

# Toxicita odpadních vod ze zdravotnických zařízení stanovena různými biologickými testy

Gabriela Jírová, Alena Vlková, Martina Wittlerová, Jan Chrz, Magdaléna Zimová, Zdeňka Wittlingerová

**Státní zdravotní ústav Praha**

Centrum zdraví a životního prostředí

Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti

# Odpadní voda ze zdravotnických zařízení

Zdravotnická zařízení (humánní i veterinární) používají **širokou škálu chemických látek** pro diagnostické, léčebné, dezinfekční nebo výzkumné účely.

## Obsahují:

- ▶ těžké kovy (Pt, Hg)
- ▶ léčiva (antibiotika, cytostatika, anestetika)
- ▶ jodované rentgenové kontrastní látky
- ▶ prvky vzácných zemin (gadolinia)
- ▶ dezinfekční přípravky
- ▶ patogenní mikroorganismy



Velká část látek prochází čistírnami odpadních vod přímo do vodního zdroje.

Konvenčními metodami čištění v čistírnách odpadních vod (ČOV) se většina těchto látek neodstraní.

# Současný stav řešené problematiky

Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení je **legislativně a metodicky zcela nedostatečné a problematické.**

## ČSN 75 6406 Odvádění a čištění odpadních vod ze zdravotnických zařízení

- ▶ Z hlediska předpokládaného výskytu choroboplodných zárodků v OV a epidemiologicky významné kontaminace lidí těmito zárodky se zdravotnická zařízení zařazují do **dvou kategorií**.
- ▶ **zdravotnické zařízení I. kategorie** (zařízení určená k izolaci a léčbě přenosných onemocnění a k manipulaci nebo zpracovávání infekčního materiálu, který obsahuje vodou přenosné původce chorob). Mají nařízeno čistit a dezinfikovat OV.
- ▶ **zdravotnické zařízení II. kategorie** nejsou určená k izolaci a léčbě přenosných onemocnění. Mohou být vypouštěny bez čištění do veřejné stokové sítě.<sup>3</sup>

# Cíl studie

- ▶ Zhodnotit toxicitu odpadních vod pomocí biologických metod
- ▶ Studie toxicity odpadních vod (OV) je pro komplexní posouzení **možného negativního vlivu** tekutého odpadu ze zdravotnických zařízení **na životní prostředí a zdraví lidí.**
- ▶ **Ekotoxicita** - toxické působení látek na živé organismy a ekosystémy
- ▶ **Genotoxicita** - vliv negativních faktorů na genetický aparát buňky (mutageneze, karcinogeneze, teratogeneze)
- ▶ **Reprotoxicita** – toxické působení látek na reprodukční funkci, embryonální morfologii (teratogenitu) a na prenatální a raně postnatální vývoj

# Plán vzorkování

► Datum odběru:

**5 jednodenních odběrů v nemocnicích H1- H5: 2/2018**

- **Druh vzorku:** nemocniční odpadní vody předčištěné v ČOV a dezinfikované chlornanem sodným nebo plynným chlórem
- **Místo odběru:** na odtoku z ČOV
- **Způsob vzorkování:** ruční vzorkovače do PP kádinky 1000 ml.



# Plán vzorkování

- ▶ **Čas odběru:** 9:00 – 13:00 (doba nejvyššího přítoku infekčních splaškových vod); v hodinových intervalech
- ▶ **směsný vzorek** časově závislý - vzorek vzniklý sléváním několika prostých vzorků stejného objemu, které byly odebírány v konstantních intervalech

## Stanovení prováděná v místě odběru:

- ▶ stanovení teploty prostých vzorků
- ▶ stanovení volného chlóru prostých vzorků
- ▶ **Konzervace v laboratoři:** odebraná OV byla rozdělena do vyfukovaných PE vzorkovnic a zmražen na teplotu  $< -18^{\circ}\text{C}$
- ▶ **Rozmražení vzorku:** ve vodní lázni při teplotě max.  $25^{\circ}\text{C}$



# Charakteristika nemocnic

- ▶ Vzorčky byly odebrány z 5 nemocnice **H1 – H5**
- ▶ 2 z Prahy, 2 z Středočeského kraje a 1 z Královéhradeckého kraje

	H1	H2	H3	H4	H5
Typ nemocnice	Fakultní	Všeobecná	Onkologická	Všeobecná	Fakultní
Počet lůžek	2 189	996	245	476	1 375
Průtok (m <sup>3</sup> /d)	50-100	51	124	10	25
Dezinfekční proces	NaClO	NaClO	NaClO	Cl <sub>2</sub>	Cl <sub>2</sub>
ČOV	Mechanicko-biologická	Mechanicko-biologická	Mechanicko-biologická	Mechanicko-biologická	Mechanicko-biologická
Odtok	Městská kanalizace	Městská kanalizace	Recipient	Městská kanalizace	Městská kanalizace



# Charakteristika odebraných vzorků

Parametr	Jednotka	H1	H2	H3	H4	H5
Teplota	°C	6,5	6,5	13,0	4,0	6,0
pH		7,91	7,51	7,88	7,65	7,81
Konduktivita	μS/cm	1 163	869	979	811	23 800
Rozpuštěné látky	mg/l	580	532	707	465	1 970
Volný chlor	mg/l	0,04	0,08	0,20	0,08	0,14
Celkový chlor	mg/l	0,06	0,53	0,42	>6.00	2,09



# Zvolené biologické zkoušky toxicity OV

## Ekotoxicita

- ▶ Zkouška na luminiscenčních bakteriích *Aliivibrio fischeri* (ČSN EN ISO 11348-2)
- ▶ Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* (ČSN EN ISO 6341)
- ▶ Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* (ČSN EN ISO 8692)
- ▶ Test *Allium cepa*

## Genotoxicita

- ▶ Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi (OECD TG471)

## Reprotoxicita

- ▶ YES/YAS metody - Yeast Based Reporter Gene Assays (draft ISO 190 40)

# Ekotoxicitata

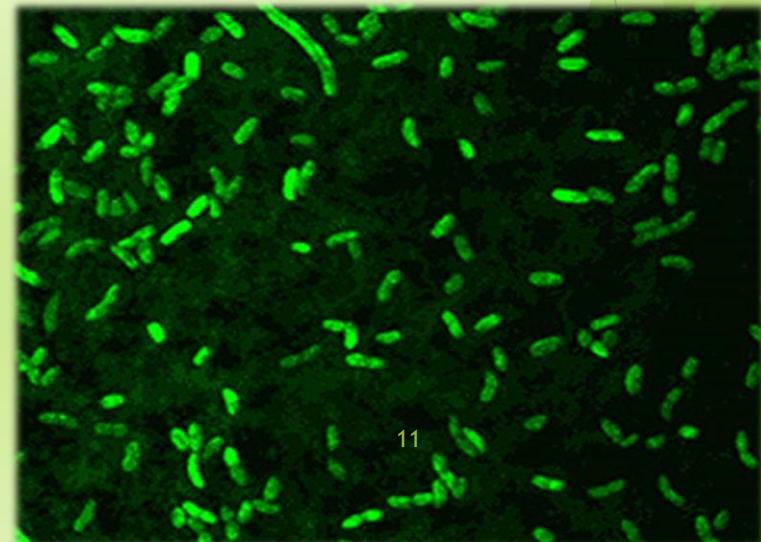
- ▶ Podstatou ekotoxikologických testů je kontakt zkoušené látky nebo jejího vodného výluhu s organismem a vyhodnocení toxického působení této látky na daný organismus.
- ▶ Vyjadřuje se pomocí :EC<sub>50</sub>
- ▶ **Čím je hodnota EC<sub>50</sub> nižší, tím vyvolává hodnocená látka negativní účinek při nižší koncentraci**
- ▶ Výpočet TU (toxická jednotka):

$$TU = \frac{1}{EC50[\%]} \cdot 100$$

TU (Toxic Unit)		Toxicity
< 0,4	Třída I	Netoxická
0,4 < TU < 1	Třída II	Málo toxická
1 < TU < 10	Třída III	Toxická
10 < TU < 100	Třída IV	Silně toxická
TU < 100	Třída V	Extrémně toxická

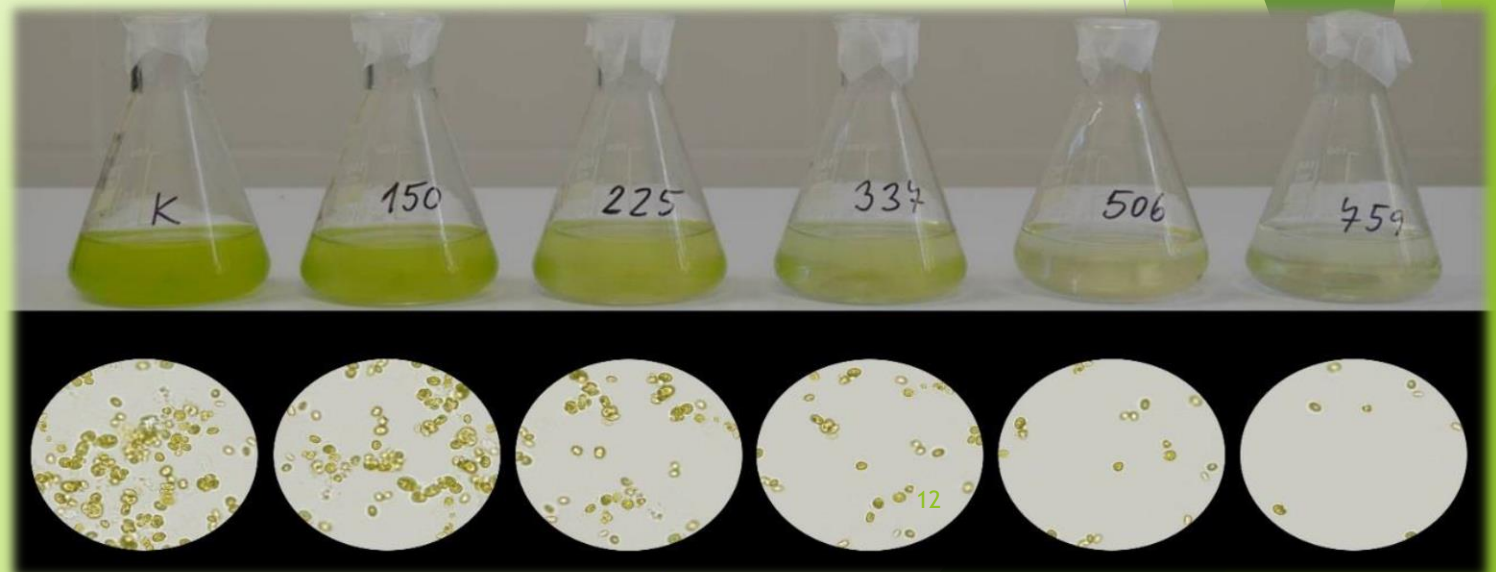
# Zkouška na luminiscenčních bakteriích *Aliivibrio fischeri* (ČSN EN ISO 11348-2)

- ▶ Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi mořské bakterie *Aliivibrio fischeri*
- ▶ Měří se snížení luminiscence v koncentrační řadě testované látky ve vztahu ke kontrolním vzorkům
- ▶ Odečet luminiscence je prováděn po 15min. a 30min.
- ▶ Výsledkem je koncentrace dané látky, která způsobí 50% inhibici luminiscence



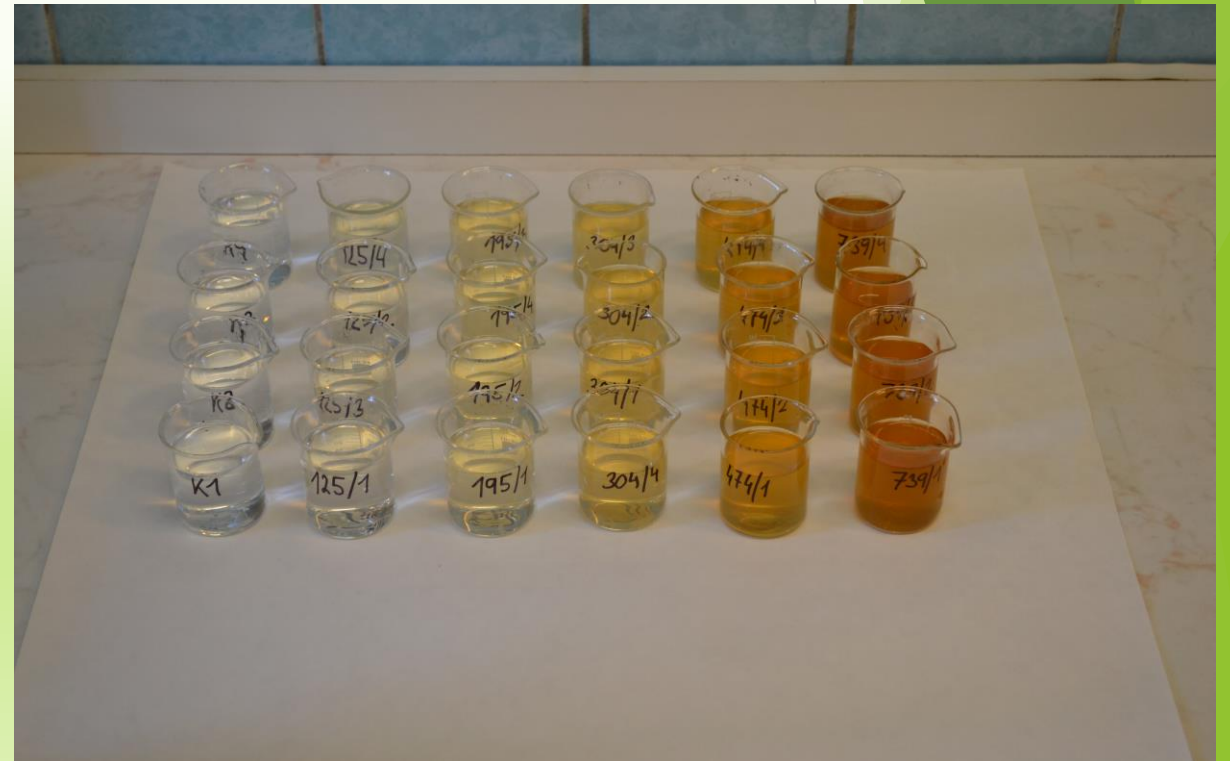
# Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Desmodesmus subspicatus* (ČSN EN ISO 8692)

- Test je založen na stanovení koncentrace zkoušené látky (EC50), která způsobuje 50% inhibici specifické rychlosti růstu vzhledem ke kontrolním vzorkům
- Test probíhá 72 hodin za konstantních podmínek (Osvětlení, teplota...)
- Pro počítání buněk se používá mikroskop s počítačí komůrkou



# Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* (ČSN EN ISO 6341)

- ▶ Vodní korýš *Daphnia magna* Straus
- ▶ Zkouška je založena na určení koncentrace testované látky, která za 24h nebo 48h imobilizuje 50% jedinců
- ▶  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  a denní fotoperioda 16h
- ▶ Na konci testu se spočítají pohybliví jedinci
- ▶ Určení 24h  $\text{EC}_{50}$  nebo 48h  $\text{EC}_{50}$



# Test *Allium cepa*

- ▶ Používá se pro hodnocení toxicity s využitím cibule druhu *Allium cepa*.
- ▶ Velikost cibulek 16 -18 mm
- ▶ Nesmí být chemicky ošetřené
- ▶ Expozice 72h
- ▶  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$



# Vyhodnocení ekotoxicity (H1-H5)

Organismus	H1		H2		H3		H4		H5	
	TU	Třída toxicity	TU	Třída toxicity	TU	Třída toxicity	TU	Třída toxicity	TU	Třída toxicity
Desmodesmus subspicatus	3.95	III toxická	0	I netoxická	0	I netoxická	2.83	III toxická	0	I netoxická
Aliivibrio fischeri 15 min	2.35	III toxická	0	I netoxická	0	I netoxická	2.32	III toxická	0	I netoxická
Aliivibrio fischeri 30 min	3.46	III toxická	0	I netoxická	0	I netoxická	2.42	III toxická	0	I netoxická
Daphnia magna 24 h	1.48	III toxická	0	I netoxická	0	I netoxická	2.54	III toxická	0	I netoxická
Daphnia magna 48 h	1.63	III toxická	0	I netoxická	0	I netoxická	4.12	III toxická	0	I netoxická
Allium cepa	0	I netoxická	0	I netoxická	0	I netoxická	0	I netoxická	0	I netoxická

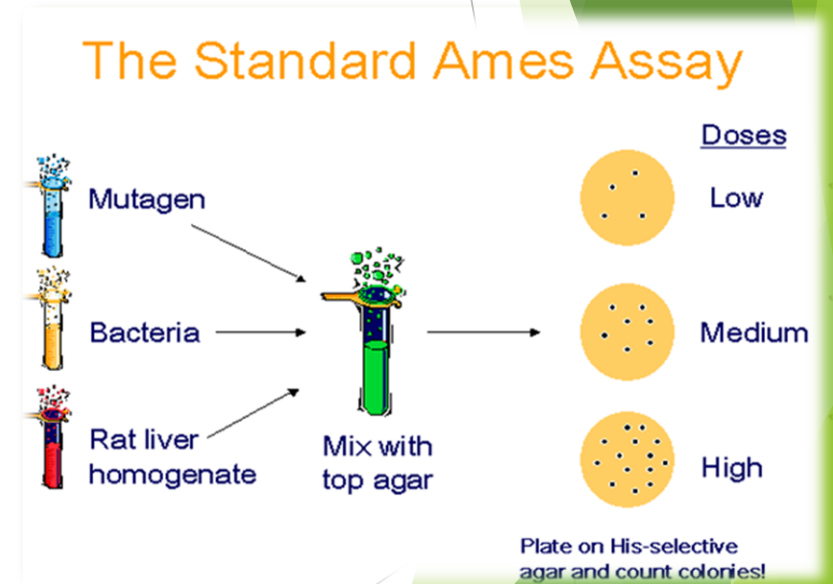
TU = 0 : < 50% inhibice neředěného vzorku

# Ames Test

## Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi (OECD TG471)

- ▶ Gen. upravené kmeny **Salmonella typhimurium**, závislé na přísunu histidinu (použité kmeny TA98, TA100, TA1535)
- ▶ Mutagenní látka způsobí tzv. **reverzní mutaci** - obnova schopnosti růst v nepřítomnosti histidinu
- ▶ **Zvětšený výskyt revertovaných** kolonií oproti kontrole (2x více) ukazuje mutagenní účinek látky
- ▶ K modelaci savčího metabolismu se přidává homogenát jater potkana (tzv. aktivace S9+)
- ▶ Bakterie obsahují další mutace, které zvyšují senzitivitu testu

(rfa mutace – zvýšená permeabilita membrány, uvrB mutace – narušené opravné mechanismy buňky, plasmid – rezistence k antibiotikům)





# Způsoby příprava vzorků OV pro stanovení mutagenity bakteriologickými testy

- ▶ Filtrace (nejvíce používaná), absorpce na pevný sorbent, použití surové vody
- ▶ Sterilizace filtrací:
- ▶ membránový filtr ze skleněných vláken Fisher , porozita 2,7  $\mu\text{m}$  1x
- ▶ membránový filtr DURAPORE (MILLIPORE) - hydrofilní, porozita 0,45  $\mu\text{m}$  1x
- ▶ membránový filtr DURAPORE (MILLIPORE) – hydrofilní, porozita 0,22  $\mu\text{m}$  2x
- ▶ **Kontrola sterility:** na agarových půdách/počet mikroorganismů při teplotě 21°C/72 hodin; 36°C/48 hodin.
- ▶ Rozdíl mezi toxicitou surové vody a filtrované vody
- ▶ surová voda - 5 000 řas/ml X 200 000 řas/ml ve vodě po filtraci → na filtrech mohou být zachyceny toxické i mutagenní látky.
- ▶ **Ames test - filtrovaná voda i extrakt z filtrů → negativní výsledek**

# Reprotoxicita

## Endokrinní disruptory

- ▶ Exogenní látky ovlivňující hormonální systém jedince → negativně ovlivňuje reprodukční, vývojové a behaviorální funkce organismu i jeho potomstva
- ▶ Chemické látky většinou s estrogením, androgenním a thyeroidním účinkem
- ▶ Yeast based reporter gene assays (YES/YAS methods)

kolorimetrický test pro identifikaci reakce s estrogen/androgen receptorem;  
kvasinkové kmeny GMO; testovaná látka se naváže na receptor  
▶ iniciace syntézy reportérového genu  $\beta$  – galaktosidázy ▶ **změna barvy**



# YES/YAS metody

## Yeast based reporter gene assays

Vzorek 250 x konc. v DMSO = 100%; koncentrace: 1%; 0,325 %; 0,1 %; 0,0325 %

- Reakce s estrogen receptorem pozitivní výsledek u vzorků H1,H2,H4
- Reakce s androgen receptorem pozitivní výsledek u vzorků H1,H4
- Byla prokázána existence endokrinních disruptorů ve vzorcích H1, H2, H4, ale vzhledem k ředění pouze v „podlimitních“ koncentracích.
- **Potencionální nebezpečí kumulace endokrinních disruptorů v přírodě**

# Toxicita OV ze zdravotnických zařízení

## Shrnutí

- ▶ **Komplexní vyhodnocení** ekotoxicity, genotoxicity a reprotoxicity u odpadních vod z vybraných zdravotnických zařízení
- ▶ Potvrdili jsme **ekotoxicitu** čišťených OV u 2 testovaných vzorků - H1 a H4
- ▶ Byla prokázána **existence endokrinních disruptorů** v odpadních vodách u vzorků H1, H2 a H4
- ▶ Vyhodnocení ekotoxicity vzorků Testem *Allium cepa* **nekoreluje** s ostatními ekotesty
- ▶ **Genotoxicita nebyla prokázána** ani u jednoho z testovaných vzorků (Ames test, Comet assay)
- ▶ Potvrdili jsme, že je významný **rozdíl mezi toxicitou surové vody a toxicitou vody zpracované filtrací**

# Toxicita OV ze zdravotnických zařízení

## Shrnutí a cíle

- ▶ Zpracování metodiky pro **optimální úpravu odpadní vody** (filtrace, centrifugace, absorpce na pevný sorbent) pro zkoušku genotoxicity Ames testem
- ▶ Návrh testovací strategie pro stanovení toxicity odpadních vod ze zdravotnických zařízení pomocí **souboru biologických testů *in vitro* a *in vivo***
- ▶ Získaná data a informace nabídnout jako možné **podklady pro vypracování metodických** pokynů, dozor a opatření a v oblasti sledování ekotoxicity odpadních vod.

# Toxicita OV ze zdravotnických zařízení

## Shrnutí

- ▶ Hlavním problémem je nedostatečná znalost kvality vyčištěných nemocničních odpadních vod vypouštěných do kanalizace nebo povrchových vod. V naší studii jsme chtěli zdůraznit nutnost řešit tuto otázku v rámci České republiky
- ▶ Nedostatečnost procesů čištění odpadních vod v nemocnicích.
- ▶ Je možné doporučit rozsáhlejší studii včetně návrhu na zlepšení úpravy nemocničních odpadních vod v České republice s cílem snížit vypouštění toxických látek do kanalizace a přispět tak ke zlepšení životního prostředí.

# Děkuji vám za pozornost

Gabriela Jírová

[gabriela.jirova@szu.cz](mailto:gabriela.jirova@szu.cz)

Centrum zdraví a životního prostředí SZÚ

