

Badanie przeżywalności bakterii *Escherichia coli* w niedopałkach papierosów.

Jeremi Aneszko 3P1, XXXIII LO w Warszawie, Opiekun: Aneta Tułacz

1. Streszczenie

Badanie miało ustalić, przez jaki czas po wypaleniu papierosa symulujące mikrobiom ludzkiej śliny bakterie *Escherichia coli* pozostają żywe w niedopałku. Bakterie zostały dodane do syntetycznej śliny, której 290 μ l zakroplono na filtr. Papierosy wypalono za pomocą pompy próżniowej. Kontrole stanowiły papierosy zakroplone sterylną śliną. Niedopałki odstawiano na 1min, 1h, 6h, 24h, 48h i 72h, po czym przenoszono je do 10 ml LB i inkubowano przez 6h. Następnie mierzono absorbancję względem LB. Stwierdzono, że bakterie *Escherichia coli* przeżywają co najmniej 48h. Po 72h nie stwierdzono obecności żywych komórek w próbkach. Badanie udowodniło zagrożenie mikrobiologiczne związane z niedopałkami oraz wyznaczyło przedziały czasowe przeżywalności *Escherichia coli* na niedopałkach.

2. Wstęp

Niedopałki papierosów to najliczniejsze odpady na świecie, będące nieodłącznym elementem ulic[4]. Filtr papierosowy buduje octanu celulozy[3], którego zdolność do utrzymywania bakterii nie została określona. Nasuwa się pytanie, czy w przypadku bezpośredniego kontaktu niedopałki mogą stanowić zagrożenie natury biologicznej. Problem ten nigdy nie został poruszony w dostępnej literaturze, więc postanowiłem zbadać okres przeżywalności symulowanego mikrobiomu ludzkiej śliny na niedopałkach.

Badanie wykorzystuje model ludzkiej śliny oparty na *Escherichia coli*. To pierwsza praca sprawdzająca przeżywalność bakterii na niedopałkach papierosów. Badany przedział czasowy został wyznaczony szeregiem wcześniejszych pomiarów, wykorzystujących opisane procedury.

3. Materiały i metody

Postawione hipotezy:

- **Hipoteza zerowa:** Bakterie *Escherichia coli* nie są w stanie przeżyć 72h w niedopałku.
- **Hipoteza alternatywna:** Bakterie *Escherichia coli* są w stanie przeżyć 72h w niedopałku.

Badaną bakterią była *Escherichia coli* DH5 α . Ze względu na jej dostępność oraz dobrze zbadane właściwości, użyto tego gatunku jako modelu dla mikrobiomu śliny człowieka. Szczep DH5 α wybrano z powodu jego niepatogenności[6]. Sztuczna ślina została zakupiona od Sigma-Aldrich[8]. Jej sterylność została potwierdzona przez cztery wymazy na LB agar.

Do badania wybrano trzy marki papierosów (Marlboro Red–PM, Camel Blue–JT, Lucky Strike Red–BAT) produkowane przez trzy największe konsorcja tytoniowe w Europie[2]. Zakupiono 10 paczek każdej marki, wszystkie wyprodukowano w Polsce w 2023 roku. Aby sprawdzić sterylność papierosów, z każdej paczki wyjęto jeden papieros i jego odcięty filtr zanurzono w 10 ml LB. Wszystkie 30 pomiarów wskazało sterylność paczek.

10 ml sterylnego LB inokulowano *Escherichia coli* z kolonii LB. Probówkę inkubowano w 37°C przez 6h, po czym mierzono absorbancję względem sterylnego LB. Zawartość wirowano przez 10 minut w 6000RPM. Usunięto supernatant i zawieszono bakterie w 1 ml jałowej wody. W zależności od absorbancji kolonii, z zawiesiny pobierano objętość zawierającą 10⁹ komórek[7]. Pobraną zawiesinę dopełniano do 10 ml syntetyczną śliną, uzyskując koncentracje bakterii 10⁸/ml, odpowiadającą tej w ludzkiej ślinie[1]. Ze względu na antyseptyczne właściwości śliny, wymagane było przygotowywanie każdorazowo nowej zawiesiny.

Objętość śliny, wydzielana na filtr podczas palenia, została ustalona jako 290 μ l. Przez brak dostępnej literatury, założenie te opiera się na średnim czasie palenia[3], powierzchni języka wchodzącej w kontakt z papierosem[5] oraz dobowym wydzielaniu śliny[1].

W celu zasymulowania palenia papierosa, stworzono instalację połączoną z pompą próżniową, która symulowała ciąg płuc. W ustniku, w którym umieszczano papierosa, zainstalowano rynienkę umożliwiającą zakroplenie filtra śliną, pozwalając na jej wchłonięcie. Całość dymu była odprowadzana przez dwa ssaki za okno. Pomieszczenie, w którym przeprowadzano eksperyment było wietrzone, a wszyscy obecni nosili maski FFP2.

Po umieszczeniu papierosa w ustniku, na filtr zakraplano 290 μ l zainfekowanej śliny. Próbką kontrolną był papieros zakroplony taką samą ilością sterylnej śliny. Następnie papieros był wypalany do końca tytoniu, a niedopałek przenoszony na szalkę. Niedopałki pozostawiano w temperaturze pokojowej na odpowiednio 1min, 1h, 6h, 24h, 48h i 72h. Dla każdego czasu wykonano 12 powtórzeń próby kontrolnej i 12 powtórzeń próby badawczej. Dla wszystkich marek zastosowano tę samą procedurę. Łącznie przeprowadzono 432 pomiary (216 badawczych i 216 kontrolnych).

Po upływie badanego czasu, niedopałek przenoszono do próbówki z 10 ml LB i mieszano w wytrząsarce. Próbkówki inkubowano przez 6h w 37°C. Zawartość ponownie mieszano i sprawdzano absorbancję względem LB. Ze wszystkich 48 i 72 godzinnych pomiarów badawczych wykonano wymazy na LB agar. Szalki inkubowano przez 24h w 37°C.

W RStudio, po sprawdzeniu normalności rozkładu, przeprowadzono analizę ANOVA i test post-hoc Tukey'a. Środki użyte w eksperymencie były własnością szkoły lub moją. Do pomiarów absorbancji użyto spektrofotometru EMCO-SEMCO-S/EC.

4. Wyniki

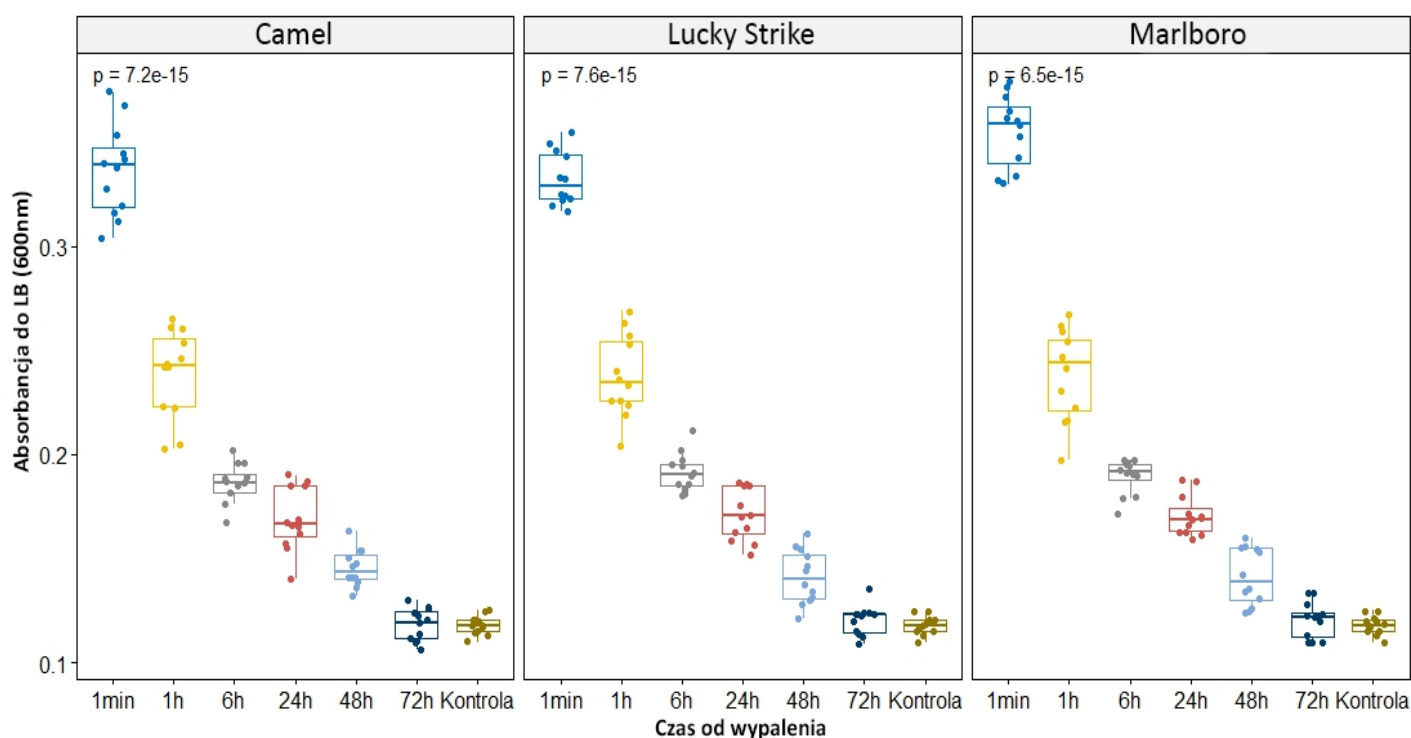


Fig.1. Zmiany absorbancji prób do LB w czasie.

Pod wpływem niedopałków LB przebarwiała się niezależnie od obecności bakterii, mieszcząc się w przedziale absorbancji 0.110-0.126.

Wymazy z 48h wykazały obecność żywych bakterii *Escherichia coli*. Wymazy z 72h pozostały sterylne.

5. Dyskusja

Wyniki pokazują, że po upływie 72 godzin pomiary badawcze nie wykazują istotnych statystycznie ($p > 0,05$) różnic względem prób kontrolnych, co może świadczyć o nieprzeżywaniu bakterii. Wyniki te nie pozwalają na odrzucenie hipotezy zerowej. Niedopałki pozostają niesterylne do przynajmniej 48h po wypaleniu. Mogą więc być w tym czasie potencjalnym zagrożeniem dla osób, które wejdą z nimi w kontakt. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między przeżywalnością bakterii a marką.

Za spadek przeżywalności bakterii może odpowiadać octan celulozy. Dodatkowym czynnikiem może być dym papierosowy oraz inne substancje budujące filtr.

Poczynione obserwacje mają znaczenie w przypadku obchodzenia się z ludźmi podejrzanymi o groźne infekcje bakteryjne oraz jako element dekontaminacji ich otoczenia. Ze względu na zastosowanie w tym badaniu uproszczonego modelu mikrobiomu śliny, wymagane są dalsze badania dla konkretnych patogenów.

6. Literatura

1. Curtis M.A.et.al(2011).*The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease*. Cell Host&Microbe.10:302–306.
2. GlobalData(2021).*Consumer-Top 10 tobacco companies in Europe in 2021 by volume*.Dostępne na:<https://www.globaldata.com/companies/top-companies-by-sector/consumer/europe-tobacco-companies-by-volume/>.Dostęp:23.12.2023
3. Hoffmann D.H et.al(1997).*THE CHANGING CIGARETTE, 1950-1995*. Journal of Toxicology and Environmental Health,50(4),307–364.
4. Micevska T et.al(2005).*Variation in, and causes of, toxicity of cigarette butts to a cladoceran and microtox*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology.50:205–212.
5. Naumova E.A.et.al(2013).*The oral mucosal surface and blood vessels*. Head & Face Medicine.
6. NEB 2023.*Cell product comparasion*.Dostępne na:<https://www.neb.com/en/tools-and-resources/selection-charts/competent-cell-product-comparison>.Dostęp:23.12.2023
7. Sezonov G.et.al(2007).*Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth*. Journal of Bacteriology.189:8746-8749.
8. Sigma-Aldrich(2023).*Artificial saliva for Pharmaceutical Research*.Dostępne na: <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/sigma/sae0149>.Dostęp:23.12.2023