

# Genotoxicita odpadních vod ze zdravotnických zařízení

Vlková A., Jírová G., Wittlerová M., Kejlová K.,  
Wittlingerová Z., Zimová M.,

Česká zemědělská univerzita Praha  
Státní zdravotní ústav Praha  
Univerzita Karlova Praha



# Současný stav řešené problematiky

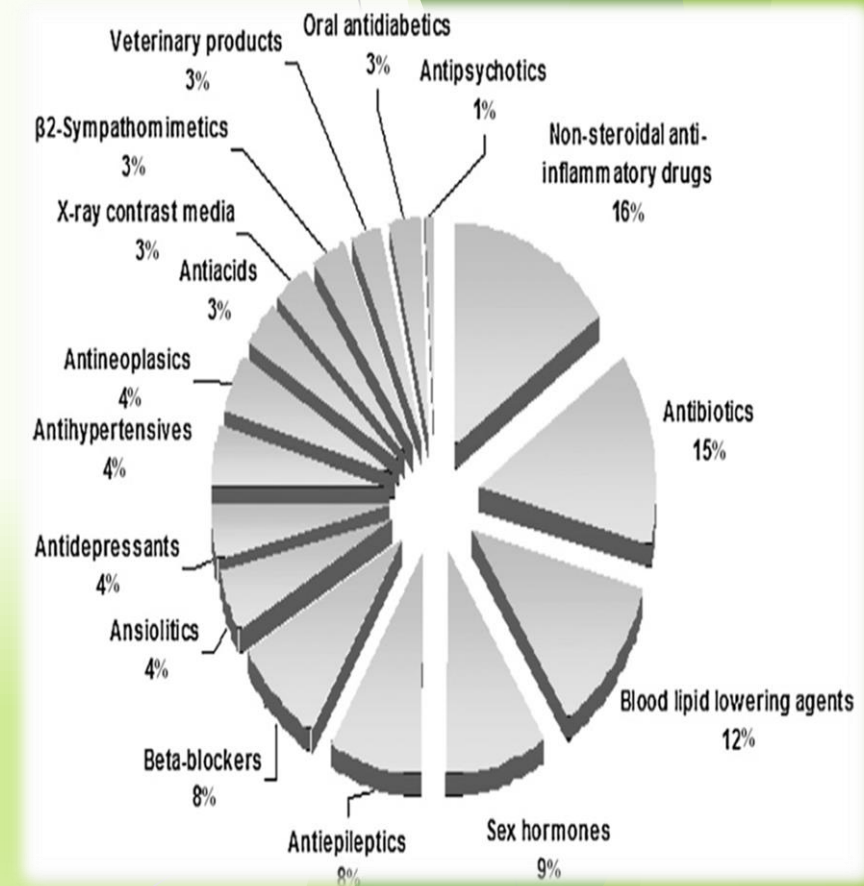
- ▶ Zdravotnická zařízení (humánní i veterinární) používají širokou škálu chemických látek pro diagnostické, léčebné, dezinfekční nebo výzkumné účely, které vstupují do odpadní vody- např. léčiva, dezinfekční přípravky, těžké kovy, prvky vzácných zemin, jodované rentgenové kontrastní látky.
- ▶ **Konvenčními metodami čištění v čističkách odpadních vod (ČOV) nelze toto znečištění odstranit**
- ▶ Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení je legislativně a metodicky zcela nedostatečné a problematické. Existuje pouze jedna norma (ČSN 75 6406), která řeší tekutý odpad z hlediska infekčního a radioaktivního.
- ▶ Standardně jsou prováděné převážně chemické analýzy odpadních vod, které ale neposkytují reálnou informaci o dopadu toxických účinků na ekosystémy vodního prostředí. Biologické testy jsou proto nezbytné pro monitoring nebezpečnosti odpadních vod.
- ▶ Studie, která by zjišťovala **genotoxicitu nebo reprotoxicitu**, zatím nebyla v ČR provedena,

# Zdroje toxicity

## Léčiva



- ▶ Existuje asi cca 3500 rozdílných účinných látek používaných v humánní a veterinární medicíně v Evropě
- ▶ V ČR bylo vydáno do zdravotnických zařízení **262 mil balení LP**
- ▶ Tyto látky jsou biokumulativní a často velmi perzistentní
- ▶ Biodegradabilita látek (fotodegradabilita, oxidace) závisí na typu látky
- ▶ **Tyto látky jsou účinné při velmi malých koncentracích ng/l - µg/l**
- ▶ Účinnost eliminace ČOV je 10% - 90%
- ▶ Cytostatika a onkologické léky mají vlastní mutagenní účinky



# Zdroje toxicity

## Dezinfekční látky

- ▶ Chemické dezinfekce (chlorování) → vznik nežádoucích látek - karboxylové kyseliny, nehalogenované a halogenové aldehydy, furanony (karcinogeny I.skupiny IARC)
- ▶ Během chlorace reaguje chlór s organickými látkami v OV a vznikají vedlejší produkty chlorace (600 látek) - trihalometan, chloroform, trichlorethen, heptachlor a chlorbenzen → mutagenní, karcinogenní a toxické
- ▶ Studie (2017) - srovnání 6 různých způsobů dezinfekce - nejvíce genotoxické (Umu test; Ames test) - samotná chlorace a chlorace s UV



# Zdroje toxicity

## Radioaktivní látky a kovy

- ▶ Více než 50% celkových emisí rtuti pochází ze zubního amalgámu a zdravotnických prostředků
- ▶ Rtuť se nachází v diagnostických látkách (Thimerosal), dezinfekci (Merbromin), diuretikách a zdravotnických přístrojích (tonometr, teploměr)
- ▶ Cis-platina je široce používaná cytostatická látka, klasifikovaná jako karcinogenní I. skupina (IARC)
- ▶ Pacienti podstupující radioterapii uvolňují **radioaktivní izotopy** prostřednictvím svých exkrementů
- ▶ Hlavním problémem je **jód 131**, ale detekce tohoto radioizotopu v odpadní vodě je nižší než přípustný limit (ICRP) International Commission on Radiological Protection





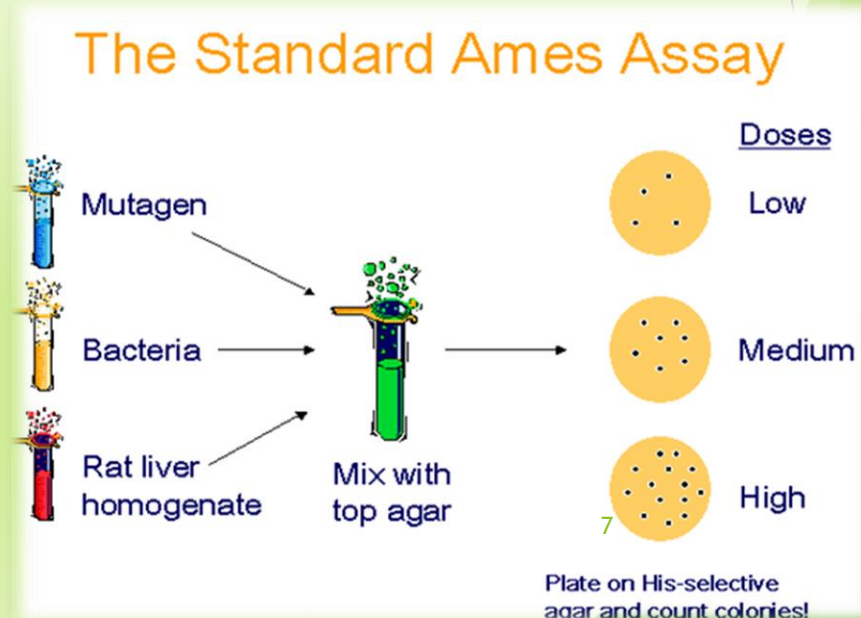
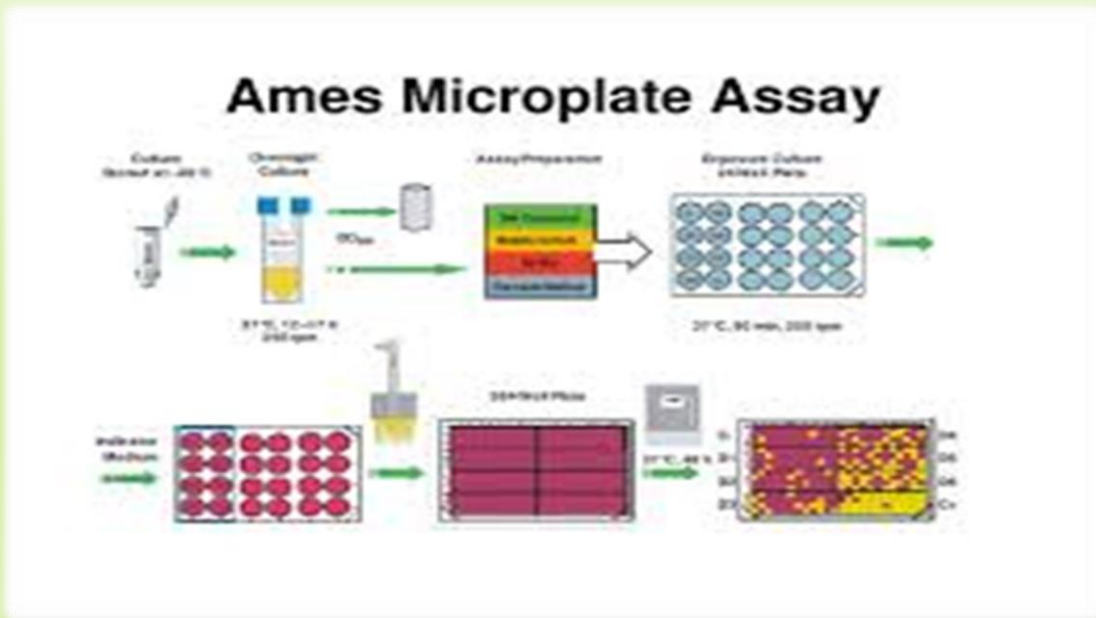
# Shrnutí studií týkajících se genotoxicity odpadních vod

Genotoxicity studies	Country	Number of samples	Genotoxicity response %	Bioassay
Giuliani et al. (1996)	Switzerland	851	13 %	Umu C test
Steger-Hartmann(1997)	Switzerland	6	50 %	Umu C test
Hartmann et al. (1999)	Germany	25	56 % *	Ames test, Chromosomal aberration test, Umu C test
Jolibois et al. (2003)	France	18	55 % *	Ames fluct.test, SOS chromotest
Jolibois & Guerbert (2005)	France	71	65 % *	Ames fluct.test, SOS chromotest
Jolibois & Guerbert (2006)	France	38	82 % *	Ames fluct.test, SOS chromotest
Jolibois & Guerbert (2006)	France	14	93 % *	Ames fluct.test, SOS chromotest
Ferk et al. (2009)	Austria	3**	0 % - Ames 100 % - Comet	Ames test, Comet assay
Gupta et al. (2009)	India	6**	100 %	Ames test
Bagatiny et al. (2009)	Brazil	10**	100 %	Test Allium cepa
Atasoy et al. (2012)	Turkey	108	56 %	Ames test
Sharma et al. (2013)	India	20**	100 %	Ames test, Saccharomyces cerevisiae test
Magdaleno et al. (2014)	Argentina	20**	40 %	Test Allium cepa
Gupta et al. (2014)	India	15	100 %	Ames test
Kern et al. (2015)	Brazil	1	100 %	Test Allium cepa
Sharma et al. (2015)	India	12**	100 %	Ames fluct. test, SOS chromotest

# Ames Test

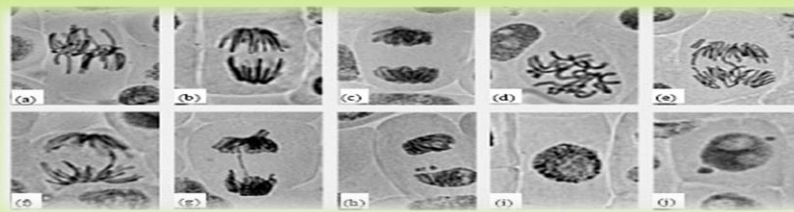
## Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi (OECD TG471)

- ▶ 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 ukazuje mutagenní účinek látky (standard), změna barvy AFT



# Test *Allium cepa*

- ▶ *Allium cepa* test používá pro hodnocení toxicity cibule druh *Allium cepa*.
- ▶ Buňky na konci kořene poskytují výhodný systém pro hodnocení:
- ▶ **Ekotoxické parametry** - hodnocení míry růstu, hodnoty  $EC_{50}$
- ▶ **Genotoxické parametry** - mitotický index, chromosomální aberace, přítomnost mikrojadern
- ▶ **Výhody** - relativní jednoduchost, citlivost ke genetickému poškození, 16 chromozomů  
nízká cena experimentu, malé množství testovaného vzorku,
- ▶ **Nevýhoda** - časová náročnost vyhodnocení genotoxických parametrů mikroskopem  
(např. Mitotický index - 1 vzorek - 1000 až 2000 buněk)
- ▶ Buňky produkují důležité rostlinné aktivační enzymy ▶ výsledky z testu na *Allium cepa* jsou v dobré shodě s výsledky z jiných testovacích systémů využívajících eukaryotických i prokaryotických buněk.
- ▶ Metoda hodnocení chromosomálních aberací používající kořeny *Allium cepa* je doporučována jako účinný test pro analýzu a monitorování **genotoxicity látek** v životním prostředí v rámci International Program on Chemical Safety (IPCS).

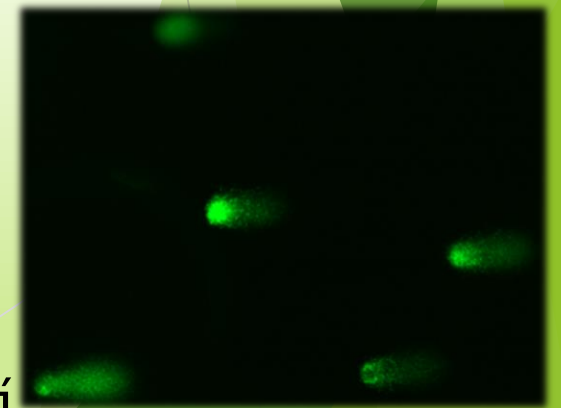
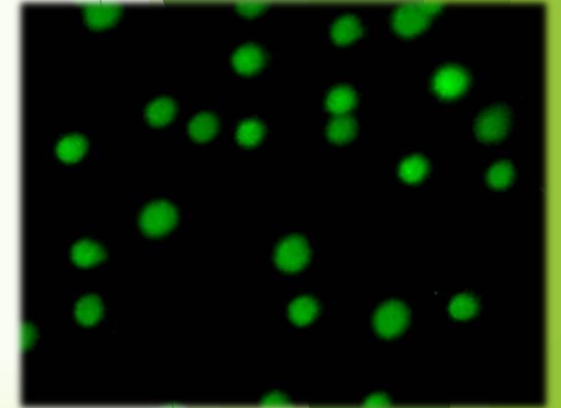




# Kometový test (Comet assay)

jednobuněčná gelová elektroforéza (SCGE; single cell gel electrophoresis)

- ▶ Metoda testuje mutagenní účinky látek analýzou zlomů DNA
- ▶ Jádra buněk (např. kostní dřeně) převedeme do gelu a případné fragmenty uvolníme z jader pomocí elektroforézy
- ▶ Následně obarvíme jádra fluoreskující látkou a hodnotíme mikroskopem
- ▶ Fragmenty jaderné DNA, vzniklé působením mutagenních faktorů, mají tendenci vycestovat z jader a po vizualizaci vidíme jako „kometry“
- ▶ Výhoda metody: sleduje se aktuální stav poškozené DNA ještě před reparací



# Toxicita OV ze zdravotnických zařízení

## Shrnutí a cíle

- ▶ Z dostupných studií je zřejmé, že odpadní vody ze zdrav. zařízení vykazují genotoxické účinky
- ▶ Vyhodnocení rizika těchto odpadních vod je obtížné - nízké koncentrace látek, chemické analytické metody nehodnotí synergické účinky směsí.....
- ▶ Návrh testovací strategie pro stanovení toxicity odpadních vod ze zdravotnických zařízení pomocí **souboru biologických testů *in vitro* a *in vivo***
- ▶ Zpracování metodiky pro optimální úpravu odpadní vody (filtrace, centrifugace, absorpce na pevný sorbent) pro toxikologické zkoušky *in vitro* a především pro zkoušku genotoxicity Ames testem
- ▶ Získaná data a informace nabídnout jako možné **podklady pro vypracování metodických pokynů, limitů, dozor a opatření** a v oblasti sledování odpadních vod

# Děkuji Vám za pozornost

Alena Vlková  
[alena.vlkova@szu.cz](mailto:alena.vlkova@szu.cz)



Metoda hodnocení chromozomálních aberací používající kořeny *Allium cepa* je doporučována jako účinný test pro analýzu a monitorování **genotoxicity** látek v životním prostředí v rámci **International Program on Chemical Safety (IPCS)**.

# Toxicita OV ze zdravotnických zařízení

## Shrnutí

- ▶ **Komplexní vyhodnocení** ekotoxicity , včetně genotoxicity a reprotoxicity u odpadních vod z vybraných zdravotnických zařízení, sledování dynamiky toxicity v různých časových periodách
- ▶ 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
- ▶ Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v týdenní dynamice ekotoxicity OV, nicméně ekotoxicita v květnu byla vyšší než v listopadu
- ▶ 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



# Charakteristika nemocnic

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

	H1	H2	H3	H4	H5
Sizing (beds)	2189	996	245	476	1 375
Wastewater treatment process	mechanical - biological	mechanical - biological	mechanical - biological	mechanical - biological	mechanical - biological
Wastewater generation (m3/d)	50 -100	51	124	10*	250
Disinfection process	NaClO	NaClO	NaClO	Cl <sub>2</sub>	Cl <sub>2</sub>
Wastewater discharges	urban sewar system	urban sewar system	Novoveský stream	urban sewar system	urban sewar system

\* čistička pouze pro část nemocnice



# Biodegradabilita toxických látek v OV

## Degradace a sorpce



### ► Záleží na chemické podstatě látek

► **Fotodegradace** - fotochemickou degradaci fotolýzou (sorpce slunečního záření molekulou léčiva) dochází k rozpadu na jednodušší látky - hlavní mechanismus k odstranění farmak

► **Biodegradace** - organické látky jsou rozkládány až na jednoduché anorganické sloučeniny uhlíku, dusíku, fosforu a síry; v ČOV se tento proces uplatňuje díky mikrobiální aktivitě aktivovaného kalu; vzhledem k nízkým koncentracím reziduí léčiv nedochází k úplné degradaci (stáří kalu, pH....)

► **Chemická oxidace** - tvorba silných oxidačních činidel ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_3$ ) během čištění a jejich následná reakce s přítomnými polutanty (podobná fotodegradaci), neboť probíhá rovněž radikálově. Výhodné je použití této techniky u již vyčištěné vody, tj. na odtoku do recipientu, kde díky ozonizaci dochází navíc k dezinfekci

# Plán vzorkování

- ▶ **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
- ▶ **Požadavky na ostatní informace:** průběh přítoku odpadní vody →  
→ informace získány od provozovatele ČOV
- ▶ **Doprava:** autem v chladících boxech do 1 hodiny od ukončení vzorkování
- ▶ **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.  $25^{\circ}\text{C}$



# Biodegradabilita toxických látek v OV

- ▶ **Sorpce** - sorpce na aktivovaný kal nebo sediment (adsorpce; absorpce); mechanismus se uplatňuje v ČOV
- ▶ **Membránové metody** - mikrofiltrace nebo ultrafiltrace; sorpční vlastnosti membrán prokazují vysokou účinnost při odstraňování estrogenních hormonů, nejsou však schopny zachytit většinu ostatních skupin léčiv, pro jejichž účinnou separaci je **nutné použít nanofiltraci nebo reverzní osmózu**
- ▶ **Aktivní uhlí** - používá se k zachycení organických polutantů zejména nepolárního charakteru. Výhoda této metody spočívá v tom, že při ní nevznikají žádné vedlejší produkty. K oxidační degradaci látek dochází při vystavení adsorbentu teplotě převyšující 650 °C
- ▶ **Fytoremediace, kořenové čističky** - dochází k precipitaci nebo k absorpci přímo v kořenech rostlin (orobinec, různé druhy řas). Používá se k odstranění **těžkých kovů, hydrofobních organických látek nebo radionuklidů**





# Charakteristika odebraných vzorků

Parameter	Unit	H1	H2	H3	H4	H5
Temperature	°C	6,5	6,5	13	4	6
pH		7,91	7,51	7,88	7,65	8
Conductivity	μS/cm	1 163	869	979	811	23 800
Dissolved substances	mg/l	580	532	707	465	1 970
Free chlorine (0,3)	mg/l	0,04	0,08	0,2	0,08	0,14
Total chlorine	mg/l	0,06	0,53	0,42	>6	2,09
Hg (1)	μg/l	1,48	0,5	<0,3	0,52	0,47
Ag (50)	μg/l	0,58	0,09	0,04	0,15	0,92
Gd	μg/l	1,55	2,75	0,15	5,01	1,51
Pt	μg/l	0,17	0,05	0,45	0,11	0,13
Pb (10)	μg/l	0,35	0,58	0,19	0,7	0,42
I	μg/l	130	1 577	86	1 390	183
Al (0,2)	mg/l	3,71	1,82	1,33	2	2,37

- **Konduktivita (vodivost)** - míra koncentrace elektrolytů ve vodě → nepřímo udává obsah minerálních látek z podloží (od 600 μS/cm - negativně a od 1300 μS/cm silně negativně působení na organismy; Ø pitných vod 40mS/l; 125mS/m = 1000mg/l)
- prvky ve vodě byly stanoveny hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP - MS)



# Zvolené biologické zkoušky toxicity OV

## ▶ Ekotoxicita

- ▶ Zkouška na luminiscenčních bakteriích *Vibrio 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)
- ▶ Kometový test (Comet assay)




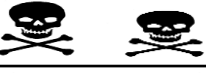

## ▶ Reprotoxicita

- ▶ YES/YAS metody - Yeast Based Reporter Gene Assays (draft ISO 190 40)<sup>9</sup>

# Ekotoxicita

- ▶ 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>;LC<sub>50</sub>;IC<sub>50</sub>
- ▶ **Čím je hodnota EC<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub> nebo IC<sub>50</sub> nižší, tím vyvolává hodnocená látka negativní účinek při nižší koncentraci → VYŠŠÍ TOXICITA!!!!**
- ▶ Výpočet TU (toxic unit):
- ▶ (Perssone et al. 2003)

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

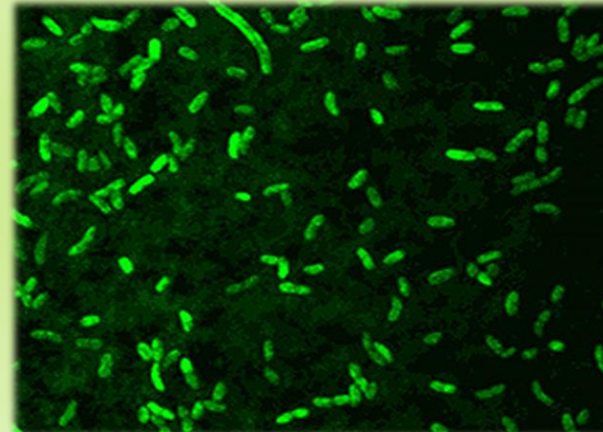
TU (Toxic Unit)		Toxicity	Symbol
< 0,4	Class I	No acute toxicity	
0,4 < TU < 1	Class II	Slight acute toxicity	
1 < TU < 10	Class III	Acute toxicity	
10 < TU < 100	Class IV	High acute toxicity	
TU < 100	Class V	Very high acute toxicity	

# Legislativa OV

- ▶ **V Evropě nebylo dosud přijato žádné specifické nařízení nebo směrnice pro nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení**
- ▶ Vodní rámcová směrnice (Water Framework Directive - WFD 2000/60/EC), zavazuje státy EU dosáhnout dobrého kvalitativního a kvantitativního stavu vnitrozemských povrchových vod, pobřežních vod a podzemních vod do roku 2015
- ▶ Do 22. 12. 2003 členské státy EU jsou povinny transponovat do svých předpisů
- ▶ Zákon č. 254/2001 Sb. **Vodní zákon**
- ▶ Zákon č. 274/2001 Sb. **Zákon o vodovodech a kanalizaci**
- ▶ Zákon č. 258/2000 Sb. **O ochraně veřejného zdraví**
- ▶ Odpadní vody nejsou řešeny v zákoně o odpadech - č. 185/2001 Sb.
- ▶ Členské státy EU by měly sledovat **45 prioritních nebezpečných látek (žádné léčivo);** do r.2017 navrhnout opatření
- ▶ Legislativa a normy týkající se ČOV v ČR obsahuje: 5 zákonů; 1 nařízení; 39 norem ČSN EN; 37 ČSN; 22 TNV
- ▶ **Neexistuje norma pro posouzení ekotoxicity ani genotoxicity OV ze zdravotnických zařízení**
- ▶ **ČSN EN 12255 - 14 (75 6406)** dezinfekce a radioaktivita (z r.1996); Zákon č. 263/2016 - Atomový zákon
- ▶ Norma EN pro endokrinní disruptory v OV (duben/2018 ?????) **ISO 19040 Series:** Determination of the estrogenic potential of water and waste water.

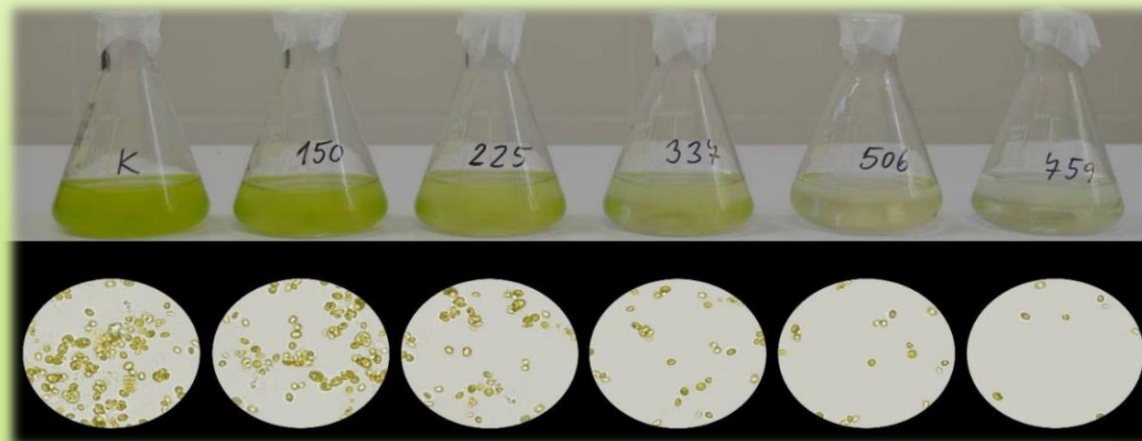
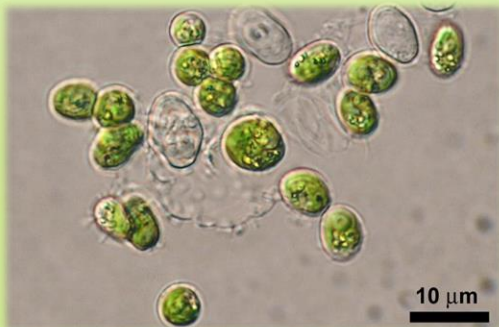
# Zkouška na luminiscenčních bakteriích *Vibrio fischeri* (ČSN EN ISO 11348-2)

- ▶ Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi mořské bakterie *Vibrio fischeri*
- ▶ *Test byl* proveden na nefiltrované odpadní vodě
- ▶ Měří se snížení luminiscence v koncentrační řadě
- ▶ Odečet luminiscence je prováděn po 15min. a 30min.
- ▶ Výsledkem je koncentrace dané látky, která způsobí 50% inhibici luminiscence za 72 hod →  $EC_{50}$  [%] / TU



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

- ▶ Tato norma určuje metodu stanovení inhibice růstu jednobuněčných zelených řas látkami a směsmi obsaženými ve vodě nebo odpadní vodou
- ▶ Stanovení koncentrace ( $EC_{50}$ ), která způsobí 50% inhibici specifické růstové rychlosti
- ▶ Inkubace při 25 °C / 72 hod.





# Cíl studie

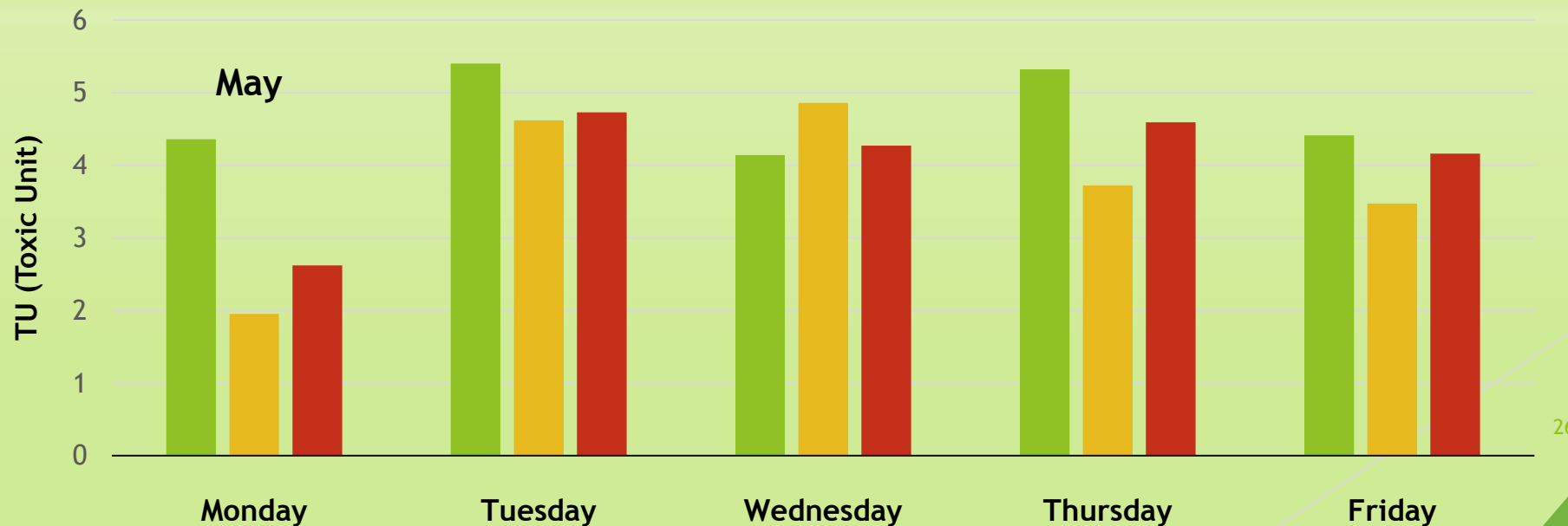
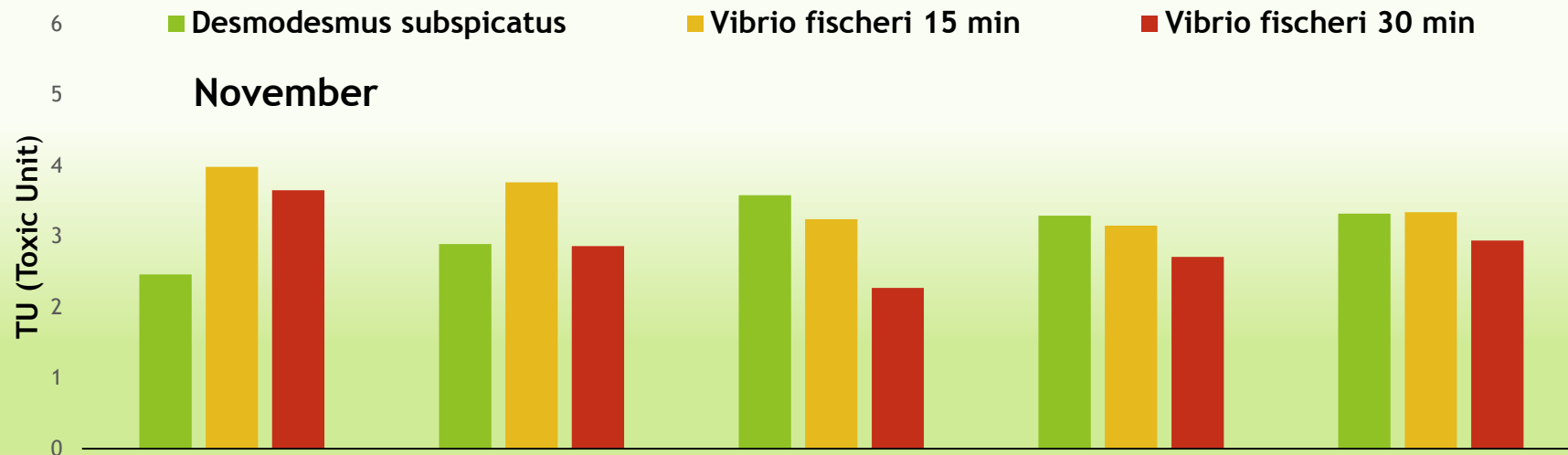
- ▶ Studie toxicity odpadních vod (OV) je pro komplexní posouzení **možného negativního vlivu** tekutého odpadu ze zdravotnických zařízení na životní prostředí a zdraví lidí.
- ▶ Sledování dynamiky toxicity OV v různých časových periodách
- ▶ Ekotoxicita - toxické působení látek na živé organismy a ekosystémy
- ▶ Genotoxicita - vliv negativních faktorů na genetický aparát buňky (mutagenese, karcinogenese, teratogenese)
- ▶ Reprotoxicita - toxické působení látek na reprodukční funkci, embryonální morfologii (teratogenitu) a na prenatální a raně postnatální vývoj

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

- ▶ Vodní korýš *Daphnia magna* Straus se inkubuje 24h až 48h v ředící vodě, která obsahuje koncentrační řadu zkoušeného vzorku
- ▶ Inkubace probíhá při teplotě  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  a denní fotoperiodě 16h
- ▶ Poté se spočítají pohybliví jedinci
- ▶ Určení 24h  $\text{EC}_{50}$  nebo 48h  $\text{EC}_{50}$ , tj. koncentrace, která za 24 nebo 48 hodin imobilizuje 50% jedinců *Daphnia magna*, vystavených podmínkám zkoušky



# Srovnání týdenní dynamiky ekotoxicity OV (H1)



# Vyhodnocení ekotoxicity (H1-H5)

Hospital		<i>Desmodesmus subspicatus</i>	<i>Vibrio fischeri</i> 15 min	<i>Vibrio fischeri</i> 30 min	<i>Daphnia magna</i> 24 h	<i>Daphnia magna</i> 48 h	<i>Allium cepa</i>
<b>H1</b>	EC <sub>50</sub> [%]	25,3	42,6	28,9	67,6	61,3	ND
	TU	3,95	2,35	3,46	1,48	1,63	0
	toxicity class	III - toxic	III - toxic	III - toxic	III - toxic	III - toxic	I - non toxic
<b>H2</b>	EC <sub>50</sub> [%]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	TU	0	0	0	0	0	0
	toxicity class	I - non toxic	I - non toxic	I - non toxic	I - non toxic	I - non toxic	I - non toxic
<b>H3</b>	EC <sub>50</sub> [%]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	TU	0	0	0	0	0	0
	toxicity class	I - non toxic	I - non toxic	I - non toxic	I - non toxic	I - non toxic	I - non toxic
<b>H4</b>	EC <sub>50</sub> [%]	35,3	43,1	41,3	39,3	24,3	ND
	TU	2,83	2,32	2,42	2,54	4,12	0
	toxicity class	III - toxic	III - toxic	III - toxic	III - toxic	III - toxic	I - non toxic
<b>H5</b>	EC <sub>50</sub> [%]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	TU	0	0	0	0	0	0
	toxicity class	I - non toxic	I - non toxic	I - non toxic	I - non toxic	I - non toxic	I - non toxic

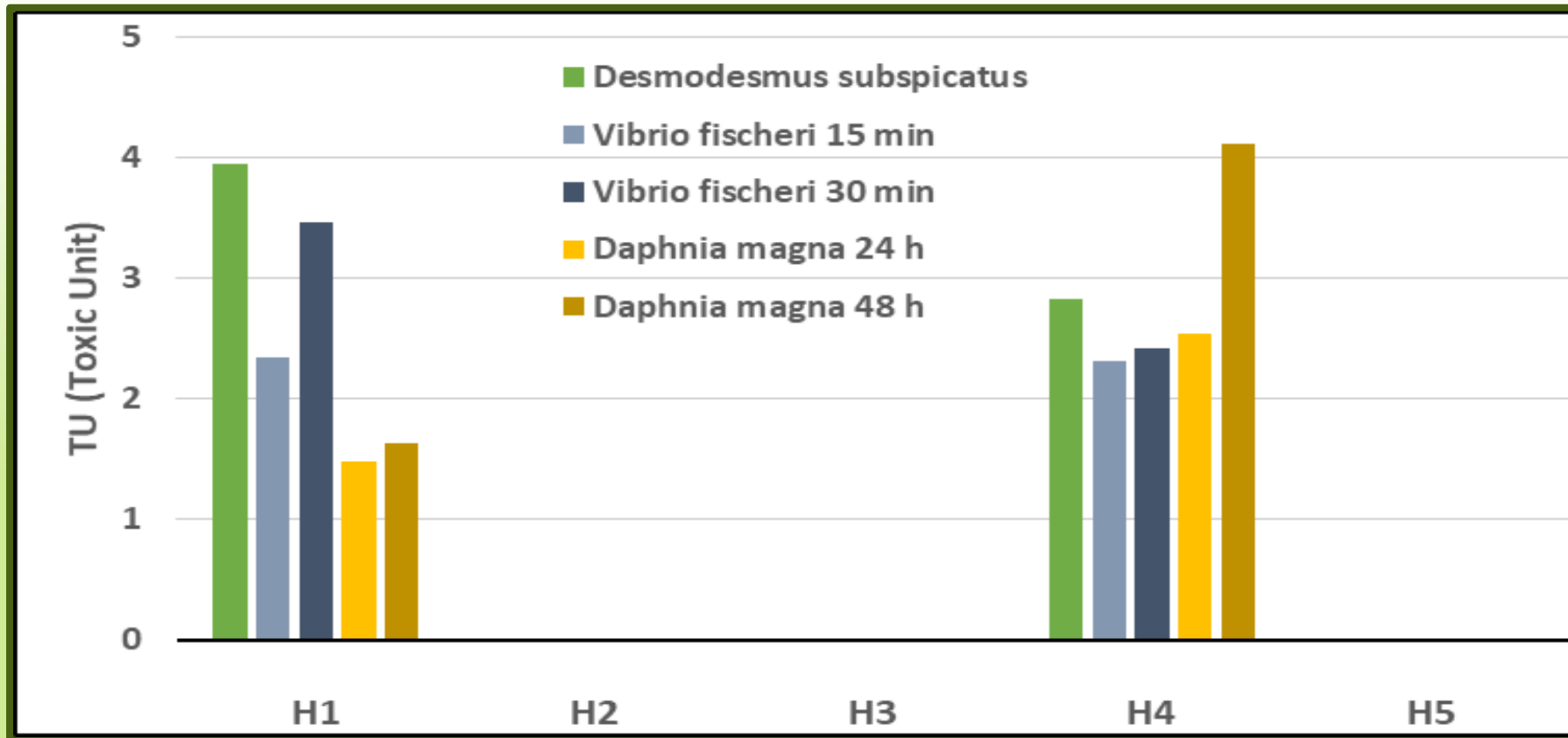
ND (not detected) - < 50 % inhibition in the undiluted sample

# 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<sup>0</sup>C/72 hodin; 36<sup>0</sup>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.
- ▶ Provedena analýza filtru a filtrované vody pomocí ICP- MS
- ▶ Test Allium cepa - prokázal genetický potenciál filtrované vody
- ▶ Extrakt použitých inertních filtrů v DMSO/ 24hod; 2hod třepáno / 100 kmitů
- ▶ **Ames test - filtrovaná voda i extrakt z filtrů → negativní výsledek**



# Vyhodnocení ekotoxicity (H1-H5)



# Plán vzorkování

- ▶ **Cíl vzorkování:** odběr vzorků odpadní vody z ČOV u pěti nemocnic H1-H5
- ▶ **Druh vzorku:** splaškové odpadní vody předčištěné v biologické čistírně a dezinfikované chlornanem sodným nebo plynným chlórem
- ▶ **Místo odběru:** na odtoku z ČOV
- ▶ **Datum odběru:**
  - ▶ **2 týdenní cykly v nemocnici H1: 11/2016; 5/2017**
  - ▶ **5 jednodenních odběrů v nemocnicích H1- H5 - 2/2018**
- ▶ **Čas odběru:** 9:00 - 13:00 (doba nejvyššího přítoku infekčních splaškových vod); v hodinových intervalech
- ▶ **Způsob vzorkování:** ruční vzorkovače do PP kádinky 1000 ml.
- ▶ **Vzorkovnice:** PE kanystr o objemu 10 litrů (prohlášení na výrobky pro styk s potravinami)



# Reprotoxita

## 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
- ▶ Pesticidy, insekticidy (endosulfan), chemikálie vaření a hoření (dioxiny, PAU), **farmaceutika (ATB, antikoncepce..)**, plasty (bisfenol A), rostlinné metabolity.....
- ▶ **Způsobující:**  
Narušení vývoje a sex.diferenciaci, poruchy, rozmnožování, ▲ výskyt hormonálně závislých nádorů (CA prostaty, prsu), neurologické poruchy, (ADHD) u dětí, autoimunní choroba (Crohnova ch.)

### Yeast based reporter gene assays (YES/YAS methods)

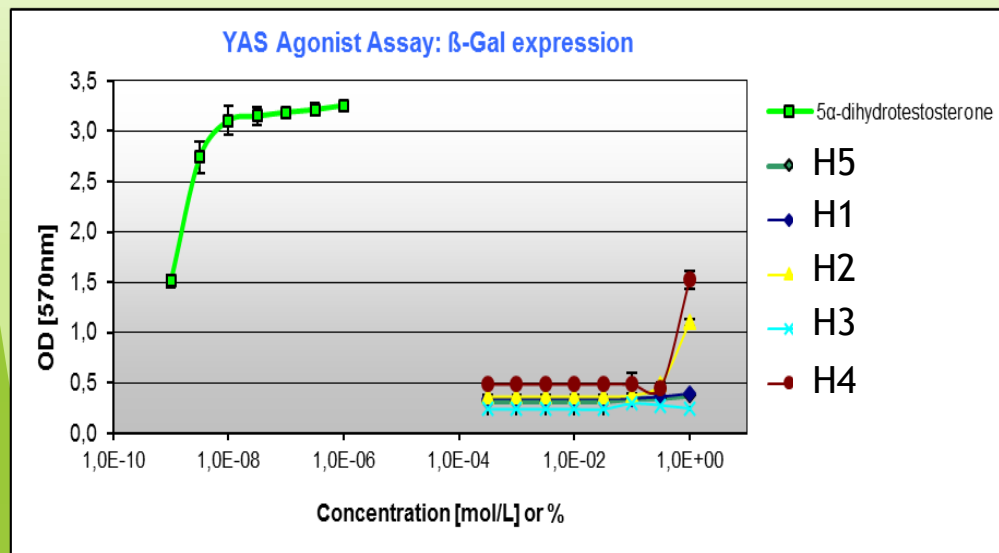
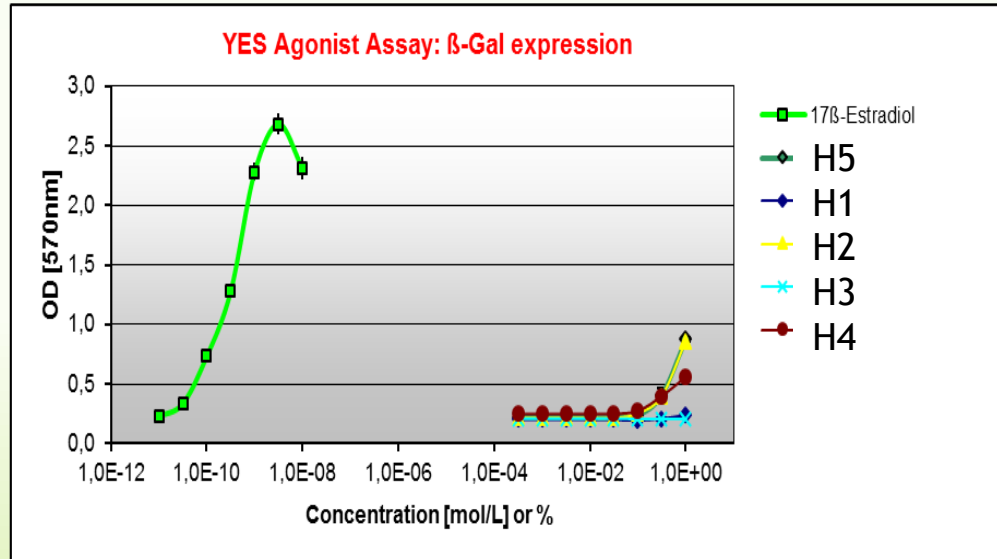
kolorimetrický test pro identifikaci reakce s estrogen/androgen receptorem; kvasinkové kmény GMO; testovaná látka se naváže na receptor  
▶ iniciace syntézy reportérového genu  $\beta$  - galaktosidázy ▶ **změna barvy**

31



# 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**

# Metody používané ve studii

**Tab.3.** Characteristics of bioassays used in the study

Method	Organism	Standard	Sample preparation	Biological parameter and exposure time	End point
Water Algal Inhibition Test	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	EN ISO 8692	non filtered	growth inhibition 72 h	EC <sub>50</sub> [%] / TU
Luminescent Bacteria Test	<i>Vibrio fischeri</i>	EN ISO 11348-2	non filtered	bioluminescence inhibition 15 min, 30 min	EC <sub>50</sub> [%] / TU
Crustacean Immobilization Test	<i>Daphnia magna</i>	EN ISO 6341	non filtered	mobility inhibition 48 h	EC <sub>50</sub> [%] / TU
<i>Allium cepa</i> Assay	<i>Allium cepa</i>		non filtered	inhibition of root elongation 72 h	EC <sub>50</sub> [%] / TU
Bacterial Reverse Mutation Test (Ames Agar Plate Test)	<i>Salmonella typhimurium</i>	OECD TG 471	filtered	number of revertants 72 h	qualitative determination
Comet Assay single-cell gel electrophoresis			filtered	% DNA in Tail 24 h	qualitative determination
YES/YAS-Yeast Based Reporter Gene Assays	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	in compliance with Draft ISO 190 40	non filtered concentrated	β-gal expression 48 h	qualitative determination