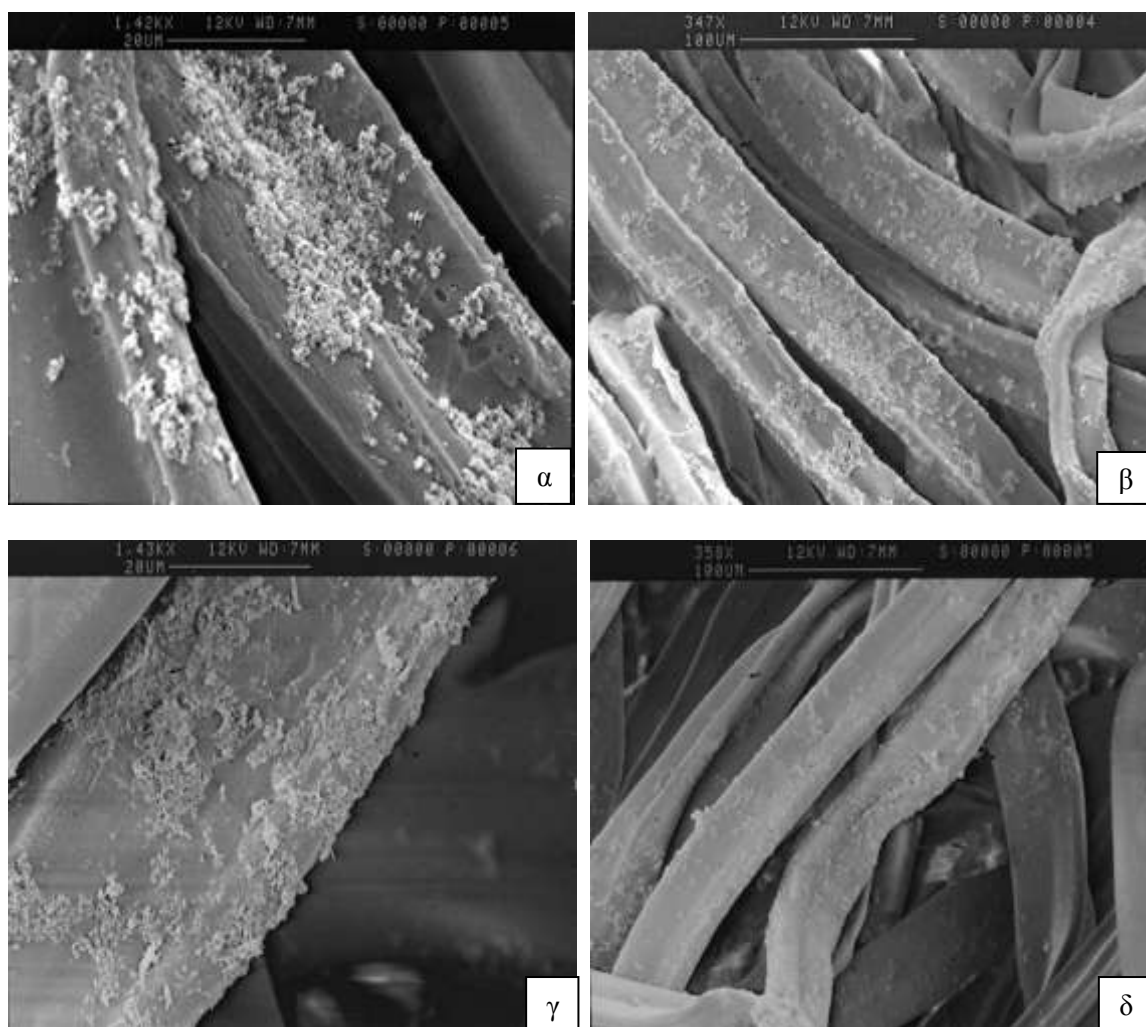
Την 40^η όπως και την 51^η μέρα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις προηγούμενες δειγματοληψίες. Τα βιοϋμένια δεν αυξήθηκαν σημαντικά αλλά συγκριτικά η διάταξη ETC (Εικ. 3.7) είχε μικρότερη αύξηση σε σχέση με τις ομάδες ET (Εικ. 3.8) και ETWN (Εικ. 3.9).



Εικόνα 3.7. Απεικόνιση βιοϋμενίων της ομάδας ETC α) την 40^η μέρα, κλίμακα μπάρας: 20 μm, β) την 51^η μέρα, κλίμακα μπάρας: 20 μm.

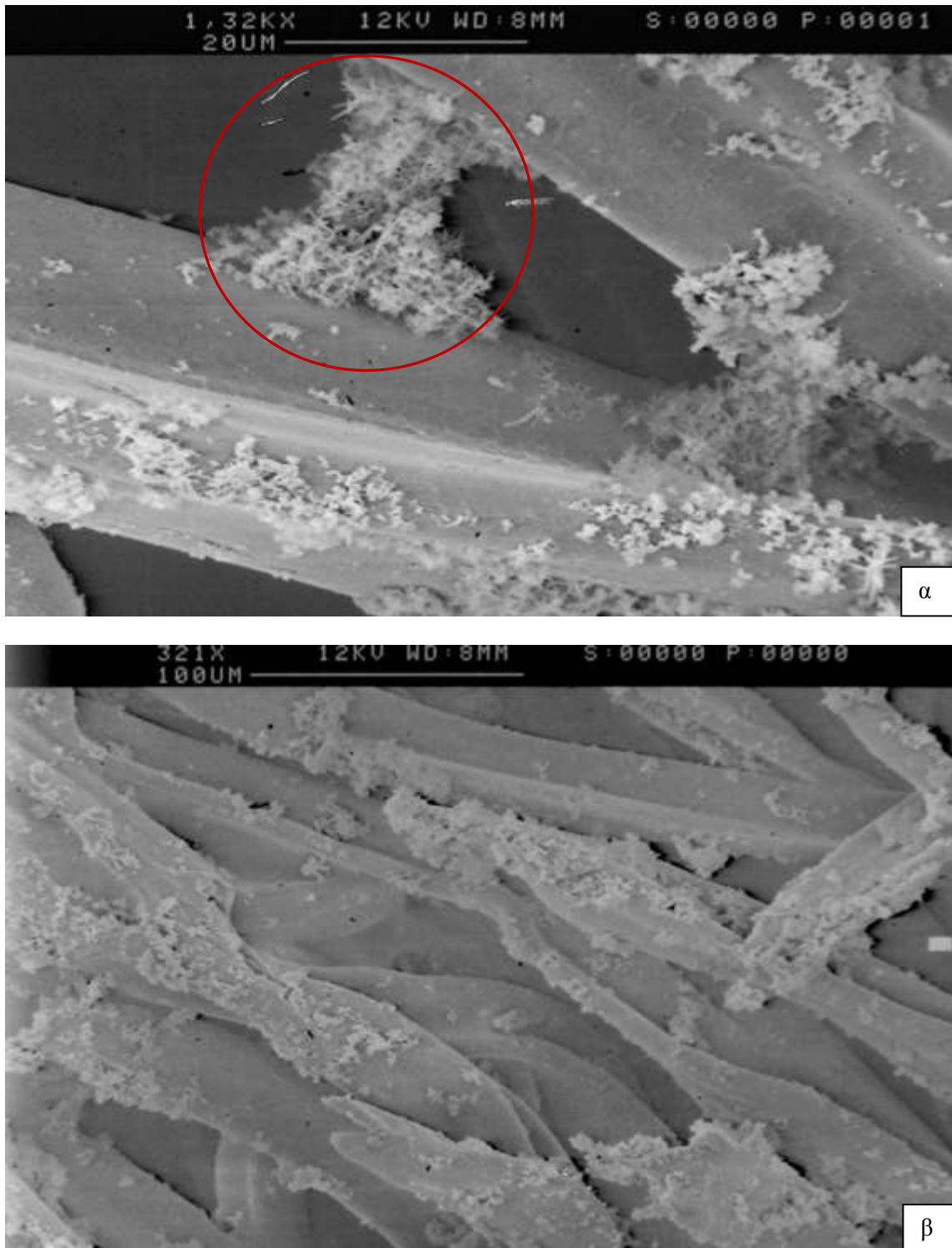


Εικόνα 3.8. Απεικόνιση βιοϋμενίων της ομάδας ET α) την 40^η μέρα, κλίμακα μπάρας: 100 μm, β) την 51^η μέρα, κλίμακα μπάρας: 100 μm.

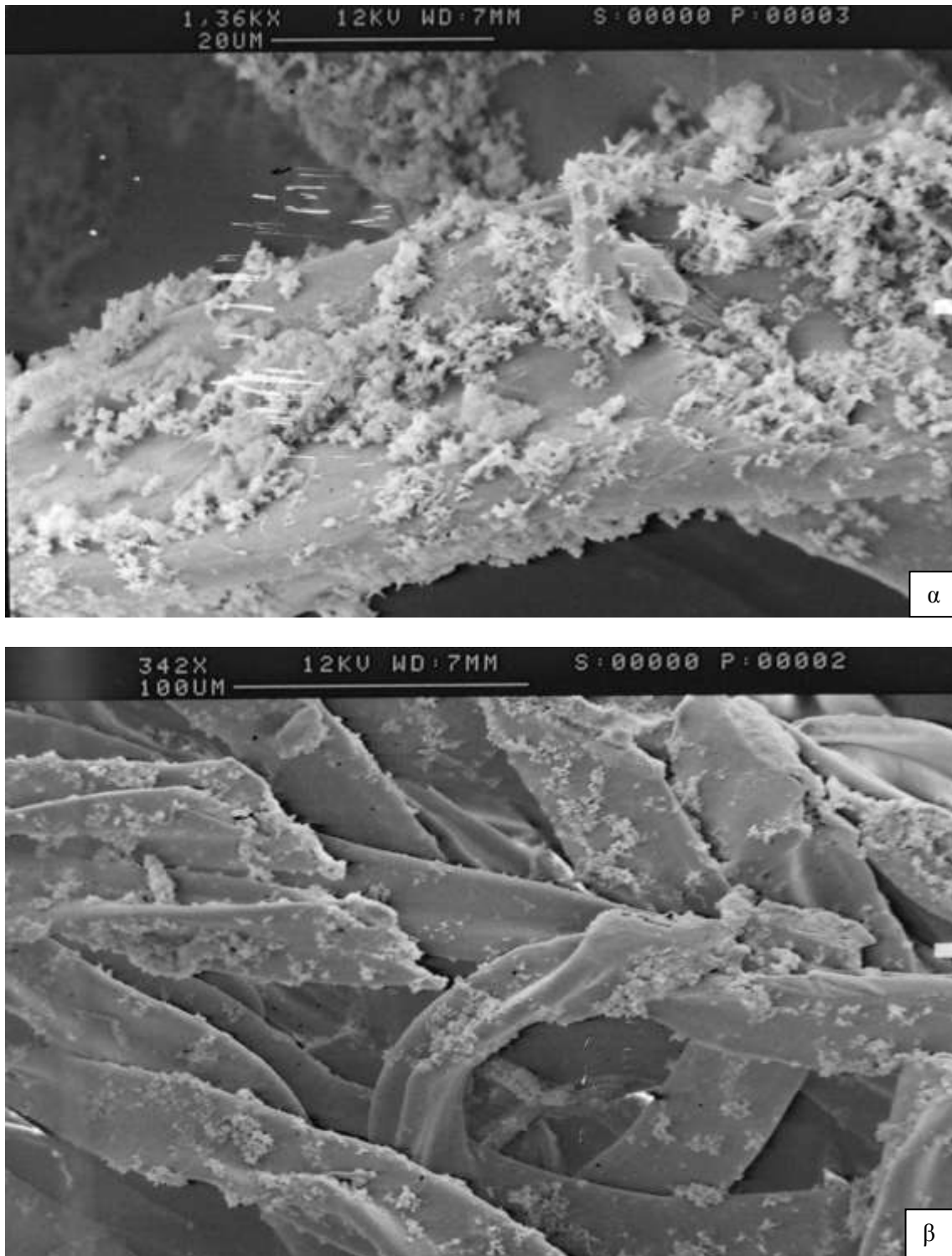


Εικόνα 3.9. Απεικόνιση βιοϋμενίων της ομάδας ETWN α) την 40η μέρα, κλίμακα μπάρας: 20 μm, β) την 40η μέρα, κλίμακα μπάρας: 100 μm, γ) την 51^η μέρα, κλίμακα μπάρας: 20 μm, δ) την 51^η μέρα, κλίμακα μπάρας: 100 μm.

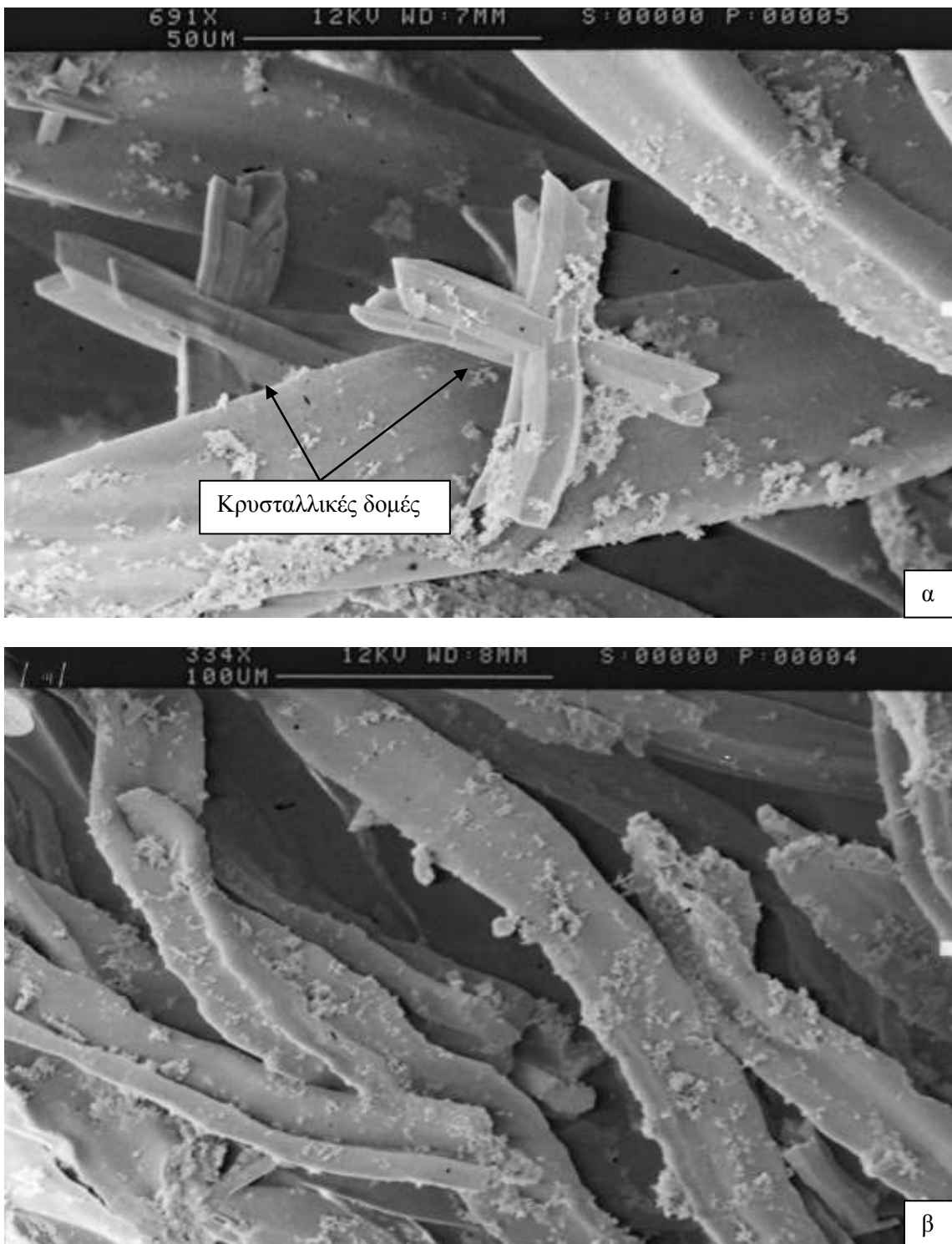
Κατά την 71^η μέρα για όλες τις ομάδες εμφανίστηκε σταδιακή αύξηση βακτηρίων. Παράπλευρη ανάπτυξη βιοϋμενίου ανάμεσα στις ίνες του φίλτρου εμφανίστηκε στην ομάδα ETC. Αύξηση των βιοϋμενίων παρατηρήθηκαν στις ομάδες ET και ETWN καθώς και κρύσταλλοι. Η μεγαλύτερη βακτηριακή αύξηση ήταν στην ομάδα ETWN, ενώ η μικρότερη στην ETC.



Εικόνα 3.10. Απεικόνιση βιοϋμενίων την 71^η μέρα του πειράματος. α) Παράπλευρη ανάπτυξη βιοϋμενίου στην διάταξη ETC, κλίμακα μπάρας: 20 µm, β) Βιοϋμένιο της διάταξης ETC, κλίμακα μπάρας: 100 µm.

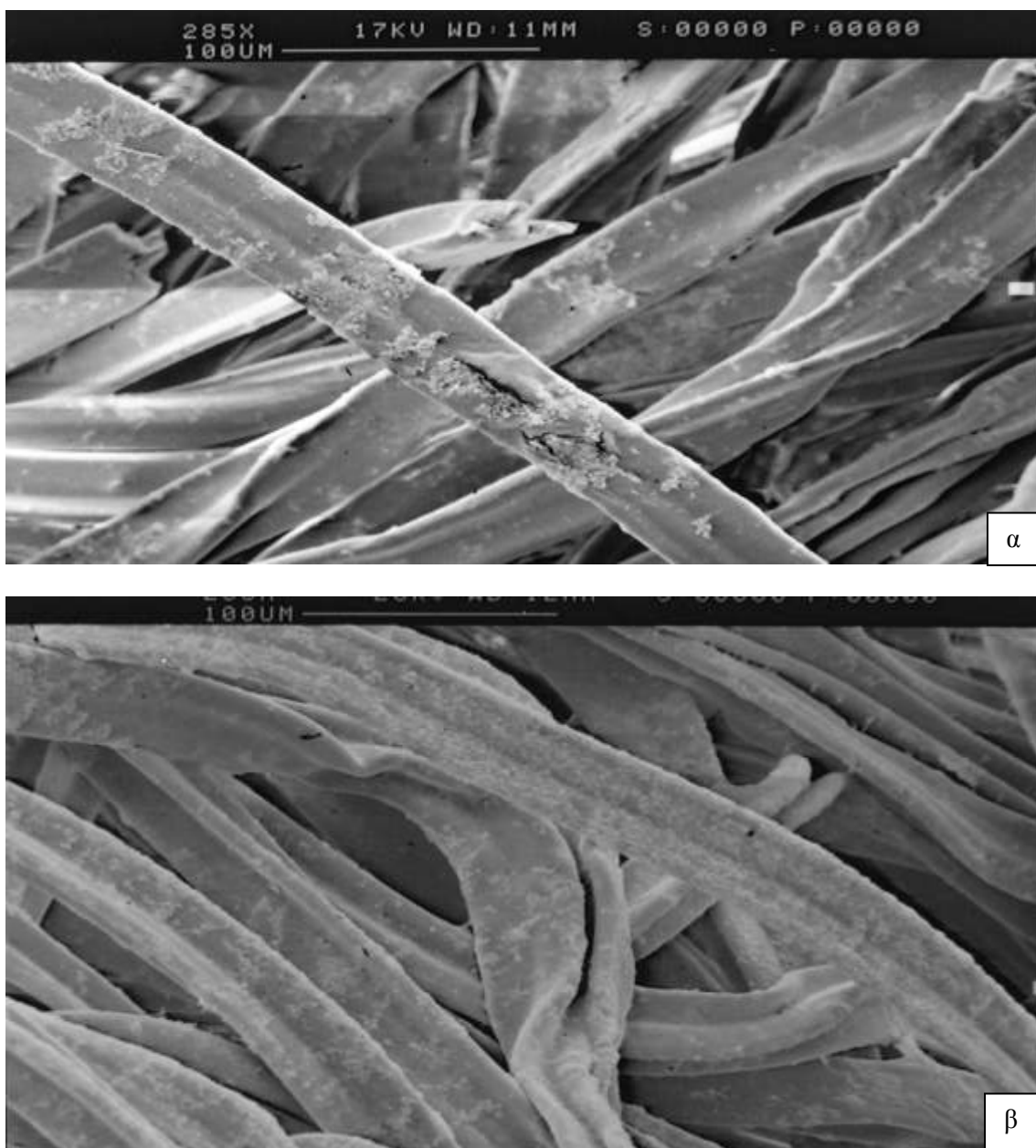


Εικόνα 3.11. Απεικόνιση βιοϋμενίων την 71^η μέρα του πειράματος. α) Αύξηση βιοϋμενίου στην ομάδα ET, κλίμακα μπάρας: 20 μm, β) Αύξηση βιοϋμενίου στην ομάδα ET, κλίμακα μπάρας: 100 μm.

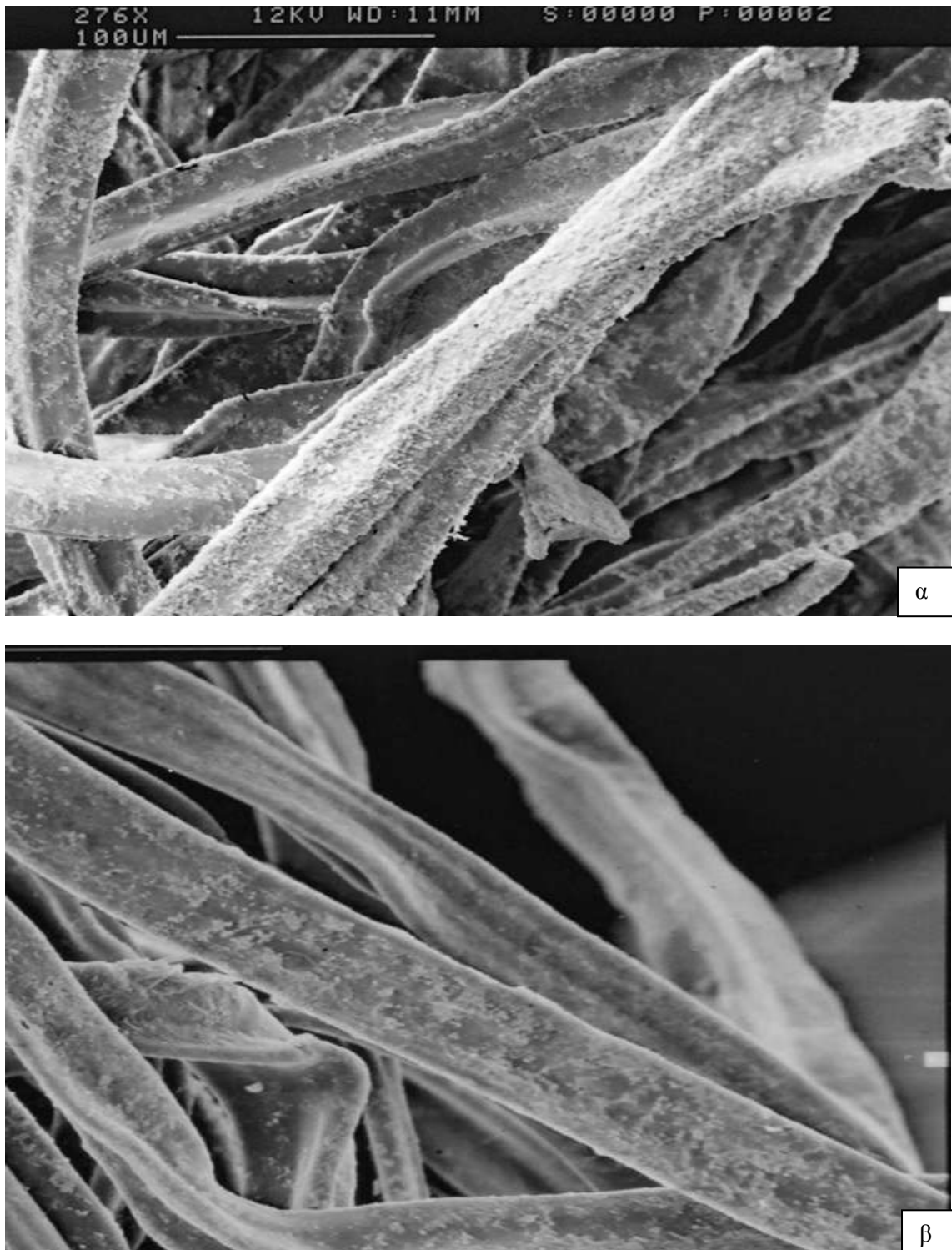


Εικόνα 3.12. Απεικόνιση βιοϋμενίων την 71^η μέρα του πειράματος. α) Βιοϋμένιο και παρουσία κρυστάλλων στην ομάδα ETWN, κλίμακα μπάρας: 50 μm, β) Βιοϋμένιο στην ομάδα ETWN, κλίμακα μπάρας: 100 μm.

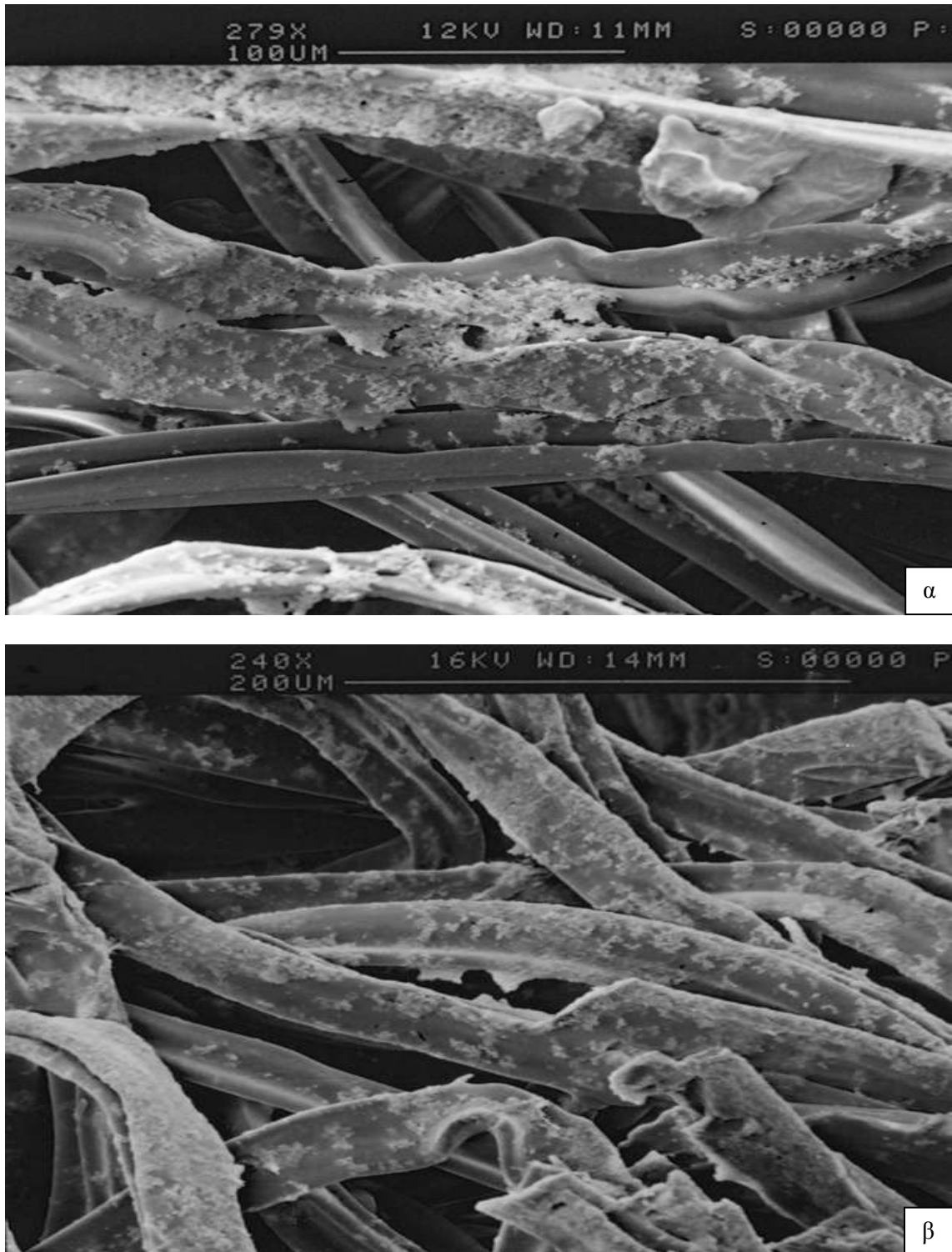
Την 103^η μέρα όπως και την 219^η μέρα του πειράματος παρατηρήθηκε πλήρης κάλυψη των φίλτρων από βακτηριακά βιοϋμένια και στις τρεις διατάξεις. Την 103^η μέρα η ομάδα που εμφάνισε την μεγαλύτερη αύξηση ήταν η ET και τη μικρότερη η ETC (Εικ. 3.13.α), ενώ την 219^η μέρα η ομάδα που εμφάνισε την μεγαλύτερη αύξηση ήταν η ETWN και την μικρότερη η ETC (Εικόνα 3.13.β).



Εικόνα 3.13. Απεικόνιση βιοϋμενίων την 103^η και την 219^η μέρα του πειράματος. α) ETC 103 μέρες, κλίμακα μπάρας: 100 µm, β) ETC 219 μέρες, κλίμακα μπάρας: 100 µm.



Εικόνα 3.14. Απεικόνιση βιοϋμενίων την 103^η και την 219^η μέρα του πειράματος. α) ΕΤ 103 μέρες, κλίμακα μπάρας: 100 μm, β) ΕΤ 219 μέρες, κλίμακα μπάρας: 100 μm.



Εικόνα 3.15. Απεικόνιση βιοϋμενίων την 103^η και την 219^η μέρα του πειράματος. α) ETWN 103 μέρες, κλίμακα μπάρας: 100 μm, β) ETWN 219 μέρες, κλίμακα μπάρας: 200 μm.

Η επίπτωση των θαλάσσιων απορριμμάτων είναι μία περιβαλλοντική απειλή, η οποία λαμβάνει μεγάλες διαστάσεις εξαιτίας της γρήγορης αύξησης της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών και του μεγάλου όγκου απορριμμάτων που εισέρχεται στο θαλάσσιο οικοσύστημα αποτελώντας κύρια οικολογική ανησυχία για τα απειλούμενα είδη. Λόγω έλλειψης δεδομένων σχετικά με τις επιπτώσεις των ανθρωπογενών απορριμμάτων, οι Wilcox et al. (2016) μελέτησαν την οικολογική απειλή της επιλοκής, της έκχυσης στο στόμαχο και της χημικής επιμόλυνσης σε 3 κύρια θαλάσσια είδη, θαλάσσια πουλιά, θαλάσσιες χελώνες και θαλάσσια θηλαστικά. Η αποτίμηση του ρίσκου επικεντρώθηκε στους πιο κοινούς τύπους απορριμμάτων, που βρίσκονται στις παγκόσμιες ακτογραμμές σχετικά με τα στοιχεία που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια 3 δεκαετιών από τον Διεθνή Οργανισμό Καθαρισμού Ακτών (International Coastal Clean-Up 2013). Οι πιο μεγάλες απειλές βρέθηκαν να ανήκουν σε εξοπλισμό αλίευσης, μπαλόνια, πλαστικές σακούλες, τσιγάρα και καπάκια από πλαστικά μπουκάλια (Εικ. 4.1). Παρατηρήθηκε ότι τα είδη αλιείας ήταν τα είδη που προκαλούσαν τις μεγαλύτερες επιπτώσεις στα ζώα που αλληλεπιδρούσαν μ' αυτά. Ακολουθούσαν οι πλαστικές σακούλες και τα είδη συσκευασίας τροφίμων και σαν τέταρτος σημαντικότερος παράγοντας ήταν οι επιπτώσεις των τσιγάρων (Wilcox et al. 2016).



Εικόνα 4.1. Τα πιο επικίνδυνα απορρίμματα που βρίσκονται στον ωκεανό για τα θαλάσσια πουλιά, θαλάσσιες χελώνες και θαλάσσια θηλαστικά: 1) Εξοπλισμός αλίευσης, 2) Πλαστικά μπουκάλια και υλικά συσκευασίας, 3) Μπαλόνια, 4. Αποτσίγαρα, 5) Καπάκια πλαστικών μπουκαλιών (oceanconservancy.org/our-work/marine-debris/threat-rank-report.html).

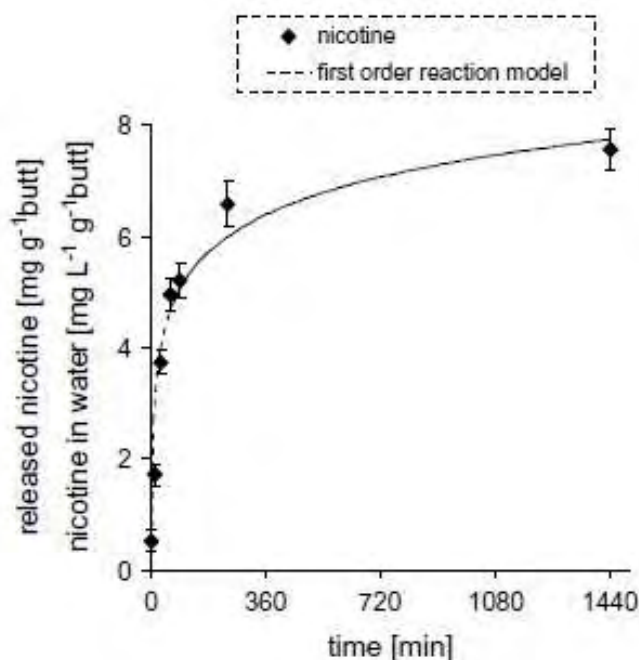
Αν και τα αποτσίγαρα αποτελούν τον πιο κοινό ανθρωπογενή ρύπο των ακτογραμμών δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς τους μικροοργανισμούς που μπορούν να αναπτυχθούν σ' αυτά. Η έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον Διεθνή Οργανισμό Καθαρισμού Ακτών (International Coastal Cleanup – ICC) το 2015 σε 13360 μίλια ακτών έδειξε ότι βρέθηκαν περίπου 2,2 εκατομμύρια αποτσίγαρα και ότι ήταν ο πιο πολυάριθμος ρύπος σε όλες τις παραθαλάσσιες περιοχές (Εικ. 4.2).



Εικόνα 4.2. Τα 10 πιο πολυάριθμα είδη απορριμμάτων που συλλέχθηκαν από τον ICC το 2015 σε παραθαλάσσιες περιοχές. 1) Αποτσίγαρο, 2) Συσκευασίες τροφίμων, 3) Πλαστικές φιάλες αναψυκτικών, 4) Καπάκια από πλαστικές φιάλες, 5) Καλαμάκια και αναδευτήρες, 6) Πλαστικές σακούλες, 7) Πλαστικές σακούλες τροφίμων, 8) Γυάλινες φιάλες αναψυκτικών, 9) Κυτία αλουμίνιου, 10) Πλαστικά ποτήρια και πιάτα (oceanconservancy.org/our-work/international-coastal-cleanup/2015-by-the-numbers.html)

Με βάση την έρευνα των Green et al. (2014) η νικοτίνη απελευθερώνεται άμεσα στα στάσιμα νερά, στις λίμνες, στα ποτάμια αλλά και σε κοιλάτες, στο δρόμο ή πεζοδρόμιο που προκαλούνται από καθίζηση. Σε δείγμα $7,1 \text{ mg g}^{-1}$ (τυπική απόκλιση: $0,07 \text{ mg g}^{-1}$) η νικοτίνη απελευθερώθηκε από το αποτσίγαρο μετά από 1,440 λεπτά, το 50% του συνολικού ποσού μετά 27.2 λεπτά και το 90% μετά από 651 λεπτά (Σχ. 4.1). Η απελευθέρωση της νικοτίνης στο νερό αυξάνεται με την αύξηση του μέσου βάρους του

φίλτρου του τσιγάρου. Οι νικοτινόφιλοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί στην αποσύνθεση της νικοτίνης σε νερό (Civilini et al. 1997).



Σχήμα 4.1. Απελευθέρωση της νικοτίνης στο νερό σε συνάρτηση με τον χρόνο (Green et al. 2014).

Οι βιβλιογραφικές αναφορές που σχετίζονται με την ανάπτυξη βακτηριακών βιοϋμενίων σε φίλτρα τσιγάρων που έχουν εκτεθεί σε θαλασσινό νερό εκλείπουν. Παρόλ' αυτά είναι γνωστό ότι οι ουσίες του καπνού όπως είναι η νικοτίνη και η πίσσα έχουν τοξικές δράσεις (Lee & Lee 2015) και έχουν μελετηθεί οι επιπτώσεις αυτών σε διάφορα είδη. Στην προσπάθεια των Dieng et al. (2014) να μελετήσουν τις επιπτώσεις που προκαλούνται σε αυγά κουνουπιών του είδους *Aedes aegypti* από τις ουσίες του καπνού, τοποθέτησαν σε θάλαμο διαφορετικές ποσότητες φίλτρων τσιγάρων με συγκεντρώσεις 1, 3 και 5 τσιγάρα και 1 ακάπνιστο. Αποτέλεσμα αυτού ήταν τα θηλυκά να προτιμούν σημεία που περιείχαν τσιγάρα για την εναπόθεση των αυγών. Παρατηρήθηκαν ισοδύναμοι ρυθμοί έκδυσης στα αυγά που υπήρχαν στα τσιγάρα και

στο νερό και παρατηρήθηκε μειωμένη διάρκεια ζωής των ενηλίκων ατόμων που επέζησαν στα τσιγάρα. Επιπρόσθετα συμπέραναν ότι τα εκχυλίσματα των τσιγάρων έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις στη γονιμότητα και τη μακροζωία των απογόνων ενώ ταυτόχρονα ελκύουν τα θηλυκά για την εναπόθεση των αυγών (Dieng et al. 2014).

Μία άλλη έρευνα των Booth et al. (2015) έδειξε ότι τα μαλάκια (σαλιγκάρια) που διαβιώνουν σε παραλιακές περιοχές επηρεάζονται από τα εκχυλίσματα των τσιγάρων. Τα σαλιγκάρια εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ουσιών από τα φίλτρα τσιγάρων. Η θνησιμότητα ήταν εξαιρετικά υψηλή με όλα τα είδη (*B. nanum*) που δοκιμάστηκαν φτάνοντας στο 100% στην ανώτατη συγκέντρωση που ήταν 5 τσιγάρα ανά λίτρο και 2 ώρες χρόνος ανάδευσης. Μετά από 8 ημέρες παρατηρήθηκε 100% θνησιμότητα στην υψηλότερη συγκέντρωση (5 τσιγάρα/λίτρο). Το είδος *Austrocochlea porcata* εμφάνισε τη μεγαλύτερη θνησιμότητα από τα άλλα δύο είδη σε συγκεντρώσεις εκχυλίσματος τσιγάρων 10 - 25%. Πιο ανθεκτικό είναι το είδος *Nerita atramentosa*. Επίσης, παρατηρήθηκαν επιπτώσεις στη συμπεριφορά των σαλιγκαριών που επιβίωσαν (όπως χρόνος κίνησης και νοθρότητα) (Booth et al 2015).

Μία ακόμη έρευνα των Lee & Lee (2015) δείχνει ότι και τα νεαρά ιχθύδια επηρεάζονται από τις ουσίες που εκλύονται από τα αποτσίγαρα. Το νερό περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις διηθημένου νερού από χρησιμοποιημένο καπνό είτε νερό διηθημένο από μη χρησιμοποιημένο καπνό. Παράλληλα υπήρχαν και ομάδες με καπνισμένα και μη φίλτρα τσιγάρου που τοποθετήθηκαν στα ιχθύδια έπειτα από 1 – 3 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι χαμηλές συγκεντρώσεις από καπνισμένο καπνό, ακάπνιστο καπνό και καπνισμένο φίλτρο αύξησαν τον ρυθμό της καρδιάς, επιτάχυναν την ανάπτυξη και άλλαξαν τη συμπεριφορά των ιχθυδίων, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις ελάττωσαν τον ρυθμό της καρδιάς, επιβράδυναν την ανάπτυξη

και αύξησαν τη θνησιμότητα αυτών. Η χαμηλότερη συγκέντρωση ήταν λιγότερη ή ίση από 0,2 κομμάτια φίλτρου ανά λίτρο. Η τοξικότητα σε σχέση με τις ομάδες διακυμάνθηκε ως εξής: καπνισμένος καπνός, μη καπνισμένος καπνός, καπνισμένο φίλτρο, ακάπνιστο φίλτρο (Lee & Lee 2015).

Τα βιοϋμένια αναπτύσσονται κυρίως από βακτήρια, μικροφύκη, διάτομα, μικροσκοπικούς μύκητες, ετερότροφα μαστιγωτά κύτταρα και πρώτιστα. Η αναλογία της αφθονίας των οργανισμών αυτών ποικίλλει, με τα βακτήρια και τα διάτομα συχνά να είναι το κυρίαρχο ταξινομικό είδος (Salta et al. 2013). Στη Λευκή Θάλασσα (Ρωσία), οι κοινότητες που αναπτύχθηκαν στις πλάκες πολυμερούς περιείχαν βακτήρια / διάτομα / ετερότροφα μαστιγωτά κύτταρα (107 κύτταρα ml^{-1}) με αναλογία $640 : 4 : 1$ (Railkin 2004).

Τα βιοϋμένια σε μια περιοχή αναπτύσσονται με βάση τις συνθήκες του οικοσυστήματος που επικρατούν. Τα θρεπτικά συστατικά, η θερμοκρασία και η υδροδυναμική του οικοσυστήματος επηρεάζουν την ανάπτυξη των βιοϋμενίων (Hall-Stoodley et al. 2004). Επίσης σημαντικό ρόλο παίζουν και βιοχημικοί και φυσικοί παράγοντες, εποχικές και γεωγραφικές διακυμάνσεις. Για παράδειγμα, η θερμοκρασία όπως και τα θρεπτικά συστατικά (Chiu et al. 2008, Briand et al. 2012) μιας περιοχής, το φως, το pH και διαλυμένο οξυγόνο (Nayar et al. 2005) έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη δομή των βιοϋμενίων ενώ η αλατότητα δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των βιοϋμενίων σημαντικά (Lau et al. 2005). Κατά την πειραματική διαδικασία της παρούσας μελέτης η επίδραση του υδροδυναμισμού ήταν ελλιπής με αποτέλεσμα η ανάπτυξη και η ωρίμανση των βακτηριακών βιοϋμενίων να επηρεάστηκε από τους υπόλοιπους παράγοντες όπως θρεπτικά συστατικά, θερμοκρασία, φως, pH και διαλυμένο οξυγόνο. Τα βακτηριακά βιοϋμένια μπορούν να αναπτυχθούν σε ποικίλα υποστρώματα όπως

στελέχη φυκιών *Ulva linza* έπειτα από έκθεση σε θαλασσινό νερό (Mieszkin et al. 2012) και εμφανίζουν κοινά λειτουργικά γονίδια (Burke et al. 2011). Ανθρωπογενώς μπορούν να αναπτυχθούν σε γυάλινες επιφάνειες βυθισμένες ακόμη και στα νερά της Ανταρκτικής όπου η ελάχιστη καταγεγραμμένη θερμοκρασία είναι $-93\text{ }^{\circ}\text{C}$, το διαλυμένο οξυγόνο είναι $242\text{ }\mu\text{mol/kg}$ και η αλατότητα έως $34,7\text{ mg/l}$ (Webster & Negri 2006). Βακτηριακά βιοϋμένια αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές επιφάνειες όπως τιτάνιο, αλουμίνιο, ασβεστόλιθος και σχιστόλιθος στην περιοχή του Ιονίου Πελάγους σε διαφορετικά βάθη ($1500, 2500, 3500$ και 4500m). Μετά από 155 ημέρες υπό βύθιση σε βάθος 4500 m , διαπιστώθηκε ότι η βιολογική ποικιλομορφία των βιοϋμενίων αυξάνεται με το βάθος, ενώ οι κοινότητες φάνηκε να επηρεάζονται λιγότερο από τον τύπο του υποστρώματος (Bellou et al. 2012).

Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσουν βιοϋμένια στο θαλασσινό νερό συγκεντρώνονται σε συστάδες και μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή των ΕΠΟ πάνω από 100% σε κάποιες περιπτώσεις όταν το θαλασσινό νερό περιέχει τοξικά μέταλλα και χημικά όπως Cd(II) , Cu(II) , Pb(II) , Zn(II) , Al(III) , Cr(III) , γλουταραλδεϋδη και φαινόλη (Fang et al. 2002). Η δημιουργία μικροβιακού συμπλέγματος και η αυξημένη παραγωγή ΕΠΟ που περιέχει 84-92% πρωτεΐνη και 8-16% πολυσακχαρίτες επιταχύνει τη διάβρωση του ατσαλιού, με αποτέλεσμα τα βακτηριακά βιοϋμένια να διαβρώνουν το ατσάλι σε ακόμη μεγαλύτερο βαθμό με την ύπαρξη των βαρέων μετάλλων (Fang et al. 2002).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να παρατηρηθούν βακτήρια και βιοϋμένια που προσκολλούνται στα φίλτρα των τσιγάρων αφού αυτά έχουν εκτεθεί σε θαλασσινό νερό.

Τα βακτήρια μπορούν να προσκολληθούν, να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν στις ίνες των φίλτρων από τα τσιγάρα είτε αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί είτε όχι. Τα βιοϋμένια εμφανίστηκαν την 22^η μέρα του πειράματος σε όλες τις ομάδες. Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας εμφανίστηκε σταδιακή αύξηση των βακτηρίων και των βιοϋμενίων και στις τρεις διατάξεις. Η ομάδα που αποτελούνταν από μη χρησιμοποιημένα φίλτρα τσιγάρων, δηλαδή η ETWN, εμφάνισε τη μεγαλύτερη σταδιακή αύξηση, ενώ η ομάδα ETC είχε συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες τη μικρότερη. Αυτό προφανώς οφείλεται στην ύπαρξη τοξικών ουσιών, όπως είναι η νικοτίνη, στα καπνισμένα φίλτρα. Οι ουσίες αυτές επιβραδύνουν την ανάπτυξη βακτηριακών βιοϋμενίων στις ίνες των φίλτρων εφόσον η ομάδα ETWN εμφάνιζε την μεγαλύτερη αύξηση σε κάθε δειγματοληψία. Πλήρης κάλυψη των φίλτρων από βιοϋμένια παρατηρήθηκε την 103^η μέρα του πειράματος.

Οι ουσίες του καπνού, όπως η νικοτίνη, έχουν ανασταλτική δράση στην αύξηση του βακτηριακού βιοϋμενίου, αλλά τα βακτήρια είναι ανθεκτικά κατά την έκθεσή τους σε ουσίες του καπνού.

Η παρατήρηση των βιοϋμενίων που σχηματίστηκαν στα φίλτρα των τσιγάρων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, έδωσε μια ικανοποιητική εικόνα σχετικά με τη δομή των βακτηρίων κατά τη διαδικασία ανάπτυξης των βιοϋμενίων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alam M, Sultana M, Nair G, Sack R, Sack D, Siddique A, Ali A, Huq A, Colwell R. (2006) Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:2849-2855.
- Alonso S.G., Valcarcel Y., Montero J.C., Catala M., (2012) Nicotine occurrence in bottled mineral water: analysis of 10 brands of water in Spain. *Science of the Total Environment*. 416, 527–531.
- Bator R.J., Bryan A.D., Schultz P.W. (2011) Who Gives a Hoot?: intercept surveys of litterers and disposers. *Environmental Behavior* 43, 295–315.
- Bellou N., Papathanassiou E., Dobretsov S., Lykousis V., Colijn F. (2012) The effect of substratum type, orientation and depth on the development of bacterial deep-sea biofilm communities grown on artificial substrata deployed in the Eastern Mediterranean. *Biofouling*, 28(2), 199-213.
- Branda S.S, Vik A., Friedman L., Kolter R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *TRENDS in Microbiology*, Vol.13 No.1.
- Briand J.-F., Djeridi I., Jamet D., Coupé S., Bressy C., Molmeret M. (2012) Pioneer marine biofilms on artificial surfaces including antifouling coatings immersed in two contrasting French Mediterranean coast sites. *Biofouling* 28: 453–463.
- Boleda, M.R., Huerta-Fontela, M., Ventura, F., Galceran, M.T., (2011) Evaluation of the presence of drugs of abuse in tap waters. *Chemosphere* 84, 1601–1607.
- Booth D. J., Gribben P., Parkinson K. (2015) Impact of cigarette butt leachae on tidepool snails. *Marine pollution bulletin*, 95(1), 362-364.

- Burke C., Thomas T., Lewis M., Steinberg P., Kjelleberg S. (2011) Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *The ISME journal*, 5(4), 590-600.
- Characklis W.G. (1973) Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research*, 7:1249–58.
- Chiu J., Zhang R., Wang H., Thiyagarajan V., Qian P. (2008) Nutrient effects on intertidal community: from bacteria to invertebrates. *Mar Ecol Prog Ser* 358: 41–50.
- Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K-J. (1978) How bacteria stick. *Scientific American*, 238:86–95.
- Civilini M., Domenis C., Sebastianutto N., de Bertoldi M. (1997) Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms. *Waste Management & Research* 15, 349–358.
- Connolly G.N., Alpert H.R., Wayne G.F., Koh H. (2007). Trends in nicotine yield in smoke and its relationship with design characteristics among popular US cigarette brands, 1997–2005. *Tobacco Control* 16 (5), e5.
- Cowan M.M., Warren T.M., Fletcher M. (1991) Mixed species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. *Biofouling*, 3:23–34.
- Donlan R.M. (2000) Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J*, 46:47–52.
- Donlan R.M. (2002) Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 8, No. 9.
- Dieng H., Rajasaygar S., Ahmad A. H., Rawi C.S.M., Ahmad H., Satho T., Hamid S. A. (2014) Indirect effects of cigarette butt waste on the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Acta tropica*, 130, 123-130.

- Fang H.H., Xu L.C., Chan K.Y. (2002) Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Research*, 36(19), 4709-4716.
- Fera P., Siebel M.A., Characklis W.G., Prieur D. (1989) Seasonal variations in bacterial colonization of stainless steel, aluminum, and polycarbonate surfaces in a seawater flow system. *Biofouling*, 1:251–61.
- Flemming H.C., Wingender J., Griegbe T., Mayer C. (2000) Physico-chemical properties of biofilms. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 19-34.
- Fletcher M. (1988) Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J Bacteriol*, 170:2027–30.
- Green A.L.R., Putschew A., Nehls T. (2014) Littered cigarette butts as a source of nicotine in urban waters. *Journal of Hydrology*, 519, 3466-3474.
- Hall-Stoodley L., Costerton J., Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95–108.
- Heukelekian H. & Heller A. (1940) Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *J Bacteriol*, 40:547–58.
- Huq A., Whitehouse C.A., Grim C.J., Alam M., Colwell R.R. (2008) Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Current Opinion in Biotechnology*, 19:244–24.
- International Coastal Clean-up (2013) Report. <http://www.oceanconservancy.org/our-work/international-coastal-cleanup/2012-ocean-trash-index.html>
- International Coastal Clean-up (2015) Trash free seas report: By the numbers <http://www.oceanconservancy.org/our-work/international-coastal-cleanup/2015-by-the-numbers.html>

- James G.A., Beaudette L., Costerton J.W. (1995) Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15:257–62.
- Johnson L. (2007) Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J Theoretical Biol*, 251:24-34.
- Jones H.C., Roth I.L., Saunders W.M. (1969) Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol*, 99:316–25.
- Konar S.K. (1970) Nicotine as a fish poison. *North American Journal Aquaculture*, 32:103–104.
- Lau S., Thiagarajan V., Cheung S., Qian P. (2005) Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates. *Aquatic Microbial Ecology* 38: 41–51.
- Lee W., & Lee C.C. (2015) Developmental toxicity of cigarette butts—An underdeveloped issue. *Ecotoxicology and environmental safety*, 113:362-368.
- Leffingwell J.C. (1999) Basic Chemical Constituents of Tobacco Leaf and Differences among Tobacco Types.
- Leriche V., Sibille P., Carpentier B. (2000) Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:1851–6.
- Loeb G.I. & Neihof R.A. (1975) Marine conditioning films. *Advances in Chemistry*, 145:319–35.
- Lopes F., Morin P., Oliveira R., Melo L. (2006) Interaction of *Desulfovibrio desulfuicans* biofilms with stainless steel surface and its impact on bacterial metabolism. *J Appl Microbiol*, 101:1087-1095.

- Marah M. & Novotny T.E. (2011) Geographic patterns of cigarette butt waste in the urban environment. *Tob. Control* 20, 142–144.
- Micevska T., Warne M.S., Pablo F., Patra R. (2006) Variation in, and causes of, toxicity of cigarette butts to a cladoceran and microtox. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 205–212.
- Mieszkin S., Martin-Tanchereau P., Callow M. E., Callow J. A. (2012) Effect of bacterial biofilms formed on fouling-release coatings from natural seawater and *Cobetia marina*, on the adhesion of two marine algae. *Biofouling*, 28(9), 953-968.
- Moerman J.W. & Potts G.E. (2011) Analysis of metals leached from smoked cigarette litter. *Tob. Control* 20, 130–135.
- Moriwaki H., Kitajima S., Katahira K. (2009) Waste on the roadside, ‘poi-sute’ waste: its distribution and elution potential of pollutants into environment. *Waste Manag.* 29, 1192–1197.
- Nadell C., Xavier J., Levin S., Foster K. (2008) The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PloS Biol.* 6:e14.
- National Research Council (1977) *Drinking Water and Health*, vol. 1. National Academies Press, Washington D.C., Washington, DC.
- Nayar S., Goh B., Chou L. (2005) Settlement of marine periphytic algae in a tropical estuary. *Estuarine Coast Shelf Sci* 64: 241–248.
- Ocean Conservancy: International Coastal Clean Up 2015. oceanconservancy.org/our-work/international-coastal-cleanup/2015-by-the-numbers.html
- Ocean Conservancy Report: Ocean Trash Impacts, Our study on the deadliest ocean trash. <http://www.oceanconservancy.org/our-work/marine-debris/threat-rank-report.html>

- Patel V., Thomson G.W., Wilson N. (2013). Cigarette butt littering in city streets: a new methodology for studying and results. *Tob. Control* 22, 59–62.
- Perfetti T.A., Coleman III W.M., Smith W.S. (1998) Determination of main- stream and sidestream cigarette smoke components for cigarettes of different tobacco types and a set of reference cigarettes. *Beitr. Tabakforsch. Int.* 18, 95–113.
- Pringle J.H. & Fletcher M. (1983) Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 45:811–17.
- Railkin, A.I. (2004) *Marine Biofouling: Colonization Processes and Defenses*. Florida, USA: CRC Press
- Rawls S.M., Patil T., Tallarida C.S., Baron S., Kim M., Song K., Ward S., Raffa R.B. (2011) Nicotine behavioral pharmacology: clues from planarians. *Drug Alcohol Depend.* 118, 274–279.
- Salta M., Wharton J. A., Blache Y., Stokes K. R., Briand J. F. (2013) Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environmental microbiology*, 15(11), 2879-2893.
- Savino J.F. & Tanabe L.L. (1989). Sublethal effects of phenanthrene, nicotine, and pinane on daphnia-pulex. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 778–784.
- Schneider J.E., Peterson N.A., Kiss N., Ebeid O., Doyle A.S. (2011) Tobacco litter costs and public policy: a framework and methodology for considering the use of fees to offset abatement costs. *Tob. Control* 20, 136–141.
- Schultz P.W., Bator R.J., Large L.B., Bruni C.M., Tabanico J.J. (2013) Littering in context: personal and environmental predictors of littering behavior. *Environ. Behav.* 45 (1), 35–59.

- Seco Pon J.P. & Becherucci M.E. (2012) Spatial and temporal variations of urban litter in Mar del Plata the major coastal city of Argentina. *Waste Manag.* 32 (2), 343–348.
- September S., Els F., Venter S., Brozel V. (2007) Prevalence of bacterial pathogens in biofilms of drinking water distribution systems. *J Water Health*, 5:219-227.
- Slaughter E., Gersberg R., Watanabe K., Rudolph J., Stransky C., Novotny T.E. (2011) Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. *Tob. Control* 20, 25–29.
- Stanley K., Stabenau E., Landry, A. (1988) Debris ingestion by sea turtles along the Texas coast. Schroeder, B.A. (Ed.), *Eighth Annual Workshop on Sea Turtle Conservation and Biology*. NOAA Technical Memorandum, Fort Fisher, NC, USA, pp. 119–121.
- Stoodley P., Boyle J.D., Dodds I., Lappin-Scott H.M. (1997) Consensus model of biofilm structure. In: Wimpenny JWT, Gilbert PS, Lappin-Scott HM, Jones M, editors. *Biofilms: community interactions and control*. Cardiff, UK: Bioline, p. 1–9.
- Stuart M., Lapworth D., Crane E. Hart A. (2012) Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci. Total Environ.* 416, 1–21.
- Sutherland I.W. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147:3–9.
- Tolker-Nielsen T. & Molin S. (2000) Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol*, 40:75–84.
- Tolker-Nielsen T., Brinch U.C., Ragas P.C., Andersen J.B., Jacobsen C.S., Molin S. (2000) Development and dynamics of *Pseudomonas sp.* biofilms. *J Bacteriol*, 182:6482–9.
- US Department of Agriculture (USDA) 2010. Tobacco statistics and reports. <http://www.fas.usda.gov/cots/tobstats.html>

- Valcarcel Y., Alonso S.G., Rodriguez-Gil J.L., Gil A., Catala M. (2011) Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere* 84, 1336–1348.
- Webster N.S. & Negri A.P. (2006) Site-specific variation in Antarctic marine biofilms established on artificial surfaces. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1177-1190.
- Wertz M.S., Kyriss T., Paranjape S., Glantz S.A. (2011) The toxic effects of cigarette additives. Philip Morris' project mix reconsidered: an analysis of documents released through litigation. *PLoS Med.* 8 (12), e1001145.
- Zobell C.E. (1943) The effect of solid surfaces on bacterial activity. *J Bacteriol*, 46:39–56.
- Βερίλλης Π. (2015) Οπτική και Ηλεκτρονική Μικροσκοπία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.

6. ABSTRACT

«Monitoring of sea bacteria biofilms on cigarettes' filters.»

The present undergraduate dissertation conducted within the undergraduate bachelor program of the Department of Ichthyology and Aquatic Environment, University of Thessaly. The biofilm development in cigarette filter tips after their exposure to seawater was studied.

Smoked as well as non-smoked cigarette filter tips and filtered seawater from Anavros, Magnesia have been used. Three experimental arrays of three groups each, were used overall in sterilized falcons (50 ml). The arrays ETC and ET consisted of smoked filters dipped into seawater filtered through films at 0.2 μm and 0.8 μm pores respectively. The group ETWN included non-smoked filter tips and seawater filtered through a film of 0.8 μm pores. After a ten-day incubation of the samples in room conditions (temperature 20 °C and photoperiod 12L:12D) the first sampling took place. All in all, nine samplings took place throughout a period of 219 days. The samples fixed within a solution of 2,5% glutaraldehyde in particle free seawater (4 hours at 4 °C), dehydrated in a graded alcohol series and finally were covered with a thin layer of gold using a sputter coater. They were examined under a scanning electron microscope (SEM).

A gradual biofilm increase was observed all over the samplings in all three arrays. ETWN group had the highest increase while the ETC group had comparatively the lowest increase. The biofilm made its appearance on the 22nd day of the experiment. On the 31st day, an adjoining increase of biofilm was observed among the fibers of the filter of the ETWN group. On the 51st and 71st days not any significant changes took

place in contrast to the previous samplings. On the 103rd and 219th day of the experiment the whole tip was completely covered with bacterial biofilm in all 3 arrays.

The current project has shown that the increase of bacterial biofilm may be possible in both smoked and non-smoked cigarette filter tips after seawater incubation. The substances such as nicotine inhibit the increase of these bacteria biofilm.

Keywords: bacteria, biofilm, seawater, filter tips, scanning electron microscope