

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta životního prostředí**

**Katedra aplikované ekologie**



## **Stanovení genotoxicity v odpadních vodách**

DISERTAČNÍ PRÁCE typu "SOUBOR PRACÍ"

Autor: Mgr. Alena Vlková

Obor: Aplikovaná a krajinná ekologie

Školitel: prof. Ing. Zdeňka Wittlingerová, CSc.

Konzultant: MUDr. Magdalena Zimová, CSc.

2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Stanovení genotoxicity v odpadních vodách“ vypracovala pod vedením školitele samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato disertační práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Praha, listopad 2021

.....

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování MUDr. Magdaleně Zimové, CSc. za odbornou pomoc a cenné rady při vedení mé disertační práce. Rovněž bych chtěla poděkovat prof. Ing. Zdeňce Wittlingerové, CSc. za podporu a odborné vedení při studiu. Dále bych ráda poděkovala týmu pracovníků Centra toxikologie a zdravotní bezpečnosti a týmu pracovníků z Národní referenční laboratoře půdy a odpadů Státního zdravotního ústavu v Praze za ochotu a trpělivost při spolupráci a za předání cenných zkušeností. Jmenovitě děkuji Ing. Martině Wittlerové a RNDr. Stanislavu Janouškovi za pomoc při analýzách vzorků a poskytnutí odborných zkušeností.

Praha, 2021

## **Abstrakt**

V posledních letech získala otázka kvality vody strategický význam, a to jak v Evropské unii, tak celosvětově. Současným prvořadým úkolem je účinně chránit vodní ekosystémy, zachovat jejich dobrý stav a omezit negativní dopady na životní prostředí a lidské zdraví.

Zdravotnická zařízení a především nemocnice produkují významné množství odpadních vod zatížených komplexními směsmi toxických chemických látek nebo jejich metabolitů, přičemž některé z nich mají prokázané genotoxické účinky (např. cytostatika, dezinfekční prostředky, antibiotika apod.). Tyto antropogenní genotoxické látky přecházejí do životního prostředí a mohou indukovat změny v genetické informaci buněk. Chronická expozice nízkým dávkám těchto chemikálií může genotoxicky působit na úrovni populací a vést až ke změně genofondu znečištěného biotopu. U člověka může chronická expozice genotoxickým látkám zvýšit riziko vzniku rakoviny.

V současné době proto vzniká potřeba monitorování odpadních vod ze zdravotnických zařízení z hlediska jejich genotoxických účinků s ohledem na jejich potenciální zdravotní a ekologická rizika. Posouzení genotoxických účinků komplexních směsí je však velmi problematické, protože jedním testem nelze obsáhnout rozdílné koncové body potřebné ke kvalifikovanému odhadu genotoxického rizika a je nutné vždy volit více testů v kombinaci.

Cílem předkládané disertační práce je posoudit jednotlivé doporučované biologické testy pro stanovení genotoxického rizika odpadních vod na základě současných vědeckých poznatků a s ohledem na jejich vhodné kombinace a využití specificky u odpadních vod. Na základě výsledků dosažených v prezentované disertační práci byla navržena vhodná kombinace biologických testů. Výsledky disertační práce byly prezentovány na vybraných odborných vědeckých konferencích a publikovány v odborných vědeckých časopisech.

## **Klíčová slova**

genotoxicita, mutagenita, odpadní vody, zdravotnická zařízení, Ames test

## **Abstract**

Recently, water quality became a topic of strategic importance in the EU and worldwide. The current priority is effective protection of water ecosystems, maintenance of their welfare and decrease of negative impacts on the environment and human health.

Healthcare facilities and particularly hospitals produce significant amounts of wastewater loaded with complex mixtures of toxic chemicals or their metabolites, many of them with confirmed genotoxic effects (e.g. cytostatics, disinfectants, antibiotics). These anthropogenic genotoxic substances enter the environment and might induce changes of the genetic information in cells. Chronic exposure to low doses of these chemicals has genotoxic effects on the population level and leads to changes in the gene pool of the polluted biotope. Chronic exposure to genotoxic substances may increase the risk of cancer development in humans.

Consequently, the need for monitoring of wastewater produced by healthcare facilities is becoming more urgent, particularly with regard to potential health and ecological risks. However, the evaluation of genotoxicity of complex mixtures seems problematic, as one separate test cannot comprise all the different endpoints necessary for a qualified genotoxicity risk assessment and a battery of tests has to be employed in combination.

The aim of this thesis was to evaluate separate recommended biological tests for the assessment of genotoxicity risks associated with wastewater with regard to the current state of scientific knowledge, their feasible combinations and performance particularly in the field of wastewater analysis. Based on the results of this work, an applicable combination of biological tests has been proposed. The outcomes of this thesis were presented at scientific conferences and published in peer-reviewed journals.

## **Keywords**

genotoxicity, mutagenicity, wastewater, healthcare facility, Ames test

## OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE .....	4
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	6
3.1	Odpadní vody ze zdravotnických zařízení z hlediska genotoxicity.....	6
3.1.1	Obecná charakteristika.....	6
3.1.2	Chemické znečištění.....	7
3.1.3	Biologické znečištění .....	12
3.1.4	Rizikové prvky.....	14
3.2	Genotoxické látky a jejich působení.....	19
3.2.1	Karcinogenita.....	22
3.2.2	Teratogenita .....	23
3.3	Vybrané biotesty stanovení genotoxicity .....	24
3.3.1	Ames test .....	24
3.3.2	Comet test.....	26
3.3.3	Mikronukleový test .....	26
3.3.4	Test chromozomových aberací .....	27
3.3.5	Test <i>Allium cepa</i> .....	27
3.4	Technologicky pokročilé testy stanovení genotoxicity.....	28
3.4.1	Stanovení biomarkerů genotoxicity vysokokapacitním screeningem.....	28
3.4.2	Testování genotoxicity na 3D modelech.....	28
3.4.3	Stanovení genotoxicity <i>in silico</i> výpočetní metodou QSAR.....	29
3.5	Hodnocení genotoxicity odpadních vod ze zdravotnických zařízení.....	29
4	VLASTNÍ PRÁCE.....	33
5	KOMENTÁŘE K PUBLIKACÍM.....	34
5.1	Studie I .....	34
5.2	Studie II .....	40
5.3	Studie III.....	49
5.4	Studie IV.....	55
6	ZÁVĚR.....	61
7	SEZNAM LITERATURY.....	65
8	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	81
9	PŘÍLOHY.....	82

## Použité zkratky a symboly

AgNP	nanočástice stříbra
BCL-2	protoonkogen
bcl-2	protein regulující apoptózu
BRCA 1/2	tumor supresorový gen
ČOV	čistička odpadních vod
DBP	vedlejší produkty dezinfekce
DMSO	dimethylsulfoxid
DSB	dvouvláknové zlomy DNA
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky
EU	Evropská unie
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
ICP-MS	hmotnostní spektrofotometr s indukčně vázanou plazmou
MI	mutagenní index
MI <sup>m</sup>	mitotický index
NEK	normy environmentální kvality
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
OECD TG	pokyny pro testování chemikálií dle pokynů OECD
OV	odpadní vody
QSAR	zkratka pro kvantitativní vztah mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou
REE	prvky vzácných zemin
ROS	reaktivní formy kyslíku
SPE	extrakce na pevnou fázi
SSB	jednovláknové zlomy DNA
THM	trihalomethany - halogenové deriváty methanu
TP 53	tumor supresorový gen proteinu p53
WHO	Světová zdravotnická organizace
3T3 Balb/c	buněčná kultura myších embryonálních fibroblastů

# 1 ÚVOD

Pětinásobného růstu globální ekonomiky v posledních 50 letech bylo dosaženo do značné míry na úkor znečištění životního prostředí. Evropská komise si nyní uvědomuje naléhavost řešení změny klimatu, ztráty biologické diverzity a znečištění životního prostředí na globální úrovni, představující obrovská rizika pro zdraví lidí a ekosystému. EU proto aktuálně představila ambiciózní Akční plán „Vstříc nulovému znečištění ovzduší, vod a půdy“ (tzv. Zelená dohoda pro Evropu, „Green Deal“) s cílem dosáhnout do r. 2050 *„světa, v němž je znečištění sníženo na úroveň, která již není škodlivá pro zdraví lidí a přírodní ekosystémy“*. Jedním z hlavních cílů tohoto plánu je výrazné zlepšení kvality vod. Na úrovni EU byly již přijaty rozsáhlé právní předpisy a nařízení, jež mají zamezit znečištění a chránit kvalitu vod. Základním a zároveň zásadním právním předpisem Evropského parlamentu a Rady v oblasti vodní politiky je Vodní rámcová směrnice č. 2000/60/ES, která stanoví členským státům EU rámec pro ochranu povrchových, brakických, pobřežních a podzemních vod, který zajistí udržení a zlepšení vodního prostředí. Za účelem dosažení těchto cílů uložila směrnice všem státům EU vypracovat tzv. Plán povodí a jeho klíčovou součástí je i monitoring stavu vody v oblasti daného povodí. Dle konkrétních dat jsou volena opatření a investice do zlepšení stavu vod.

Mezi další důležité předpisy EU týkající se ochrany vod patří Směrnice o ochraně podzemních vod (EU 2006/118/EHS), Směrnice o pitné vodě (EU 98/83/ES), Směrnice o čištění městských odpadních vod (EU 91/271/ES) a Směrnice o normách environmentální kvality vod (EU 2008/105/ES). Nejen v rámci EU, ale i celosvětově nyní dochází k podpoře programů podporujících čistotu vody, která je pro lidskou společnost a zdraví člověka nezbytná (např. v rámci dohody „The Green New Deal“ v USA).

Jedním ze zdrojů znečištění vod jsou odpadní vody (OV) vzniklé antropogenní činností vypouštěné z čistíren odpadních vod (ČOV). Znečišťující látky v OV pocházejí z různých bodových zdrojů. Významným bodovým zdrojem znečištění jsou OV ze zdravotnických zařízení a zejména OV z nemocnic, které se svým specifickým složením velmi liší od OV z jiných zdrojů. Nemocniční OV je charakterizována přítomností široké škály nebezpečných znečišťujících látek, jako jsou např. farmaceutické látky a jejich metabolity, hormony, chemické látky, radioizotopy, těžké kovy, dezinfekce, mikrobiální patogeny atd. (WHO 2013, Beltifa et al. 2020, Achak et al. 2021, Khan et al. 2021, Majumerd et al. 2021). Ve vědeckých pracích různé skupiny kontaminantů a znečišťujících látek nebyly dosud terminologicky sjednoceny. Na úrovni EU jsou nejvíce používány termíny



mikropolutant a makropolutant a tyto výrazy budou rovněž použity v této práci.

Část nebezpečných sloučenin nacházejících se v nemocničních OV má prokázané genotoxické a cytotoxické účinky (Oliveira et al. 2017, Cevik et al. 2020). Jsou to především nové farmaceuticky aktivní látky, cytostatika, antidepresiva, antibiotika, protizánětlivé léky, vedlejší produkty dezinfekce, nanočástice a nově vyvíjené bioaktivní látky.

Karcinogenní, mutagenní nebo teratogenní toxikologické účinky vykazují obecně látky klasifikované jako CMR (Carcinogenic-Mutagenic-Reprotoxic). Mohou se vyskytovat v životním prostředí a zejména ve vodním ekosystému, kde mohou způsobit změny v genetické informaci vodních organismů s následnými nepříznivými účinky v dalších populacích. Genetické poškození může vést až k úplnému vymizení daného organismu ze znečištěného biotopu. Na základě informací Světové zdravotnické organizace (WHO) se mohou genotoxiny vyskytující se v životním prostředí podílet na zvýšeném výskytu nádorových onemocnění u člověka (WHO 2013, Gray et al. 2017, Beltifa et al. 2020).

Právní úpravou EU, podílející se na snížení a regulaci nebezpečných látek ve vodním prostředí obecně, je směrnice 2008/105/ES (viz níže). Bohužel, navzdory výše uvedeným legislativním nástrojům, se na úrovni EU dosud nepodařilo prosadit závaznou směrnici nebo pokyny, které by řešily specificky problematiku OV z nemocnic a dalších zdravotnických zařízení. S nemocničními OV je nakládáno v EU dvěma způsoby: v případě, že je dle právní úpravy daného státu nemocniční OV považována za průmyslovou (např. Španělsko, Francie), je nutná předběžná úprava a povinnost splnit regulační limity (např. chemické, fyzikální a mikrobiologické limity, pH, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, *Escherichia coli* apod.), na základě kterých dochází k vydání povolení před vypuštěním nemocniční OV do kanalizační sítě (EU 91/271/EHS). Pokud však je nemocniční OV legislativně považována v dané zemi za domácí nebo komunální OV (např. Německo), není před vypouštěním do kanalizační sítě nijak upravena (Cararo et al. 2016).

Směrnice 2008/105/ES řeší v EU snížení a regulaci nebezpečných látek ve vodním prostředí. Tato směrnice stanoví normy environmentální kvality (NEK) a limity koncentrací prioritních látek pro splnění podmínek dobrého chemického stavu povrchových vod. Aktuální seznam sledovaných prioritních látek pro monitorování v rámci celé Unie je uveden v prováděcím rozhodnutí Komise (EU) 2020/1161. V tomto seznamu jsou uvedeny vysoce toxické látky představující významné riziko pro vodní

prostředí. V pravidelně aktualizovaném seznamu byla v r. 2018 uvedena i první léčiva (např. amoxicilin a ciprofloxacin) a v aktualizaci v r. 2020 byla přidána další antibiotika (např. sulfomethoxazol, trimetropim), azolová léčiva (klotrimazol, flukonazol a mikonazol) nebo antidepresivum venlafaxin.

V České republice problematiku vypouštění OV z nemocnic upravuje pouze jedna norma - ČSN 75 6406, která se zabývá odváděním a čištěním OV ze zdravotnických zařízení. Tato norma platí pro zdravotnická zařízení produkující OV se zvýšeným obsahem rizikových chemických látek, léčiv, cytostatik, infekčních patogenů a radioaktivních látek. Pro zajištění bezpečnosti OV je velmi důležité v blízké budoucnosti zavést optimální strategii testování pro vyhodnocení genotoxického potenciálu, která bude využita pro pravidelný monitoring OV a bude podporována legislativou.

Správné a bezpečné nakládání s OV a zdravotnickým odpadem způsobem, který bude minimalizovat potenciální rizika pro zdraví lidí a životní prostředí, je pro složitost problematiky jednou z největších výzev zdravotnictví.

## 2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem předkládané disertační práce je vypracování a ověření návrhu baterie biologických testů vhodných pro specifické využití u OV a obecných doporučení vhodných pro stanovení genotoxického potenciálu OV ze zdravotnických zařízení.

Pro naplnění hlavního cíle disertační práce byly stanoveny následující dílčí kroky:

1/ Vypracování rešerše o využívaných přístupech biologického testování a monitoringu OV ze zdravotnických zařízení z hlediska posouzení genotoxických účinků.

2/ Stanovení genotoxicity OV se zaměřením na vybraná zdravotnická zařízení.

3/ Dlouhodobý monitoring a stanovení genotoxického účinku OV z vybraného zdravotnického zařízení za využití různých experimentálních přístupů.

4/ Porovnání různých preanalytických postupů využitelných pro přípravu vzorků OV určených pro sledování genotoxických účinků a doporučení nejvhodnějšího postupu.

5/ Zavedení nového, legislativně doporučovaného screeningového testu na stanovení genotoxicity OV a porovnání tohoto testu se standardizovanými validovanými testy.

6/ Doporučení konkrétní baterie biologických testů vhodných pro stanovení genotoxického potenciálu OV ze zdravotnických zařízení, které bude možné využít jako podklad pro normativní a legislativní doporučení.

Dílčí kroky byly řešeny v jednotlivých studiích v rámci souboru prací:

- I. **Vlkova A.**, Wittlingerova Z., Zimova M., Jirova G., Kejlova K., Janousek S., Jirova D., 2016: Genotoxicity of wastewater from health care facilities. *Neuro Endocrinol Lett.* 37 (1), 101-108.
- II. Jirova G., **Vlkova A.**, Wittlerova M., Dvorakova M., Kasparova L., Chrz J., Kejlova K., Wittlingerova Z., Zimova M. Hosikova B., Jiravova J., Kolarova H., 2018: Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different

bioassays. *Neuro Endocrinol Lett.* 39 (6), 441-453.

- III. Janousek S., **Vlkova A.**, Jirova G., Kejlova K., Krsek D., Jirova D., Kandarova H., Wittlingerova Z., Heinonen T., Mannerstrom M., Maly M., 2021: Qualitative and Quantitative Analysis of Certain Aspects of the Cytotoxic and Genotoxic Hazard of Hospital Wastewaters by Using a Range of In Vitro Assays. *Altern Lab Anim.* 49 (1-2), 33-48.
- IV. Wittlerova M., Jirova G., **Vlkova A.**, Kejlova K., Maly M., Heinonen T., Wittlingerova Z., Zimova M., 2020: Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos to Hospital Effluent Compared to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Physiol Res.* 69 (4), S681-S691.

### 3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

#### 3.1 Odpadní vody ze zdravotnických zařízení z hlediska genotoxicity

##### 3.1.1 Obecná charakteristika

Při poskytování zdravotní péče ve zdravotnických zařízeních je generováno velké množství OV. Nemocnice ve vyspělých zemích produkují 400 - 1200 litrů OV na lůžko za den, zatímco v rozvojových zemích je to 200 - 400 litrů OV na lůžko za den. Množství a charakter nemocničních OV jsou závislé na mnoha faktorech, především na velikosti nemocnice, geografické oblasti, na množství hospitalizovaných a ambulantních pacientů, počtu a typech oddělení, dostupného technického vybavení, rozsahu poskytovaných služeb (prádelna, kuchyň, klimatizace) a charakteru řízení nemocnice (Khan et al. 2021).

Z celkového počtu OV vzniklých činností v oblasti zdravotní péče patří téměř 80 % mezi běžné OV, které jsou srovnatelné s komunálními OV. Zbývajících přibližně 20 % OV je považováno za nebezpečné, které mohou být infekční, toxické nebo radioaktivní (Sharma et al. 2013). Některé koncentrace mikropolutantů (např. antibiotika, analgetika, těžké kovy) mohou být několikrát vyšší v nemocniční OV než v komunální OV. Obecně lze říci, že OV z nemocnic jsou 5 – 15x toxičtější než komunální OV. Tato vysoká úroveň toxicity je dána velkou variabilitou znečišťujících látek obsažených v nemocniční OV v důsledku výše uvedených faktorů (Carraro et al. 2016, Oliveira et al. 2017, Kumari et al. 2020).

WHO charakterizovala nemocniční OV podle činností do 3 kategorií:

- OV ze specializovaných činností, tzv. blackwater (černá voda) – operační sály, výzkumné a diagnostické laboratoře, radiologie a jiná specializovaná pracoviště, pohotovost a toalety z těchto oddělení.

Tyto OV obsahují nejvíce nebezpečných látek, patogenů, těžkých kovů, kontrastních látek, léčiv a jejich metabolitů, rtuti, sterilizačních a dezinfekčních prostředků.

- OV z provozních činností, tzv. greywater (šedá voda) – prádelny, kuchyně, technický provoz, klimatizační jednotky, doprava.

Tyto OV obsahují oleje, ropné produkty, především velký objem čisticích a dezinfekčních prostředků.

- Dešťová voda, tzv. stormwater (srážková voda) – nejsou to OV v pravém slova

smyslu, jde o srážkové vody shromážděné z nemocničních střech a ze zastavěných ploch v nemocnicích. Tyto vody mohou být použity pro zavlažování, splachování toalet nebo mít jiné alternativní využití (WHO 2013).

OV ze zdravotnických zařízení tvoří 0,2 - 2 % objemu komunálních OV. I přes tento relativně malý podíl se však významně podílejí na celkové koncentraci mikropolutantů v prostředí. Přibližně 1/3 léčiv v komunálních OV má původ v nemocničních OV (Beier et al. 2011, Chonova et al. 2017).

### **3.1.2 Chemické znečištění**

Mezi chemické látky často detekované v nemocničních OV patří farmaceuticky aktivní látky, dezinfekční prostředky, chemikálie z laboratoří, detergenty, rozpouštědla, kontrastní látky, kovy apod. Farmaceutické látky nebo jejich metabolity jsou vyloučeny do kanalizačního systému nemocnic převážně močí (55 - 88 %), méně stolicí (4 - 30 %). Ostatní chemické látky se dostávají do nemocničních OV během terapeutických, výzkumných a provozních činností (Verlicchi et al. 2012, Majumder et al. 2021). Tyto látky jsou různou měrou eliminovány v ČOV na základě své rozpustnosti ve vodě, těkavosti, polarity, molekulové hmotnosti, biologického poločasu rozpadu, rozložitelnosti, perzistence. Pokud nejsou dostatečně odstraněny během čistících procesů, jsou uvolňovány do životního prostředí (Sousa et al. 2017).

Léčivé látky a přípravky představují skupinu široce používaných chemických látek kontaminujících životní prostředí. Jsou relativně dobře rozpustné ve vodě a mají potenciál kontaminovat vodní ekosystém (Pereira et al. 2020).

V současné době je v Evropě k dispozici více než 3 000 účinných složek léčiv. Spotřeba léčiv se v Evropě každým rokem výrazně zvyšuje jako důsledek nárůstu a stárnutí populace v souladu se zkvalitněním lékařské péče. Úměrně ke zvýšené spotřebě se budou zvyšovat koncentrace i zastoupení reziduí a metabolitů léčiv v životním prostředí. V povrchových, odpadních, ale také podzemních vodách ve více než 71 zemích celého světa bylo již identifikováno přibližně 600 farmaceuticky aktivních složek nebo jejich metabolitů a produktů transformace (Kümmerer 2008, Kar et al. 2018).

Léčiva, jako např. antibiotika, cytostatika či nanočástice, jsou vyvíjena tak, aby vykazovala mechanismus účinku na organismus již při velmi nízkých koncentracích ( $\mu\text{g/l}$ ,  $\text{ng/l}$ ). Některá z nich mohou být do značné míry perzistentní a těžko biodegradovatelná a mohou

být nedostatečně eliminována konvenčními procesy čištění v ČOV (Beier et al. 2011, Khan et al. 2021). Mezi léčiva, u nichž byly zjištěny vysoké koncentrace v životním prostředí, patří paracetamol, ciprofloxacin, cyklofosfamid, 5-fluorouracil, metronidazol (Khan et al. 2021, Li et al. 2021).

Nejtoxictější skupinou léčiv, která mají prokázané mutagenní, karcinogenní a teratogenní účinky na všechny eukaryotické organismy, jsou cytostatika (Kar et al. 2018). V důsledku zvýšeného výskytu rakoviny a zaváděním nových progresivních způsobů onkologické léčby dochází celosvětově k velkému nárůstu spotřeby těchto léků. Například ve Španělsku bylo v období let 2010-2015 vydáno prostřednictvím lékáren 25 tun onkologických léků (Franquet-Griell et al. 2017). Protinádorová léčiva jsou pro svoje chemicko-fyzikální vlastnosti většinou omezeně metabolizována a vylučována močí a exkrementy pacientů v nezměněné podobě. Protože onkologická léčba je primárně realizována v nemocnicích, jsou nemocniční OV významným zdrojem protinádorových léčiv (Jureczko, Pryzstaś 2019, Li et al. 2021). Tyto stabilní organické látky jsou obtížně degradovány jak sekundárním, tak terciálním procesem čištění v ČOV, a tím představují významnou hrozbu, pro vodní ekosystémy (Yadav et al. 2020). Ze všech detekovaných protinádorových léků jsou nejvíce studovány cyklofosfamid a ifosfamid. Oba léky patří mezi alkylační činidla, která poškozují DNA za tvorby DNA aduktů, které mohou způsobit několik zásadních událostí během genové exprese – narušení replikace DNA, tvorba křížových vazeb zabraňujících separaci DNA pro transkripci, tvorba chromozomových aberací a mutací (Peterson 1980). V nemocničních OV se nalezená koncentrace reziduí cyklofosfamidu pohybovala v rozmezí 20 - 22  $\mu\text{g/l}$  s detekční frekvencí 8 - 100 % a koncentrace ifosfamidu se pohybovaly v rozmezí 0,20 - 86  $\mu\text{g/l}$  s detekční frekvencí 30 - 69,3 % (Isidory et al. 2016). Tyto nebezpečné genotoxické a cytotoxické látky, které nejsou dostatečně odstraněny v ČOV, byly následně nalezeny i v povrchových vodách po celém světě. Například v čínské řece Jingmei byla detekována koncentrace cyklofosfamidu až 500  $\text{ng/l}$  (Lin et al. 2013) a koncentrace ifosfamidu ve španělské řece Guadarrama byla až 41  $\text{ng/l}$  (Valcárcel et al. 2011).

K léčbě rakoviny jsou využívána také některá antibiotika. Svým mechanismem účinku způsobují interkalaci malých organických molekul mezi nukleotidové páry DNA, dochází k zablokování transkripčních a replikačních procesů a tím je zahájen proces programované smrti buňky. Mezi interkalační antibiotika patří např. antracyklin, daunorubicin a doxorubicin (Li et al. 2021). Existuje jen velmi málo studií, které by se zabývaly

sledováním těchto specifických antibiotik v nemocničních OV. Jednou z nich je studie Souza et al. (2018), kteří naměřili v nemocniční OV v Brazílii maximální koncentraci daunorubicinu a doxorubicinu 3,7 µg/l, resp. 10,4 µg/l.

Benzodiazepiny (diazepam, oxazepam, flurazepam) jsou jedny z nejčastěji předepisovaných léků na světě (Moore et al. 2017). Tato sedativní hypnotika mohou poskytnout rychlou úlevu od příznaků jako je úzkost a nespavost, ale jsou také spojena s řadou nežádoucích účinků, např. se vznikem závislosti a neuropsychologického poškození. V r. 1979 byly benzodiazepiny zařazeny na seznam omezených léků Food and Drug Administration (FDA) a také byly zařazeny do skupiny „D“ podle klasifikace FDA pro výskyt teratogenního rizika (Goyal et al. 2015). Úzkostné poruchy se vyskytují až u 15 % těhotných žen, mohou vyžadovat farmakologickou léčbu. Odhaduje se, že 10 až 26 % těhotných žen má předepsané benzodiazepiny nebo hypnotika podobná benzodiazepinům (Huitfeldt et al. 2020). Při použití během těhotenství tyto léky procházejí placentární a hematoencefalickou bariérou, kde se mohou vázat na receptory kyseliny  $\gamma$ -amino máselné ve vyvíjejícím se centrálním nervovém systému plodu, což potenciálně ovlivňuje růst a vývoj plodu. Nejvíce důkazů o teratogenním účinku benzodiazepinů bylo potvrzeno u alprazolamu a diazepamu (Talová et al. 2014). Fick et al. (2017) ve své studii provedli rozsáhlý screening výskytu benzodiazepinů ve 30 řekách 6 evropských povodí. Výsledky této studie prokázaly přítomnost jednoho nebo více benzodiazepinů v 86 % analyzovaných vzorků povrchových vod (n = 138) z 30 řek. Nejčastěji byly detekovány čtyři benzodiazepiny (oxazepam, temazepam, clobazam a romazepam). Zejména oxazepam měl nejvyšší frekvenci detekce (85 %) a maximální koncentraci 61 ng/l. Temazepam a klobazam byly nalezeny v 26 % (maximální koncentrace 39 ng/l) resp. 14 % (maximální koncentrace 11 ng/l) analyzovaných vzorků. Bromazepam byl nalezen pouze v Německu s maximální koncentrací 320 ng/l. Tato studie prokázala, že benzodiazepiny jsou běžnými mikropolutanty největších evropských říčních systémů. Ačkoli detekované koncentrace jsou nižší než ty, u nichž se uvádí, že mají negativní účinky na exponovanou biotu, nelze vzhledem k možnosti aditivních a subletálních účinků vyloučit vliv na životní prostředí.

Podle směrnice 2004/27/ES musí žádost o povolení humánních léčivých přípravků obsahovat posouzení rizika pro životní prostředí dle požadavků Evropské agentury pro léčivé přípravky (EMA). Pro hodnocení tohoto rizika se však používají pouze ekotoxikologické testy pro vodní organismy (zooplankton, řasy, bezobratlí, ryby) a nejsou zde zahrnuty testy genotoxické.



Dalším zdrojem genotoxického znečištění nemocničních OV jsou vedlejší produkty dezinfekce (DBP). OV z nemocnic a zdravotnických zařízení jsou vždy významně kontaminovány patogenními organismy (Zhang, Lu 2021), proto je žádoucí je před vypuštěním do kanalizačního řádu dezinfikovat.

K technické dezinfekci nemocničních OV se používají dezinfekční prostředky, které lze rozdělit na dezinfekční prostředky na bázi chloru (plynný chlor, oxid chloričitý, chloramin, chlornan sodný) a bezchlorové (ozonizace a UV záření). Každý způsob dezinfekce generuje různé vedlejší produkty dezinfekce (trichlormethan, bromdichlormethan, chlorfenol, kyselina bromoctová, chloraminy, formaldehyd, bromoform apod.).

Vedlejší produkty dezinfekce jsou tvořeny reakcí dezinfekčního prostředku s přirozeně se vyskytujícími organickými látkami, antropogenními kontaminanty, jodidy a bromidy přítomnými v OV nebo pitné vodě (Boucherit et al. 2015, Richardson, Postigo 2015). Na vznik a formování DBP má velký vliv obsah prekurzorů v organickém materiálu v OV. Mezi prekurzory DBP patří léčiva, antibakteriální látky, parabeny, nitrosaminy, huminové kyseliny, kontrastní látky obsahující jód aj. Tvorba a kinetika těchto různorodých chemických sloučenin je ovlivněna pH, zákalem, teplotou, chemickým a fyzikálním charakterem organického materiálu v OV, druhem a koncentrací dezinfekčního prostředku a také dobou kontaktu OV s dezinfekčním prostředkem (Hong et al. 2013).

Již v 70. letech bylo ve studiích na hlodavcích prokázáno, že chloroform a bromoform jsou karcinogenní a 3 bromované trihalomethany (THM) jsou mutagenní (DeMarini 2020). Pro své nebezpečné vlastnosti Agentura na ochranu životního prostředí (EPA) v USA vydala v r.1979 první nařízení regulující DBP. Nejdříve byly regulovány trihalomethany (bromoform, chloroform, chlorodibrommethan, bromdichlormethan) a později 5 haloctových kyselin, chlorečnany a chloritany. Do současné doby bylo identifikováno téměř 700 DBP (Richardson, Plewa 2020).

V posledních čtyřech desetiletích bylo přibližně 100 DBP podrobně studováno a analyzováno na cytotoxicitu, mutagenitu, genotoxicitu, karcinogenitu, teratogenitu a narušení endokrinního systému pomocí kvantitativních a srovnávacích toxikologických analýz (Richardson et al. 2007, Liu et al. 2014). Laboratorními testy na zvířatech a bakteriích bylo u těchto látek vědecky zjištěno, že mají mutagenní a karcinogenní účinky (Wagner, Plewa 2017). Některé epidemiologické studie u lidí poukazují na souvislost mezi pitím dezinfikované vody a rakovinou močového měchýře (Villanueva et al. 2004),

rakovinou konečníku a tlustého střeva (Rahman et al. 2010).

Na mezinárodní úrovni dlouhodobě přetrvává diskuse, které konkrétní DBP by měly být předmětem kontroly a regulace. Dle některých vědeckých výsledků dezinfekce za využití chloraminů v ČOV sníží regulované DBP až o 90 %, přičemž tímto způsobem dochází ke splnění přísných regulačních limitů. Vysoká efektivita chloraminů s ohledem na snížení regulovaných DBP je však vykoupena vznikem dosud neregulovaných, přesto mnohem toxickejších jodo-DBP a dusíkatých DBP. Nahrazení dezinfekce na bázi chloru použitím nechlorovaných způsobů dezinfekce (jako je např. dezinfekce ozonem a UV zářením) však není řešením, neboť při těchto alternativních dezinfekčních postupech je prováděna tzv. sekundární dezinfekce chlorem nebo chloraminem za účelem udržení dezinfikovaného distribučního systému. Tím opět dochází ke vzniku vysoce toxických látek, jako např. ozonu, haloketonů, UV-halonitrimethanu. Dalším významným neregulovaným vedlejším produktem dezinfekce je kyselina jodoctová. Tato kyselina inhibuje v buňkách glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenázu a způsobuje oxidační stres v buňce, který vede k poškození DNA. Kyselina jodoctová není jen vysoce genotoxická, ale i karcinogenní a má nepříznivý vliv na reprodukci, přesto není regulována. Nicméně v současné době již probíhají studie této kyseliny na zvířatech, a pokud se potvrdí tyto nepříznivé účinky dříve zjištěné *in vitro* na buněčných liniích křečka čínského (CHO linie), je pravděpodobné, že v brzké době bude kyselina jodoctová taktéž regulována (Richardson, Plewa 2020).

Wagner, Plewa (2017) ve své studii provedli rozsáhlou srovnávací analýzu indukce cytotoxicity a genotoxicity u 103 DBP za použití jediné biologické platformy savčích buněk (neoplastických buněk ovarií křečka čínského - buněčná linie AS52). Genotoxický potenciál jednotlivých DBP byl určen pomocí Comet testu a výsledky prokázaly genotoxicitu u většiny sledovaných DBP.

Celosvětová pandemie onemocnění covid-19 způsobila výrazný nárůst užívání dezinfekčních prostředků na bázi chloru. Byly prováděny intenzivní a pravidelné sanitace nejen zdravotnických zařízení, ale také sanitace vnitřních prostor budov, obchodů, ulic a dokonce i pláží. OV v ČOV byly z preventivních důvodů dezinfikovány vyšší dávkou dezinfekčních prostředků, aby se zajistila deaktivace RNA koronaviru (SARS-CoV-2), jehož přítomnost v OV byla potvrzena v několika studiích (Mlejnková et al. 2020, Tai et al. 2020). Ve své studii sledovali Zhang et al. (2020) přítomnost RNA viru SARS-CoV-2 v nemocnici ve Wu-chan. Dle jeho studie nedošlo k úplnému odstranění RNA SARS-CoV-2 v septiciích nemocnice, pokud bylo při dezinfekci postupováno dle pokynů WHO. K

úplnému odstranění RNA SARS-CoV-2 došlo až po výrazném předávkování chlornanem sodným. Autor však upozorňuje na vysoké dávky DBP, které byly identifikovány ve výpusti OV z ČOV sledované nemocnice. Nadužívání dezinfekčních prostředků na bázi chloru během pandemie COVID -19 způsobuje nejen výskyt toxických koncentrací chloru v OV, které mohou ohrozit vodní ekosystém, ale druhotným významným nebezpečím je tvorba DBP.

### 3.1.3 Biologické znečištění

OV z nemocnic může sloužit jako ideální růstové médium pro různé biologické vysoce rizikové agens. Do této skupiny lze zařadit patogenní bakterie, viry, plísně, prvoky, helminty, biotoxiny, bakteriofágy, geny rezistentní vůči antibiotikům a bakterie rezistentní na antibiotika pocházející převážně z tělních tekutin.

Výzkumy potvrdily, že nemocniční OV mohou být potencionálním zdrojem patogenních bakterií, jako jsou *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae* a *Yersinia enterocolitica* (Cai, Zhang 2013). Některé kmeny těchto bakterií jsou původci velmi závažných onemocnění, mezi něž patří tyfus, tuberkulóza, cholera, úplavice, krvavý průjem, infekce močových cest nebo těžký zápal plic (Dougan, Baker 2014, Teklehaimanot et al. 2014).

Řada těchto patogenních bakterií může také produkovat a vylučovat bakteriální toxiny, které jsou (buď přímo, nebo nepřímo) odpovědné za patogenní reakce spojené s bakteriální infekcí. Jako příklad lze zmínit „cytolethal distending toxin“ produkováný několika gramnegativními bakteriemi (např. *E.coli*), tyfusový toxin produkováný některými sérovary *S.enterica* a kolibaktin produkováný hlavně fylogenetickou skupinou B2 *E.coli*. Bakteriální genotoxiny jsou neobvyklé efekторы, které indukují poškození DNA v infikovaných buňkách a za specifických okolností mohou přispět k rozvoji nádoru kolonizovaného hostitele (Martin, Frisan 2020).

Viry jsou jedny z hlavních lidských patogenů přenosných vodním médiem, zejména nemocniční OV, a jsou příčinou závažných onemocnění a zdrojem infekcí. V nemocničních OV nejvíce převládají enteroviry, adenoviry, viry hepatitidy A-E, rotaviry, parvoviry a noroviry, způsobující nevolnost, horečky, hepatitidu, gastroenteritidu, poliomyelitidu a další negativní reakce (Jia, Zhang 2020, Achak et al. 2021). Některé viry jsou vysoce stabilní, během procesu čištění OV se mohou usazovat na suspendovaných

látkách přítomných v OV a tím se mohou stát ještě odolnější. Například enteroviry jsou velmi odolné vůči dezinfekci a v OV mohou přežít i několik měsíců (Majumder et al. 2021).

Je známo, že genetické změny vedoucí ke vzniku nádorů mohou být vyvolány i biologickým infekčním agens, jako jsou například právě viry. Viry jsou „vnitrobuněční parazité“, kteří využívají vnitřního prostředí a orgány buňky ke své replikaci. Virová genetická informace a virové proteiny představují cizorodé molekuly, které mohou reagovat s buněčnými proteiny i buněčným genomem. Mechanismus karcinogeneze se u různých virů liší. Viry DNA (např. papillomaviry, herpesviry) mohou způsobit neoplazii inhibicí tumor supresorových genů, zatímco RNA viry (např. retroviry, virus hepatitidy C) většinou aktivují protoonkogeny. Imunosuprese/immunodeficienze je rizikovým faktorem rakoviny, včetně karcinogeneze způsobené viry. V souladu s tímto pozorováním Mezinárodní agentura pro výzkum rakovin (IARC) klasifikovala virus lidské imunodeficienze typu 1 (HIV-1) jako agens skupiny 1, nepřímě spojené s rizikem rakoviny prostřednictvím imunosuprese. Kromě výše zmíněného viru HIV-1 klasifikovala IARC do nejzávažnější skupiny č.1, tzn. „karcinogenní pro člověka“, i další viry - virus hepatitidy B, virus hepatitidy C, virus Epstein-Barrové, herpesvirus Kaposiho sarkomu, viry lidského papilomu, lymfotropní virus T-buněk lidského typu 1 (Hatano et al. 2021).

V současné době, kdy je intenzivně řešena problematika související s onemocněním covid-19, jsou virové infekce v popředí celosvětového zájmu. Na základě mnoha studií poslední doby, kdy je orálně-fekální přenos jedním z možných přenosů viru SARS-CoV-2, je prováděn intenzivní výzkum a monitoring OV. Studie dosud identifikovaly SARS-CoV-2 v systémech OV různých zemí, včetně Austrálie, Francie, Itálie, Nizozemska, Španělska, České republiky, Japonska, Turecka, Izraele, Indie, Číny a USA. Frekvence detekce SARS-CoV-2 RNA ve vzorcích OV korelovala s procentem nakažených lidí v dané zemi. Na základě monitorování OV je možné predikovat přítomnost viru v populaci (Mlejnkova et al. 2020, Achak et al. 2021, Majumder et al. 2021).

Mikroskopické houby (plísňe, kvasinky) jsou běžné heterotrofní organismy, které mají schopnost využívat organické látky z okolního prostředí a nemocniční OV jsou pro ně ideálním médiem. Běžnými druhy mikroskopických patogenních hub identifikovaných v nemocničních OV jsou *Penicillium rubrum*, *P.viricadum*, *Trichothecium roseum*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus*, *A.parasiticus*, *A.niger*, *Microsporium canis*, *Curvularia lunata*, *Fusarium sporotrichoides*. Nejčastějším rodem hub

v nemocniční OV byl *Aspergillus* (33,3 %) (Cairns et al. 2018, Assress et al. 2019).

Některé rody mikroskopických hub přítomných v OV z nemocnic (rod *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* apod.) produkují za určitých podmínek velmi toxické mykotoxiny odolné vůči vysokým teplotám a chemickému i fyzikálnímu ošetření. Jejich nejčastějšími účinky na zdraví jsou nefrotoxicita, hepatotoxicita, imunosuprese, karcinogenita a teratogenita (Janík et al. 2020).

Nejběžnějšími mykotoxiny je 18 typů aflatoxinů, produkovaných rodem *Aspergillus*. Aflatoxin B<sub>1</sub> je definován jako nejsilnější karcinogen a mutagen a podle IARC je aflatoxin B<sub>1</sub> klasifikován jako karcinogen skupiny 1 (karcinogenní pro člověka). Aflatoxin B<sub>1</sub> způsobuje až 28 % celosvětových případů hepatocelulárního karcinomu, což je nejčastější forma rakoviny jater. V jaterních buňkách je aflatoxin metabolizován enzymy oxidázy a je převáděn na toxičtější, vysoce reaktivní metabolity, které mají vysokou afinitu k navázání na DNA za tvorby aduktů DNA, jež vedou k mutacím DNA (Liu et al. 2017). Dalším mykotoxinem je ochratoxin A metabolizovaný několika druhy mikroskopických hub – *Aspergillus bochraceus*, *A.carbonarius*, *A.niger*, *Penicillium verrucosum*, *P.nordicum*, *P.viridicatum* (Zhang et al. 2016). Ochratoxin vyvolává několik toxických účinků, jako je nefrotoxicita, hepatotoxicita, genotoxicita, teratogenita, imunotoxicita a neurotoxicita (Janík et al. 2020). Byly pozorovány různé mechanismy genotoxického působení ochratoxinu A. Toxin způsobuje zástavu buněčného cyklu ve fázi G2/M, apoptózu, nekrózu, inhibici sestavy mikrotubulů, procesů dělení buněk nebo syntézy proteinů. Několik studií ukázalo, že ochratoxin A indukuje generování reaktivních forem kyslíku (ROS), což vede k oxidačnímu stresu a apoptóze zprostředkované ROS, jakož i DNA adukty a zlomy DNA s jedním vláknem (Janík et al. 2020). V důsledku těchto genotoxických účinků IARC klasifikovala ochratoxin jako karcinogen skupiny 2B (možný lidský karcinogen).

### 3.1.4 Rizikové prvky

Termínem rizikové prvky lze označit chemické prvky, které jsou toxické pro životní prostředí a zdraví člověka. Do této skupiny byly zařazeny kovy a metaloidy, nekovové prvky s vlastnostmi kovů.

První lékařské záznamy o toxicitě kovů pocházejí již z období kolem r. 1 500 př. n. l., kdy byly nalezeny v Erbesově papyrusu (toxicita Pb, Cu). Toxický účinek kovu je dán interakcí mezi volným iontem kovu a organickými makromolekulami v buňce (nukleové kyseliny,

bílkoviny, lipidy, organely jako mitochondrie, buněčná membrána, jádro). Ionty kovů reagují s DNA, nukleovými kyselinami a proteiny a v důsledku těchto interakcí dochází k poškození DNA, které následně vede k mnoha změnám na buněčné úrovni – např. poškození buněčného cyklu, apoptóze, karcinogenitě a mutagenitě (Tchounwou et al. 2012). Karcinogenní proces není často vyvoláván kationty kovů přímo, ale ionty kovů působí jako promotory a proces je vyvolán nepřímou, např. v součinnosti promotoru s karcinogenními organickými látkami (např. polyaromatickým uhlovodíkem) (Kafka, Punčochářová 2002).

V OV nemocnic byla identifikována celá škála kovů o různých koncentracích (Carraro et al. 2016). Většina těchto nalezených chemikálií není regulována legislativními předpisy.

Kovy v nemocničních OV se vyskytují v podobných koncentracích jako v komunálních OV, avšak rtuť, gadolinium a platina byly v nemocničních OV nalezeny ve větší míře (Verlicchi et al. 2010). Gouille et al. (2012) ve své práci porovnávali nalezené koncentrace antropogenních prvků v OV z Univerzitní nemocnice a městské čističky v Rouenu. Pomocí metody ICP (hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem) stanovili v odebraných vzorcích celkem 34 prvků. V této studii byl opět prokázán zvýšený výskyt gadolinia a platiny v nemocniční OV v porovnání s městskou OV, ale nebyl potvrzen zvýšený výskyt rtuti. Naproti tomu bylo zaznamenáno více antropogenního stříbra. V pracovních dnech byly ve vzorcích OV z Univerzitní nemocnice koncentrace antropogenního stříbra, gadolinia a platiny přibližně 3x, 13x a 27x krát vyšší než v komunálních OV.

Cytostatika na bázi platiny (cis-platina, oxiplatina a karboplatina) se již mnoho let široce používají při léčbě nádorových onemocnění pro svůj inhibiční účinek na proliferující buňky nádorů. Působení cytostatik není selektivní, a proto jsou tyto látky v různé míře karcinogenní, mutagenní a teratogenní pro všechny organismy v životním prostředí, a to i při velmi nízkých koncentracích (ng/l), zejména při dlouhodobé expozici (Zounková et al. 2007, Isidori et al. 2016). Santana-Viera et al. (2020) studovali výskyt cytostatik na bázi platiny po dobu jednoho roku v OV z ČOV a v nemocničních OV na ostrově Gran Canaria. Bylo zjištěno, že koncentrace platiny byla v rozmezí 81,94 až 13 913 ng/l v nemocničních OV a mezi 3,97 a 75,79 ng/l ve výpusti z ČOV.

V další studii byly vzorky nemocničních OV a přítoků a odtoků ČOV ze Slovinska a Španělska podrobeny analýze s cílem detekovat 22 vybraných protinádorových léčiv,

jejich metabolitů a produktů transformace pomocí kombinace chemických analýz a biotestů zaměřených na genotoxické účinky. 60 vzorků z celkového počtu 220 bylo pozitivních na detekovatelné hladiny reziduí protirakovinných léčiv. V nemocničních OV byly nejčastěji detekovány sloučeniny na bázi platiny ICP analýzou (90 %), a to v koncentracích 226 - 352 ng/l (Isidori et al. 2016).

Gadolinium je prvek vzácných zemin (REE), který se ve formě chelátového komplexu používá od r. 1988 jako kontrastní látka při zobrazování tkání magnetickou rezonancí (MRI). Tento stabilní komplex je vylučován z lidského těla v nezměněné formě (Telgmann et al. 2013, Ebrahimi 2019). Do 24 hod od aplikace se vyloučí 85 - 90 % kontrastní látky na bázi gadolinia. Nemocniční OV jsou zřejmě největším bodovým zdrojem antropogenního gadolinia. ČOV mají jen omezenou schopnost (cca 10 %) odstraňovat tyto stabilní a inertní chemikálie a látky na bázi gadolinia jsou vypouštěny do povrchových vod. Zvýšená koncentrace gadolinia v povrchových vodách byla již identifikována v mnoha zemích včetně Austrálie, USA, ve většině zemí EU včetně České republiky (Möller et al. 2002, Ebrahimi et al. 2019). Z povrchových vod migruje tento mikropolutant do podzemních vod (Johannesson, Burdige 2017) a pozitivní nález gadolinia byl potvrzen i v pitné vodě (Kulaksız, Bau 2011). Množství gadolinia v prostředí roste s množstvím provedených vyšetření magnetickou rezonancí. V současné době je odhadováno, že se provádí až 30 miliónů vyšetření magnetickou rezonancí ročně, což je asi o 50 % více než v r. 2005 (Ebrahimi et al. 2019). Studie Wang et al. (2015) potvrdila ukládání gadolinia v mozku, kůži a kostech potkanů vystavených působení neiontové i iontové kontrastní látky na bázi gadolinia. Klinický význam akumulace gadolinia v různých tkáních není doposud vysvětlen (Rogosnitzky, Branch 2016).

Jeden z potvrzených negativních účinků souvisejících s toxicitou je, že iont  $Gd^{3+}$  má podobný iontový poloměr jako vápenatý iont  $Ca^{2+}$  a tato podobnost vede ke „kompetitivnímu ovlivnění“ biologických procesů vyžadující  $Ca^{2+}$  (Siew et al. 2020). I přes zvyšující se zájem o zkoumání toxikologických informací gadolinia jsou některé podstatné informace o gadolinu zatím nedostatečné. Tým Centra toxikologie a zdravotní bezpečnosti SZÚ se podílel na rozšíření znalostí toxikologického profilu solí REE pomocí různých biotestů. Ve sledované práci bylo zjištěno, že testované REE nemají potenciál mutagenity nebo senzibilizace kůže, vykazují velmi slabý potenciál narušení endokrinního systému, ale mají akutní toxické účinky prokázané testem akutní toxicity na nitěnce obecné (test *Tubifex tubifex*) (Rucki et al. 2021). V další studii Cho et al. (2020) se autoři zabývali

ovlivněním cytotoxického a genotoxického účinku gadolinia vystaveného nízkofrekvenčnímu elektromagnetickému poli u lidských lymfocytů. Kombinovaná expozice lymfocytů 0,2mM Gd spolu s 60Hz extrémně nízkofrekvenčním elektromagnetickým polem měla za následek snížení životoschopnosti buněk, zvýšení frekvence výskytu mikronukleů, poškození DNA, apoptickou buněčnou smrt. Potvrdila se tedy zajímavá skutečnost, že nízkofrekvenční elektromagnetické pole zvyšuje genotoxicitu gadolinia.

Rtuť a její sloučeniny, především organické, jsou látky vysoce toxické pro všechny živé organismy. V nemocniční OV se vyskytují v koncentracích 0,3 - 8 µg/l (Tyagi et al. 2018). Dle WHO 50 % z celkových emisí rtuti ve Velké Británii pochází ze zdravotnických zařízení a uvolňuje se především ze zubních amalgámů (WHO 2013). Pro prokázanou toxicitu rtuti a jejích sloučenin přijala EU opatření k řešení problému se rtutí uvedených v Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/852 o rtuti. V tomto dokumentu je doporučováno postupné omezování používání zubních amalgámů se rtutí až po jejich úplný zákaz v r. 2030. Ve stomatologických ordinacích je povinnost používat separátory rtuti a používat zubní amalgám ve formě kapslí. Toxický účinek rtuti je závislý na formě, ve které se rtuť vyskytuje. Mezi její nejnebezpečnější sloučeniny patří methylrtuť. Její toxicita je dána schopností prostupovat jak plodovou placentou, tak hematoencefalickou bariérou. Z tohoto důvodu jsou methylrtuť a její organické sloučeniny zařazeny mezi embryotoxické a mutagenní látky a jsou hodnoceny dle IARC jako možné karcinogeny pro člověka.

Navzdory prokázané souvislosti mezi zvýšeným výskytem rakoviny v oblastech kontaminovaných rtutí není stále zcela zřejmé, které genotoxické molekulární mechanismy se podílejí na vzniku rakoviny. Tyto možné molekulární mechanismy hodnotili ve studii Crespo-Lopez et al. (2009). Na základě výsledků posouzených studií vyhodnotili jako možné molekulární mechanismy, které vedou ke genotoxicitě, generování volných radikálů a oxidačního stresu, působení na mikrotubuly, vliv na mechanismy opravy DNA a přímou interakci Hg s molekulami DNA.

Stříbro bylo dříve široce používané pro své antimikrobiální vlastnosti a jako terapeutický a dezinfekční prostředek. S objevem penicilinu bylo jeho používání silně omezeno. V současné době se dostává do popředí zájmu v nově vzniklém oboru – nanomedicíně. Nanočástice stříbra se využívají v celé řadě léčebných preparátů jako nosiče pro cílenou distribuci léčiv, např. v onkologii, jako biocidní látky, jsou součástí obvazového materiálu



a textilních výrobků se zdravotním účinkem, používají se jako nanosenzory apod. Stříbro je také stále standardně používané ve stomatologii a zobrazovací technice. Vzhledem k výše zmíněnému širokému využití v medicíně je stříbro ve zvýšené míře detekováno v OV ze zdravotnických zařízení (Gouille et al. 2012).

Nanočástice obecně mají odlišné chemické a fyzikální vlastnosti než jejich chemické analogy, které nejsou v nanoformě. Toxicitu nanočástic je proto nutné posuzovat samostatně. V posledních letech probíhá intenzivní výzkum všech toxických účinků nanočástic stříbra (AgNP), zejména s ohledem na jejich cytotoxický, genotoxický, karcinogenní a teratogenní potenciál (Kohl et al. 2020).

Výsledky studií AgNP v posledním desetiletí již prokázaly genotoxické účinky, a to jak poškození DNA, tak vznik chromozomových aberací vedoucích ke vzniku mutací v somatických buňkách a ke karcinogenitě (Kohl et al. 2020, Rodrigues-Garraus et al. 2020). Bylo posouzeno 43 studií týkajících se genotoxicity AgNP. Studie probíhaly v letech 2013-2019 a byly v nich použity různé metody *in vivo* a *in vitro* s použitím různých modelů na různých trofických úrovních. Autoři na závěr konstatovali, že pozitivní výsledky AgNP byly získány pro každou úroveň poškození DNA jak v testech *in vivo*, tak v testech *in vitro* s tím, že více pozitivních výsledků bylo v testech *in vitro*. Ani jedna z vybraných vědeckých studií nezahrnovala celou baterii testů genotoxicity doporučených pro farmaceutické a chemické látky. Autoři ve studii doporučují použít pro testování genotoxicity AgNP přednostně eukaryotické a nikoliv prokaryotické buňky. To znamená, že Ames test není vhodný pro zjištění mutagenního potenciálu. Tento fakt zdůvodňují tím, že AgNp pro svou antimikrobiální účinnost nejsou kompatibilní s metodou, a také tím, že prokaryotické buňky mají jiné enzymatické a antioxidační vybavení oproti eukaryotické buňce (Rodrigues-Garraus et al. 2020).

Studie společnosti EAWAG (Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology) obsahuje výsledky stanovení koncentrací 69 prvků ve vzorcích kalů a OV z 64 ČOV ve Švýcarsku. Tento soubor cenných dat představuje referenční bod pro stanovení celkové zátěže povrchových vod antropogenními prvky vypouštěnými z ČOV. Dle této studie je spolu s OV vypouštěno každý rok do řek zlato a stříbro v celkové hodnotě 3 miliony švýcarských franků (Vriens et al. 2017).

Radioaktivní izotopy jsou důležité pro řadu lékařských diagnostických a léčebných postupů, např. terapie nukleární medicíny využívá radioaktivní izotopy jako jód-131 nebo

beta-zářiče (fosfor-32, stroncium-89 a yttrium-90). Ve zdravotní péči a diagnostice se většinou využívají radioizotopy s krátkým poločasem rozpadu, např. radioizotop jódu-131 má poločas rozpadu 8 dní. Až 90 % z celkové podané radioaktivní dávky během terapie je vylučováno exkrementy pacienta do OV.

Genotoxické a mutagenní účinky ionizujícího záření jsou dlouhodobě známy. Ionizující záření indukuje léze DNA přímo nebo nepřímo tvorbou volných radikálů hydroxyly. Typem indukovaných DNA lézí jsou dvouvláknové zlomy (DSB) a jednořetězcové zlomy (SSB) stejně jako shluk DNA lézí. Jak DSB, tak shluky lézí DNA jsou považovány za významně škodlivé pro všechny buněčné typy. Prerušování DNA ozařováním obvykle zvyšuje buněčné reakce počínaje detekcí poškození DNA a zastavením buněčného cyklu. Neefektivní oprava lézí DNA je široce považována za kritickou iniciační událost pro mutagenézi, genomickou nestabilitu a buněčnou smrt (Honjo et al. 2020). Embrya jsou extrémně citlivá na účinky ionizujícího záření, citlivost se v různých fázích embryonálního vývoje liší. Pro embrya během vývoje platí Bergonieho – Tribondeauův zákon, který uvádí, že radiocitlivost tkáně je přímo úměrná počtu nediferencovaných buněk ve tkáni, jejich mitotické aktivitě a době, kterou stráví proliferací.

Ionizující látky kontaminující OV mají regulační status a nakládání s nimi je v České republice legislativně ošetřeno (Zákon č. 263/2016 Sb., atomový zákon, ČSN 75 6406). Radioizotopy kontaminovaná nemocniční OV je zadržena v zachytých nádržích, kde se k eliminaci radioaktivity využívá přirozeného rozkladu radioizotopu. Při dodržování podmínek nakládání s radioizotopy v nemocnicích a zdravotnických zařízeních nehrozí žádná významná kontaminace životního prostředí.

### **3.2 Genotoxické látky a jejich působení**

Chemické, fyzikální a biologické faktory, které způsobují nezvratné změny v genetickém materiálu buňky, tzn. způsobují mutace, jsou označovány za genotoxické látky. Mutace je definována jako kvantitativní nebo kvalitativní irreverzibilní změna genetické informace. Změny v genetickém materiálu jsou způsobeny genotoxickými látkami, které interagují na konkrétním místě se strukturou nebo sekvencí bází DNA, vedou k jejímu poškození a vzniku mutací (Mohamed et al. 2017).

Látky s genotoxickým účinkem ovlivňují normální zdravé buňky, které plní své fyziologické funkce dané jejich genetickým programem, pokud jsou v rovnováze jejich stimulační a inhibiční signály z okolí. Během procesu replikace DNA a dělení buněk

existuje stálé riziko vzniku spontánních a exogenních mutací. Na tuto negativní zátěž reaguje buňka adaptačními a specifickými reparačními mechanismy a tím si udržuje do určité míry svojí dynamickou rovnováhu, homeostázu. V případě, že dojde k narušení této rovnováhy, např. nepřiměřeným či chronickým působením látek s genotoxickým účinkem, dochází k nevratnému poškození DNA a ke vzniku mutací, náhodných změn, které naruší genovou stabilitu buňky (Hofmanová 2013).

Z hlediska organizační struktury buněčného genomu mohou mutace vznikat na úrovni samotného genu či jejich skupiny (mutace genové), nebo mají za následek poškození na chromozomální úrovni (mutace chromozomové), kde se projevují jak poškozením chromozomů, tak odchylkou v jejich počtech.

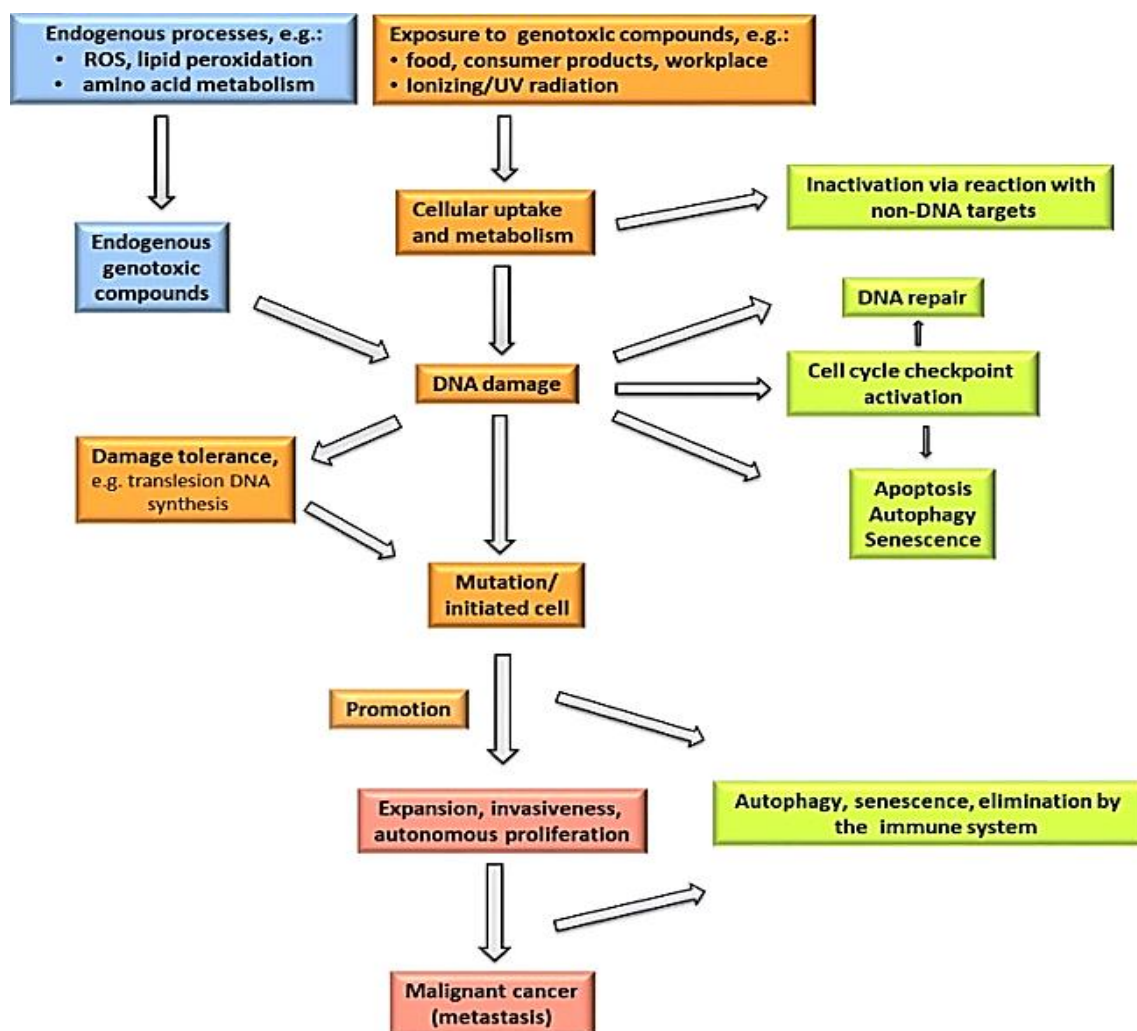
Genotoxické látky se vyskytují přirozeně v našem životním prostředí (voda, půda, ovzduší, potrava), anebo se jedná o látky syntetického původu (Sousa et al. 2017). Studium účinků a mechanismů působení těchto látek se zabývá genetická toxikologie. Ke svému studiu využívá *in vitro* metody hodnotící samotný genotoxický potenciál látek, ale i *in vivo* metody genetické analýzy, které hodnotí stav exponovaného subjektu.

Z hlediska vztahu dávky a účinku jde v případě látek s genotoxickým působením o bezprahové účinky, tzn. že genotoxicita může být vyvolána již při velmi nízkých koncentracích těchto látek.

Látky s genotoxickým účinkem mohou působit na lidského jedince různými způsoby. Dochází-li k poškození genetického materiálu eukaryotických somatických tělních buněk, může docházet až k nádorovému bujení, tzv. karcinogennímu účinku a vzniku nádorových onemocnění. Genetické poškození zárodečných buněk pak vede k dědičným mutacím způsobujícím vrozené vady a geneticky podmíněná onemocnění, nebo dochází k poruchám prenatalního vývoje jedince, a takové látky označujeme jako teratogeny. Genotoxická látka přitom nemusí být pouze karcinogenem či teratogenem, ale může zde být i souběh působení. Detailně jsou zmiňované procesy karcinogenity a teratogenity popsány v následující kapitole.

Jedním z důležitých a nejvíce diskutovaných mechanismů vedoucích k poškození DNA genotoxickými látkami je oxidativní stres. Běžné reaktivní formy kyslíku (ROS) - superoxid ( $O_2^-$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), ozon ( $O_3$ ), singletový kyslík ( $^1O_2$ ), hydroxylový radikál ( $OH^-$ ) jsou generovány jako vedlejší produkty metabolismu biologického systému (fosforylace proteinů, apoptóza, imunita a diferenciace). Nízká, fyziologicky potřebná

úroveň ROS se podílí na syntéze buněčných struktur a podílí se i na obranném systému organismu proti patogenům. Například fagocyty syntetizují a ukládají volné radikály, aby je uvolnily na zničení pohlcených patogenních mikrobů (Pizzino et al. 2017). Pokud buňka ztratí schopnost udržet ROS na potřebné úrovni a dojde ke zvýšené produkci ROS, volné radikály a oxidanty způsobí tzv. oxidační stres v buňce. Tento škodlivý proces může negativně ovlivnit membrány, lipidy, proteiny, lipoproteiny a DNA (Wu et al. 2013). Volné radikály a oxidanty jsou generovány z endogenních a exogenních zdrojů organismu. Produkce ROS může nastat v důsledku expozice polutantům životního prostředí, těžkým kovům (Hg, Pb, Cd, AgNP), léčivům (např. gentamycin, cyklosporin, bleomycin), dále alkoholem, kouřením (obr. 1) (Thomas et al. 2015).



**Obr. 1:** Schematický nástin příčin a důsledků poškození DNA. Vlevo - endogenní a exogenní faktory a buněčné procesy vedoucí k poškození DNA. Vpravo - procesy snižující rozsah poškození DNA (Thomas et al. 2015)

### 3.2.1 Karcinogenita

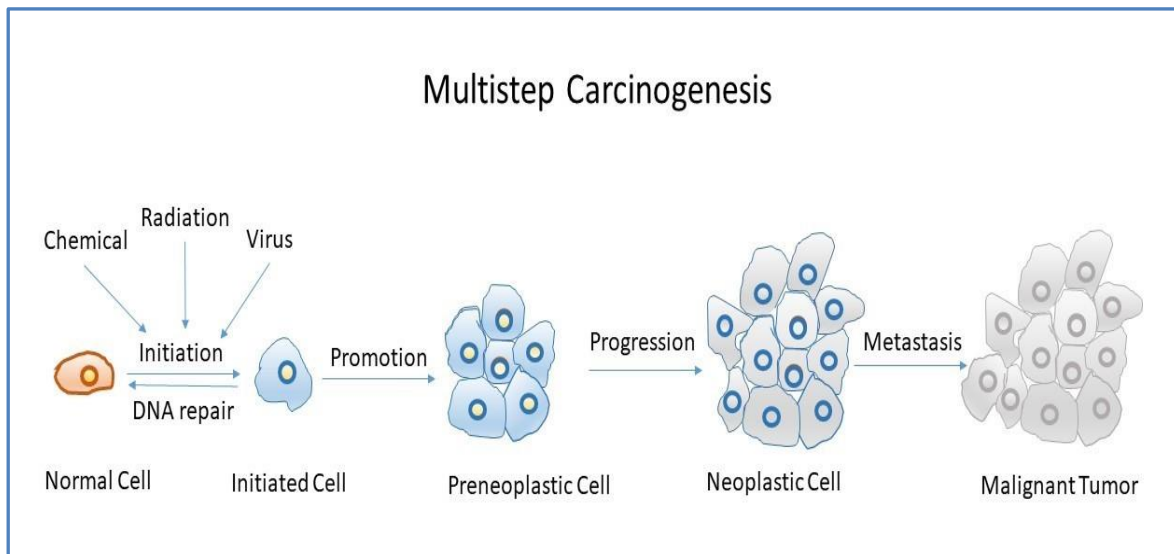
Karcinom vzniká z jedné buňky vlastní tkáně, která se dramaticky mění na základě kumulace genetických, epigenetických, biochemických a dalších změn v důsledku buněčné a genetické nestability. Transformace zdravé (normální) buňky v maligní probíhá především přes akumulaci mutací v genech, které se podílejí na řízení životního cyklu buňky. Protoonkogeny stimulují růst buňky, naproti tomu nádorově supresorové geny růst buňky inhibují. Mutací těchto genů dojde k narušení rovnováhy stimulačních a inhibičních signálů. Protoonkogeny se mění (transformují) na karcinogenními onkogeny a dochází k nadměrné proliferaci buněk.

Proti neobvyklým změnám v procesu buněčného dělení je buňka vybavena mechanismem regulované (naprogramované) buněčné smrti – apoptózou. Tohoto procesu se účastní některé specifické geny, např. TP53, BCL-2 p53, bcl-2. V řadě studií bylo zjištěno, že mutací těchto specifických genů dochází k poruchám apoptózy. Neschopnost buňky provést apoptózu je jeden z faktorů vzniku nádorů a přispívá k jejich rezistenci na léčbu (Hofmanová 2013).

Druhým obranným mechanismem proti proliferaci je proces řízeného zkracování segmentů DNA na koncích chromozomů, tzv. telomery. Ty se po každém dělení zkracují a po dosažení kritické délky dochází ke stárnutí a smrti buňky. Aktivací genu pro enzym telomerázu v nádorových buňkách však dochází ke kontinuální obnově segmentů DNA na konci telomer a nádorová buňka se stává mitoticky nesmrtelnou. Třetím důležitým obranným mechanismem je regulace replikace DNA.

Karcinogeneze je složitý vícestupňový proces, při kterém dochází k poruchám regulace nekontrolované proliferace buněk (obr. 2). Celý proces začíná iniciační fází, kdy dochází k irreverzibilní mutaci kritického genu a buňka se mění v preneoplastickou. V této fázi se může proces zastavit. Ve fázi promoční neboli růstové dochází působením tzv. nádorových promočních podnětů ke klonálnímu růstu buněk. Proces lze odstraněním podpůrných faktorů (např. exogenní xenobiotika) zpočátku zvrátit, ale po dosažení určitého stupně je již proces nevratný a dochází ke vzniku maligního klonu buněk. Tato fáze karcinogeneze může trvat i desetiletí. Poslední fází karcinogeneze je fáze progresivní, která je charakterizována akumulací dalších mutací a genetických změn a nekontrolovaným růstem nádorové masy. Aktivací dalších faktorů se začnou nádorové buňky šířit krevním oběhem a dochází k metastázám. Velmi důležitou podmínkou růstu nádoru (karcinomu) je

vytvoření bohatého cévního zásobení nádoru živinami a kyslíkem (nádorová neoangiogeneze) (Hofmanova 2013).



**Obr. 2:** Vícestupňový proces karcinogeneze (<https://med.libretexts.org>)

Karcinogeneze je velmi složitý proces a může tedy probíhat i desítky let, ale v případě vlivu více negativních faktorů (např. environmentální faktory, kouření, obezita) se fáze karcinogeneze mohou výrazně zkrátit. Dalšími důležitými faktory vedoucími ke vzniku nádorů jsou mutace v genech způsobujících rakovinu (např. BRCA1/2, TP53 u Li-Fraumeniho syndromu, mutace DNA reparačních genů u Lynchova syndromu). Zhruba 5-10 % z celkového počtu nádorových onemocnění je označováno jako hereditární, tzn. dědičné, způsobené vrozenými mutacemi v konkrétních genech (Garber, Offit 2005). V případě, že rodičovská zárodečná buňka obsahuje mutaci kritického genu, u potomka je tato mutace již ve všech buňkách přítomna a riziko vzniku rakovin se zvyšuje.

### 3.2.2 Teratogenita

Pokud hovoříme o teratogenezi, pak jde o prenatální toxicitu charakterizovanou strukturálními nebo funkčními vadami vyvíjejícího se embrya nebo plodu. Zahrnuje intrauterinní retardaci růstu, smrt embrya nebo plodu a také transplacentární karcinogenezi. Tato (transplacentární) karcinogeneze znamená, že expozice matky iniciuje vývoj nádoru v embryu nebo plodu, což má za následek přítomnost nádorového onemocnění ihned po narození jedince. Teratogenní agens lze rozdělit na:

- 1) léčiva (např. hypnotikum Thalidomid, antibiotikum Tetracyklin)
- 2) fyzikální agens (např. radioizotopy)

3) environmentální agens (např. dioxiny, polychlorované bifenyly, těžké kovy)

4) mateřské infekce (např. virus Zika)

V závislosti na vývojovém stádiu plodu (embrya) může mít chemická expozice u matky za následek různé stupně toxicity u embrya nebo plodu. V preimplantačním období prenatalního vývoje po vystavení teratogenům dochází ve většině případů ke smrti embrya. Během postimplantačního období může chemická expozice vést k ovlivnění konkrétního vyvíjejícího se orgánu, což vede k malformaci postižených orgánů a někdy i ke smrti. Během třetího fetálního období chemická expozice způsobuje zpomalení růstu nebo vede k usmrcení plodu. Výslednými teratogenními efekty jsou spontánní potrat, ztráta plodu, morfologické abnormality embrya a plodu, omezení nitroděložního růstu, vývoj nádoru či funkční postižení, např. mentální retardace (Gilbert-Barness 2010).

Dle dat WHO v r. 2018 celosvětově zemřelo 283 582 novorozenců po měsíci života v důsledku vrozených anomálií (WHO 2020).

Mechanismy teratogeneze nejsou dostatečně známy, ale dle mnohých studií velmi záleží na několika faktorech. Teratogenní účinek závisí především na genotypu matky a plodu. Nejčastějšími mechanismy působení teratogenů jsou hyperacetylace, nerovnováha cholesterolu, změna metabolismu folátu a antagonismus folátu, nerovnováha kyseliny retinové, endokrinní narušení, vaskulární narušení a oxidační stres (Mazzu et al. 2017).

### **3.3 Vybrané testy stanovení genotoxicity**

Nejčastěji využívané testy pro detekci genotoxických účinků *in vitro* jsou schopny detekovat jen jeden koncový bod či mechanismus, a proto je třeba provést kombinaci několika genotoxických testů. Většina standardních testů je validována pro chemické látky. Metodologické a operační postupy jsou specifikovány ve specifických standardech ISO, pokynech pro testování chemikálií (OECD TG) nebo databázích alternativních metod (DB-ALM) Evropského centra pro validaci alternativních metod (EURL ECVAM).

#### **3.3.1 Ames test**

Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi, dále jen Ames test (OECD TG 471), je nejdéle používaná krátkodobá metoda využívající reverzní mutace bakterií kmene *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotyp *Typhimurium*. Tato mutace se nachází v genech, které se účastní syntézy histidinu. Mutované kmeny vyžadují pro svůj růst externí zdroj histidinu.

V testu se sleduje schopnost testované látky způsobit reverzní mutaci a tím umožnit opět růst bakterie v mediu bez histidinu.

K testování genotoxického potenciálu se používá kombinace minimálně 5 modifikovaných kmenů bakterií *S.typhimurium*. Tyto kmeny detekují substituční mutace, mutace, které posunující čtecí rámeček, a mutace způsobující zkřížení vazeb v DNA. Kombinace těchto kmenů umožňuje nalezení mutagenů, které působí odlišnými mechanismy. Některé sloučeniny tak zapříčiní reverzní mutaci pouze u jednoho či dvou kmenů. Bakteriální kmeny mají přidáné „pomocné“ mutace, aby byla zvýšena senzitivita testu. Jedna z těchto mutací je v genech zodpovědných za syntézu lipopolysacharidů, čímž je dosažen snadnější přístup mutagenu buněčnou stěnou, a další mutace je v reparačním systému buňky.

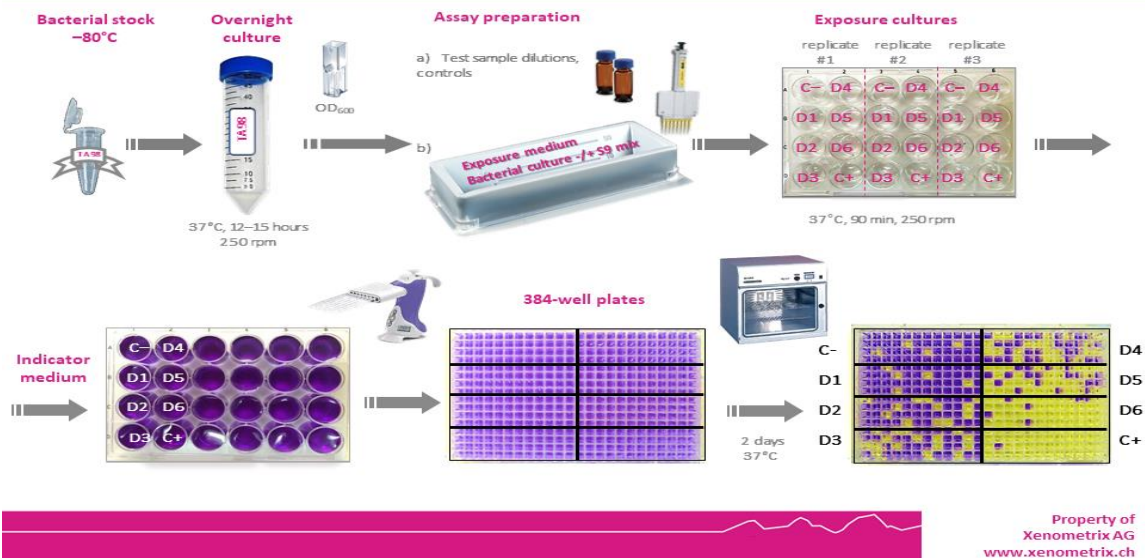
Tímto lze detekovat i látky promutagenního charakteru, jejichž genotoxický účinek se projeví až po metabolické aktivaci v savčím organismu. Aby bylo možno simulovat savčí metabolismus, test se doplní o tzv. metabolickou aktivaci S9, která obsahuje extrakt z krysích jater (Maron, Ames 1983). K vyhodnocení Ames testu se nejčastěji používá „pravidlo dvojnásobku“, které bylo popsáno Mortelmansem, Zeigerem (2000). Testovaná látka se považuje za mutagenní, pokud dojde k dvojnásobnému zvýšení počtu revertantních kolonií u testovaného vzorku oproti spontánním koloniím v negativní kontrole, nebo je detekována zřetelná závislost zvýšení počtu revertantních kolonií na koncentraci vzorku.

Ames test byl široce používán pro hodnocení genotoxického účinku různých typů vod, např. pitné vody (Shen et al. 2003) či vody po čištění v ČOV (Jolibois, Guerbet 2006, Sharma et al. 2015). V těchto testech jsou obecně používané kmeny *Salmonella* TA100 a TA98.

Modifikovaný mikrodestičkový flukтуаční test bakteriální reverzní mutace je založen na stejném principu jako miskový Ames test. Přednostmi tohoto testu jsou nízké požadavky na množství testovaného vzorku, použití méně plastů, snadné kolorimetrické vyhodnocení a především požadavek na malé množství jaterního homogenátu, a tím splnění principu 3R na snížení používání laboratorních zvířat v pokusech. Nevýhodou kapalného mikrodestičkového (formát 384 jamek) Ames testu je obtížná detekce hranice toxicity testovaného vzorku a kontaminace testu (obr. 3). Flukтуаční Ames test se v současné době často používá k hodnocení genotoxického potenciálu chemikálií a vzorků životního prostředí (Jolibois, Guerbet 2006, Sharma et al. 2015).



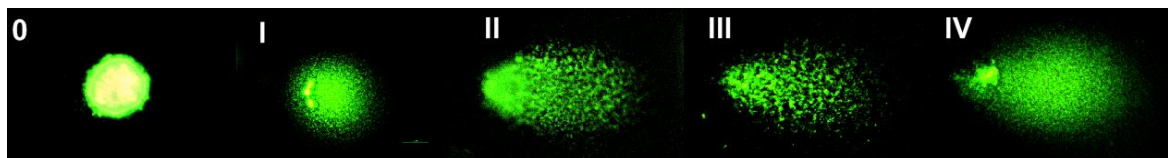
# Ames MPF



Obr. 3: Postup fluktuálního Ames MPF testu (zdroj [www.xenometrix.ch](http://www.xenometrix.ch))

## 3.3.2 Comet test

Kometový test (OECD TG 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay), dále jen Comet test, je jednoduchá metoda umožňující vizualizaci poškození DNA v eukaryotických buňkách (obr.4). Ke zlomům DNA dochází v důsledku přerušení fosfodiesterové vazby mezi dvěma sousedními deoxyribonukleotidy. Principem metody je alkalické rozplétání DNA a následná alkalická elektroforéza. Fragменты DNA putují při elektroforéze k anodě a vytvářejí při vysokých pH charakteristický obraz komety, pozorovaný ve fluorescenčním mikroskopu. Intenzita ohonu komety ve vztahu k jejímu čelu odráží počet DNA zlomů (Brendler-Schwaab et al. 2005). Tímto testem lze analyzovat různé typy eukaryotických buněk jak v systému *in vitro*, tak *in vivo*.



Obr. 4: Comet test -hodnocení poškození DNA. Vizuální klasifikace podle velikosti komety, tvaru ohonů a skóre od 0 (nepoškozené) do IV (těžce poškozené) (Collins et al. 1995)

## 3.3.3 Mikronukleový test

Mikronukleový test spočívá v pozorování fragmentovaného jaderného materiálu. Mikronukleus (mikrojádru) je malá částice vznikající v důsledku chromozomových zlomů

nebo poruchou funkce dělicího vřeténka. V případě chromozomových zlomů je mikronukleus, který není začleněn v jádře, tvořen acentrickým fragmentem chromozomu nebo celým chromozomem. Pomocí testu lze tedy detekovat cytogenetické poškození chromozomů nebo mitotického aparátu způsobeného látkami s genotoxickým účinkem. Mikronukleový test *in vitro* na savčích buňkách (OECD TG 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test) je validovaný test, který byl přijat v r. 2016 organizací OECD pro testování chemických látek. Nespornou výhodou mikronukleového testu je, že jej lze použít nejen na savčích buňkách, ale na jakékoli dělicí se buněčné populaci bez ohledu na její karyotyp.

### **3.3.4 Test chromozomových aberací**

Test chromozomových aberací (OECD TG 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test) umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu chromozomových abnormalit (strukturálních a numerických aberací) v savčích buňkách *in vitro* pomocí optického mikroskopu. V předem stanovených intervalech po expozici jsou buněčné kultury ošetřeny látkou zastavující metafázi (např. kolchicinem). Buňky jsou ve vhodné době zpracovány a následně je z nich připraven mikroskopický preparát. Preparáty jsou obarveny vhodným barvivem (např. barvení Giemsa-Romanowský) a metafázované buňky jsou analyzovány mikroskopicky na přítomnost chromozomových aberací. Stejně jako u Comet testu lze chromozomové aberace analyzovat u různých typů eukaryotických buněk. Koncový bod je jednoduchý a snadno identifikovatelný.

### **3.3.5 Test *Allium cepa***

Test *Allium cepa* využívá pro hodnocení toxicity cibule kuchyňské *A. cepa*. V monitorovacích studiích byly vyšší rostliny využívány jako excelentní genetické modely pro detekci mutagenů, které ohrožují životní prostředí (Leme, Marin-Morales 2009). Vzhledem k relativní jednoduchosti, citlivosti ke genetickému poškození, nízké ceně experimentu a malému požadovanému množství testovaného vzorku pro krátkodobou studii byl tento test uznán jako důležitý nástroj pro genotoxické studie. Buňky na konci kořene poskytují výhodný systém pro makroskopické (míra růstu, hodnoty EC<sub>50</sub>) i pro mikroskopické parametry (mitotický index, lepivost, chromozomální zlomy, přítomnost mikrojadra). Protože buňky produkují důležité rostlinné aktivační enzymy, jsou výsledky z testu na *A. cepa* v dobré shodě s výsledky z jiných testovacích systémů využívajících eukaryotických i prokaryotických buněk. Metoda hodnocení chromozomových aberací

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

### **3.4 Technologicky pokročilé testy stanovení genotoxicity**

Z technologicky pokročilejších testů stanovení genotoxicity jsou využívány pokročilé moderní technologie, zejména screeningové testy HTS (High Throughput Screening), prediktivní modely *in silico* (QSAR), trojrozměrné (3D) *in vitro* modely rekonstruovaných lidských tkání (např. EpiOcular, EpiDerm, EpiCorneal, EpiVaginal) nebo technologie založené na molekulárně biologických metodách (např. DNA senzorech či próbách - DNA-chips), případně orgánových čipech (organs-on-a-chip). Tyto testy umožní zcela nové integrované přístupy posuzování genotoxického potenciálu xenobiotik z hlediska bezpečnosti pro člověka, ale i jejich výskytu a účinků v životním prostředí. Zaváděním a validací technologicky pokročilých testů bude možné nahradit některé testy na zvířatech a zkvalitnit a zrychlit posouzení genotoxického rizika látek.

#### **3.4.1 Stanovení biomarkerů genotoxicity vysokokapacitním screeningem (HTS)**

S rostoucím chemickým a farmakologickým průmyslem vznikla naléhavá potřeba urychlit způsob hodnocení nežádoucích účinků nových sloučenin a rychle identifikovat aktivní sloučeniny/molekuly, které modulují konkrétní cíl, dráhu nebo biochemickou či buněčnou událost. Využití prediktivních, vysoce výkonnostních screeningových testů (HTS - High Throughput Screening) usnadňuje a urychluje provedení velkého množství biologických testů v krátkém časovém horizontu za pomoci použití robotiky, automatizovaných manipulátorů a sofistikovaných softwarů na zpracování velkého množství dat (Nel et al. 2013). Tyto testy jsou prováděny v mikrotitračních destičkách ve formátech 96, 384 a 1536 jamek. Nejvíce jsou HTS přístupy využívány pro hodnocení rizik nových chemikálií, ale zjištěné toxikologické profily nových látek lze extrapolovat i na ekologické retrospektivní hodnocení rizik (Villanueva et al. 2019).

#### **3.4.2 Testování genotoxicity na 3D modelech**

Aplikace těchto modelů v toxikologii poskytuje data, která jsou relevantnější pro hodnocení genotoxicity než standardní 2D modely. Buňky kultivované ve 3D se lépe podobají orgánové struktuře a jejich chování je v některých aspektech podobnější *in vivo*, např. životaschopnost buněk, proliferace, diferenciace, morfologie, genová a proteinová

exprese a funkce (Chen et al. 2020). Pro hodnocení genotoxicity byly vytvořeny robustní protokoly pro 3D modely pro ekvivalenty kůže, dýchacích cest a jaterní tkáně. U komerčně dostupných rekonstruovaných tkání kůže (EpiDerm™, EpiSkin™) bylo prokázáno, že mají stejné metabolické vlastnosti jako nativní kůže (Senapati et al. 2017). Další výhodou těchto modelů je, že většina 3D modelů je založena na lidských buňkách, což zvyšuje relevanci výsledků pro stanovení rizik pro zdraví lidí (Kohl et al. 2020).

Mikronukleový test na rekonstruované kůži (RSMN) je test genotoxicity *in vitro*, který se zabývá potenciálem testovaných látek způsobit genotoxicitu ve formě chromozomálních poškození (klastogenita a aneugenicita) spojených s dermální expozicí. Test RSMN byl již dostatečně validován a byl přijat do vývojového programu OECD pro testovací směrnice (Pfuhler et al. 2021).

### **3.4.3 Stanovení genotoxicity *in silico* metodou QSAR**

Metoda QSAR (Quantitative structure-activity relationship) je dlouhodobě používaný výpočetní přístup k analýze chemických dat. Toto modelování je založeno na předpokladu, že strukturně podobné chemické sloučeniny vykazují podobné biologické účinky. K modelaci kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou je využito statistických metod a metod pro analýzu dat za účelem tvorby predikčních modelů (Thomas et al. 2019). Jednou z výzev je využití QSAR k modelování biologického účinku směsí, což by mohlo být využito k predikci bezpečnosti různorodých environmentálních matric, jako je například OV (Muratov et al. 2020).

Benigni, Bossa (2019) ve své studii provedli souhrn a vyhodnocení dostupných informací, které ověřovaly schopnost metod QSAR předpovídat mutagenitu Ames testu. Ve své práci museli autoři konstatovat, že schopnost posledních nových modelů QSAR (např. Derek Nexus; LeadScope Model Applier; ADMET6.06.0007; ToxTree2.5.0) předpovídat mutagenitu Ames testu je ve shodě s výsledky získanými pomocí Ames testu.

## **3.5 Hodnocení genotoxicity odpadních vod ze zdravotnických zařízení**

Správný odběr vzorku je nezbytnou podmínkou, aby výsledky odpovídaly skutečnému stavu složení OV. V ČSN EN 5667-1 jsou uvedeny postupy odběru všech druhů vod, sedimentů a kalů. OV mají během dne velmi kolísavé složení. Z tohoto důvodu není vhodné provádět pouze jednorázový odběr prostých vzorků, ale je nutné odebírat průměrné směšné vzorky za určenou časovou jednotku (za 8 nebo za 24 hod) nebo provádět

opakované odběry podle předem připraveného plánu a zjišťovat minimum a maximum denního, týdenního nebo ročního kolísání složení OV (Popl, Fähnrich 1999). V převážné většině studií zabývajících se vyhodnocením genotoxicity OV byly odebírány směsné vzorky ručním vzorkovačem po dobu 24 hod (Hartmann et al. 1998, Jolibois et al. 2006, Ferk et al. 2009) nebo v době největší aktivity nemocnic, a to nejčastěji v době od 8 hod do 18 hod (Jolibois, Guerbert 2005, Sharma et al. 2015, Gupta et al. 2009). Vzorky po odběru musí být udržovány v chladu a skladovány buď při teplotě 4°C (Gupta et al. 2014, Sharma et al. 2013, 2015), nebo zamrazeny na -25°C (Hartmann et al. 1998, Jolibois et al. 2003, 2005, 2006, Magdaleno et al. 2014). Vzorky, které byly uchovávány při 4°C, je nutné zpracovat do 7 dní od odběru. Je nutné si uvědomit, že během odběru může dojít k nepřesnosti vzorkování, a to vlivem těkavosti, biodegradace, oxidace či redukce látek. Také teplota při odběru, transportu a skladování má velký vliv na případné ztráty a změny vzorku. Je tedy nutné minimalizovat tyto faktory vhodně zvoleným plánem vzorkování.

V některých případech, zvláště při provádění bakteriálních genotoxických testů (např. Ames test), je nutné vzorky OV před vlastní analýzou upravovat, aby se zabránilo kontaminaci během provádění testu. Nejjednodušší a nejvíce používanou technikou úpravy tekutých vzorků je filtrace přes speciální filtr (např. nitrát celulózoový, acetát celulózoový filtr) o velikosti pórů 0,45 µm (Hartmann et al. 1998, Jolibois et al. 2003, 2005, 2006) nebo o velikosti pórů 0,22 µm (Paz et al. 2006, Magdaleno et al. 2014). I když filtrace je nejvíce používanou metodou, White et al. (1996) ve své studii upozorňuje, že během filtrace může dojít k zachycení některých chemických látek na filtru a tím ke ztrátě genotoxické aktivity. Z těchto důvodů Gupta et al. (2009, 2014) a Sharma et al. (2013, 2015) použili ve svých biologických testech neupravenou OV bez zakoncentrování.

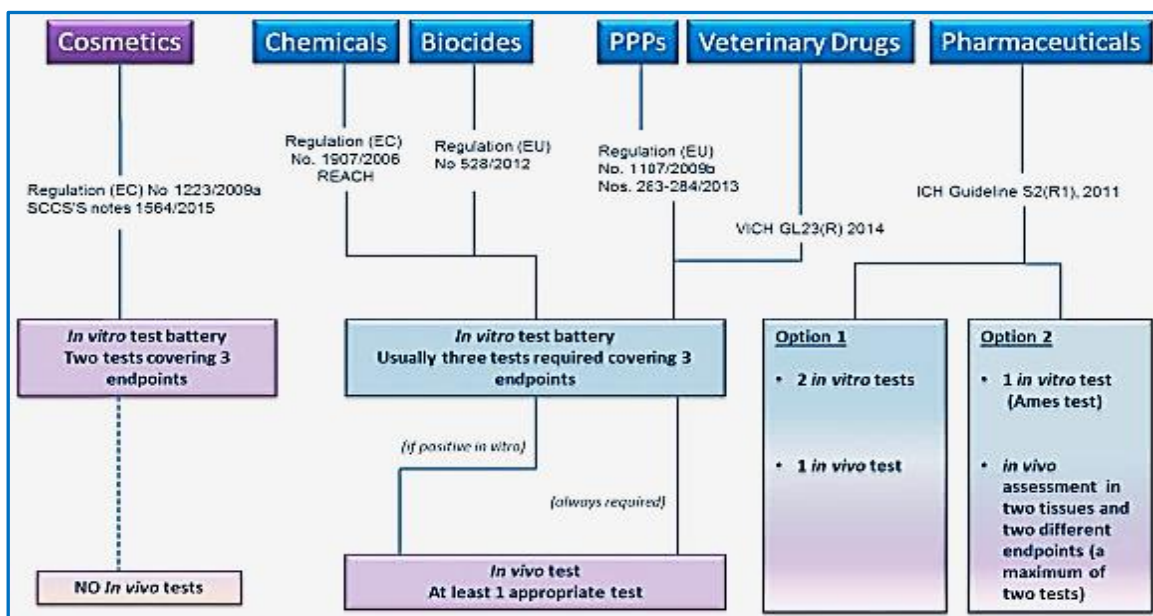
Další možností zpracování kapalných vzorků je extrakce. Nejvíce používaná je extrakce na pevnou fázi - Solid Phase Extraction (SPE) (Paz et al. 2006, Abbas et al. 2019). Podstatou této analytické techniky je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu v koloně, přes který protéká testovaný vzorek. Následně dojde k uvolnění zachycených látek promytím kolony vhodným činidlem o malém objemu. Zakoncentrovaný vzorek je po vysušení činidla rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle (např. DMSO) a je připraven k dalšímu zpracování nejen analytickými metodami, ale i zpracováním zkouškami *in vitro*, např. ke stanovení mutagenity Ames testem. Extrakce zabraňuje mikrobiální kontaminaci neošetřených vzorků a zlepšuje detekci toxikologických účinků způsobených nízkými koncentracemi znečišťujících látek.

Identifikace a kvantifikace jednotlivých mikropolutantů v nemocničních OV, která je prováděna pouze na základě analytických chemických metod (kapalinová nebo plynová chromatografie, průtoková analýza, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP), atomová absorpční spektrometrie (AAS), gravimetrie, kapilární elektroforéza apod.), může poskytovat zavádějící a nepřesné informace. Tento přístup nezohledňuje vícenásobné chemické interakce a nelze jimi posoudit synergické a aditivní účinky chemikálií v komplexních směsích (Verlicchi et al. 2012, Vlková et al. 2016). Z tohoto důvodu je vhodnější hodnotit genotoxický účinek OV přednostně pomocí biologických testů (Jabbour et al. 2016, Yilmaz et al. 2017, Cevik et al. 2020), které nevyžadují přesnou znalost složení vyšetřovaného vzorku ani jeho chemicko-fyzikální vlastnosti.

Pomocí řady *in vitro* a *in vivo* biotestů je možné identifikovat potenciaální mutageny a karcinogeny na základě detekce primárních lézí DNA, genových a genomových mutací, chromozomových aberací nebo tvorby mikrojader. Většina těchto biotestů je dlouhodobě využívána, dobře charakterizována, validována a přijímána regulačními agenturami.

V současné době má EU vypracované pokyny pro hodnocení genotoxického rizika v oblasti léčiv, chemikálií, přípravků na ochranu rostlin a kosmetiky. V těchto pokynech se řídí postupným přístupem, počínaje základní řadou testů *in vitro*, po nichž v některých případech následuje testování *in vivo* (obr. 5). Avšak, jak je výše uvedeno, strategie testování genotoxického potenciálu environmentálních komplexních směsí není upravena z hlediska regulace.

Regulační požadavky pro testování genotoxicity *in vivo* (na zvířatech) se liší v závislosti na typu regulované chemické látky. U kosmetických přípravků je testování *in vivo* v EU zakázáno od r. 2013 nejen pro testování finálních kosmetických přípravků, ale i jejich ingrediencí (EU č. 1223/2009). U průmyslových chemikálií a biocidních přípravků je test *in vivo* vyžadován pouze pokud má jeden z testů *in vitro* pozitivní výsledek (EU č. 528/2012). V regulačních požadavcích na humánní, veterinární léčiva a přípravky na ochranu rostlin je vždy vyžadováno testování *in vivo* (ICH S2 (R1), 2011). Mezi doporučené testy *in vivo* patří: Zkouška savčích erytrocytárních mikrojader *in vivo* (OECD TG 474), Zkouška na chromozomové aberace v buňkách kostní dřeně savců (OECD TG 475), Comet test na savčích buňkách (OECD TG 489).



**Obr. 5:** Souhrn nařízení a pokynů pro testování a posouzení genotoxicity v EU 2017 (PPP's plant protection products) (Corvi, Madia 2017)

Je třeba uvést, že jedním z obecných cílů EU v oblasti posouzení účinků chemických látek léčiv a přípravků na ochranu rostlin na lidské zdraví je co nejvíce minimalizovat používání zkoušek na zvířatech a povinnost dodržovat principy 3R. Cílem 3R je nahradit pokusy na zvířatech, kdykoli je to možné (replacement), omezit počet zvířat (reduction) a jejich potenciálního utrpení na minimum (refinement). Při posuzování účinků chemikálií a léčiv na lidské zdraví je tedy nutné přednostně použít k testování validovanou alternativní metodu a testování na laboratorních zvířatech by mělo být prováděno pouze jako poslední nezbytná možnost, mělo by být vědecky zdůvodněno a legislativně povoleno (EU 2010/63/EU).

V posledních letech bylo kromě zavedených *in vivo* testů vyvinuto a navrženo několik *in vitro* testovacích systémů využitelných pro monitorování genotoxicity OV zejména na základě dat ze stávajících testů pro hodnocení čistých chemických sloučenin a farmaceutických přípravků. Bohužel, dosud nedošlo k harmonizované legislativní podpoře baterií testů, které by pomohly stanovit různé koncové body genotoxicity.

Ke stanovení genotoxického potenciálu OV byla v této studii využita kombinace standardních metod (Ames test, Comet test, test chromozomových aberací, test *Allium cepa*) a unikátních, méně využívaných testů genotoxicity, konkrétně testu CEGA (Chicken Egg Genotoxicity Assay) a testu HET-MN (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction).

## 4 VLASTNÍ PRÁCE

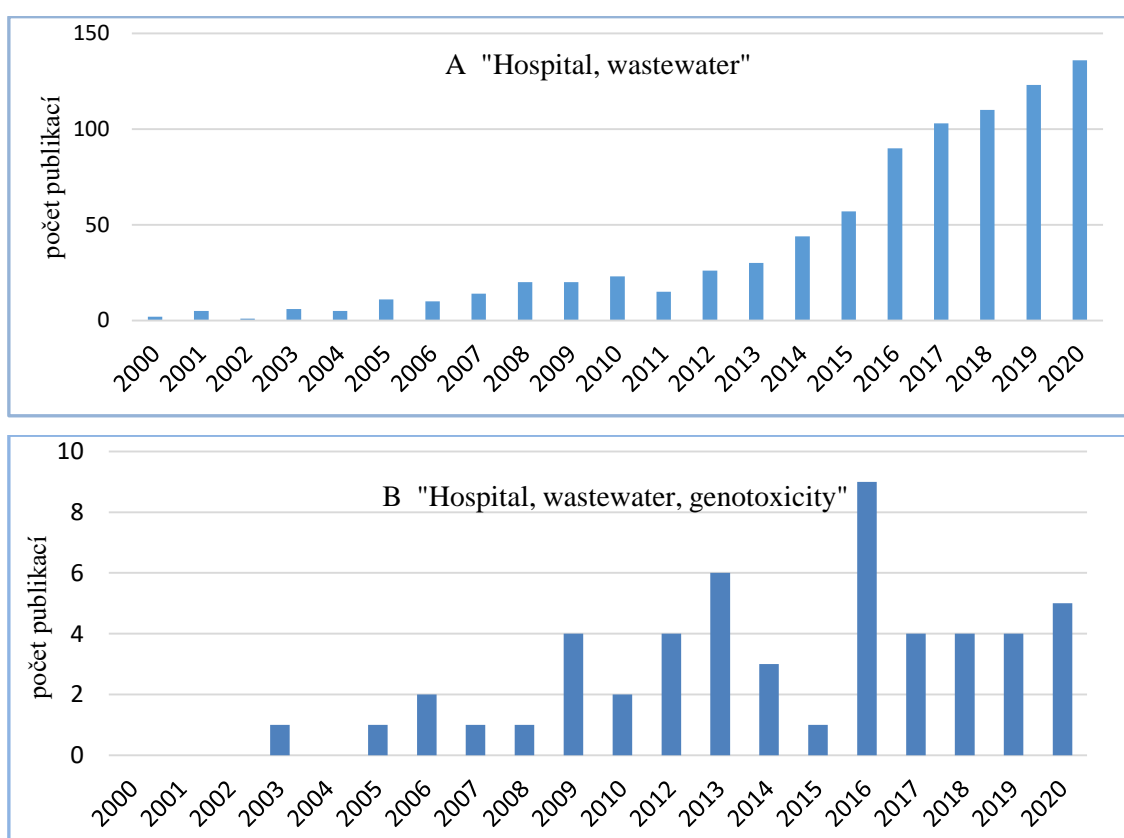
Disertační práce je prezentována souborem čtyř vědeckých studií, které byly publikovány v odborných recenzovaných časopisech. Vyhodnocení toxicity OV ze zdravotnických zařízení bylo provedeno na základě široké škály biologických testů. Vlastní práce se týkala především prací na odběrech a zpracování vzorků OV, úpravách vzorků v preanalytické fázi a na cytogenetických vyhodnoceních *in vitro*. Vyhodnocení toxicity bylo provedeno na základě široké škály biologických testů. Při prezentování dosažených výsledků byly pro unikátní komplexnost hodnocení toxicity OV ze zdravotnických zařízení přednostně voleny společné publikace, ve kterých se prezentovaly i výsledky dosažené koordinací činností více pracovišť SZÚ spolupracujících na řešení projektu institucionálního výzkumu - Ekotoxicita odpadních vod ve zdravotnických zařízení. Vzhledem ke stanoveným cílům institucionálního výzkumu se na jeho řešení podílela především dvě pracoviště SZÚ, a to Národní referenční centrum (NRC) pro hygienu půdy a odpadů a Oddělení alternativních toxikologických metod, jejímž pracovníkem je autorka této disertační práce. Hlavním cílem prezentovaných prací bylo komplexní posouzení environmentálních rizik OV ze zdravotnických zařízení z hlediska negativních ekotoxických a genotoxických účinků.



## 5. KOMENTÁŘ K PUBLIKACÍM

### 5.1 Studie I - Genotoxicity of wastewater from health care facilities

V posledních letech jsou nemocniční OV pro svoje negativní dopady na znečištění vodní bioty předmětem zvýšeného zájmu studia a výzkumu v různých zemích světa a počet publikací rozšiřujících znalosti o složení a účincích OV se neustále zvyšuje (graf 1A). Avšak převážná většina studií je zaměřena na identifikaci chemického složení a ekotoxicitu OV z nemocnic a zdravotnických zařízení a jen velmi málo z nich hodnotí komplexní toxikologické účinky a posuzuje genotoxický potenciál OV (graf 1B).



**Graf 1 A,B:** Počet publikací dle bibliometrické analýzy databáze Web of Science Core Collection. Klíčová slova: A/ „Hospital Wastewater“; B/ „Hospital wastewater genotoxicity“

Cílem studie I bylo shromáždit a analyzovat dostupná data, na základě kterých dojde k nasměrování plánovaného experimentálního výzkumu a bude zajištěna aktualizace současného stavu poznání v oblasti posouzení genotoxicity nemocničních OV pomocí různých biotestů. Přehled nejdůležitějších vědeckých prací v období 1996–2015 ve studii I je uveden v tabulce 1.

**Tab. 1:** Přehled studií genotoxicity zaměřených na odpadní vody ze zdravotnických zařízení na základě biotestů u nečištěných vzorků (Vlkova et al. 2016)

Reference	Country	Number of samples	Percentage of genotoxic samples	Bioassay
Giuliani et al. (1996)	Switzerland	851	13 %	UmuC test
Steger–Hartman et al. (1997)	Switzerland	6	50 %	UmuC test
Hartmann et al. (1998)	Germany	16	0 %	UmuC test
Hartmann et al. (1999)	Germany	25	56 % *	Ames test (TA100, TA98), Chromosomal aberration test, UmuC test
Jolibois et al. (2003)	France	18	55 % *	Ames fluct. test (TA100, TA98), SOS chromotest
Jolibois & Guerbet (2005)	France	71	65 % *	Ames fluct. Test (TA100, TA98, TA102), SOS chromotest
Paz et al. (2006)	Argentina	2	50 %	Test <i>Allium cepa</i> , Saccharomyces c. test
Jolibois & Guerbet (2006a)	France	38	82 % *	Ames fluct. test (TA100, TA98, TA102), SOS chromotest
Jolibois & Guerbet (2006b)	France	14	93 % *	Ames fluct. Test (TA100, TA98, TA102), SOS chromotest
Ortolan & Ayub (2007)	Brazil	28	32 %	UmuC test
Ferk et al. (2009)	Austria	3	0 % - Ames t. 100 % – Comet t.	Ames test (TA98, TA100, TA1535), Comet test
Bagatiny et al. (2009)	Brazil	10	100 %	Test <i>Allium cepa</i>
Gupta et al. (2009)	India	6	100 %	Ames test (TA98, TA100)
Alabi & Shokunbi (2011)	Nigeria	1	100 %	Animal assay
Atasoy et al. (2012)	Turkey	108	56 %	Ames test (TA98, TA100)
Sharma et al. (2013)	India	20	100 %	Ames test (TA98, T
Magdaleno et al. (2014)	Argentina	20	40 %	Test <i>Allium cepa</i>
Gupta et al. (2014)	India	15	100 %	Ames test (TA98, TA100, TA102)
Kern et al. (2015)	Brazil	1	100 %	Test <i>Allium cepa</i>
Sharma et al. (2015)	India	12	100 %	Ames fluct. test (TA100, TA98), SOS chromotest

\*pozitivní v jednom testu

Výsledky vědecké literatury shromážděné ve studii I potvrzují, že všechny nečištěné, ale i některé čištěné OV (Ferk et al. 2009) z nemocnic vykazují genotoxický účinek (tab. 1). Studie provedené v posledních 5 letech potvrzují závěry předešlých studií uvedených ve studii I (Sharif et al. 2016, Jabbour et al. 2016, Yilmaz et al. 2017, Cevik et al. 2020, Beltifa et al. 2020). Například ve studii Yilmaz et al. (2017) hodnotili environmentální riziko OV tří nemocnic v Istanbulu, které vypouštějí OV do Marmarského moře. Dvě nemocnice vypouštěly OV do moře přímo po předběžném čištění. Třetí nemocnice vypouštěla své OV do moře po průchodu městskou biologickou čistírnou. Environmentální riziko ve studii bylo hodnoceno kombinací chemické analýzy, hodnocením cytotoxicity a stanovením genotoxicity. Stanovení genotoxicity bylo provedeno pomocí testu Ames MPF (Xenometrix AG, Švýcarsko). Vzorky všech tří nemocnic vykazovaly silnou mutagenní aktivitu s maximálním nárůstem mutagenity (mutagenní index MI=10,4) oproti negativní kontrole v závislosti na koncentraci vzorků a metabolické aktivitě frakce S9. Dále nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi vzorky zpracovanými filtrací (0,45 µm) a nefiltrovanými vzorky. Kmen TA98 byl citlivější než kmen TA100. Tato první studie nemocničních OV v Turecku ukázala vysoké environmentální riziko OV sledovaných nemocnic v Istanbulu.

Z vědecké literatury je zřejmé, že hodnocení genotoxických účinků OV je extrémně složitý problém ze dvou hlavních důvodů. Za prvé, nemocniční OV mají velmi variabilní složení závislé na mnoha proměnlivých faktorech (kapacita nemocnice, rozdílné výzkumné, odborné a provozní činnosti apod.). Za druhé, komplexní hodnocení genotoxicity nelze stanovit pouze jedním testem, ale je nutné zvolit baterii 2-3 testů stanovujících základní koncové body genotoxicity jako jsou genové mutace, chromozomové aberace a větší poškození genomu vedoucí k aneuploidii (Turkez et al. 2017).

Ames test je jedním z nejvíce používaných biologických testů identifikujících genové mutace především u chemických a farmaceutických sloučenin (tab. 2). Publikované studie ukazují, že Ames test je také široce používán při posuzování toxicity environmentálních matric, jakou je například OV (tab. 1). K jeho masivnímu rozšíření přispěly nejen četné výhody tohoto testu (standardizace, reprodukovatelnost, snadná proveditelnost), ale i fakt, že jeho „objevitel“ B. N. Ames ani jeho zaměstnavatel (Kalifornská univerzita Berkeley) unikátní kmeny *S.typhimurium* používané v testu nedali nikdy patentovat. Zcela záměrně je dali volně k dispozici pro usnadnění zavedení a šíření testu v akademických, průmyslových a vládních laboratořích (Claxton et al. 2010).

**Tab. 2:** Odhadovaný počet sloučenin s genetickými toxikologickými údaji v toxikologické databázi Leadscope (Leadscope 2018)

Typ zkoušky	Počet sloučenin
Bakteriální mutagenicita	10 440
Chromozomové aberace ( <i>in vitro</i> )	1 690
Chromozomové aberace ( <i>in vivo</i> )	360
Mutagenicita na savčích buňkách ( <i>in vitro</i> )	2 390
Mikronukleový test ( <i>in vivo</i> )	290
Mikronukleový test ( <i>in vivo</i> )	1 850

Statní zdravotní ústav v Praze dlouhodobě splňuje akreditační požadavky Českého institutu pro akreditaci pro zkoušku na reverzní mutace s bakteriemi *S.typhimurium* (Ames test). Na základě vyhodnocení dostupných dat a vědeckých informací ohledně jeho potenciálního využití pro vzorky OV a praktických zkušeností s prováděním této akreditované zkoušky na pracovišti byl Ames test zvolen jako metoda první volby k hodnocení mutagenity OV. Byly vyzkoušeny různé postupy přípravy vzorků a provedena co nejvhodnější optimalizace preanalytické fáze.

V současné době existuje několik běžně využívaných modifikací provedení Ames testu. Pro testování OV je nejčastěji využíván původní miskový Ames test (ISO 16240, 2005) nebo mikrodestičkový Ames MPF test, tzv. fluktuační (ISO 11350, 2012). V těchto standardizovaných protokolech testování genotoxicity vod jsou používány dva specifické kmeny *S.typhimurium* – kmen TA98 a TA100. Kmeny detekují dva rozdílné typy mutací, a to „posunové mutace“ (TA98) a mutace „substituce párů bází“ (TA100). Někteří autoři doporučují pro testování OV rozšířit sadu 2 kmenů o další kmen TA102, umožňující detekci cross-over mutací a vysokou citlivost při testování genotoxicity OV. Jsou také dostupné výsledky studie využívající pro testování OV kmen TA1535 (Ferk et al. 2009).

Citlivost a selektivitu bakteriálních kmenů používaných v Ames testu, uvedených v pokynech OECD TG 471, řešili na svém zasedání v r. 2017 v Tokiu členové Mezinárodního workshopu o testování genotoxicity. Cílem tohoto zasedání bylo revidovat validovaný test OECD TG 471 po 20 letech používání a doporučit možnou úpravu v počtu používaných kmenů. K detekci 3 typů mutací je v pokynech OECD vyžadováno použití minimálně 5 bakteriálních kmenů z 9 doporučených (kmeny *S.typhimurium* TA97, TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537, *E.coli* WP2 uvrA, *E.coli* WP2 uvrA pKM101).

Rovněž byla provedena analýza publikovaných dat zaměřená na vypovídající schopnost jednotlivých bakteriálních kmenů detekovat vznik mutací, zahrnující data o více než 10 000 sloučeninách. Analýza zaměřená na kmeny TA98 a TA100 ukázala, že tyto kmeny byly dostatečně citlivé pro detekci většiny bakteriálních mutagenů (93 %), a pokud budou do posuzování mutagenity zahrnuty také testy *in vitro*, které detekují klastogeny, jako je např. test chromozomových aberací *in vitro*, tak výsledná baterie testů zvýší detekovatelnost bakteriálních mutagenů na 99 %. Celkově tyto analýzy podporují závěr, že kmeny *S.typhimurium* TA1535, TA1537, TA102 a kmen *E.coli* WP2 *uvrA* by mohly být odstraněny z doporučených v OECD TG471 s malou ztrátou vypovídací schopnosti a citlivosti Ames testu pro detekci bakteriálních mutagenů (Williams et al. 2019).

Při použití bakteriálních testů, jako je Ames test, je třeba brát v úvahu, že i po dezinfekci OV obsahují určité množství mikroorganismů. OV a kanalizační systém jsou ideálním prostředím pro růst mikrobiální komunity. Aby nedošlo ke kontaminaci vzorků, je nutné před testováním provést vhodnou úpravu vzorků OV. Běžně používanou technikou úpravy vzorku je sterilizace filtrací přes filtry o velikosti pórů 0,45 - 0,22  $\mu\text{m}$  (Cevik et al. 2020, Jabbour et al. 2016). Další možností zpracování kapalných vzorků je extrakce. Nejvíce používaná je extrakce na pevnou fázi - Solid Phase Extraction (SPE) (Paz et al. 2006, Abbas et al. 2019). Různé způsoby úpravy budou hodnoceny a diskutovány v komentářích studií II a III.

Další velmi perspektivní, dlouhodobě již od r. 1938 používanou metodou pro ekotoxické a genotoxické hodnocení látek znečišťujících životní prostředí, je test založený na rostlinném testovacím systému *A.cepa* (cibule kuchyňské). Použití rostlin poskytuje údaje o možném poškození DNA v mnohobuněčném kontextu eukaryotického organismu. Proto lze získané údaje extrapolovat u eukaryot obecně (Bonciu et al. 2018).

Další výhodou testu založeného na *A.cepa* je, že lze sledovat několik koncových bodů genotoxicity. Především mezi ně patří genové mutace, které způsobují morfologické změny na chromozomech – chromozomové aberace. Model cibule *A.cepa* má diploidní genom pouze s 16 monocentrickými chromozomy, které jsou pro svoji robustnost snadno pozorovatelné světelným mikroskopem a vhodné pro detekci karyomorfologických změn. Mezi další koncové body patří sledování odchylek buněčného cyklu hodnocené mitotickým indexem ( $MI^m$ ), asynchronií buněčného cyklu, chromatidové fragmenty, nukleoplazmatické můstky, numerické změny chromozomů, aneugenické změny, přítomnost a počet mikronukleů (Bonciu et al. 2018).

Test *Allim cepa* je testovací systém, kdy je modelový organismus v přímém kontaktu s testovanou látkou, což jej činí ideálním testem pro hodnocení genotoxických rizik OV. V neposlední řadě tento test vykazuje značnou robustnost, proveditelnost, přenositelnost a nízkou nákladnost. Pro výše zmíněné unikátní vlastnosti a standardní rutinní používání tohoto testu v laboratoři SZÚ byl tento test zvolen jako druhý základní test pro optimalizaci stanovení genotoxických rizik OV.

## 5.2 Studie II - Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays

Cílem studie II bylo posouzení toxicity OV z 5 nemocnic (H1–H5) v České republice za použití baterie biotestů zahrnující hodnocení ekotoxicity, genotoxicity a reprotoxicity. Vybrané nemocnice provozují uzavřené infekční oddělení a jsou povinny provádět řádné hygienické zabezpečení a dezinfekci OV dle doporučení v normě ČSN 75 6406 - Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení vypouštěnými do stokové sítě pro veřejnou potřebu. Jedna z posuzovaných nemocnic vypouští své OV přímo do vodního recipientu a má svoji samostatnou ČOV. OV této nemocnice musí splňovat ukazatele a hodnoty přípustného znečištění OV dle Nařízení vlády č. 401/2015 Sb., týkající se vypouštění OV do vod povrchových a do kanalizací, a musí mít povolení vypouštět OV do povrchových vod od příslušného vodoprávního úřadu.

Odběry vzorků nemocnic H1-H5 byly provedeny v únoru 2018 (13. 2. – 22. 2. 2018). Jednalo se o časově závislé směsné vzorky odebírané v době největší aktivity nemocnic, tj. od 9 hod do 13 hod. Podobné schéma odběru zvolili i ve své studii ekotoxicity Boillot et al. (2008) nebo ve studii genotoxicity Gupta et al. (2009) a Sharma et al. (2015). Vzorky byly odebrány v místě výtoku OV z ČOV do městské kanalizační sítě nebo v místě výtoku do vodního toku dle postupu předepsaného normou ČSN EN 5667-1.

Ekotoxicita OV byla stanovena využitím tří metod doporučených ČSN 75 6406 v příloze F (2020), a to testu inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* (ISO 6341, 2012), testu inhibice luminiscence *Aliivibrio fischeri* (ISO 11348-2, 2007) a testu inhibice růstové rychlosti sladkovodních zelených řas *Desmodesmus subspicatus* (ISO 8692, 2012). Testy byly doplněny ekotoxickým testem *Allium cepa*, kterým se stanovuje inhibice růstu kořenů cibule vystavených vzorkům OV vůči negativní kontrole s čistou vodou. Ekotoxický test *Allium cepa* se ukázal ve studii II jako nejméně citlivý v porovnání s ostatními inhibičními testy. Pokud hodnoty inhibice (toxický efekt) u modelových organismů překročily 50 %, byla vypočítána hodnota EC<sub>50</sub>. Vypočítané hodnoty EC<sub>50</sub> pro každý modelový organismus byly transformovány na toxické jednotky (TU) dle vzorce:

$$TU = [1/EC_{50} (\%)] * 100.$$

Pětistupňový klasifikační systém hodnocení toxicity na základě výpočtu TU byl navržen autory Persoone et al. (2003) a je často využíván k vyhodnocení ekotoxicity OV (Yilmaz et al. 2017, Laquaz et al. 2017). Získané hodnoty TU ukázaly, že OV ze dvou posuzovaných

nemocnic (H1, H4) patří do třídy toxicity III, tj. jako toxické, a ostatní tři vzorky OV z posuzovaných nemocnic (H2, H3, H5) patří do třídy I, tj. jako netoxické.

Reprotoxická OV byla ve studii II testována standardizovaným komerčním mikrotitračním (destičkovým) testem YES/YAS (Yeast Estrogen Screen, Yeast Androgen Screen, Xenometrix®, Švýcarsko), který detekuje estrogenní a androgenní aktivity testovaných vzorků OV na geneticky modifikovaných kvasinkových buňkách *Saccharomyces cerevisiae*.

U vzorků OV z nemocnic H1 a H4 byl potvrzen potenciál agonistické aktivity vůči estrogennímu a androgennímu receptoru. Je třeba vzít v úvahu, že vzorky OV v testu byly 250x koncentrované, proto musí být interpretace výsledků těchto i dalších podobných *in vitro* testů prováděna s ohledem na biorelevantní koncentrace.

Genotoxický účinek OV sledovaných nemocnic byl ve studii II posuzován kombinací dvou testů, a to Ames testem a Comet testem, které jsou běžně využívány pro hodnocení toxicity OV. U obou testů byla provedena úprava vzorků filtrací, aby se zabránilo mikrobiologické kontaminaci vzorků. Comet test byl proveden a vyhodnocen na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Comet test umožňuje detekovat primární poškození DNA v savčích buňkách. Ve studii II byly použity 3T3 Balb/c (myší embryonální fibroblasty) (Singh et al. 1988, Tice et al. 2000). Komety byly vizualizovány fluorescenčními barvivy a hodnoceny fluorescenčním mikroskopem. Ames test byl proveden dle standardního operačního postupu vycházejícího z metody OECD TG 471 (1997). Ve studii II byly pro Ames test použity dva testovací kmeny pro detekci bodových mutací, pro detekci posunových mutací byl použit kmen TA98 a pro substituci párů bází byl použit kmen TA100. K simulaci metabolické aktivace savců byla použita aktivační směs S9 obsahující homogenát jater hlodavců. Testy byly provedeny paralelně s/bez přítomnosti vnějšího metabolického aktivačního systému. Detailní popis metody včetně vlastní výroby jaterního homogenátu a optimalizace metabolické aktivační směsi S9 je uveden ve studii III. U žádného vzorku OV z nemocnic H1-H5 nebyla genotoxicita potvrzena. Je pravděpodobné, že genotoxické účinky nebyly zaznamenány z důvodu sterilizace vzorků filtrací, protože v takovém případě může dojít k eliminaci některých (vysokomolekulárních) látek (White et al. 1996, Ferk et al. 2009).

Komplexnímu testování toxicity nemocničních OV (H1–H5) ve studii II předcházel pilotní výzkum sledující týdenní dynamiku toxicity vzorků čištěných OV z nemocnice H1 ve dvou ročních obdobích. První série odběrů byla provedena v listopadu 2016, druhá v květnu



2017. Po provedení testů nebyly zjištěny významné rozdíly ekotoxicity mezi jednotlivými dny v týdnu, nicméně byly zaznamenány vyšší hodnoty ekotoxicity v květnu ve srovnání s listopadem. Genotoxicita těchto dvou týdenních odběrů byla hodnocena pouze Ames testem a pozitivní výsledek nebyl zaznamenán u žádného vzorku.

Na základě výsledků studie II a získaných vědeckých poznatků z rešerše ve studii I vyvstalo několik otázek a úkolů, jejichž objasnění a realizování je žádoucí k prohloubení znalostí o dané problematice a pro optimalizaci testování genotoxických účinků nemocničních OV:

- 1/ Porovnat různé preanalytické postupy využitelné pro vhodnou přípravu vzorků OV určených pro sledování genotoxických účinků.
- 2/ Doplnit další analýzy a metody používané pro sledování genotoxických účinků OV.
- 3/ Posoudit, zda úprava vzorku filtrací způsobuje změny ve vzorku OV.

Při hodnocení kvality vod je kriticky důležitá úprava vzorků pro testování. Různé způsoby předúprav vodních environmentálních vzorků jsou přizpůsobeny převážně pro chemické analýzy a nejsou optimalizovány pro metody *in vitro*. Z těchto důvodů byla studie II doplněna o 3 různé způsoby úpravy testovaných vzorků OV z nemocnic H1–H5. Nejvíce používanou technikou sterilizace při testování různých forem vod je filtrace přes vhodný filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  (Jolibois et al. 2003, 2005, 2006, Hartmann et al. 1998) nebo až velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$  (Paz et al. 2006, Magdaleno et al. 2014). Při úpravě vzorků ve studii II byla použita sada nylonových filtrů v sérii 1,6  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$  a 0,22  $\mu\text{m}$ . Filtry o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$  byly použity ve studiích II a III z důvodů opakované kontaminace agarových ploten po sterilizaci filtrací s filtry 0,45  $\mu\text{m}$ . Filtrace jako způsob úpravy vzorků OV je požadována také normou ISO 11350, která standardizuje detekci genotoxicity/mutagenity OV pomocí fluktuačního Ames testu. V této normě však je doporučeno použít pouze filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Nicméně četné studie upozorňují na fakt, že filtrace vzorků OV může způsobit eliminaci látek s cytotoxickým a genotoxickým účinkem (Kreuzinger et al. 2007, Ferk et al. 2009). Jako druhý způsob zpracování vzorků OV byl navržen a vyzkoušen tzv. eluát z filtrů. Nylonové filtry, přes které byly filtrovány vzorky OV z nemocnic H1-H5, byly umístěny do lahví s 15 ml DMSO, inkubovány 24 hod při 25 °C a před vlastním testováním byly v DMSO 2 hod třepány (150 kmitů/min.). Posledním zvoleným způsobem předúpravy vzorků byla extrakce na pevnou fázi. Tento způsob extrakce je nejvíce používán při testování pitných a

povrchových vod (Roubicek et al. 2020), kde je nutné konzervovat a koncentrovat rozpuštěné organické látky pro maximální výtěžnost jejich toxicity (Abbas et al. 2019). 500 ml vzorku gravitačně protéklo kolonou (sorbet Separon TM COPOL SE). Následně byl sorbet vysušen a extrahován v acetonu. Acetonový extrakt byl odpařen pod proudem dusíku ve vodní lázni do sucha a rozpuštěn v 2 ml DMSO. Jako „slepý“ vzorek byl testován Ames testem extrakt destilované vody a současně kontrolována čistota DMSO stejným způsobem.

**Tab. 3:** Hodnoty mutagenního indexu (MI) odpadních vod z nemocnic H1- H5. Srovnání tří různých předúprav vzorků

		TA98				TA100				TA1535			
		S9-		S9+		S9-		S9+		S9-		S9+	
<b>H1</b>	<b>FOV</b>	1,03	0,97	1,25	1,14	1,12	0,96	0,99	1,01	1,20	1,03	0,92	1,24
	<b>EF</b>	1,18	1,00	0,87	1,22	1,22	0,93	1,10	0,96	0,79	1,23	1,16	1,73
	<b>SPE</b>	1,08		0,94		0,92		1,10					
<b>H2</b>	<b>FOV</b>	1,23	0,80	1,35	0,93	1,13	1,04	1,13	1,21	0,80	0,86	1,25	0,76
	<b>EF</b>	1,48	1,18	0,99	1,27	1,08	1,01	1,04	1,11	0,91	1,38	0,92	1,45
	<b>SPE</b>	1,05		1,05		1,15		1,06					
<b>H3</b>	<b>FOV</b>	1,30	1,10	1,22	1,07	0,92	1,09	1,00	1,20	1,00	1,04	1,35	1,13
	<b>EF</b>	1,34	1,06	1,16	1,37	1,01	1,12	1,00	1,00	0,66	1,38	1,13	0,91
	<b>SPE</b>	0,92		1,14		1,10		1,14					
<b>H4</b>	<b>FOV</b>	1,38	0,95	1,22	1,21	1,17	1,19	1,03	1,03	0,86	0,76	1,12	1,32
	<b>EF</b>	1,19	1,16	0,89	0,91	1,24	1,21	1,06	1,03	0,72	1,74	1,00	1,03
	<b>SPE</b>	1,08		1,09		1,14		1,04					
<b>H5</b>	<b>FOV</b>	1,03	0,90	1,12	1,10	0,98	1,09	1,10	0,96	0,81	0,87	0,80	1,02
	<b>EF</b>	0,81	0,99	1,22	1,08	1,04	0,97	1,13	1,21	1,12	1,48	0,83	0,95
	<b>SPE</b>	1,07		1,19		1,15		0,96					

*FOV - filtrovaná odpadní voda; EF – eluát z filtrů; SPE – extrakce na pevnou fázi (Solid Phase Extraction)*

V tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty mutagenního indexu (MI) vzorků OV z nemocnic H1- H5, které byly před vlastním testováním upravené třemi rozdílnými způsoby. Mutagenní potenciál nebyl prokázán u žádného vzorku OV a nebyl zaznamenán ani žádný rozdíl mezi různými způsoby úpravy. Vzhledem k negativním výsledkům mutagenity u všech vzorků nebylo možné porovnat vliv úprav vzorků na výsledky, nicméně bylo potvrzeno, že nedochází ke kontaminaci testovacího systému.

Optimalizaci příprav vzorků povrchových, podzemních a nemocničních OV pro biologické zkoušky *in vitro* posuzoval ve své studii Abbas et al. (2017), který popsal a charakterizoval výhody a nedostatky běžně používaných technik (filtrace, okyselení, extrakce na pevnou fázi). Ty zahrnovaly detekci environmentálně významných endokrinních aktivit,

cytotoxicity a mutagenity. Mutagenita vzorků byla posuzována pomocí fluktuálního Ames MPF testu a Umu testu (mutagenní test na bakteriích *E.coli*). Ve studii byla také porovnána účinnost 3 sorbentů na extrakci při kyselém (pH 2,5) a neutrálním pH 7. Výsledky studie ukázaly, že okyselení vzorků významně ovlivňuje a zkrsluje jejich toxicitu. Filtrace přes filtry o velikost pórů 1  $\mu\text{m}$  neovlivňuje výsledky toxicity *in vitro* testů. Extrakce na pevnou fázi je velmi selektivní a nevhodně zvolený sorbent může způsobit ztrátu biologicky aktivních sloučenin v matrici, které mají nízkou afinitu k sorbentu. Metoda SPE se sorbentem Telos C18/ENV (pH 7) byla vybrána jako nejvhodnější pro zpracování vzorků OV. Navzdory probíhajícím výzkumům optimalizace úpravy vzorků vod pro analýzu biotestů zůstává stále řada nevyřešených otázek a je tedy velkou výzvou pokračovat ve výzkumu a provést další zkoumání v této oblasti.

Z provedené rešerše ve studii I a dalších publikací je zřejmé, že mikrodestičková fluktuální forma Ames testu je stále více využívána pro stanovení genotoxicity nemocničních OV (Jolibois et al. 2005, 2006, Sharma et al. 2015, Vijay et al. 2018, Rainer et al. 2021). Hlavní předností této metody je jednoduchost kolorimetrického vyhodnocení. Proto lze předpokládat, že test bude vhodný pro rutinní testování mutagenity. S ohledem na problematické použití standardizovaného miskového Ames testu (získání pouze negativních výsledků mutagenity) byl zaveden fluktuální Ames test s cílem potvrdit výsledky standardního miskového Ames testu a posoudit, zda by mohl být fluktuální Ames test vhodnější pro hodnocení genotoxických/mutagenních účinků OV z hlediska proveditelnosti a vypovídající schopnosti. Posouzení mutagenního potenciálu vzorků OV z nemocnic H1-H5 pomocí fluktuálního Ames testu bylo provedeno podle požadavků protokolu dodavatele kitu – „Ames MPF 98/100 Aqua - ISO11350“ (f. Xenometrix). Tento kit splňuje podmínky mezinárodní normy ISO 11350, která specifikuje postup pro stanovení genotoxického potenciálu OV pomocí bakteriálních kmenů *S.typhimurium* TA98 a TA100. Vzorky OV z nemocnic H1-H5 byly testované ve třech koncentracích 100 %, 50 % a 25 %. U žádného vzorku nebyla prokázána koncentrační závislost ani dvojnásobné zvýšení počtu revertantů oproti negativní kontrole. Je však nutné poznamenat, že dle normy ISO 11350 i protokolu f. Xenometrix je vyžadováno provést sterilizaci vzorků filtrací.

V r. 2019 byl proveden odběr OV 7 nemocnic pro účely studie IV. Vzorek H6 měl specifické složení - čištěná OV na výtoku z nemocniční ČOV se mísila s nečištěnou OV z nemocniční prádely. Z vědeckých publikací je známo, že právě nemocniční prádely

z důvodu zajištění vysokého standardu čistého a dezinfikovaného prádla jsou zdrojem široké škály znečišťujících látek v důsledku aplikace vysokých dávek dezinfekce, pracích prostředků, detergentů apod. Tyto látky způsobují, že OV z nemocničních prádelen mohou vykazovat toxické a genotoxické vlastnosti (Kern et al. 2013. Lutterbeck et al. 2020). Vzorek OV z nemocnice H6 byl po provedení ekotoxických testů klasifikován jako velmi toxický (třída IV) dle klasifikace Persoone et al. (2003) uvedené ve studii II. Na základě těchto informací bylo u vzorku H6 provedeno také stanovení genotoxicity miskovým a fluktuálním Ames testem. Opět byly použity dvě formy úpravy vzorků (filtrace, výluh filtrů) před testováním. Testy byly provedeny stejným způsobem jako u vzorků OV z nemocnic H1–H5. Vzorek byl testován ve 3 koncentracích. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 4.

**Tab. 4:** Miskový Ames test - hodnoty Mutagenního indexu (MI) vzorků odpadních vod z nemocnice H6

	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
<b>FOV 100 %</b>	0,96	1,17	1,07	1,13
	1,38	0,92	0,98	1,00
<b>FOV 50 %</b>	0,90	1,14	0,86	1,05
<b>FOV 25 %</b>	0,91	1,19	0,86	1,10
<b>EF</b>	<b>5,04</b>	<b>5,53</b>	<b>2,02</b>	<b>2,05</b>
	<b>3,38</b>	<b>3,35</b>	1,29	1,31

*FOV - filtovaná odpadní voda; EF – výluh z filtrů*

U vzorků upravených filtrací byl mutagenní index vždy menší než dvě, a to jak u miskového (agarového) Ames testu, tak u fluktuálního Ames testu. Pozitivní výsledek byl zaznamenán jen u specifické úpravy vzorku, a to výluhu z filtrů. Výrazný mutagenní potenciál byl zaznamenán u kmene TA98, ale u kmene TA100 byla hodnota mutagenního indexu hraniční. Hraniční hodnota u kmene TA100 již nebyla potvrzena při opakování testu. Pozitivní výsledek naznačuje, že u vysoce toxického vzorku H6 byly pravděpodobně vyluhovány zachycené látky z hydrofilních filtrů. Tento navržený způsob úpravy bude předmětem dalšího zkoumání.

Srovnání dvou formátů Ames testu bylo hodnoceno ve studii Rainer et al. (2021). Pro tento účel bylo vybráno 21 chemických látek. Oba testy ukázaly vysokou shodu (> 90 %) při

klasifikaci mutagenních a nemutagenních látek. Avšak nejnižší účinná koncentrace (LEC) byla nižší u 17 z 21 testovaných látek u flukтуаčního formátu. Toto zjištění vede k závěru, že flukтуаční Ames test by mohl být vhodnější při testování komplexních směsí, u kterých jsou relevantnější nízké koncentrace nebezpečných látek, jako jsou například vzorky OV.

V současné době onemocnění covid-19 způsobilo výrazný nárůst užívání dezinfekčních prostředků, zvláště ve zdravotnických zařízeních. Nadužívání dezinfekčních prostředků způsobuje v OV vznik vedlejších produktů dezinfekce (DBP), které mají prokázané karcinogenní a genotoxické účinky (Rahman et al. 2010, Wagner, Plewa 2017). Z těchto důvodů bylo rozšířeno posouzení dynamiky genotoxicity čištěných vzorků OV z nemocnice H1 o třetí týdenní odběr, který byl proveden 15. 3. - 19. 3. 2021. Byly dodrženy stejné podmínky vzorkování jako u odběrů v letech 2016 a 2017. Srovnání vybraných hodnot fyzikálních parametrů s předešlými odběry je uvedeno v tabulce 5. Podle předpokladu byl zaznamenán výrazný nárůst volného chloru.

**Tab. 5:** Srovnání vybraných fyzikálních parametrů vzorků odpadních vod z nemocnice H1 v různých časových obdobích

Parametr	pH			Konduktivita μS/cm			Volný chlor mg/l		
	X/2016	V/2017	III/2021	X/2016	V/2017	III/2021	X/2016	V/2017	III/2021
<b>pondělí</b>	8.05	8.01	7.52	2010	1125	685	0.04	0.25	<b>3.59</b>
<b>úterý</b>	8.01	8.03	7.46	2130	1186	679	0.05	0.32	<b>3.94</b>
<b>středa</b>	8.12	8.07	7.64	2150	1205	689	0.07	0.15	<b>0.48</b>
<b>čtvrtek</b>	8.02	8.07	7.60	2090	1206	683	0.07	0.17	<b>0.57</b>
<b>pátek</b>	8.03	8.09	7.69	2160	1232	753	0.05	0.20	<b>0.54</b>

Genotoxicita vzorků z nemocnice H1 (odběr v březnu 2021) byla vyhodnocena pomocí miskového a flukтуаčního Ames testu (kmeny TA98, TA100). U žádného vzorku OV nebyl zaznamenán pozitivní výsledek. Stejně jako u předešlých testů byly vzorky upraveny filtrací, což znovu naznačilo, že tento způsob úpravy buď interferuje s testovacím postupem, nebo je koncentrace potenciálně genotoxických látek ve vzorcích OV pod limitem detekce. Podobná zjištění byla zaznamenána i v jiných studiích (Ferk et al. 2009). Nicméně v četných studiích i po úpravě vzorku OV filtrací jsou zaznamenány pozitivní výsledky Ames testu (Sharif et al. 2016, Jabbour et al. 2016, Yilmaz et al. 2017, Cevik et al. 2020).

Vzhledem k opakovaně získaným negativním výsledkům genotoxicity OV u filtrované OV

bylo velmi vhodné ověřit vliv filtrace na další mechanismy toxicity a navrhnout vhodnou optimalizaci úpravy vzorků. Pro srovnání filtrovaných a nefiltrovaných vzorků byl použit test inhibice růstové rychlosti řasy *D.subspicatus*. Byly testovány vzorky z nemocnic H1-H5 (odběr v únoru 2018) a H6 (odběr v dubnu 2019). Filtrace byla provedena pomocí nylonových filtrů s velikostí pórů 1,6  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$  a 0,22  $\mu\text{m}$ . Výsledky porovnání lze rozdělit do dvou skupin (tab. 6). U vzorků, které před filtrací vykazovaly vysokou toxicitu (H1, H2, H4), došlo po filtraci k jejímu výraznému poklesu, což nepochybně souvisí se záchytem organických částic s absorbovanými chemickými látkami na filtru. Vzorky, u kterých před filtrací nebyla stanovena žádná toxicita, pouze mírná stimulace růstové rychlosti (H3, H5), se filtrací prakticky nezměnily. U vzorku z nemocnice H6, specifického tím, že byl smíchán s OV z nemocniční prádely, byla stanovena 100% inhibice před i po filtraci. Toxicita vzorku byla natolik vysoká, že znemožnila srovnání neupraveného a upraveného vzorku. Lze konstatovat, že na základě výsledků testování ekotoxicity jsou toxické látky obsažené v nemocničních OV efektivně zachycovány při filtrování především filtrem 0,22  $\mu\text{m}$ .

**Tab. 6:** Hodnoty inhibice růstové rychlosti *Desmodesmus subspicatus* u filtrovaných a nefiltrovaných vzorků odpadních vod z nemocnic H1-H6

vzorek	datum odběru	inhibice (stimulace) (%)	
		NFOV	FOV
H1	únor 2018	97,5	54,3
H2	únor 2018	31,4	-7,1
H3	únor 2018	-7,2	-9,5
H4	únor 2018	79,1	20,4
H5	únor 2018	-5,2	-3,6
H6	duben 2019	100	100

NFOV - nefiltrovaná odpadní voda; FOV - filtrovaná odpadní voda

U filtrovaných a nefiltrovaných vzorků OV z nemocnice H1 odebraných v březnu 2021 byla provedena semikvantitativní analýza kovů s použitím hmotnostního spektrometru s indukčně vázanou plazmou (ICP-MS). Obsah rtuti ve vzorcích byl stanoven pomocí atomového absorpčního spektrofotometru (AAS). Rozdíly v obsahu kovů mezi filtrovanými a nefiltrovanými vzorky byly zaznamenány u rtuti, hliníku, manganu, železa a bromu (tab. 7). Obsah ostatních prvků byl nezměněn. Je zajímavé, že žádný z prvků naměřených ve sledovaných OV nepřekročil limity pro pitnou vodu dané Vyhláškou č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu.

**Tab. 7:** Hodnoty kovů naměřených ICP -MS u filtrovaných a nefiltrovaných vzorků odpadních vod z nemocnice H1 (březen 2021)

	Hg (µg/l)		Al (µg/l)		Mn (µg/l)		Fe (µg/l)		Br (µg/l)	
	NFOV	FOV	NFOV	FOV	NFOV	FOV	NFOV	FOV	NFOV	FOV
<b>pondělí</b>	0,89	0,26	18,3	1,3	5,4	2,7	29,3	19,9	139,2	102,0
<b>úterý</b>	0,39	0,26	18,3	1,3	10,2	7,8	29,8	22,0	235,2	191,0
<b>středa</b>	0,32	0,20	20,0	1,2	9,9	7,7	30,2	20,7	261,3	170,1
<b>čtvrtek</b>	0,26	0,23	16,8	0,0	10,2	7,3	31,8	17,9	272,5	183,8
<b>pátek</b>	0,18	0,18	40,2	2,2	16,3	13,4	57,7	26,1	317,0	169,6

NFOV - nefiltrovaná odpadní voda; FOV - filtrovaná odpadní voda

Testem ICP-MS a testem inhibice růstové rychlosti řasy *D. subspicatus* bylo prokázáno, že úprava vzorku OV filtrací mění kvalitu a toxicitu vzorku. Nicméně v některých studiích hodnotících genotoxicitu OV po úpravě vzorku filtrací jsou zaznamenány pozitivní výsledky Ames testu (Sharif et al. 2016, Jabbour et al. 2016, Yilmaz et al. 2017, Cevik et al. 2020). Je tedy nutné při posuzování genotoxicity obecně, ale především u OV, vždy doplnit Ames test dalším genotoxickým testem.

Studie II je první studií v České republice, která velmi komplexně hodnotila toxicitu nemocničních OV. Studie prokázala různé úrovně toxicity čištěných nemocničních OV u vybraných nemocnic a zároveň sezónně závislou dynamiku toxicity vyhodnocenou standardními ekotoxikologickými testy. Genotoxicita nebyla potvrzena ani Ames testem, ani Comet testem v žádném vzorku z nemocnic H1-H5, nemohou však být vyloučeny nepřímé mechanismy vedoucí k systémovým účinkům, jak naznačují výsledky testu zaměřeného na endokrinní disrupci a toxicita prokázaná na vyšších biologických úrovních ve studii III. Negativní výsledky genotoxicity mohou být velmi pravděpodobně dosaženy v případě, že je vzorek nemocniční OV podroben filtraci. Doplnující testy za zaměřily na optimalizaci testování genotoxických účinků nemocničních OV a porovnání 2 formátů Ames testu.

### 5.3 Studie III Qualitative and Quantitative Analysis of Certain Aspects of the Cytotoxic and Genotoxic Hazard of Hospital Wastewaters by Using a Range of *In Vitro* Assays

Studie III pokračovala v komplexním hodnocení toxicity vzorků OV z nemocnic H1-H5 po dezinfekčním procesu. Vzorky byly odebrány v únoru 2018 a částečně analyzovány ve studii II (Jírová et al. 2018). Prezentovaná studie III byla zaměřena na hodnocení cytotoxicity a genotoxicity za použití sady unikátních biologických metod, a to konkrétně testu NRU (Neutral Red Uptake Assay), Comet testu, testu CEGA (Chicken Egg Genotoxicity Assay) a testu HET-MN (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction). Studie III byla zaměřena na testy, ve kterých mohou být zkoušeny vzorky bez úpravy. Testy ve studii III byly porovnány s miskovým Ames testem vyhodnoceným ve studii II, jehož provedení vyžaduje sterilizaci vzorků filtrací.

Před testováním genotoxicity, zvláště u neznámých komplexních směsí, je důležité provést nejprve kvantifikaci cytotoxicity, aby bylo dosaženo relevantních výsledků a nedocházelo k chybnému vyhodnocení genotoxických účinků způsobených nesprávně zvolenou koncentrací testovaného vzorku (Fowler et al. 2012). Ve studii III bylo provedeno hodnocení cytotoxicity nemocničních OV pomocí testu Neutral Red Uptake (NRU) na buněčné kultuře myších fibroblastů 3T3 Balb/c a nebyly zaznamenány žádné cytotoxické účinky na proliferaci fibroblastů.

Comet test se ukazuje jako užitečný nástroj při hodnocení genotoxického dopadu nebezpečných znečišťujících látek v OV. Hlavní výhodou Comet testu je vysoká citlivost nízkých úrovní poškození DNA (Sharif et al. 2016, Tice et al. 2000). Proliferující buňky 3T3 Balb/c byly ve studii III vystaveny 24 hod jednotlivým vzorkům OV následně bylo vyhodnoceno poškození DNA (% DNA v jádře, % DNA v ocasu komety, olivový a ocasní moment) pomocí alkalického Comet testu. Výrazné poškození DNA bylo zaznamenáno pouze u vzorků bez předúpravy. Pokud byly vzorky sterilizovány filtrací či autoklávovány, byly negativní. To je v souladu s výsledky Comet testu ve studii II, ve které byly vzorky upraveny filtrací.

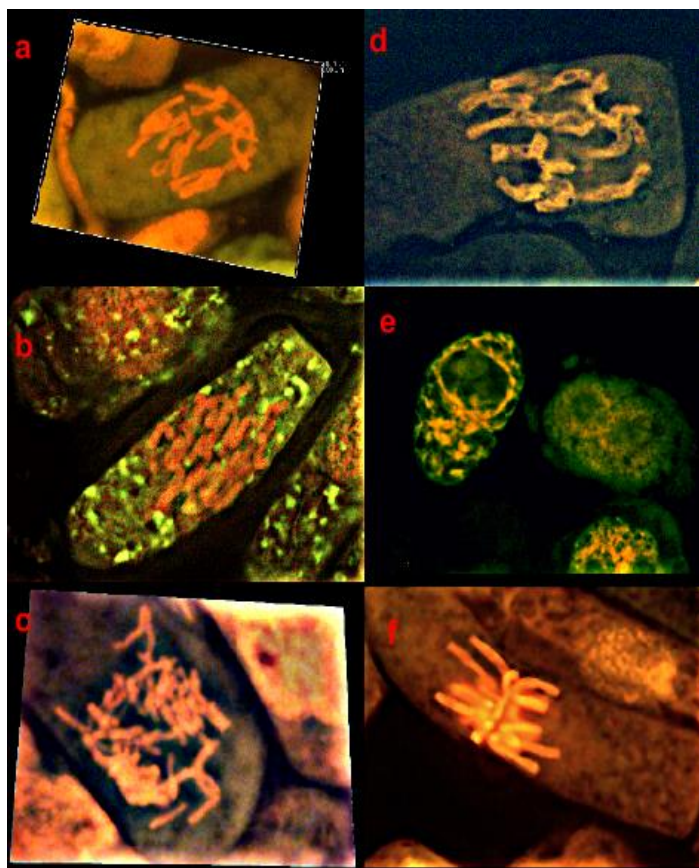
Ptačí vejce je jedinečný embryo-fetální model *in ovo* pro testování toxicity, který poskytuje aseptický model vyvíjejícího se organismu. Tento model byl ve studii III využit k testu genotoxicity CEGA a mikronukleovému testu HET-MN. V testu CEGA byla injekce OV v dávce 10-100  $\mu$ l aplikována do vzduchového vaku 8. den vývoje embrya. 10. den byl



experiment ukončen a buněčná suspenze fetálních hepatocytů byla vyhodnocena Comet testem. U testu HET-MN byl testovaný vzorek pipetován přímo na membránu vnitřního obalu 8. den vývoje embrya, následně byl otvor překryt páskou pro udržení vitality embrya. 10. den vývoje embrya byla odebrána krev *in situ* z *arteria umbilicalis* a hned vytvořen krevní nátěr. Přibližně 1000 erytroidních buněk bylo podrobena screeningu pro stanovení frekvence výskytu mikrojaderných buněk. Testy CEGA a HET-MN opět potvrdily skutečnost, že genotoxický potenciál byl zaznamenán u neupravených vzorků OV, ale ne u vzorků upravených filtrací nebo autoklávováním. U kuřecích embryí, která byla exponována neošetřeným vzorkům OV, byla zaznamenána nízká míra přežití. Lze předpokládat, že tento neobvykle rychlý úhyn i při velmi nízkých dávkách (10 µl) byl způsoben možnou mikrobiální kontaminací. Z těchto důvodů byl proveden jednoduchý screening detekce mikrobiální kontaminace, který je detailně popsán ve studii III. Screening potvrdil významnou mikrobiální kontaminaci. Mikroskopickým vyšetřením byly v OV nalezeny také kolonie *A.flavus*. Bakteriální kontaminace a nález kolonií *A.flavus* je jedno z možných vysvětlení rychlého úhynu kuřecích embryí, která jsou extrémně citlivá na aflatoxin B<sub>1</sub> (Williams et al. 2014). Masivní bakteriální kontaminace byla zároveň potvrzena vyšetřením na elektronovém mikroskopu provedeném na pracovišti Centra epidemiologie a mikrobiologie SZÚ.

Dalším testem, kterým byly posuzovány cyto/genotoxické účinky OV z nemocnic H1–H5, byl test *Allium cepa*. Jak bylo uvedeno již ve studii I, je test *Allium cepa* jedním z nejčastěji používaných testů využívajících vyšších rostlin pro stanovení cytotoxicity a genotoxicity různých polutantů životního prostředí (Bonciu et al. 2018). Protože se jedná o eukaryotické buňky s morfologicky podobnými chromozomy s chromozomy savčí eukaryotické buňky, lze výsledky extrapolovat na savce. Tento test umožňuje posouzení různých genetických koncových bodů způsobujících poškození DNA, které se projevuje chromozomovými aberacemi, poruchami mitotického cyklu, jadernými změnami a přítomností mikrojaderných buněk v meristémových buňkách. Výsledky získané testem *Allium cepa* nebyly dosud publikovány a budou prezentovány v samostatné publikaci. Z tohoto důvodu bude na tomto místě stručně popsáno i provedení testu. Zdravé a stejně velké cibule byly klíčeny po dobu 60 hodin v destilované vodě, aby se navodil růst kořenů. Cibulky byly pěstovány ve skleněných nádobách při teplotě 25°C a po dosažení kořenů o délce 2-3 cm byly exponovány vzorkům nemocničních OV po dobu 24 hodin. Je důležité chránit cibulky před přímým slunečním zářením. Jako pozitivní kontrola byl použit ethylmethansulfonát

(100  $\mu$ M). Kontrolní kořeny byly udržovány pouze v destilované vodě. Mikroskopické preparáty kořene *A. cepa* byly připraveny podle standardního protokolu techniky squash obarvené acetokarmínem (Borboa, Torre 1996, Kumari et al. 2011). Preparáty byly prohlíženy pod světelným mikroskopem (Olympus BH2 RFCA mikroskop, Japonsko) a analyzovány. Byly zaznamenány cytologické/chromozomové aberace jako jsou chromozomové můstky a zlomy, chromozomy C-metafáze, lepkavý chromozom v metafázi, lepkavá chromozomová anafáze, zaostávající chromozomy, mikronukleové buňky, polyploidní buňky a další anomálie. Příklady některých chromozomových aberací jsou zaznamenány na obrázcích 6 a 7.

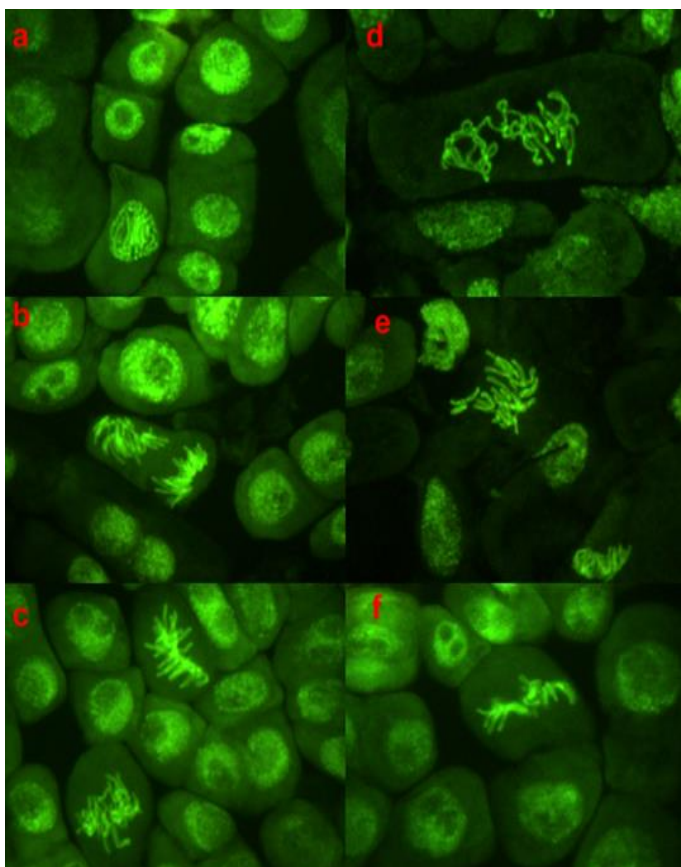


**Obr. 6:** Příklady chromozomových aberací v buňkách meristémů *Allium cepa* vystavených nemocničním odpadním vodám (akridinová oranž, původní zvětšení 400x). (a) chromozomy C-metafáze; (b) C-metafáze; (c) multipolární chromozomová dislokace; (d) změna chromozomové metafáze a lepkavost chromozomů; (e) destrukce chromozomů v profázi; (f) normální metafáze

Na základě pozorování buněk v mitóze byl vypočítán Mitotický index ( $MI^m$ ) jako počet dělicích se buněk na 1000 pozorovaných buněk (Fiskesjo 1997). Byl stanoven počet buněk v různých fázích buněčného dělení a procenta celkových/individuálních chromozomových abnormalit (Bakare et al. 2000). Cytogenetická analýza je uvedena v tabulce 8.

**Tab. 8:** Cytogenetická analýza kořenových špiček *Allium cepa* po expozici nemocničním odpadním vodám (H1-H5) a kontrole (2x destilovaná voda). ( $MI^m$ -mitotický index)

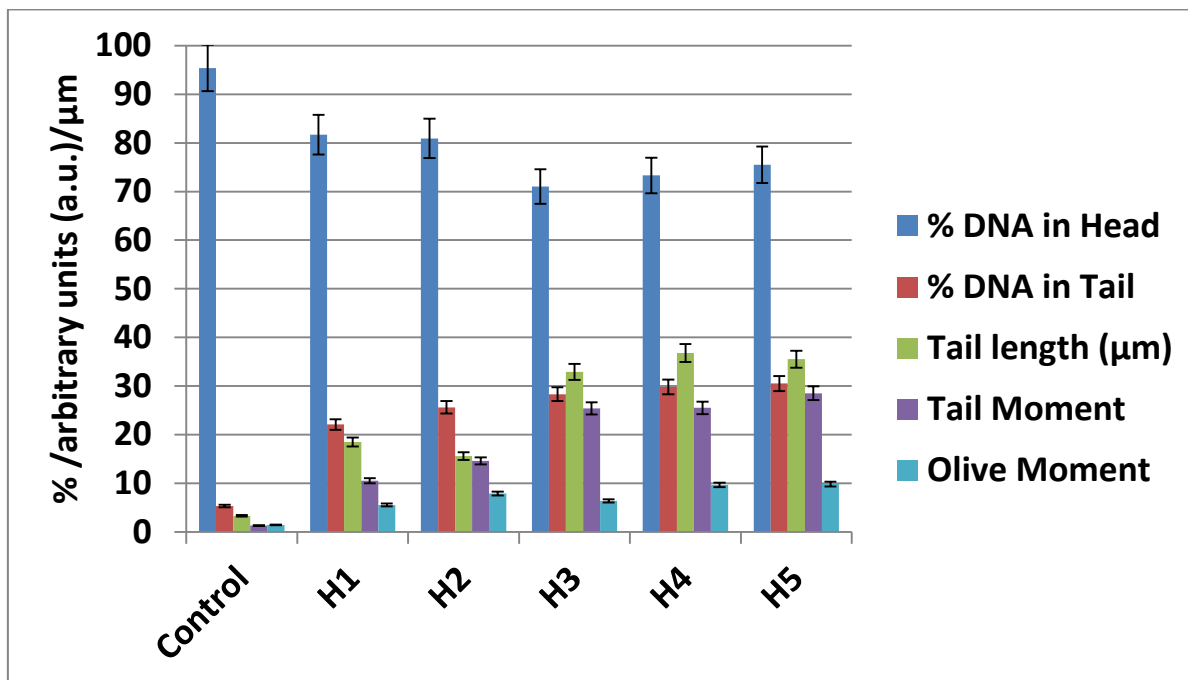
Vzorek	$MI^m$ průměr (%) ± S.D.	Normální dělicí buňka v %			Nespecifikované anomálie (%)
		Profáze	Metafáze	Anafáze	
Kontrola	13,81±1,9	8,65±2,9	18,65±3,1	10,61±3,3	2,66±1,2
H1	21,91±2,3	23,87±3,6	31,41±4,2	25,33±4,3	13,1±2,5
H2	30,35±3,8	23,53±4,4	31,52±3,36	33,33±5,5	9,15±3,3
H3	17,9±3,6	28,78±3,9	40,02±4,1	19,38±3,3	17,58±4,8
H4	14,7±5,2	32,78±3,9	31,02±4,8	15,25±4,3	8,75±4,8
H5	33,5±3,2	36,33±2,3	28,22±3,1	26,31±6,3	9,58±3,8



**Obr. 7:** Příklady chromozomových aberací vyvolaných odpaními vodami z nemocnic H1-H5 v buňkách kořenových špiček *Allium cepa* (Syberd Green, zvětšení 400x); (a) prodloužená profáze a abnormální kinetika; (b) multipolární anafáze; (c) porucha vřetena v metafázi; (d) zlomy a denaturace vláken, které vedou k profáznímu rozpletení DNA; (e) narušená metafáze s opožděnými chromozomy; (f) porucha a dislokace vřeténka v časné anafázi

Pro stanovení komet byly vyjmuty kořenové špičky *A. cepa* a meristémové buňky za použití ocelových jehel byly ihned vytlačeny. Izolovaná jádra pak byla dispergována ve 40

μl destilované vody a vortexována (pro získání dostatečné jaderné suspenze je zapotřebí alespoň 500 jader meristémových buněk). 60 μl 1% agarózy s nízkou teplotou tání (LMP) bylo přidáno do izolovaných jader a 80 μl této suspenze bylo umístěno na ztuhlou agarózu na mikroskopické sklíčko, zakryto krycím sklíčkem a zpracováno tak, jak je popsáno ve studii III pro postup Comet testu s použitím myších fibroblastů 3T3 Balb/c. Parametry kometového testu jsou znázorněny v grafu 2.



**Graf 2:** Délka ocasu, % DNA v ocasu, olivovém a ocasním momentu jako míry poškození DNA v buňkách kořenového meristému *Allium cepa* vystavených neošetřeným vzorkům nemocničních odpadních vod (H1-H5)

Každý neošetřený vzorek testovaných nemocničních OV poskytl jasný důkaz poškození DNA v mitotických buňkách meristému cibule kuchyňské *A. cepa* a mikroskopicky byla potvrzena chromozomální nestabilita těchto buněk.

Všechny vzorky OV z nemocnic H1-H5 testované metodami uvedenými ve studii III lze považovat za potenciálně genotoxické. Je však důležité zdůraznit, že genotoxický potenciál se projevil pouze u vzorků, které nebyly upraveny před testováním a testovaly se v tzv. surovém stavu. Pokud byly vzorky upraveny filtrací nebo autoklávováním, nebyl genotoxický potenciál zaznamenán. To je v souladu s výsledky studie II, ve které vzorky upravené filtrací a využité v Comet testu a Ames testu neměly genotoxický potenciál a zároveň byla doplňkovými testy potvrzena změna toxicity vzorků po filtraci. Na základě výsledků studie III se lze domnívat, že identifikovaný genotoxický potenciál je pravděpodobně způsoben vyšší mikrobiální kontaminací a nalezenými koloniemi *A. flavus*.

Je známo, že některé bakterie mohou být producenty genotoxinů, které ovlivňují metabolické pochody v buňce za vzniku volných radikálů. Volné radikály mohou vyvolat oxidační stres, který může nepřímo způsobit negativní změny v buňce, jako je porušení DNA či zastavení buněčného cyklu, nebo mohou vyvolat apoptózu (Wu et al. 2013, Druzhinin et al. 2018).

Ačkoliv u vzorků upravených filtrací ve studii II a III nebyl prokázán genotoxický potenciál, v jiné studii hodnotící OV vypouštěné ze tří nemocnic a jedné městské ČOV v Istanbulu byl genotoxický potenciál identifikován, i když vzorky těchto nemocnic byly upraveny filtrací dokonce i přes filtr s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$  (Cevik et al. 2020). Analogické zjištění bylo zaznamenáno i v dalších studiích (Sharif et al. 2016, Jolibois, Guerbet 2006). Rozdílné výsledky mohou být způsobeny velikostí dávky genotoxické látky ve vzorku a variabilitou složení nemocničních OV.

#### 5.4 Studie IV - Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos to Hospital Effluent Compared to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*

V EU jsou testy akutní toxicity na akvatických organismech jedním z nástrojů sloužících k monitoringu kvality vod v rámci snahy o zlepšení stavu evropských povrchových vod dané Směrnicí o vodě (EU 2000/60/ES). Souběžně s tím je nutné implementovat zásady Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely a uplatňovat principy 3R (Replacement, Reduction, Refinement). Pro potřeby konvenčního testu akutní toxicity na rybách *in vivo* (Fish Acute Toxicity Test, OECD TG 203) je každoročně použito až 5 milionů ryb (Norberg-King et al. 2018). Jako vhodná alternativa, vysoce korelující s touto metodou, byl v r. 2013 validován test akutní toxicity na rybích embryích (Fish Embryo Acute Toxicity Test, OECD TG 236) – FET test, ve kterém byli dospělci nahrazeni embryonálními vývojovými stadii. Metoda je založena na předpokladu, že raná stadia vývoje před přechodem na exogenní výživu nemají nervový systém vyvinutý natolik, aby cítila stres a bolest. Podle Směrnice 2010/63/EU nejsou tudíž experimenty na rybích embryích považovány za pokusy na zvířatech. Metoda FET test tedy nejen splňuje podmínky 3R, ale je také vhodná pro stanovení toxicity odpadních a povrchových vod (Thellmann et al. 2015, Tenorio-Chávez et al. 2020, Ribeiro et al. 2020).

Ryba *D. rerio* (dánio pruhované) je moderní, pokrokový a celosvětově uznávaný zvířecí model. Vědecké experimenty na dospělých rybách i embryích se stávají populární v toxikologii a biomedicínském výzkumu. Ve studii IV byla embrya *D. rerio* použita ke stanovení akutní toxicity nemocničních OV.

Studie IV sledovala několik cílů:

1/ Porovnat citlivost FET testu (OECD TG 236) s konvenčními testy doporučenými normou ČSN 75 6406, a to se Zkouškou pohyblivosti na vodním korýši *Daphnia magna* (ČSN ISO 6341) a se Zkouškou na luminiscenčních bakteriích *Aliivibrio fischeri* (ČSN ISO 11348-2), a na základě výsledků vyhodnotit vhodnost metod pro stanovení akutní toxicity OV z nemocnic.

2/ Porovnat dva expoziční časy FET testu:

- čas 96 hpf\* doporučený OECD TG 236 (2013) – označení FET 96 h
- čas 48 hpf\* doporučený (ISO 15088 (2009) – označení FET 48 h

\*hpf – hodiny po oplodnění (hour post fertilization)

3/ Vyhodnotit vliv modifikace FET testu přidáním sledování 5 subletálních účinků na citlivost

metody – označení FET 96 h+sub

4/ Rozšířit vědecké informace týkající se toxicity OV z nemocnic v České republice.

Vzhledem k tomu, že se tato disertační práce zabývá hodnocením genotoxicity nemocničních OV, byla studie doplněna o posouzení potenciálu teratogenity odebraných vzorků, které však nebylo publikováno.

Vzorky OV byly odebrány v r. 2019 na odtoku z ČOV 7 různých nemocnic v České republice podle normy ČSN EN ISO 5667-1. Vzorek H6 byl odebrán v místě, kde docházelo k mísení čištěné OV z nemocnice a nečištěné odpadní vody z nemocniční prádelny. Při odběru a přepravě byly dodrženy požadavky normy (přeprava v chladicím boxu, zmrazení na -18 °C) a vzorky byly zpracovány do 2 měsíců po odběrech.

Ve studii byla nejprve stanovena imobilita (*D.magna*), inhibice luminiscence (*A.fischeri*) a mortalita a výskyt subletálních účinků (*D.rerio*) a tyto ukazatele byly vyjádřeny jako procento toxického účinku všech 7 neřaděných vzorků OV. Získaná data prokázala vysoce variabilní toxický účinek OV na všechny studované organismy. Testy FET 96 h a FET 96 h+sub prokázaly vysokou citlivost embryí *D.rerio* u 5 ze 7 vzorků (H1, H3, H4, H5, H6) s hodnotami toxického účinku 62,5 - 100 %. Toxický účinek vzorků na další studované organismy byl více variabilní (viz publikace č. 4, obr. 2a). Vzorky H2 a H7 vykazovaly nízkou nebo nulovou toxicitu. U vzorků a testovacích organismů, u nichž hodnoty toxického účinku překročily 50 % (tzn. H1, H3, H4, H5, H6), byly stanoveny hodnoty EC<sub>50</sub> (*D.magna*, *A.fischeri*) a LC<sub>50</sub> (*D.rerio*) (viz publikace č. 4, obr. 2b). V případě vzorků OV, které byly hodnoceny jako nejtoxičtější a které negativně ovlivnily většinu testovaných druhů (H1, H3, H6), byla *D.magna* nejcitlivějším organismem s hodnotami EC<sub>50</sub> 4,5 - 37,6 %. Citlivost metod na vzorky H1 a H3 klesala v následujícím pořadí: *D.magna* > FET 96 h+sub > FET 96 h > *A.fischeri* 15 min > FET 48 h. U nejvíce toxického vzorku H6 byly nejcitlivějšími organismy *D.magna* a *A.fischeri*.

Na základě porovnání tří akvatických organismů ve studii IV se prokázalo, že citlivost FET testu neboli citlivost embryí *D.rerio* je srovnatelná a v některých případech i vyšší než citlivost organismů *D.magna* a *A.fischeri*.

Jedním ze záměrů studie IV bylo srovnání tří možností provedení FET testu a podle dosažených výsledků vytipování nejcitlivějšího testovacího způsobu stanovení toxicity OV

ze zdravotnických zařízení. FET test byl hodnocen dle standardního validovaného postupu OECD TG 236 po 96 hpf na základě přesně popsanych letálních účinků (morfologické koncové body letality) - koagulace embrya, neoddělení ocasu od žloutkového váčku, nepřítomnost tvorby somitů (bloky mezodermy podél struny hřbetní) a nepřítomnost srdečního tepu. Dále byla hodnocena přítomnost letálních účinků po 48 hpf podle normy ČSN EN ISO 15088 - Stanovení akutní toxicity odpadních vod pro jikry dávná pruhovaná (*Danio rerio*). Nakonec byl FET test rozšířen o hodnocení subletálních účinků OV na vývoj embryí, a to po 48 hpf a 96 hpf expozice embryí všem testovaným vzorkům. Ve vědecké literatuře byla popsána a charakterizována celá řada častých (specifických) i méně obvyklých (nespecifických) morfologických subletálních změn embryí *D. rerio* (Hellfeld et al. 2020). Pro účely studie IV bylo vybráno pět subletálních efektů, které jsou nejčastěji publikované a které lze jednoznačně identifikovat (Babič et al. 2017, Cedron et al. 2020). Mezi ně patří zpomalený srdeční tep, nedostatečnost krevního oběhu, přítomnost perikardiálního edému a (nebo) edému žloutkového váčku, zakřivení páteře a porucha pigmentace. Přidáním subletálních efektů se citlivost FET testu zvýšila o 1-12%. Frekvence výskytu subletálních změn (malformací) u embryí byla v následujícím pořadí: zakřivení páteře (34,5 %), nedostatek krevního oběhu (26,4 %), zpomalený tep srdce (25,7 %), poruchy pigmentace (12,7 %), výskyt edému (0,7 %). Výskyt subletálních účinků ve dvou expozičních časech je uveden v tabulce 9.

**Tab. 9:** Přehled výskytu subletálních efektů (+ přítomnost / - nepřítomnost) po inkubaci ve vzorcích H1-H7 ve dvou expozičních časech (48 hpf / 96 hpf)

Subletální efekty	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
48 hpf / 96 hpf							
zpomalený srdeční tep	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-
nedostatečný krevní oběh	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-
přítomnost edému	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-
zakřivení páteře	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-
porucha pigmentace	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-

Z tabulky 9 je zřejmé, že výskyt subletálních účinků je závislý na době expozice a zároveň je rozdílný mezi různými vzorky. Prodloužená doba expozice embryí ze 48 hpf na 96 hpf významně zvýšila citlivost FET testu u 57 % testovaných vzorků. Jeden



z pravděpodobných faktorů rozdílného výskytu subletálních účinků při různé časové expozici je přítomnost bariérové funkce chorionu. Chorion tvoří vnější ochranu vyvíjejícího se embrya a může inhibovat absorpci některých chemických látek s vysokou molekulovou hmotností do embrya (Sobanska et al. 2017). Tato bariéra mizí během období líhnutí, což je přibližně 72 h po oplodnění v závislosti na teplotě vody. Po vyhodnocení všech výsledků ve studii IV byla stanovena klesající citlivost FET testu a jeho modifikací v následujícím pořadí: FET 96 h+sub > FET 96 h > FET 48 h.

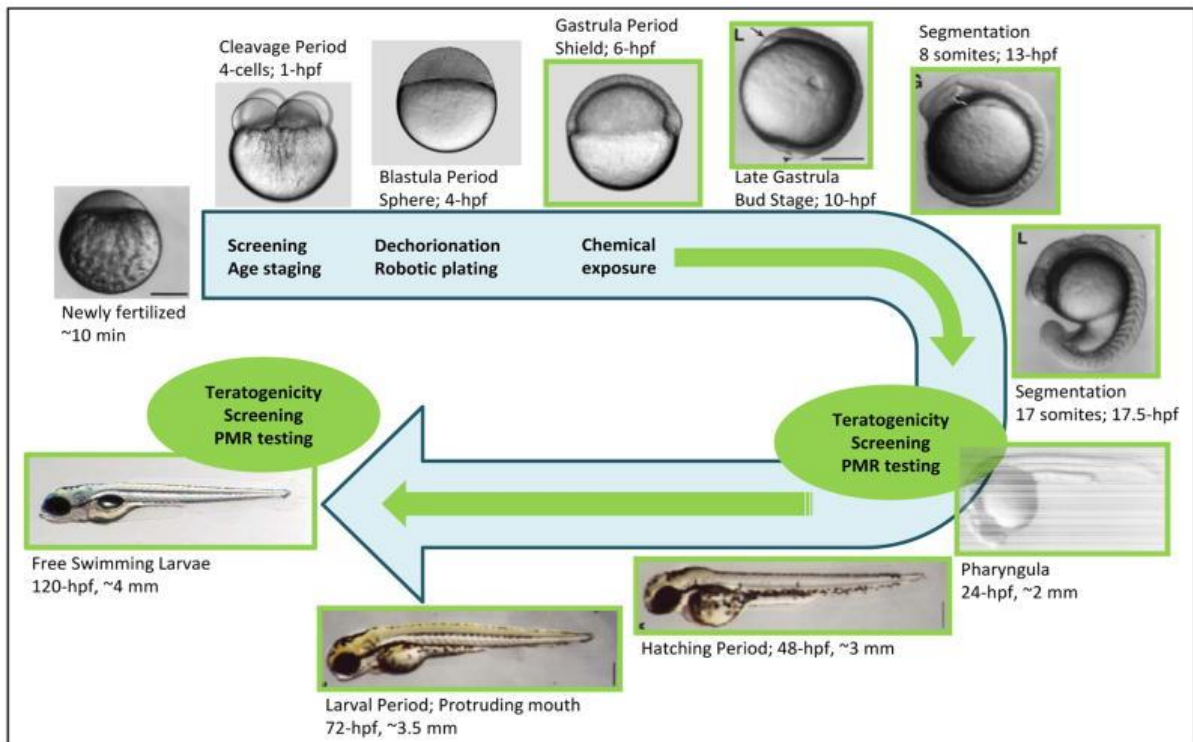
Získané výsledky ve studii IV lze využít k odhadu teratogenního potenciálu OV na základě výpočtu teratogenního indexu. Teratogeneze je proces, který narušuje normální vývoj embrya tím, že v závažných případech způsobuje trvalé strukturální a funkční abnormality projevující se morfologickými subletálními malformacemi embrya. Embryonální model ryb *D. rerio* se ukazuje jako velmi perspektivní alternativní model k tradičním testům předpovídajícím teratogenní potenciál především chemických látek a směsí či nových léčiv a lze jej také využít při screeningu genotoxicity/teratogenity environmentálních matric s účinkem na volně žijící zvířata (Noyes et al. 2016). Teratogenní index (TI) se vypočítá jako poměr  $LC_{50} / EC_{50}$ , kdy  $LC_{50}$  je koncentrace testovaného vzorku způsobující uhynutí 50 % embryí *D. rerio* a  $EC_{50}$  je koncentrace testovaného vzorku způsobující malformace (subletální změny) u 50 % embryí *D. rerio* stanovená při expozici 96 hpf (tab. 10). Testovaný vzorek je podle kritérií Weigt et al. (2011) považován za teratogenní, pokud je  $TI > 1$ , pokud je  $TI < 1$ , je hodnocen jako embryoletální.

**Tab. 10:** Hodnoty teratogenního indexu (TI),  $EC_{50}$ ,  $LC_{50}$  ve studii IV

	H1	H3	H4	H5	H6
LC50 [%]	90,4	64,5	87,7	66,7	20,6
EC50 [%]	83,1	60,5	77,2	65,7	20,4
<b>TI</b>	<b>1,09</b>	<b>1,07</b>	<b>1,14</b>	<b>1,02</b>	<b>1,01</b>

Lze konstatovat, že vzhledem k výskytu subletálních malformací u embryí *D. rerio* u vzorků OV H1, H3-H6 a hodnotě teratogenního indexu  $TI > 1$ , mají tyto OV teratogenní potenciál (Weigt et al. 2011, Tenorio-Chávez et al. 2020, Vasamseti et al. 2020).

Molekulární mechanismy, které řídí organogenezi u embryí ryb se podobají mechanismům u savců i lidí. Tento proces je však u embryí ryb urychlen a dokončen 120 hod po oplodnění (obr. 9).



**Obr. 8:** Embryonální vývoj *Danio rerio* v průběhu 120 hpf (hpf = hodiny po oplodnění)

Některé srovnávací studie teratogeneze dosahují až 85 % shody (Gustafson et al. 2012) nebo 87 % (Brannen et al. 2010), ale výsledky pro stejnou sloučeninu se mohou mezi laboratořemi podstatně lišit (Brannen et al. 2010, Ball et al. 2014, Lee et al. 2013, Teixido et al. 2013). To lze vysvětlit rozmanitostí protokolů (Pruvot et al. 2012) a výpočtu teratogenního indexu, což naznačuje jasnou potřebu harmonizace tohoto alternativního testu ke stanovení teratogenního potenciálu (Cassar 2020). Obdobný embryonální model pro hodnocení rizika embryotoxicity a teratogenity je standardizovaný FETAX test, ve kterém jsou jako testovací organismy používána embrya žáby drápatky vodní (*Xenopus laevis*) – Frog Embryo Teratogenesis Assay – *Xenopus* (ASTM E 1439-98). Princip výpočtu teratogenního indexu je stejný, avšak hranice pro pozitivní teratogenitu je stanovena na  $TI=1,5$ . Omezením metody je však nedostatečná průhlednost žabích zárodků na rozdíl od zárodků *D.rerio*, které jsou pro svou vysokou transparentnost velmi dobře hodnotitelné, a proto lze *D.rerio* považovat za vhodnější a perspektivnější experimentální embryonální model.

I přes řadu výhod, jakými jsou genetická a fyziologická podobnost se savci (přibližně 70 %), rychlý embryonální vývoj, vysoká plodnost a průhlednost embrya, je prozatím *D.rerio* málo využíváno pro testování OV.

Jednou ze sporadických studií zabývajících se výzkumem embryotoxického a genotoxického potenciálu OV s využitím embryonálního modelu *D. rerio* je studie Babić et al. (2017). Vzorky před a po vypouštění z ČOV byly odebrány na 6 místech s předpokládanou rozdílnou mírou znečištění. Genotoxický účinek OV na embrya po 48hod expozici byl vyhodnocen pomocí modifikovaného Comet testu, což představuje další zajímavou možnost využití embryí *D. rerio*. Histopatologická analýza ukázala, že 48hod expozice testovaným vzorkům vedla k narušení svalové organizace a zpomalení vývoje očí a mozku. Tato studie prokázala, že OV způsobovaly změny na úrovni buněk, tkání i celého organismu embrya. Potvrdila tím nejen existenci toxikologického rizika OV, ale zároveň dostatečnou citlivost embryí *D. rerio* na toxicitu OV a vhodnost těchto testovacích organismů pro její stanovení.

Výsledky studie IV a mnoha vědeckých publikací (Babić et al. 2017, Tenorio- Chavez et al. 2020) podporují využití FET testu jako perspektivního a užitečného nástroje k hodnocení akutní toxicity a teratogenity OV. Lze tedy doporučit, aby byl FET test, společně s ostatními používanými biomarkery, začleněn do monitorování nejen toxicity OV, ale vodních ekosystémů obecně.

## 6 ZÁVĚR

V posledním desetiletí se výrazně zvýšilo povědomí o problémech s kvalitou vody v rámci Evropské unie. Stanovení toxických účinků směsí nebezpečných látek a jejich metabolitů nacházejících se v odpadních vodách (OV) je předmětem zájmu vyžadujícím naléhavou pozornost a zároveň velkou výzvou pro odbornou veřejnost. Cílové analýzy zaměřené na kvantifikaci toxických látek v OV ze zdravotnických zařízení požadované současnou legislativou jsou pro komplexní hodnocení rizik OV nedostatečné, protože nemohou správně určit veškeré toxické účinky těchto složitých environmentálních matric. Pro relevantní vyhodnocení rizik OV je žádoucí tyto analýzy doplnit vhodně zvolenou baterií biologických testů.

V současné době pro hodnocení rizik OV ze zdravotnických zařízení jsou v ČR využívány pouze inhibiční ekotoxikologické testy na vodních organismech na základě výpočtů  $EC_{50}$  a  $LC_{50}$  doporučené normou ČSN 75 6406 (2020). Zařazení testů stanovení genotoxicity by mělo být povinnou součástí posuzování negativních účinků OV ze zdravotnických zařízení z důvodu zvýšení přesnosti a správnosti predikce rizika pro životní prostředí.

Výzkum provedený v této disertační práci hodnotil nemocniční OV pomocí široké škály biotestů se záměrem nejen stanovit genotoxicitu OV vybraných nemocnic, ale také optimalizovat postupy pro screeningové stanovení genotoxického potenciálu OV ze zdravotnických zařízení. Publikované výsledky provedených genotoxických studií zároveň významně přispěly k rozšíření informací o genotoxickém potenciálu OV z nemocnic v České republice.

Na základě výsledků dlouhodobého multifaktoriálního testování OV z vybraných nemocnic je nutno zdůraznit, že komplexní strategie testování genotoxicity by měla zahrnovat jak identifikaci reverzibilního primárního poškození DNA, tak i detekci irreverzibilního poškození DNA (tj. genové mutace a chromozomové aberace), které je přenosné na další generace (Corvi, Madia 2016). Pro adekvátní posouzení genotoxicity je třeba hodnotit alespoň tři hlavní ukazatele - genové mutace (mutagenita), strukturní chromozomové aberace (klastogenita) a numerické chromozomální aberace (aneugenicita). Žádným samostatným testem nelze hodnotit genotoxický potenciál zcela komplexně, a proto je nutné zvolit vhodnou baterii testů. V naší studii byla využita k testování rozsáhlá sada genotoxických testů a byla porovnána a hodnocena jejich citlivost, reprodukovatelnost a snadnost provedení. Testy s různými genetickými koncovými body

se navzájem vhodně doplňují, pokud jde o citlivost vůči xenobiotikům v životním prostředí a detekci nízkých úrovní genotoxického potenciálu.

Ames test, který byl použit v této práci k identifikaci mutagenního potenciálu OV, prokázal během 50 let používání pozoruhodnou predikci genotoxické karcinogeneze a je považován za spolehlivý prediktor relevantní mutagenity (Hartwig et al. 2020). V této disertační práci výsledky analýz získané použitím Ames testu dle metodiky OECD neprokázaly genotoxický potenciál vzorků nemocničních OV. Vzhledem k negativním výsledkům miskového Ames testu byl ve studii zaveden nový, legislativně doporučený flukтуаční Ames test. Bylo provedeno srovnání těchto dvou formátů Ames testu s cílem posoudit jejich citlivost a proveditelnost pro rutinní testování nemocničních OV. Výsledky flukтуаčního testu byly ve shodě s výsledky miskového testu, tj. negativní. U žádného vzorku nebyla nalezena koncentrační závislost ani dvojnásobné zvýšení počtu revertantů oproti negativní kontrole. Vzhledem k opakovanému získání negativních výsledků genotoxicity vzorků OV z nemocnic H1-H5 je možné usuzovat, že jejich genotoxicita může být způsobena jinými mechanismy, než vznikem bodových mutací, na jejichž detekci je Ames test založen. Na základě pozitivních výsledků estrogenní a androgenní disrupce filtrované OV, a také mnoha pozitivních výsledků dosažených ve studiích III a IV na nefiltrované OV (test *Allium cepa*, test CEGA, test HET-MN, Comet test, FET test), je možné předpokládat, že (geno)toxicita OV je nespecifické multifaktoriální povahy a může být založena na více mechanismech a interakcích. Specifické interakce a narušení mechanismů na buněčné úrovni (např. interakce s receptory, transkripčními faktory, ovlivnění aktivity enzymů vedoucí k ovlivnění replikace DNA či transkripce a následné proteosyntézy) se mohou projevit i na vyšších biologických úrovních. Je nutné vzít v úvahu, že u Ames testu je vyžadována předúprava vzorku filtrací. Vzhledem k opakovaným negativním výsledkům filtrované OV v porovnání s pozitivními výsledky vzorků OV ve studii III a IV, u nichž filtrace neproběhla, je velmi pravděpodobné, že při úpravě OV filtrací může docházet k zachycení organických částí, na kterých jsou adsorbovány aktivní chemické látky na filtru, a tím ke snížení jejich koncentrace v testovaném vzorku.

Provedené studie v této práci ukázaly, že úprava vzorků před vlastním testováním ovlivňuje výsledky biologických testů. V rámci výzkumu byly posouzeny různé způsoby úpravy vzorků OV, a to filtrace, extrakce na pevnou fázi (SPE) a autoklávování. Úpravy vzorků se běžně provádí při analýze složitých směsí o neznámém složení pro zvýšení

výtěžnosti toxicity nebo z důvodu zabránění kontaminace vzorků. I když mají tyto úpravy svůj význam, je třeba si uvědomit, že vždy určitým způsobem ovlivňují reálnou toxicitu vzorku (Abbas et al. 2019). Při testování vzorků OV je nutné individuálně posoudit, který způsob úpravy je pro danou matici optimální, a při hodnocení vždy zohlednit limity dané úpravy. Na základě získaných výsledků je zřejmé, že úprava vzorků OV a zároveň citlivost *in vitro* metod jsou proto stěžejní pro odhalení genotoxicity či mutagenity OV, které mohou být způsobené i velmi nízkými koncentracemi aktivních látek.

Dosažené výsledky jsou základem pro formulaci vhodných doporučení a postupů na hodnocení genotoxických účinků OV a také dalších směrů výzkumu v této oblasti. Ames test, založený na stanovení mutagenity, je nejvíce využívaným testem k prokázání mutací složitých směsí jako jsou OV. Po porovnání 2 formátů Ames testu však bylo dosaženo negativních výsledků, proto nebylo možné srovnat citlivost a vhodnost jednotlivých formátů. Dle vědeckých poznatků jsou oba formáty v dobré shodě (cca 90 %) a je tedy možné pro stanovení genotoxického potenciálu OV využít obě varianty dle vybavení laboratoře. Oba formáty Ames testu jsou standardizovány ve schválených ISO normách (miskový Ames Test ISO 16240:2005, flukтуаční Ames test ISO 11350:2012).

Test *Allium cepa* je dlouhodobě uznávaný test pro detekci genotoxického potenciálu komplexních směsí životního prostředí. Umožňuje hodnotit poškození DNA v mnohobuněčném kontextu a nevyžaduje žádnou úpravu vzorku. Výhodou této mikroskopické metody je tedy identifikace několika genotoxických koncových bodů v meristematických buňkách kořenových špiček *A. cepa*, jako jsou chromozomové aberace, stanovení frekvence výskytu mikrojader, stanovení mitotického indexu, narušení buněčného cyklu, identifikace aneugenických změn apod. V současné době je metoda doporučena vědeckou komunitou a Evropským centrem pro validaci alternativních metod (EURL ECVAM) a v jejich databázi je protokol uveden pod označením „DB-ALM Protocol no 8: Allium Test“.

Na základě veškerých shromážděných poznatků a nových informací získaných v rámci disertační práce o genotoxicitě OV, Ames test a test *Allium cepa* lze považovat za vhodné standardizované testy pro komplexnější posouzení genotoxického potenciálu OV ze zdravotnických zařízení. Výsledky a doporučení uvedené v této disertační práci mohou být využity jako podklad ke změnám normy ČSN 75 6406 v oblasti posuzování environmentálních rizik.

Disertační práce svými výsledky získanými v rámci genotoxických studií přispěla k dosažení cílů institucionálního výzkumu SZÚ (Ekotoxicita odpadních vod ze zdravotnických zařízení) řešeného Národním referenčním centrem pro hygienu půdy a odpadů, tj. k vypracování podkladů, metodických pokynů a doporučení pro komplexní hodnocení OV ze zdravotnických zařízení. Problematika hodnocení environmentálních rizik OV z hlediska genotoxických účinků byla řešena v návaznosti na projekt Mezinárodní konkurenceschopnosti SZÚ ve výzkumu, vývoji a vzdělávání v alternativních toxikologických metodách (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/ 0000860) a položila významný základ pro další směřování výzkumu v oblasti toxicity OV.

## 7 SEZNAM LITERATURY

**Abbas A.**, Schneider I., Bollmann A., Funke J., Oehlmann J., Prasse C., Schulte-Oehlmann U., Seitz W., Ternes T., Weber M., Wesely H., Wagner M., 2019: What you extract is what you see: Optimising the preparation of water and wastewater samples for in vitro bioassays. *Water Res.* 152, 47-60.

**Achak M.**, Alaoui Bakri S., Chhiti Y., M'hamdi Alaoui F. E., Barka N., & Boumya, W., 2021: SARS-CoV-2 in hospital wastewater during outbreak of COVID-19: A review on detection, survival and disinfection technologies. *Sci Total Environ.* 761, 1-15.

**Assress H. A.**, Selvarajan R., Nyoni H., Ntushelo K., Mamba B.B., Msagati T. A. M., 2019: Diversity, Co-occurrence and Implications of Fungal Communities in Wastewater Treatment Plants. *Sci Rep.* 9 (1), 1-15.

**ASTM E1439-12**, 2019: Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX), ASTM International, West Conshohocken, PA, 2019.

**Babić S.**, Barišić J., Višić H., Klobučar R. S., Popović N. T., Strunjak-Perović I., Čož-Rakovac R., Klobučar G., 2017: Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish embryo using multiple endpoint testing. *Water Res.* 115, 9-21.

**Bakare A.**, Mosuro A., Osiban J. o, O., 2000: Effect of simulated leachate on chromosomes and mitosis in roots of *Allium cepa* (L.). *J. Environ. Biol.* 21 (3), 263-271.

**Ball J. S.**, Stedman D. B., Hillegass J. M., Zhang C. X., Panzica-Kelly J., Coburn A., Enright B. P., Tornesi B., Amouzadeh H. R., Hetheridge M., Gustafson A. L., Augustine-Rauch K.A., 2014: Fishing for teratogens: a consortium effort for a harmonized zebrafish developmental toxicology assay. *Toxicol Sci.* 139 (1), 210–219.

**Beier S.**, Cramer C., Koster S., Mauer C., Palmowski L., Schroder H. F., Pinnekamp J., 2011: Full scale membrane bioreactor treatment of hospital wastewater as forerunner for hot-spot wastewater treatment solutions in high density urban areas. *Water Sci Technol.* 63 (1), 66–71.

**Beltifa A.**, Alibi S., Mansour H., 2020: Monitoring hospital wastewaters for their probable genotoxicity. *J Water Health.* 18 (1), 1–7.

**Benigni R.**, Bossa C., 2019: Data-based review of QSARs for predicting genotoxicity: the state of the art. *Mutagenesis.* 34 (1), 17-23.

**Boillot C.**, Bazin C., Tissot-Guerraz F., Droguet J., Perraud M., Cetre J. C., et al. 2008: Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *Sci Total Environ.* 403 (1–3), 113–29.

**Bonciu E.**, Firbas P., Fontanetti C., Wusheng J., Karaismailoğlu M. C., Liu D., Menicucci F., Pesnya D. S., Popescu A., Romanovsky A. V., Schiff S., Ślusarczyk J., de Souza C. P., Srivastava A., Sutan A., Papini A., 2018: An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia.* 71 (3), 191-209.



**Borboa L.**, Torre C., 1996: The genotoxicity of Zn (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells. *New Phytol.* 134 (3), 481-486.

**Boucherit A.**, Moulay S., Ghernaout D., AlGhonamy A. I., Ghernaout B., Naceur M. W., Messaoudene N. A., Aichouni M., Mahjoubi A. A., Elboughdiri N. A., 2015: New Trends in Disinfection By-Products Formation upon Water Treatment. *Journal of Research & Developments in Chemistry.* 1-27.

**Brannen K. C.**, Panzica-Kelly J. M., Danberry T. L., Augustine-Rauch K. A., 2010: Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 89 (1), 66–77.

**Brendler-Schwaab S.**, Hartmann A., Pfuhrer S., Speit G., 2005: The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis.* 20, 245–254.

**Cai L.**, Zhang T., 2013: Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a high-throughput shotgun sequencing technique. *Environ Sci Technol.* 47 (10), 5433 - 5441.

**Cairns T. C.**, Nai C., Meyer V., 2018: How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biol. Biotechnol.* 5 (1), 1-14.

**Carraro E.**, Si B., Bertino C., Lorenzi E., Sa B., Gilli G., 2016: Hospital effluents management: chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries. *J Environ Manage.* 168, 185–199.

**Cassar S.**, Adatto I., Freeman J. L., Gamse J. T., Iturria I., Lawrence C., Muriana A., Peterson R. T., Van Cruchten S., Zon L. I., 2020: Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chem Res Toxicol.* 33 (1), 95–118.

**Cedron V. P.**, Weiner A. M. J., VERA M., Sanchez L., 2020: Acetaminophen affects the survivor, pigmentation and development of craniofacial structures in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biochem Pharmacol* 174, 113816.

**Cevik M.**, Dartan G., Ulker M., Bezci K., Deliorman G., Cagatay P., Lacin T., Cinel H. K., Aksu B., Keskin Y., Can S. Z., Yurdun T., Susleyici B., 2020: Evaluation of Cytotoxicity and Mutagenicity of Wastewater from Istanbul: Data from Hospitals and Advanced Wastewater treatment Plant. *Bull Environ Contam Toxicol.* 104, 852–857.

**Claxton L. D.**, Umbuzeiro G., DeMarini D. M., 2010: The Salmonella Mutagenicity Assay: the Stethoscope of Genetic Toxicology for the 21st Century. *Environ Health Perspect.* 118 (11), 1515–1522.

**Collins A. R.**, Ma A. G., Duthie S. J., 1995: The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 336, 69-77.

**Corvi R.**, Madia F., 2017: In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced? *Food Chem Toxicol.* 106, 600-608.

**Crespo-López M. A.,** Macêdo G. L., Pereira S. I. D., Arrifano G. P.v F., Picanço-Diniz D. L. W., do Nascimento J. L. M., Herculano A. M., 2009: Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacol Res.* 60 (4), 212-220.

**ČSN 75 6406:** Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení (ZZ) vypouštěnými do stokové sítě pro veřejnou potřebu. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2020. 28s.

**ČSN 5667-1:** Jakost vod – Odběr vzorků - Část 1: Návod pro návrh programu odběru vzorků a pro způsoby odběru vzorků. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2007. 32s.

**ČSN EN ISO 6341 (757751):** Jakost vod - Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) - Zkouška akutní toxicity. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2013. 28 s.

**ČSN EN ISO 11348-2 (757734):** Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2009, 24 s.

**DeMarini D. M.,** 2020: A review on the 40th anniversary of the first regulation of drinking water disinfection by-products. *Environ Mol Mutagen.* 61, 588-601.

**Dougan G.,** Baker S., 2014. *Salmonella enterica* Serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. *Annu Rev Microbiol.* 68, 317-336.

**Druzhinin V. G.,** Matskova L. V., Fucic A., 2018: Induction and modulation of genotoxicity by the bacteriome in mammals. *Mutat. Res.* 776, 70-77.

**Ebrahimi P.,** Barbieri M., 2019: Gadolinium as an Emerging Microcontaminant in Water Resources: Threats and Opportunities. *Geosciences.* 93 (9), 1-44.

**EU, 1991:** Směrnice Rady **91/271/EHS:** ze dne 21. května 1991, o čištění městských odpadních vod. *Úř. Věst. L 135, 30. 5. 1991, s. 40–52.*

**EU, 1998:** Směrnice Rady **98/83/ES:** ze dne 3. listopadu 1998, o jakosti vody určené k lidské potřebě. *Úř. věst. L 330, 5. 12. 1998, s. 32–54.*

**EU, 2000:** Směrnice Evropského parlamentu a Rady **2000/60/ES:** ze dne 23. října 2000, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky. *Úř. Věst. L 327, 22. 12. 2000, s. 1–73.*

**EU, 2004:** Směrnice Evropského parlamentu a Rady **2004/27/ES:** ze dne 31. března 2004, kterou se mění směrnice 2001/83/ES o kodexu Společenství týkajícím se humánních léčivých přípravků. *Úř. Věst. L 136, 30.4.2004, s. 34–57.*

**EU, 2006:** Směrnice Evropského parlamentu a Rady **2006/118/ES:** ze dne 12. prosince 2006 o ochraně podzemních vod před znečištěním a zhoršováním stavu. *Úř. Věst. L 372,*

27.12.2006, s. 19–31.

**EU, 2008:** Směrnice Evropského parlamentu a Rady **2008/105/ES**: ze dne 16. prosince 2008 o normách environmentální kvality v oblasti vodní politiky, změně a následném zrušení směrnic Rady 82/176/EHS, 84/156/EHS, 84/491/EHS a 86/280/EHS a změně směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/60/ES. Úř. věst. L 348, 24.12.2008, s. 84–97.

**EU, 2009:** Nařízení Evropského parlamentu a Rady **(ES) č. 1223/2009**: ze dne 30. listopadu 2009, o kosmetických přípravcích. Úřední věstník EU, L 342, 22. 12. 2009, s. 59–209.

**EU, 2010:** Směrnice Evropského parlamentu a Rady **2010/63/EU** ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. Úř. věst. L 276, 20.10.2010, s. 33–79.

**EU, 2012:** Nařízení Evropského parlamentu a Rady **(ES) č. 528/2012**: ze dne 22. května 2012, o dodávání biocidních přípravků na trh a jejich používání. Úř. Věst. EU, L 167, 27. 6. 2012, s. 1–123.

**EU, 2017:** Nařízení Evropského parlamentu a Rady **(ES) č. 2017/852**: ze dne 17. května 2017, o rtuti, o zrušení nařízení (ES) č. 1102/2008. Úř. věst EU, L 137, 24. 5. 2017, s. 1–21.

**EU, 2020:** Prováděcí rozhodnutí Komise **(EU) 2020/1161**: ze dne 4. srpna 2020, kterým se stanoví seznam sledovaných látek pro monitorování v rámci celé Unie v oblasti vodní politiky podle směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/105/ES. Úř. věst. L 257, 6.8.2020, s. 32–35.

**Ferk F., Misík M., Grummt T., Majer B., Fuerhacker M., Buchmann Ch., Vital M., Uhl M., Lenz K., Grillitsch B., Parzefall W., Nersesyan A., Knasmüller, 2009:** Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward. *Mut Res.* 672: 69–75.

**Fick J., Brodin T., Heynen M., Klaminder J., Jonsson M., Grabicová K., Randák T., Grabic R., Kodeš V., Slobodník J., Sweetman A., Earnshaw M., Caracciolo A. B., Lettieri T., Loos R., 2017:** Screening of benzodiazepines in thirty European rivers. *Chemosphere* 176, 324-332.

**Fiskesjo G., 1997:** Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. *Plants Environ. Stud.* 101, 307-333.

**Fowler P., Smith R., Smith K., Young J., Jeffrey L., Kirkland D., Pfuhler S., Carmichael P., 2012:** Reduction of misleading (“false”) positive results in mammalian cell genotoxicity assays. II. Importance of accurate toxicity measurement. *Mutat Res.* 747 (1), 104–117.

**Franquet-Griell H., Gómez-Canela C., Ventura F., Lacorte S., 2017:** Anticancer drugs: Consumption trends in Spain, prediction of environmental concentrations and potential risks. *Environ. Pollut.* 229, 505-515.

**Garber J. E., Offit K., 2005:** Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol.*

23 (2), 276-292.

**Gilbert-Barness E.**, 2010: Teratogenic causes of malformations. *Ann Clin Lab Sci.* 40 (2), 99-114.

**Goullé J. P.**, Saussereau E., Mahieu L., Cellier D., Spiroux J., Guerbet M., 2012: Importance of Anthropogenic Metals in Hospital and Urban Wastewater: Its Significance for the Environment. *Bull Environ Contam Toxicol.* 89 (6), 1220-1224.

**Goyal M. K.**, Hersh A. L., Badolato G., Luan X., Trent M., Zaoutis T., Chamberlain M. J., 2015: Underuse of pregnancy testing for women prescribed teratogenic medications in the emergency department. *Acad Emerg Med.* 22 (2), 192-196.

**Gray J.M.**, Rasanayagam S., Engel C., Rizzo J., 2017: State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. *Environ Health.* 16 (1), 1-61.

**Gupta P.**, Mathur N., Bhatnagar P., Nagar P., Srivastava S., 2009: Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters. *Ecotoxicol Environ Saf.* 72 (7), 1925-1932.

**Gupta P.**, Mathur P., Mathur N., Aarya B., 2014: A comparative study of the sensitivities of *Salmonella typhimurium* strains TA 98, TA 100 and TA 102 to hospital waste waters. *Bull Environ Contam Toxicol.* 93 (1), 95-100.

**Gustafson A. L.**, Stedman D. B., Ball J., Hillegass J. M., Flood A., Zhang C. X., Panzica-Kelly J., Cao J., Coburn A., Enright B. P., Tornesi M. B., Hetheridge M., Augustine-Rauch K. A., 2012: Inter-laboratory assessment of a harmonized zebrafish developmental toxicology assay - progress report on phase I. *Reprod Toxicol.* 33 (2), 155-64.

**Hartmann A.**, Alder A. C., Koller T., Widmer R.M., 1998: Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umu C genotoxicity in native hospital wastewater. *Environ Toxicol Chem.* 17, 377-382.

**Hartwig A.**, Arand M., Epe B., Guth S., Jahnke G., Lampen A., Martus J. H., Monien B., Rietjens M. C. M. I., Schmitz-Spanke S., Schriever-Schwemmer G., Steinberg P., Eisenbrand G., 2020: Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens. *Arch Toxicol.* 94 (6), 1787-1877.

**Hatano Y.**, Ideta T., Hirata A., Hatano K., Tomita H., Okada H., Shimizu M., Tanaka T., Hara A., 2021: Virus-Driven Carcinogenesis. *Cancers (Basel).* 13 (11), 1-27.

**Hellfeld R.**, Brotzmann K., Baumann L., Strecker R, Braunbeck T., 2020: Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Sci Eur.* 32 (122), 1-18.

**Hofmanová J.**, 2013: Genotoxicita a karcinogeneze. Masarykova univerzita, Brno.

**Hong H.**, Xiong Y., Ruan M., Liao F., Lin H., Liang Y., 2013: Factors affecting THMs,

HAA and HNM formation of Jin Lan reservoir water exposed to chlorine and monochloramine. *Sci Total Environ.* 444, 196–204.

**Honjo Y.**, Ichinohe T., 2020: Stage-Specific Effects of Ionizing Radiation during Early Development. *Int J Mol Sci.* 21 (11), 1-12.

**Huitfeldt A.**, Sundbakk L.M., Skurtveit S., Handal M., Nordeng H. 2020: Associations of Maternal Use of Benzodiazepines or Benzodiazepine-like Hypnotics During Pregnancy With Immediate Pregnancy Outcomes in Norway. *JAMA Netw Open.* 3 (6), 1-3.

**Chen L.**, Li N., Liu Y., Faquet B., Alépée N., Ding C., Eilstein J., Zhong L., Peng Z., Ma J., Cai Z., Ouedraogo G., 2020: A new 3D model for genotoxicity assessment: EpiSkinTM Micronucleus Assay. *Mutagenesis.* 36 (1), 51-61.

**Cho S. S.**, Salinas R., De Ravin E., et al., 2020: Near-Infrared Imaging with Second-Window Indocyanine Green in Newly Diagnosed High-Grade Gliomas Predicts Gadolinium Enhancement on Postoperative Magnetic Resonance Imaging. *Mol Imaging Biol.* 22 (5), 1427–1437.

**Chonova T.**, Labanowski J., Bouchez A., 2017: Contribution of Hospital Effluents to the Load of Micropollutants in WWTP Influent. In: Verlicchi P. (eds) *Hospital Wastewaters. The Handbook of Environmental Chemistry.* 60.

**ICH**, 2011: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; ICH S2(R1) Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use.

**Isidori M.**, Lavorgna M., Russo Ch., Kundi M., Žegura B., Novak M., Filipič M., Mišič M., Knasmueller S., López de Alda M., Barceló D., Žonja B., Česen M., Ščančar J., Kosjek T., Heath E., 2016: Chemical and toxicological characterisation of anticancer drugs in hospital and municipal wastewaters from Slovenia and Spain. *Environ Pollut.* 219, 275-287.

**ISO**, 2005: Terms and definition in ISO 16240:2005 - Water quality — Determination of the genotoxicity of water and waste water. Salmonella/microsome test (Ames test). International Organization for Standardization, Geneva.

**ISO**, 2007: Terms and definition in ISO 11348-2:2007 - Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 2: Method using liquid dried bacteria. International Organization for Standardization, Geneva.

**ISO**, 2007: Terms and definition in ISO 15088:2007 Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). International Organization for Standardization, Geneva.

**ISO**, 2012: Terms and definition in ISO 8692:2012 - Water quality – Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. International Organization for Standardization, Geneva.

**ISO**, 2012: Terms and definition in ISO 6341:2012 - Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna Straus* (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. International Organization for Standardization, Geneva.

**ISO**, 2012: Terms and definition in ISO 11350:2012 - Water quality — Determination of the genotoxicity of water and waste water — Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test). International Organization for Standardization, Geneva.

**Jabbour J. F.**, Farah J., Abdel-Massih R. M., 2016: Hospital wastewater genotoxicity: A comparison study between an urban and rural university hospital with and without metabolic activation. *J Environ Eng Ecol Sci.* 5 (2), 1-6.

**Janik E.**, Niemcewicz M., Ceremuga M., Stela M., Saluk-Bijak J., Siadkowski A., Bijak M., 2020: Molecular Aspects of Mycotoxins-A Serious Problem for Human Health. *Int J Mol Sci.* 21, 1-21.

**Janousek S.**, Vlkova A., Jirova G., Kejlova K., Krsek D., Jirova D., Kandarova H., Wittlingerova Z., Heinonen T., Mannerstrom M., Maly M., 2021: Qualitative and Quantitative Analysis of Certain Aspects of the Cytotoxic and Genotoxic Hazard of Hospital Wastewaters by Using a Range of In Vitro Assays. *Altern Lab Anim.* 49 (1-2), 33-48.

**Jia S.**, Zhang X., 2020: Biological HRP in wastewater. *High-Risk Pollutants in Wastewater.* Elsevier. 41–78.

**Jirova G.**, Vlkova A., Wittlerova M., Dvorakova M., Kasparova L., Chrz J., Kejlova K., Wittlingerova Z., Zimova M. Hosikova B., Jiravova J., Kolarova H., 2018: Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays. *Neuro Endocrinol Lett.* 39 (6), 101-113.

**Johannesson K. H.**, Burdige D. J., 2017: Rare earth element behavior during groundwater–seawater mixing along the Kona Coast of Hawaii. *Geochim Cosmochim.* 198, 229–258.

**Jolibois B.**, Guerbet M., Vassal S., 2003: Detection of hospital wastewater genotoxicity with the SOS chromotest and Ames fluctuation test. *Chemosphere.* 51 (6), 539-543.

**Jolibois B.**, Guerbet M., 2005: Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the Salmonella fluctuation test and the SOS chromotest. *Mutat Res.* 565 (2), 151– 162.

**Jolibois B.**, Guerbet M., 2006: Hospital Wastewater Genotoxicity. *Ann Occup Hyg.* 50 (2), 189-196.

**Jureczko M., Przystaś W.**, 2019: Ecotoxicity risk of presence of two cytostatic drugs: Bleomycin and vincristine and their binary mixture in aquatic environment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 172, 210-215.

**Kafka Z.**, Punčochářová J., 2002: Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita. *Chem list.* 96, 611-617.

**Kar S.**, Roy K., Leszczynski J., 2018: Impact of Pharmaceuticals on the Environment: Risk Assessment Using QSAR Modeling Approach. *Computational Toxicology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 1800, 395-443.

**Kaur R.**, Yadav B., Tyagi R. D., 2020: Microbiology of hospital wastewater. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*: Elsevir. 103–148.

**Kern D. I.**, Schwaickhardt Rde O., Mohr G., Lobo E. A., Kist L. T., Machado Ê. L., 2013: Toxicity and genotoxicity of hospital laundry wastewaters treated with photocatalytic ozonation. *Sci Total Environ*. 443, 566-572.

**Khan M.T.**, Shah I.A., Ihsanullah I., Naushad M., Ali S., Shah S.H.A., Mohammad A.W., 2021: Hospital wastewater as a source of environmental contamination: An overview of management practices, environmental risks, and treatment processes. *J Wat Process Engineer*. 41, 1-17.

**Kohl Y.**, Rundén-Pran E., Mariussen E., Hesler M., El Yamani N., Longhin E. M., Dusinska M., 2020: Genotoxicity of Nanomaterials: Advanced In Vitro Models and High Throughput Methods for Human Hazard Assessment—A Review *Nanomaterials*. 10 (10), 1-22.

**Kreuzinger N.**, Fuerhacker M., Scharf S., et al. 2007: Methodological approach towards the environmental significance of uncharacterized substances quaternary ammonium compounds as an example. *Desalination*. 215, 209–222.

**Kulaksız S.**, Bau M., 2011: Anthropogenic gadolinium as a microcontaminant in tap water used as drinking water in urban areas and megacities. *Appl Geochem*. 26, 1877–1885.

**Kumari M.**, Khan S. S., Pakrashi S., Mukherjee A., Chandrasekaran N., 2011: Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *J. Hazard. Mater*. 190 (1), 613-62.

**Kumari A.**, Maurya N. S., Tiwari B., 2020: Hospital wastewater treatment scenario around the globe. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. 549-570.

**Kümmerer K.**, Helmers E., Hubner P., Mascart G., Milandri M., Reinthaler F., Zwakenberg M., 1999: European hospitals as a source for platinum in the environment in comparison with other sources. *Sci Total Environ*. 225 (1–2), 155-165.

**Kümmerer K.**, 2008: *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. Springer, Berlin, 521s.

**Laquaz M.**, Dagot C.H., Bazin C.H., Bastide T., Gaschet M., Ploy M., et al. 2017: Ecotoxicity and antibiotic resistance of a mixture of hospital and urban sewage in a wastewater treatment plant. *Environ Sci Pollut Res*. 25, 9243–9253.

**Leadscope**. 2018. Dostupné z<[http://www.leadscope.com/toxicity\\_databases/](http://www.leadscope.com/toxicity_databases/)>.

**Lee S. H.**, Kang J. W., Lin T., Lee J. E., Jin D. I., 2013: Teratogenic potential of

antiepileptic drugs in the zebrafish model. *BioMed res int.* 1-6.

**Leme D. M.**, Marin-Morales M. A., 2009: Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res.* 682 (1), 71-81.

**Li D.**, Chen H., Liu H., Schlenk D., ingli Mu J., Lacorte S., Ying G-G., Xie L., 2021: Anticancer drugs in the aquatic ecosystem: Environmental occurrence, ecotoxicological effect and risk assessment. *Environ Inter.* 153, 1-12.

**Lin A.Y.C.**, Wang X.H., Lee W.N., 2013: Phototransformation determines the fate of 5-fluorouracil and cyclophosphamide in natural surface waters. *Environ Sci Technol.* 47 (9), 4104-4112.

**Liu J.**, Zhang X., 2014: Comparative toxicity of new halophenolic DBPs in chlorinated saline wastewater effluents against a marine alga: Halophenolic DBPs are generally more toxic than haloaliphatic ones. *Water Res.* 65, 64–72.

**Liu X.**, Guan X., Xing F., Lv C., Dai X., Liu Y., 2017: Effect of water activity and temperature on the growth of *Aspergillus flavus*, the expression of aflatoxin biosynthetic genes and aflatoxin production in shelled peanuts. *Food Control.* 82, 325–332.

**Lutterbeck C. A.**, Colares G. S., Osbel N. D., da Silva F. P., Kist L. T., Machado E. L., 2020: Hospital laundry wastewaters: A review on treatment alternatives, life cycle assessment and prognosis scenarios. *Journal of Cleaner Production.* 273, 1-19.

**Magdaleno A.**, Juarez A. B., Dragani V., Saenz M. E., Paz M., Moretton J., 2014: Ecotoxicological and genotoxic evaluation of Buenos Aires city (Argentina) hospital wastewater. *J Toxicology.* 1-10.

**Majumder A.**, Gupta A. K., Ghosal P. S., Varma M., 2021: A review on hospital wastewater treatment: A special emphasis on occurrence and removal of pharmaceutically active compounds, resistant microorganisms, and SARS-CoV-2. *Environ Chem Eng.* 9 (2), 2-21.

**Maron D. M.**, Ames B. N., 1983: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res.* 113 (3-4), 173-215.

**Martin O.**, Frisan T., 2020: Bacterial Genotoxin-Induced DNA Damage and Modulation of the Host Immune Microenvironment. *Toxins.* 12 (2), 1-22.

**Mazzu-Nascimento T.**, Melo D.G., Morbioli G.G., Carrilho E., Vianna F.S.L., Silva A.A., Schuler-Faccini L., 2017: Teratogens: a public health issue - a Brazilian overview. *Genet Mol Biol.* 40 (2), 387-397.

**Mlejnkova H.**, Sovova K., Vasickova P., Ocenaskova V., Jasikova L., Juranova E., 2020: Preliminary Study of Sars-Cov-2 Occurrence in Wastewater in the Czech Republic. *Int J. Environ. Res. Public Health.* 17 (15), 1-9.

**Mohamed S.**, Sabita U., Rajendra S. V., Raman D., 2017: Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Glob J Pharm & Pharmaceu Sci.* 1 (5), 133-138.



**Möller P.**, Paces , T., Dulski P., Morteani G., 2002: Anthropogenic Gd in surface water, drainage system, and the water supply of the city of Prague, Czech Republic. *Environ Sci Technol.* 36, 2387–2394.

**Moore T. J.**, Mattison D. R., 2017: Adult Utilization of psychiatric drugs and differences by sex, age, and race. *JAMA Intern Med.* 177, 274–275.

**Mortelmans K.**, Zeiger E., 2000: The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 455 (1-2), 29-60.

**Muratov E. N.**, Bajorath J., Sheridan R. P., Tetko I. V., Filimonov D., Poroikov V., Oprea T.I., Baskin I.I., Varnek A., Roitberg A., Isayev O., Curtarolo S., Fourches D., Cohen Y., Aspuru-Guzik A., Winkler D.A., Agrafiotis D., Cherkasov A., Tropsha A., 2020 QSAR without borders. *Chem Soc Rev.* 49 (11), 3525-3564.

**Nařízení vlády č. 401/2015 Sb.**, ze dne 14. prosince 2015, o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, v platném znění.

**Nel A.**, Xia T., Meng H., Wang X., Lin S., Ji Z., Zhang H., 2013: Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: Use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Acc Chem Res.* 46 (3), 607–621.

**Norberg-King T. J.**, Embry M. R., Belanger S. E., Braunbeck T., Butler J. D., Dorn P. B., Farr B., Guiney P. D., Hughes S. A., Jeffries M., Journal R., Léonard M., McMaster M., Oris J. T., Ryder K., Segner H., Senac T., Van Der Kraak G., Whale G., Wilson P., 2018: An International Perspective on the Tools and Concepts for Effluent Toxicity Assessments in the Context of Animal Alternatives: Reduction in Vertebrate Use. *Environ Toxicol Chem.* 37(11), 2745-2757.

**Noyes P. D.**, Garcia G. R., Tanguay R. L., 2016: Zebrafish as an in vivo model for sustainable chemical design. *Green Chem.* 18 (24), 6410-6430.

**OECD**, 1997: Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, France.

**OECD**, 1983: Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, France.

**OECD**, 2013: Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, France.

**OECD**, 2014: Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD Publishing, Paris, France.

**OECD**, 2014: Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals OECD Publishing, Paris, France.

**OECD**, 2016: Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, France.

**OECD**, 2016: Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Section 2, OECD Publishing, Paris, France.

**OECD**, 2019: Test No. 203. Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, France.

**Oliveira T.S.**, Al Aukidy M., Verlicchi P., 2017: Occurrence of Common Pollutants and Pharmaceuticals in Hospital Effluents. In: Verlicchi P. (eds) Hospital Wastewaters. The Handbook of Environmental Chemistry. 60.

**Paz, M.**, Muzio, H., Mendelson, A., Magdaleno, A., Tornello, C., Balbis, N., & Moretton, J. 2006. Evaluation of genotoxicity and toxicity of Buenos Aires city hospital wastewater samples. *J. Braz Soc Ecotoxicol.* 1 (1), 1-6.

**Pereira A.**, Silva L., Laranjeiro C., Lino C., Pena A., 2020: Selected Pharmaceuticals in Different Aquatic Compartments: Part I-Source, Fate and Occurrence. *Molecules.* 25, 1-33.

**Persone G.**, Marsalek B., Blinova I., Törökne A., Zarina D., Manusadzianas L., Nalecz-Jawecki G., Tofan L., Stepanova N., Tothova L., Kolar B., 2003: A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environ Toxicol.* 18 (6), 395-402.

**Peterson A. R.**, 1980: DNA Synthesis, Mutagenesis, DNA Damage, and Cytotoxicity in Cultured Mammalian Cells Treated with Alkylating Agents. *Cancer Res.* 40 (3), 682-688.

**Pfuhler S.**, Downs T. R., Hewitt N. J., Hoffmann S., Mun G. C., Ouedraogo G., Roy S., Curren R. D., J Aardema M. J., 2021: Validation of the 3D reconstructed human skin micronucleus (RSMN) assay: an animal-free alternative for following-up positive results from standard in vitro genotoxicity assays, *Mutagenesis.* 36 (1), 1-17.

**Pizzino G.**, Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A., 2017: Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health, *Oxid Med Cell Longev.* 1-14.

**Popl M.**, Fährnich J., 1999: Analytická chemie životního prostředí. 4. přeprac. vyd. VŠCHT Praha.

**Pruvot B.**, Quiroz Y., Voncken A., Jeanray N., Piot A., Martial J. A., Muller M., 2012: A panel of biological tests reveals developmental effects of pharmaceutical pollutants on late stage zebrafish embryos. *Reprod Toxicol.* 34 (4), 568– 83.

**Rahman M. B.**, Driscoll T., Cowie Ch., Armstrong B. K., 2010: Disinfection by-products in drinking water and colorectal cancer: a meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 39 (3), 733–745.

**Rainer B.**, Pinter E., Prielinger L., Coppola C., Marin-Kuan M., Schilter B., Apprich S., Tacker M., 2021: Direct Comparison of the Lowest Effect Concentrations of Mutagenic Reference Substances in Two Ames Test Formats. *Toxics.* 9 (7), 1-17.

**Ribeiro R. X.**, da Silva Brito R., Pereira A. C., Monteiro K. B. S, Gonçalves B. B., Rocha T. L., 2020: Ecotoxicological assessment of effluents from Brazilian wastewater treatment plants using zebrafish embryotoxicity test: A multi-biomarker approach. *Sci Total Environ.* 735, 1-10.

**Richardson S. D.**, Plewa M. J., Wagner E. D., Schoeny R., DeMarini D. M., 2007: Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutat Res.* 636 (1), 178–242.

**Richardson S.D.**, Postigo C., 2015: Formation of DBPs: state of the science. In: Karanfil, T., Mitch, W.A., Westerhoff, P., Xie, Y. (Eds.), *Recent Advances in Disinfection By-products*. Am.Chem. Society. 189–214.

**Richardson S.D.**, Plewa M.J., 2020: To regulate or not to regulate? What to do with more toxic disinfection by-products? *J Environ Chemical Engineering.* 8 (4), 1-5.

**Rodriguez-Garraus A.**, Azqueta A., Vettorazzi A., López de Cerain A., 2020: Genotoxicity of Silver Nanoparticles. *Nanomaterials.* 10 (2), 1-26.

**Rogosnitzky M.**, Branch S., 2016: Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *Biometals.* 29 (3), 365–376.

**Roubicek D. A.**, Rech C. M., Umbuzeiro G. A., 2020: Mutagenicity as a parameter in surface water monitoring programs—opportunity for water quality improvement. *Environ Mol Mutagen.* 61 (1), 200-211.

**Rucki M.**, Kejlova K., Vlkova A., Jirova D., Dvorakova M., Svobodova L., Kandarova H., Letasiova S., Kolarova H., Mannerstrom M., Heinonen T., 2021: Evaluation of toxicity profiles of rare earth elements salts (lanthanides). *J Rare Earths.* 39 (2), 225-232.

**Santana-Viera S.**, Padrón M. E. T., Sosa-Ferrera Z., Santana-Rodríguez J. J., 2020: Quantification of cytostatic platinum compounds in wastewater by inductively coupled plasma mass spectrometry after ion exchange extraction. *Microchemical Journal.* 157, 1-6.

**Senapati V.A.**, Kansara K., Shanker R., Dhawan A., Kumarp A., 2017: Monitoring characteristics and genotoxic effects of engineered nanoparticle-protein corona. *Mutagenesis* 32 (5), 479–490.

**Sharif A.**, Ashraf M., Anjum A. A., Javeed A., Altaf I., Akhtar M. F., Abbas M., Akhtar B., Saleem A., 2016: Pharmaceutical wastewater being composite mixture of environmental pollutants may be associated with mutagenicity and genotoxicity. *Environ Sci Pollut Res.* 23 (3), 2813–2820.

**Sharma P.**, Kumar M., Mathur N., Singh A., Bhatnagar P., Sogani M., 2013: Health care industries: potential generators of genotoxic waste. *Environ Sci Pollut Res.* 20 (8), 5160–5167.

**Sharma P.**, Mathur N., Singh A., Sogani M., Bhatnagar P., Atri R., 2015: Monitoring hospital wastewaters for their probable genotoxicity and mutagenicity. *Environ Monit*

Assess. 187 (1), 1-9.

**Shen L.**, Wu J. Y., Lin G.F., Shen J.H., Westendorf J., Huehnerfuss H., 2003: The mutagenic potentials of tap water samples in Shanghai. *Chemosphere*. 52, 1641-1646.

**Siew E. L.**, Farris A. F., Rashid N., Chan K. M., Rajab N. F., 2020: In vitro toxicological assessment of gadolinium (III) chloride in V79-4 fibroblasts. *Genes Environ*. 42 (22), 1-7.

**Singh N. P.**, McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L., 1988: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. 175(1), 184–191.

**Smither R.**, 1977: Rapid screening for significant bacteriuria using a Coulter Counter. *J Clin Pathol*. 30, 1158–1162.

**Sobanská M.**, Scholz S., Nyman A-M., Cesnaitis R., Alonso S. G., Klüver N., Kühne R., Tyle H., Knecht J., Dang Z., Lundbergh I., Carlon C., Coen W., 2017: Applicability of the Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (OECD 236) in the Regulatory Context of Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH). *Environ Toxicol Chem*. 37 (3), 657-670.

**Sousa J. C. G.**, Ribeiro A. R., Barbosa M. O., Pereira M. F. R., Silva A. M. T., 2017: A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *J Hazard Mater*. 344, 146-162.

**Souza D. M.**, Reichert J. F., Martins A. F., 2018: A simultaneous determination of anti-cancer drugs in hospital effluent by DLLME HPLC-FLD, together with a risk assessment. *Chemosphere* 201, 178-188.

**Stope M. B.**, 2021: Phosphorylation of histone H2A.X as a DNA-associated biomarker (Review). *World Acad Sci J*. 3 (31), 1-5.

**Tai W.**, He L., Zhang X., Pu J., Voronin D., Jiang S., Zhou Y., Du L., 2020: Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol*. 17 (6), 613–620.

**Talová B.**, Látalová K., Praško J., Mainerová B., 2014: Úzkost a úzkostné poruchy v průběhu těhotenství a po porodu. *Čes a slov Psychiat*. 110 (1), 29-37.

**Teixidó E.**, Piqué E., Gómez-Catalán J., Llobet J. M., 2013: Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. *Toxicol In Vitro*. 27 (1), 469–78.

**Teklehaimanot G. Z.**, Coetzee M. A., Momba M. N., 2014: Faecal pollution loads in the wastewater effluents and receiving water bodies: a potential threat to the health of Sedibeng and Soshanguve communities, South Africa. *Environ Sci Pollut Res*. 21 (16), 9589-9603.

**Telgmann L.**, Sperling M., Karst U., 2013: Determination of gadolinium-based MRI contrast agents in biological and environmental samples: A review. *Anal Chim Acta*. 764,

1-16.

**Tenorio-Chávez P.**, Cerro-López M., Castro-Pastrana L. I., Ramírez-Rodrigues M. M., Orozco-Hernández J. M., Gómez-Oliván L. M., 2020: Effects of effluent from a hospital in Mexico on the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Sci Total Environ.* 727, 1-11.

**Thellmann P.**, Köhler H. R., Rößler A., Scheurer M., Schwarz S., Vogel H-J., Triebkorn R., 2015: Fish embryo tests with *Danio rerio* as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment technologies. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22 (21), 16405–16416.

**Thomas A. D.**, Fahrer J., Johnson G. E., Kaina B., 2015: Theoretical considerations for thresholds in chemical carcinogenesis. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 765, 56-67.

**Thomas K. V.**, Dye C., Langford K. H., 2007: Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works. *J Environ Monit.* 9 (12), 1410-1418.

**Thomas P. C.**, Bicherel P., Bauer F. J., 2019: How in silico and QSAR approaches can increase confidence in environmental hazard and risk assessment. *Integr Environ Assess Managt.* 15 (1), 40-50.

**Tchounwou P. B.**, Yedjou C. G., Patlolla A. K., Sutton D. J., 2012: Heavy Metal Toxicity and the Environment. In: Luch A. (eds) *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Experientia Supplementum.* 101.

**Tice R. R.**, Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., et al. 2000: Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (3), 206–221.

**Turkez H.**, Arslan M. E., Ozdemir O., 2017: Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 13 (10), 1089-1098.

**Tyagi S.**, Kalia K., Chundawart R., & Sood P., 2018: Heavy metal intoxication, oxidative stress and antioxidants therapy: A Review. *J Cell Tiss Res.* 18 (3), 6583-6611.

**Valcárcel Y.**, González Alonso S., Rodríguez-Gil J. L., Gil A., Catalá M., 2011: Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere* 84 (10), 1336-1348.

**Vasamsetti B. M. K.**, Kim N-S., Chon K., Park H. H., 2020: Teratogenic and developmental toxic effects of etridiazole on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Appl Biol Chem.* 63, 1-10.

**Verlicchi P.**, Galletti A., Petrovic´ M., Barcelo´ D., 2010: Hospital effluents as a source of emerging pollutants: an overview of micropollutants and sustainable treatment options. *J Hydrol.* 389, 416–428.

**Verlicchi P.**, Al Aukidy M., Galletti A., Petrovic M., Barcelo´ D., 2012: Hospital effluent:

investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci Total Environ.* 430: 109-118.

**Vijay U.**, Gupta S., Mathur P., Suravajhala P., Bhatnagar P., 2018: Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test. *Bio-protoc.* 8 (6), 1-10.

**Villanueva C. M.**, Cantor K. P., Cordier S., Jaakkola J. J. K., King W. D., Lynch Ch. F., Porru S., Kogevinas M., 2004: Disinfection Byproducts and Bladder Cancer: A Pooled Analysis. *Epidemiology.* 15 (3), 357–367.

**Vlkova A.**, Wittlingerova Z., Zimova M., Jirova G., Kejlova K., Janousek S., Jirova D., 2016: Genotoxicity of wastewater from health care facilities. *Neuro Endocrinol Lett.* 37 (1), 101-108.

**Vriens B.**, Voegelin A., Hug S.J., Kae gi R., Winkel L.H.E., Buser A.M., Berg M., 2017: Quantification of Element Fluxes in Wastewaters: A Nationwide Survey in Switzerland, *Environ Sci Technol.* 2017 51 (19), 10943-10953.

**Vyhláška č.252/2004 Sb.**, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, v platném znění.

**Wáng Y. X. J.**, Schroeder J., Siegmund H., Idée J. M., Fretellier N., Jestin-Mayer G., Factor C., Deng M., Kang W., Morcos S. K., 2015: Total gadolinium tissue deposition and skin structural findings following the administration of structurally different gadolinium chelates in healthy and ovariectomized female rats. *Quant Imaging in Med Surg.* 5, 534-545.

**Wagner E. D.**, Plewa M. J., 2017: CHO cell cytotoxicity and genotoxicity analyses of disinfection by-products: An updated review. *J Environ Sci.* 58, 64-76.

**Weigt S.**, Huebler N., Strecker R., Braunbeck T., Broschard T.H., 2010: Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology.* 281 (1-3), 25–36.

**White P. A.**, Rasmussen J. B., Blaise C., 1996: Comparing the presence, potency and potential hazard of genotoxicity extracted from a broad range of industrial effluents. *Environ Mol Mutagen.* 27, 116-139.

**WHO**, 2013: World Health Organisation. Safe Management of Wastes from Health-care Activities, 2nd edition.

**WHO, 2020:** Distribution of causes of death among children aged < 5 years (%).(online) [cit.2020.12.6]dostupné z <[https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/distribution-of-causes-of-deathamong-children-aged-5-years-\(-\)>](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/distribution-of-causes-of-deathamong-children-aged-5-years-(-)>)

**Williams G. M.**, Duan J. D., Brunnemann K. D., Iatropoulos M. J., Vock E., Deschl U., 2014: Chicken fetal liver DNA damage and adduct formation by activation-dependent DNA-reactive carcinogens and related compounds of several structural classes. *Toxicol Sci.* 141 (1), 18-28.

**Williams R. V.**, DeMarini D. M., Stankowski L. F., Escobar P. A., Zeiger E., Howe J.,

Elespuru R., Cross K. P., 2019: Are all bacterial strains required by OECD mutagenicity test guideline TG471 needed? *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 848, 1-10.

**Wittlerova M.**, Jirova G., Vlkova A., Kejlova K., Maly M., Heinonen T., Wittlingerova Z., Zimova M., 2020: Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos to Hospital Effluent Compared to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Physiol Res.* 69 (4), S681-S691.

**Wu J. Q.**, Kosten T. R., Zhang X. Y., 2013: Free radicals, antioxidant defense system, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 46, 200–206.

**Yadav A.**, Kanti M., Kashyap M., Dubey K., 2020: In vitro cytotoxicity study of cyclophosphamide, etoposide and paclitaxel on monocyte macrophage cell line raw 264. 7. *Indian J Microbiol.* 60, 511-517.

**Yadav B.**, Pandey A. K., Kumar L. R., Kaur R., Yellapu S. K., Sellamuthu B., Tyagi R.D., Drogui P., 2020: Introduction to wastewater microbiology: special emphasis on hospital wastewater. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering.* 1-41.

**Yilmaz G.**, Kaya Y., Vergili I., Gönder Z., Özhan G., Celik B., Altinkum S. M., Bagdatli Y., Boergers A., Tuerk, J., 2017: Characterization and toxicity of hospital wastewaters in Turkey. *Environ Monit Assess.* 189 (2), 1-19.

**Zákon č. 263/2016 Sb.**, atomový zákon, v platném znění.

**Zhang D.**, Ling H., Huang X., Li J., Li W., Yi Ch., Zhang T., Jiang Y., He Y., Deng S., Zhang X., Wang X., Liu Y., Li G., Qu J., 2020: Potential spreading risks and disinfection challenges of medical wastewater by the presence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral RNA in septic tanks of Fangcang Hospital. *Sci Total Environ.* 741, 1-12.

**Zhang Ch.**, Lu J., 2021: Optimizing disinfectant residual dosage in engineered water systems to minimize the overall health risks of opportunistic pathogens and disinfection by-products. *Sci Total Environ.* 770, 1-6.

**Zhang X.**, Li Y., Wang H., Gu X., Zheng X., Wang Y., Diao J., Peng Y., Zhang H., 2016: Screening and Identification of New Ochratoxin A-Producing Fungi from Grapes. *Toxiny.* 8, 1-14.

**Zounková R.**, Odráska P., Dolezalová L., Hilscherová K., Marsálek B., Bláha L., 2007: Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. *Environ Toxicol Chem.* 26 (10), 2208-2214.

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

### Seznam obrázků

<b>Obrázek 1</b>	Schematický nástin příčin a důsledků poškození DNA	21
<b>Obrázek 2</b>	Vícestupňový proces karcinogeneze	23
<b>Obrázek 3</b>	Schéma znázornění postupu flukтуаčního Ames MPF testu	26
<b>Obrázek 4</b>	Comet test - hodnocení poškození DNA	26
<b>Obrázek 5</b>	Souhrn nařízení a pokynů pro testování a posouzení genotoxicity v EU	32
<b>Obrázek 6</b>	Příklady chromozomových aberací v buňkách meristémů <i>Allium cepa</i>	51
<b>Obrázek 7</b>	Příklady chromozomových aberací vyvolaných odpadními vodami z nemocnic H1-H5 v buňkách kořenových špiček <i>Allium cepa</i>	52
<b>Obrázek 8</b>	Embryonální vývoj <i>D.rerio</i> v průběhu 120 hpf	59

### Seznam tabulek

<b>Tabulka 1</b>	Přehled studií genotoxicity odpadních vod ze zdravotnických zařízení	35
<b>Tabulka 2</b>	Odhadovaný počet sloučenin s genetickými toxikologickými údaji v toxikologické databázi Leadscope	37
<b>Tabulka 3</b>	Hodnoty mutagenního indexu (MI) odpadních vod z nemocnic H1- H5	43
<b>Tabulka 4</b>	Miskový Ames test - hodnoty Mutagenního indexu (MI) vzorků odpadních vod z nemocnice H6	45
<b>Tabulka 5</b>	Srovnání vybraných fyzikálních parametrů vzorků odpadních vod z nemocnice H1 v různých časových obdobích	46
<b>Tabulka 6</b>	Hodnoty inhibice růstové rychlosti <i>Desmodesmus subspicatus</i> u filtrovaných a nefiltrovaných vzorků odpadních vod z nemocnic H1-H6	47
<b>Tabulka 7</b>	Hodnoty kovů naměřených ICP-MS u filtrovaných a nefiltrovaných vzorků odpadních vod z nemocnice H1 (březen 2021)	48
<b>Tabulka 8</b>	Cytogenetická analýza kořenových špiček <i>Allium cepa</i>	52
<b>Tabulka 9</b>	Přehled výskytu subletálních efektů po inkubaci ve vzorcích H1-H7 ve dvou expozičních časech (48 hpf / 96 hpf)	57
<b>Tabulka 10</b>	Hodnoty teratogenního indexu (TI), EC50, LC50 ve studii IV	58
<b>Graf 1</b>	Počet publikací dle bibliometrické analýzy	34
<b>Graf 2</b>	Comet test - poškození DNA v buňkách kořenového meristému <i>A. cepa</i>	53



## 9 PŘÍLOHY

<b>Příloha 1:</b>	Studie I	Genotoxicity of wastewater from health care facilities
<b>Příloha 2:</b>	Studie II	Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays
<b>Příloha 3:</b>	Studie III	Qualitative and Quantitative Analysis of Certain Aspects of the Cytotoxic and Genotoxic Hazard of Hospital Wastewaters by Using a Range of <i>In Vitro</i> Assays
<b>Příloha 4:</b>	Studie IV	Sensitivity of Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) Embryos to Hospital Effluent Compared to <i>Daphnia magna</i> and <i>Aliivibrio fischeri</i>
<b>Příloha 5:</b>	Poster I	Genotoxicity of wastewater from health care facilities
<b>Příloha 6:</b>	Poster II	National Institute of Public Health - Contact Point and Reference Laboratory for Alternative Methods According to Directive 2010/63/EU
<b>Příloha 7:</b>	Poster III	Cytotoxicity and Genotoxicity Hazard of Hospital Wastewaters Evaluated by Alternative <i>In Vitro</i> Assays
<b>Příloha 8:</b>	Publikační přehled	
<b>Příloha 9:</b>	Odborný životopis	

## **Studie I**

### **Genotoxicity of wastewater from health care facilities**

Neuroendocrinology Letters

2016: 37 (1), 101-108.

# Genotoxicity of wastewater from health care facilities

Alena VLKOVÁ<sup>1,2</sup>, Zdeňka WITTLINGEROVÁ<sup>1</sup>, Magdalena ZIMOVÁ<sup>1,2</sup>, Gabriela JÍROVÁ<sup>1,2</sup>, Kristina KEJLOVÁ<sup>2</sup>, Stanislav JANOUŠEK<sup>2</sup>, Dagmar JÍROVÁ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Praha, Czech Republic  
<sup>2</sup> National Institute of Public Health, Praha, Czech Republic

Correspondence to: Alena Vlková,  
Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague,  
Kamýcká 129, Praha 6 - Suchbát, 165 21, Czech Republic.  
TEL: +420 267082354 ; E-MAIL: vlkovaalena@fzp.czu.cz

Submitted: 2016-06-24 Accepted: 2016-10-30 Published online: 2016-12-18

Key words: **mutagenicity; pollutant; Salmonella; UmuC; Allium cepa; hospital; effluents**

Neuroendocrinol Lett 2016; **37**(Suppl. 1):101-108 PMID: ----- NEL370916AXX © 2016 Neuroendocrinology Letters • [www.nel.edu](http://www.nel.edu)

## Abstract

Health care facilities use for therapeutic purposes, diagnostics, research, and disinfection a high number of chemical compounds, such as pharmaceuticals (e.g. antibiotics, cytostatics, antidepressants), disinfectants, surfactants, metals, radioactive elements, bleach preparations, etc. Hospitals consume significant amounts of water (in the range of 400 to 1200 liters/day/bed) corresponding to the amount of wastewater discharge.

Some of these chemicals are not eliminated in wastewater treatment plants and are the source of pollution for surface and groundwater supplies. Hospital wastewater represents chemical and biological risks for public and environmental health as many of these compounds might be genotoxic and are suspected to contribute to the increased incidence of cancer observed during the last decades. The changes of the genetic information can have a lethal effect, but more often cause tumor processes or mutations in embryonic development causing serious defects.

A review of the available literature on the mutagenicity/genotoxicity of medical facilities wastewater is presented in this article.

## INTRODUCTION

In recent years, along with improving health care, researchers and experts have realized that wastes from hospitals and health facilities represent an increased risk of environmental pollution and therefore may adversely affect human health. However, no specific directive or guideline for the management of hospital effluents has been adopted in Europe so far. Hospitals and healthcare facilities utilize for therapeutic purposes, diagnostics, research, disinfection and daily operations a number of chemicals, such as pharmaceutical compounds (antibiotics, cytostatics, antidepres-

sants, etc.), disinfectants, heavy metals (platinum, silver, mercury), iodinated X-ray contrast agents, radioactive elements and bleaching agents (WHO 2013; Magdaleno *et al.* 2014).

A large part of hazardous substances found in wastewater have proven genotoxic/mutagenic effects and may cause changes in the genetic information of an organism. Genotoxic effects are particularly dangerous as they have no threshold level, their effects cannot be reversed and may affect the next generation in the long term. Genotoxic substances occurring in the environment may have contributed to the increase of cancer incidence in the last decade (Jolibois & Guerbet 2005; WHO

2013). To avoid these risks, the European Union does not allow direct discharge of chemicals and metabolites with mutagenic/carcinogenic effect to wastewater (EU Directive 80/68 EEC; 76/464 EEC). However, some compounds can reach the medical facilities wastewater along with human excreta from toilets and during the process of disinfection, washing and laundry (Kern *et al.* 2015). A significant source of genotoxic risks in hospital wastewater (HWW) represent also pharmaceuticals (antibiotics, cytostatics), which are excreted primarily in the urine (55–88%) and to a lesser extent by stool (Santos *et al.* 2010; Verlicchi *et al.* 2012). In addition, pharmaceuticals (PHs) past their expiration date contrary to regulations are frequently flushed down the toilet, reaching through sewage a wastewater treatment plant (WWTP). The currently used wastewater treatment processes are able to capture or eliminate some of these substances, however, from the WWTP some PHs, being difficult to biodegrade, may get into surface waters and rarely even into groundwater, which is the source of drinking water (Kümmerer 2009). Currently, the presence of drugs (e.g. ibuprofen, karbazapin, diclofenac) in drinking water in the Czech Republic was already demonstrated (Kožíšek *et al.* 2013).

Mercury, platinum and silver belong among heavy metal elements with genotoxicity potential found in the hospital wastewater (HWW). The World Health Organization showed that up to 5% of mercury present in the aquatic system originates from medical facilities, mainly from dental amalgam and medical devices (WHO 2013). Since mercury is on the List of Hazardous Substances (EU Directive 2006/11/EC) the release of amalgam to WW is prohibited and the use of amalgam separators at the dentists is obligatory (EU 2006).

Every year an increasing number of cancer patients are treated with antineoplastic preparations containing platinum (Pt). 90% of these drugs are excreted in urine to WW and consequently to WWTP. Goulle *et al.* (2012) in their work showed that a large proportion of Pt (68%) is not eliminated in the wastewater treatment plants and pollutes the surface waters (e.g. the river Seine 350 g/year).

The elimination of pathogens in healthcare facilities requires the use of a large number of disinfectants and detergents. The most widely used disinfectants are chlorine-based (sodium hypochlorite) or contain aldehydes or their derivatives, such as glutaraldehyde. Chlorine from disinfectants reacts with organic substances present in aquatic environments and produces toxic and genotoxic adsorbable organic halogens.

## ASSESSMENT OF GENOTOXICITY

### Sampling and storage of samples

Proper sampling is essential for quality results of the WW composition analyses. WW has a very variable composition during the day and thus single sampling is not appropriate. It is necessary to collect average com-

posite samples depending on time (per hour, per shift, per 24 h). In most studies dealing with the evaluation of the genotoxicity of WW, samples were collected with an (auto)sampler during 24h (Steger-Hartmann *et al.* 1997; Hartmann *et al.* 1999; Jolibois & Guerbet 2006a, 2006b; Ferk *et al.* 2009 2014) or at the time of the maximal hospital activity (mostly from 8 a.m. to 4 p.m.) (Jolibois *et al.* 2003, 2005; Sharma *et al.* 2015; Gupta *et al.* 2009). All collected samples were immediately transported in cooling boxes and stored either at 4°C (Giuliani *et al.* 1996, Bagatini *et al.* 2009; Alabi & Shokunbi 2011; Gupta *et al.* 2014; Sharma *et al.* 2013, 2015) or frozen at –25°C (Steger-Hartmann *et al.* 1997; Hartmann *et al.* 1999; Jolibois & Guerbet 2005, 2006a, 2006b; Magdaleno *et al.* 2014). The samples stored at 4°C were processed within 7 days from the sample collection.

### Sample preparation

It is necessary to adjust the collected WW samples from medical facilities before the assessment of their genotoxic potential, especially when using bacterial tests, to avoid any artefacts.

The most commonly used preparation technique of liquid samples is filtering through a special filter (e.g. cellulose nitrate, cellulose acetate filter) with a pore size 0.45 µm (Jolibois & Guerbet 2005, 2006a, 2006b; Hartmann *et al.* 1999) or with a pore size 0.22 µm (Paz *et al.* 2006; Magdaleno *et al.* 2014). Paz *et al.* (2006) tested each sample after filtration through a cellulose nitrate filter (0.22 µm; Millipore) and as an ether extract obtained using a special procedure. Although filtration is the most widely used method, White *et al.* (1996) mention in their study that certain chemical substances may be captured on the filter during filtration causing a loss of the genotoxic activity. For those reasons, Gupta *et al.* (2009, 2014) and Sharma *et al.* (2013, 2015) used untreated wastewater in their biological tests.

### Methods

The quantification of risk associated with chemical pollutants in wastewater is extremely difficult as they usually occur in concentrations too low to allow analytical determination (Verlicchi *et al.* 2012) and the synergic effects of mixtures cannot be evaluated by means of chemical analytical methods. Therefore, genotoxicity is preferentially evaluated using biological tests which do not require the exact knowledge of toxicant identity and physical–chemical properties of the wastewater sample. The most widely used tests of genotoxicity are based on bacteria *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (i.e. Ames test, UmuC test/SOS chromotest).

*Salmonella*/microsome assay (Ames test; OECD TG 471) or *Salmonella* fluctuation assay (Ames fluctuation test – a liquid version of Ames test) is the longest-used short-term bacterial reverse mutation assay for evaluation of the mutagenic potential of chemicals or mixtures by detecting their effect on histidine deficient strains of *Salmonella typhimurium* in the absence and presence of

liver metabolism activation (Maron & Ames 1983). The Salmonella assay has been extensively used for evaluation of genotoxicity of different types of water, e.g. tap water (Shen *et al.* 2003), water after sewage treatment (Morisawa *et al.* 2003), urban or hospital wastewater (Hartmann *et al.* 1999; Jolibois & Guerbet 2006a; Ferik *et al.* 2009; Gupta *et al.* 2014; Sharma *et al.* 2015). Salmonella strains TA100 and TA98 are commonly used in these tests. Nevertheless, some studies have also utilized strain TA102 (Jolibois & Guerbet 2005; Jolibois & Guerbet 2006a; Jolibois & Guerbet 2006b; Gupta *et al.* 2009; Gupta *et al.* 2014), which is recommended to be used for its greater sensitivity to genotoxic agents in wastewater. The use of all three strains allows the detection of a broader range of genotoxic substances as each strain is capable to identify different types of mutations (frame-shift mutation – TA98, base pair substitution mutation – TA100, DNA cross-linking – TA102) (Fan *et al.* 1998). The strain TA102 is more sensitive for detection of oxidative mutagens and determination of distinct aldehydes (Levin *et al.* 1982). Addition of liver metabolic activation in these tests can detect promutagenic properties of a substance when the genotoxic effect occurs only after metabolic activation in the mammalian organism.

SOS chromotest (*Escherichia coli* PQ 37) and UmuC test (*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK 1002) are biological assays evaluating DNA damage or inhibition of DNA replication in cells inducing the SOS repair system. This colorimetric assay measures the expression of genes induced by genotoxic agents by means of a fusion with the structural gene for  $\beta$ -galactosidase (Giuliani *et al.* 1996; Sharma *et al.* 2015).

Comet assay (single-cell gel electrophoresis) is a simple method for measuring DNA strand breaks in eukaryotic cells. Electrophoresis at high pH results in structures resembling comets, observed by fluorescence microscopy; the intensity of the comet tail in relation to the head reflects the number of DNA breaks (Brendler-Schwaab *et al.* 2005).

*In vitro* Mammalian Chromosomal Aberration (CA) Test (OECD TG 473) is based on cell cultures exposed to the test substance both with and without metabolic activation. At predetermined intervals after exposure the cell cultures are treated with a metaphase-arresting substance (e.g. colchicine), harvested, stained and metaphase cells are analyzed microscopically for the presence of CA.

The Allium test utilizes bulbs of *Allium cepa*. In monitoring studies, higher plants have been recognized as excellent genetic models to detect environmental mutagens (Leme & Marin-Morales 2009). Due to relative simplicity, sensitivity to genetic damage, low cost of experimentation and small amount of sample required these short-term bioassays have proved to be an important tool in genotoxic studies. The root tip cells constitute a convenient system for macroscopic (growth, EC50 values) and for microscopic parameters

(c-mitosis, stickiness, chromosome breaks, micronuclei (MN)). Since the cells possess important plant activation enzymes, the results from the *Allium cepa* test have shown good agreement with results from other test systems, eukaryotic as well as prokaryotic. The CA method in *Allium cepa* roots is validated by the International Program on Chemical Safety (IPCS) as an efficient test for analysis and in situ monitoring of the genotoxicity of environmental substances.

*Saccharomyces cerevisiae* Gene Mutation Assay – (OECD TG 480) utilizes genetically modified strains of *S. cerevisiae* for genotoxicity testing. Yeast cells have the same advantages as bacteria in terms of high throughput, easy manipulation, fast growth and low cost. While retaining the simplicity of unicellular organisms, they are truly eukaryotes and therefore closer to mammalian cells. DNA damage-inducible genes in yeast cells respond to a much broader spectrum of DNA lesions.

A comprehensive overview of available methods and their use in testing the genotoxicity / mutagenicity of health care facilities wastewater is described in detail in a review by Sharma *et al.* (2012).

## GENOTOXICITY OF WASTEWATER FROM HEALTH CARE FACILITIES

Recently a lot of studies focused on determination of chemical composition of WW from hospitals and health care facilities have been published, but only a few of them have assessed the complex effect of wastewaters and their overall genotoxicity. The overview of the most important studies is included in Table 1. The table contains the number of samples tested, the percentage of samples inducing genotoxic effects and the used methods. Generally, all the listed studies confirm genotoxic effect of untreated samples of wastewater from health care facilities.

Table 1. Summary of genotoxicity studies focused on wastewater from health care facilities, based on tests of untreated samples.

The most extensive published study was carried out by Giuliani *et al.* (1996). In this study, genotoxic potential of WW from a Swiss hospital (1400 beds) was evaluated. The samples of WW were collected for two years (in total 851 samples) and the genotoxic effect was assessed by UmuC test. Genotoxic activity was found in 13% of all samples and the highest number of positive effects was recorded in the morning (6–10 a.m.), which reflects the period of the highest activity in the hospital, e.g. release of pooled urine or cleaning water.

Steger-Hartmann *et al.* (1997) observed the effect of cyclophosphamide on the HWW genotoxicity in Switzerland. His study identified biodegradation and concentration of cyclophosphamide in WW before and after treatment and investigated the effect of cyclophosphamide on the overall genotoxic potential of WW. Three of the six hospital sewage water samples tested proved to be genotoxic with S9 metabolic activation.

**Tab. 1.** Summary of genotoxicity studies focused on wastewater from health care facilities, based on tests of untreated samples.

Reference	Country	Number of samples	Percentage of genotoxic samples	Bioassay
Giuliani <i>et al.</i> (1996)	Switzerland	851	13%	UmuC test
Steger–Hartman <i>et al.</i> (1997)	Switzerland	6	50%	UmuC test
Hartmann <i>et al.</i> (1998)	Germany	16	NA	UmuC test
Hartmann <i>et al.</i> (1999)	Germany	25	56% *	Ames test (TA100, TA98), Chromosomal aberration test, UmuC test
Jolibois <i>et al.</i> (2003)	France	18	55% *	Ames fluct. test (TA100, TA98), SOS chromotest
Jolibois & Guerbet (2005)	France	71	65% *	Ames fluct. test (TA100, TA98, TA102), SOS chromotest
Paz <i>et al.</i> (2006)	Argentina	2	50%	Test <i>Allium cepa</i> , <i>Saccharomyces c.</i> test
Jolibois & Guerbet (2006a)	France	38	82% *	Ames fluct. test (TA100, TA98, TA102), SOS chromotest
Jolibois & Guerbet (2006b)	France	14	93% *	Ames fluct. test (TA100, TA98, TA102), SOS chromotest
Ortolan & Ayub (2007)	Brazil	28	32%	UmuC test
Ferk <i>et al.</i> (2009)	Austria	3	0% - Ames t. 100% - Comet t.	Ames test (TA98, TA100, TA1535), Comet test
Bagatiny <i>et al.</i> (2009)	Brazil	10	100%	Test <i>Allium cepa</i>
Gupta <i>et al.</i> (2009)	India	6	100%	Ames test (TA98, TA100)
Alabi & Shokunbi (2011)	Nigeria	1	100%	Animal assay
Atasoy <i>et al.</i> (2012)	Turkey	108	56%	Ames test (TA98, TA100)
Sharma <i>et al.</i> (2013)	India	20	100%	Ames test (TA98, TA100), <i>Saccharomyces c.</i> test
Magdaleno <i>et al.</i> (2014)	Argentina	20	40%	Test <i>Allium cepa</i>
Gupta <i>et al.</i> (2014)	India	15	100%	Ames test (TA98, TA100, TA102)
Kern <i>et al.</i> (2015)	Brazil	1	100%	Test <i>Allium cepa</i>
Sharma <i>et al.</i> (2015)	India	12	100%	Ames fluct. test (TA100, TA98), SOS chromotest

\*positive in at least one test; NA – not available

Effluent samples after treatment in the WW treatment plant were not genotoxic, although occurrence of cyclophosphamide was confirmed analytically, leading to the conclusion that the genotoxic potential of untreated water was not caused by cyclophosphamide.

Hartmann *et al.* (1998; 1999) has confirmed in his two studies that fluoroquinolone ATBs (e.g. ciprofloxacin, norfloxacin) are an important source of genotoxicity in samples of untreated HWW (Germany). In both studies the induction of UmuC correlated with deter-



mined concentrations of ATBs in the WW. In the study from 1999, this finding was additionally supported by other bioassays (Ames assay and CA assay).

Comprehensive assessment and research of genotoxicity in Rouen (France) was published by Jolibois & Guerbet in their four studies from 2003 to 2006. Genotoxic effects of chemical mixtures in WW were determined using two bioassays – Ames fluctuation test and SOS Chromotest, which are complement and extend the ability to detect several types of gene mutations. In the first study (Jolibois *et al.* 2003), 18 samples of WW from the Rouen University Hospital were collected and 56% were mutagenic in at least one assay. In the second large study (Jolibois & Guerbet 2005) the authors compared industrial WW, domestic WW and HWW and the effect of treatment. Results from the six different sampling sites showed toxic effects of domestic WW at the same level as the other two WWs. However, it is important to emphasize that all the samples after treatment were not genotoxic. The third study (Jolibois & Guerbet 2006a) again confirmed the results of the previous ones (2003; 2005). From a total of 38 samples, 31 were positive at least in one of the used tests (Ames fluctuation assay, SOS chromotest). The fourth study (Jolibois & Guerbet 2006b) was focused on detailed investigation of genotoxic effects of Rouen hospital WW (13/14 samples positive) and also on setting up a simple classification of HWW genotoxic effects. The authors introduced a scale of five genotoxic levels G1-G5, where G1 was the weakest effect and G5 the strongest one. This classification would simplify and streamline the level of genotoxic risks not only for scientists, but also for public. Nevertheless, it should be noted that this method has not been frequently used by other investigators. In the last three studies (Jolibois & Guerbet 2005; 2006a; 2006b) the authors utilized in the Ames fluctuation assay not only strains TA98 and TA100, but also the strain TA102, which proved to be the most sensitive for determination of WW genotoxicity.

The levels of genotoxic and toxic effects of WW from the hospital facilities in Brazil and Argentina have been investigated in the recent years by several scientific teams (Paz *et al.* 2006; Ortolan & Ayub 2007; Bagatiny *et al.* 2009; Magdaleno *et al.* 2014; Kern *et al.* 2015). These authors used in their studies predominantly the *Allium cepa* test, *S. cerevisiae* assay and UmuC.

Magdaleno *et al.* (2014) investigated genotoxicity and toxicity of WW from hospital in Buenos Aires and the effect of treatment in a communal wastewater treatment plant. 8 samples from 20 (40%) induced high frequency of CA and MN. The correlation between genotoxicity and determined concentrations of ATBs and disinfectant agents was found only for ciprofloxacin. This finding is consistent with the study by Hartmann *et al.* (1999), where the correlation between DNA damage and concentration of ciprofloxacin was reported. Samples collected at the outlet of the WWTP

were not genotoxic in the *Allium cepa* test, but remained toxic to algae, which indicated that cleaning of WW was not totally effective.

The aim of the study conducted by Kern *et al.* (2015) was to assess the ecotoxicity and genotoxicity of wastewater from hospital laundry of a regional hospital in Rio Pardo Valley, Brazil. The laundry contributed to approximately 33% of the hospital wastewater quantity and had a different composition than the wastewater from the hospital wards. It contained high concentrations of body fluids (blood, faeces, vomit, etc.), exhibited high microbial load and potential presence of viruses. A detailed analysis and ecotoxicological assessment of these samples were performed by several methods (physico-chemical analysis, gas chromatography, acute toxicity tests on *Daphnia magna* and *Danio rerio*, etc.). The *Allium cepa* test was used for the determination of ecotoxicity and genotoxicity. No CA were observed in root tip cells, but cells with higher frequency of MN depending on sample concentration were recorded. This study did not prove evidence of toxicity in the water and soil ecosystem, however, the results confirmed that WW from hospital laundries contributes significantly to the toxicity and genotoxicity of HWW.

Ortolan & Ayub (2007) used for evaluation of cytotoxicity and genotoxicity untreated hospital effluents from hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil. Genotoxic effects were proved for 32% of samples and only without S9 metabolic activation. WW toxicity and genotoxicity in samples taken from inpatient units was higher in comparison with laboratory departments.

India is another state currently focusing on testing of dangerous properties of WW from medical facilities, as in this country the HWW is routinely discharged into the municipal sewage system and subsequently processed together with domestic WW in the WWTP. Gupta *et al.* (2009) in his work assessed mutagenicity and genotoxicity of HWW from 3 main hospitals in Delhi, one of the facilities had fully functional WWTP, the other two discharged WW directly to the sewage system. He compared genotoxic effects of untreated WW and WW in different phases of treatment (after filtration, aeration and chlorination). All untreated samples from the 3 hospitals showed positive mutagenic effects in the Ames test. Mutagenicity was slightly decreased by filtration and no samples after complex treatment showed any mutagenic effect confirming the overall treatment process in the WWTP was highly effective.

In another study by the same author (Gupta *et al.* 2014) five hospitals, three in Delhi and two in the area of Jaipur, were selected for HWW sample assessment by the Ames test using all three recommended strains. According to the classification criteria of genotoxicity set by Jolibois & Guerbet (2005), all the samples showed strong genotoxic potential, however, only in the case of strain TA102, which proves the necessity to include this strain in the standard Ames test used for testing WW.

The studies by Sharma *et al.* (2013; 2015) conducted in India confirmed that even diagnostic centres represent a small but significant source of genotoxicity to the sewage system and that samples tested with metabolic activation S9 showed stronger genotoxic activity suggesting the presence of promutagenic substances (Sharma *et al.* 2015).

Genotoxicity potential of WW from the oncology department of General Hospital Vienna, (Austria) was examined by Ferk *et al.* (2009). Two complement bacterial tests were chosen for testing of the genotoxic potential – the Salmonella/microsome assay using strains TA98, TA100, TA1535, and Comet assay. The influence of different treatment process steps – membrane filtration, UV-radiation, filtration through activated coal – was investigated. The Salmonella/microsome assay showed negative results for all the tested samples, however, the Comet assay showed a strong damage of DNA with respect to the dosage of cytostatics. The study confirmed the significant effect of membrane filtration on the overall genotoxic effect, the decrease was in the range of 62–77%. Nevertheless, the following treatment steps did not cause any further decrease of genotoxic potential. Testing of various reference cytostatics showed that the active concentrations, causing DNA damage, were much higher than concentrations detected in the untreated WW. The authors believe that cytostatics are not the main source of genotoxicity in HWW. The positive results in the Comet assay are explained by contamination by quarter ammonium compounds in the HWW.

The only available study that evaluates toxicity and genotoxicity of HWW *in vivo* on animals was performed by Alabi & Shokunbi (2011) in Niger. Albino mice were intraperitoneally administered raw, unfiltered WW in 5 concentrations. The application was carried out for 4 consequent days, followed by a battery of biological tests – MN, CA, and sperm count and morphology. Test results showed a significant increase of CA in bone marrow cells, increased frequency of MN in bone marrow erythrocytes, altered sperm morphology and their significant decrease in number in a dose dependent manner.

All the above-mentioned studies prove that untreated WW samples from medical facilities exhibit genotoxic potential in the extent from 13% samples (Giuliani *et al.* 1996) up to 100% (see Table 1). However, a relevant evaluation of the general genotoxic response is disputable as the studies utilize different research methods and in some cases only a few samples have been tested (Paz *et al.* 2006; Kern *et al.* 2015). I. Moreover, the genotoxic response of the tested samples has been influenced by many factors. The variability and concentration of chemical substances present in WW samples is influenced by the size and type of the facility, number of inpatients and outpatients, quantity and type of provided treatment and services, focus of research or sampling procedure, time and season (Jolibois & Guerbert 2006a; Ort *et al.* 2010).

## LEGISLATIVE MEASURES

Recently, a growing number of countries worldwide have been aware of the problem with micropollutants (MPs) in aquatic environment. MPs that are persistent, bioactive, not completely biodegradable and cannot be totally removed with conventional wastewater treatment technologies pose the highest risk. The continued release of MPs with WW effluent is believed to cause long-term hazards as the contaminants might bioaccumulate and form new mixtures in the aquatic system with unknown effects. It has been shown that concentrations of dangerous MPs in hospital effluent are greater than in domestic WW (Santos *et al.* 2013, Verlicchi *et al.* 2012). It is estimated that HWW is 5 to 15 times more toxic than urbanic WW (Emmanuel *et al.* 2009).

In Europe, no specific directive or guideline for the management of hospital effluent has been adopted yet and the member countries have their own specific legislation and criteria for assessing the quality of HWW. If a hospital facility is considered by the legislation of the state to be industrial (e.g. in Spain and France), usually some type of pretreatment is required and specific characteristics of the WW will have to be met before permitted to discharge it in the municipal WWTP (e.g. chemical, physical and microbiological limits for pH, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, *E. coli*, biological oxygen demand, etc.) (EU 91/271/CEE modified from Directive 98/15/CE). On the other hand, in countries where HWW is considered to be domestic or communal, neither authorisation nor specific characteristics are required before discharge (e.g. Germany) (Carraro *et al.* 2016). The removal of pharmaceutical substances is not specifically regulated by the Urban Waste Water Treatment Directive, which addresses the removal of organic pollution at treatment plant level (secondary and biological treatment) (EU 1991). However, in the areas identified as “sensitive” under this Directive, member states should consider additional treatment steps if necessary to meet certain other legislative requirements, such as those of the Water Framework Directive (EU 2000).

Recently, within the European Union legislative action has been taken and a list of prioritized substances that have been seen as a threat to surface and ground water has been published. In order to comply with the environmental standards laid out by the EU, the member countries should monitor the prevalence of the substances on this list, starting in September 2015, as specified in Directive 2013/39/EU, on priority substances in the field of water policy, and Water Framework Directive 2000/60/EC (EU 2013; EU 2000). The list currently contains 45 priority dangerous substances, however, none of them are pharmaceuticals. The Directive 2013/39/EU states in Article 8b that the Commission shall establish a watch list of substances for which Union-wide monitoring data are to be gathered for the purpose of supporting future prioritization exercises.



Specific provisions for pharmaceutical substances are mentioned in Article 8c. The environmental impacts of medicines should be taken into account more effectively in the procedure for placing medicinal products on the market. The Commission should by 14 September 2017 propose measures to address the possible environmental impacts of pharmaceutical substances, with a view to reducing discharges, emissions and losses of such substances into the aquatic environment, taking into account public health needs and the cost-effectiveness of the measures proposed.

Switzerland is one step ahead and has already decided to reduce MPs and toxicity of their wastewater. They have decided to upgrade 100 WWTPs (which represents about 50% of the municipal wastewater in Switzerland) during the next 20 years. <http://www.micropollutants.com>

## CONCLUSIONS

Results from the available scientific literature indicate that untreated wastewater from medical facilities frequently exhibits genotoxic effects. However, the evaluation of genotoxic effects of a given compound in wastewater is not an easy task mainly due to the variable characteristics of wastewaters, which depend on the type of hospital activity (care, diagnostic tests, analysis and research activities, numbers of inpatients or outpatients, etc.).

Further long-term and regular monitoring will be necessary for proper evaluation of the genotoxic risks posed by wastewater from individual health care facilities. In order to obtain relevant data to set up safe limits for the legal regulation of genotoxic substances contained in wastewaters, it will be essential to develop a unified genotoxicity testing battery and produce standardized methodologies for the individual tests to enable comparison of the published results. In addition to the conventional chemical analysis, biological genotoxicity assays should be included as additional parameters in WW hazard monitoring. A more in-depth investigation should be conducted and specific treatment proposed with the aim to decrease the discharge of genotoxic chemicals into the local sewage system and environment.

## ACKNOWLEDGEMENT

The research was supported by the Ministry of Health, the Czech Republic – conceptual development of research organization („National Institute of Public Health – NIPH, IN: 75010330“).

## REFERENCES

- Alabi OA, Shokunbi OS (2011). Toxicological effects of hospital wastewater using animal bioassays. *Ann Biol Res.* **2**(2): 265–275.
- Atasoy AR, Karakece E, Petek M, Alpsoy L, Abdullah Kiran A (2012). Determination of Genotoxic Pollution of Some Hospital Wastewater with *Salmonella* Ames Test. *J Water Resource Prot.* **4**: 859–865.
- Bagatini MD, Vasconcelos TG, Laughinghouse HD, Martins AF, Tedesco SB (2009). Biomonitoring Hospital Effluents by the *Allium cepa* L. test. *Bull Environ Contam Toxicol.* **82**(5): 590–592.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S, Speit G (2005). The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis.* **20**(4): 245–254.
- Carraro E, Bonetta S, Bertino C, Lorenzi E, Bonetta S, Gilli G (2016). Hospital effluents management: Chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries. *J Environ Manage.* **168**: 185–199.
- Emmanuel E, Pierre MG, Perrodin Y (2009). Groundwater contamination by microbiological and chemical substances released from hospital wastewater: Health risk assessment for drinking water consumers. *Environ Int.* **35**(4): 718–726.
- EU (1976). Council Directive 76/464/EEC of 4 May 1976 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community. European Union. OJ, **L129**, 18 May 1976, 23–29.
- EU (1979). Council Directive 80/68/EEC of 17 December 1979 on the protection of groundwater against pollution caused by certain dangerous substances. European Union. OJ, **L020**, 26 January 1980, 43–48.
- EU (1991). Council Directive 91/271/EEC of 21 May 1991 concerning urban waste water treatment. European Union. OJ, **L135**, 30 May 1991, 40–52.
- EU (1998). Commission Directive 98/15/EC of 27 February 1998 amending Council Directive 91/271/EEC with respect to certain requirements established in Annex I thereof. European Union. OJ, **L67**, 7 March 1998, 29–30.
- EU (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. European Union. OJ, **L327**, 22 December 2000, 1–72.
- EU (2006). Directive 2006/11/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community. European Union. OJ, **L64**, 4 March 2006, 52–59.
- EU (2013). Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. European Union. OJ, **L226**, 24 August 2013, 1–17.
- Fan M, Byrd C, Compadre CM, Compadre RL (1998). Comparison of COMFA models for *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA98 S9 and TA100 S9 mutagenicity of nitroaromatics, SAR and QSAR. *Environ Res.* **9**(3): 187–215.
- Ferk F, Misik M, Grummt T, Majer B, Fuerhacker M, Buchmann C et al. (2009). Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward. *Mutat Res.* **672**: 69–75.
- Giuliani F, Koller T, Würzler F, Widmer RM (1996). Detection of genotoxic activity in native hospital wastewater by the umuC test. *Mutat Res.* **368**: 49–57.
- Goullé JP, Sausseureau E, Mahieu L, Cellier D, Spiroux J, Guerbet M (2012). Importance of Anthropogenic Metals in Hospital and Urban Wastewater: Its Significance for the Environment. *Bull Environ Contam Toxicol.* **89**(6): 1220–1224.
- Gupta P, Mathur N, Bhatnagar P, Nagar P, Srivastava S (2009). Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters. *Ecotoxicol Environ Saf.* **72**(7): 1925–1932.
- Gupta P, Mathur P, Mathur N, Aarya B (2014). A comparative study of the sensitivities of *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100 and TA102 to hospital waste waters.
- Bull Environ Contam Toxicol. **93**(1): 95–100.
- Hartmann A, Alder AC, Koller T, Widmer RM (1998). Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environ Toxicol Chem.* **17**: 377–382.

- 22 Hartmann A, Golet EM, Gartiser S, Alder AC, Koller T, Widmer RM (1999). Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Arch Environ Contam Toxicol.* **36**(2): 115–119.
- 23 Jolibois B, Guerbet M, Vassal S (2003). Detection of hospital wastewater genotoxicity with the SOS chromotest and Ames fluctuation test. *Chemosphere.* **51**(6): 539–543.
- 24 Jolibois B, Guerbet M (2005). Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the *Salmonella* fluctuation test and the SOS chromotest. *Mutat Res.* **565**(2): 151–162.
- 25 Jolibois B, Guerbet M (2006a). Hospital Wastewater Genotoxicity. *Ann Occup Hyg.* **50**(2): 189–196.
- 26 Jolibois B, Guerbet M (2006b). Simplified protocol for evaluating the genotoxic risk of hospital wastewater. *Environ Toxicol.* **21**(2): 141–6.
- 27 Kern DI, Schwaickhardt RO, Lutterbeck CA, Kist LT, Alcayaga EA, Machado EL (2015). Ecotoxicological and Genotoxic Assessment of Hospital Laundry Wastewaters. *Arch Environ Contam Toxicol.* **68**: 64–73.
- 28 Kozisek F, Pomykacova I, Jeligova H, Cadek V, Svobodova V (2013). Survey of human pharmaceuticals in drinking water in the Czech Republic. *J Water Health.* **11**(1): 84–97.
- 29 Kümmerer K (2009). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use-present knowledge and future challenges. *J Environ Manage.* **90**(8): 2354–2366.
- 30 Leme DM, Marin-Morales MA (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res.* **682**(1): 71–81.
- 31 Levin DE, Hollstein M, Christman MF, Schwiers EA, Ames BN (1982). A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A x T base pairs at the site of station detects oxidative mutagen. *Proc Natl Acad Sci USA.* **79**: 7445–7449.
- 32 Magdaleno A, Juarez AB, Dragani V, Saenz ME, Paz M, Moretton J (2014). Ecotoxicological and genotoxic evaluation of Buenos Aires city (Argentina) hospital wastewater. *J Toxicol.* **2014**: 1–10.
- 33 Maron DM, Ames BN (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* **113**: 173–215.
- 34 Morisawa T, Mizuno T, Ohe T, Watanabe T, Hirayama T, Nukaya H, et al. (2003). Levels and behavior of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens in the effluent of sewage treatment plant. *Mutat Res.* **534**(1–2): 123–132.
- 35 OECD (1983). Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- 36 OECD (1986). Test No. 480: Genetic Toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Gene Mutation Assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- 37 OECD (1997). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- 38 Ort C, Lawrence MG, Rieckermann J, Joss A (2010). Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: are your conclusions valid? A critical review. *Environ Sci Technol.* **44**(16): 6024–6035.
- 39 Ortolan MGS, Ayub MAZ (2007). Cytotoxicity and genotoxicity of untreated hospital effluents. *Braz arch biol technol.* **5**(4): 637–643.
- 40 Paz M, Muzio H, Mendelson A, Magdaleno A, Tornello C, Balbis N et al. (2006). Evaluation of Genotoxicity and Toxicity of Buenos Aires City Hospital Wastewater Samples. *J Braz Soc Ecotoxicol.* **1**(1): 1–6.
- 41 Santos LH, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MC (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater.* **175**(1–3): 45–95.
- 42 Santos LH, Gros M, Rodriguez-Mozaz S, Delerue-Matos C, Pena A, Barceló D et al. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci Total Environ.* **461–462**: 302–316.
- 43 Sharma P, Mathur N, Singh A (2012). Genotoxicity of Health Care Waste Waters: A Review. *Res J Chem Environ.* **16**(3): 116–124.
- 44 Sharma P, Kumar M, Mathur N, Singh A, Bhatnagar P, Sogani M (2013). Health care industries: potential generators of genotoxic waste. *Environ Sci Pollut Res.* **20**(8): 5160–5167.
- 45 Sharma P, Mathur N, Singh A, Sogani M, Bhatnagar P, Atri R (2015). Monitoring hospital wastewaters for their probable genotoxicity and mutagenicity. *Environ Monit Assess.* **187**(1): 1–9.
- 46 Shen L, Wu JY, Lin GF, Shen JH, Westendorf J, Huehnerfuss H (2003). The mutagenic potentials of tap water samples in Shanghai. *Chemosphere.* **52**: 1641–1646.
- 47 Steger-Hartmann T, Kümmerer K, Hartmann A (1997). Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. *Ecotoxicol Environ Saf.* **36**: 174–179.
- 48 Verlicchi P, Al Aukidy M, Galletti A, Petrovic M, Barcelo D (2012). Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci Total Environ.* **430**: 109–118.
- 49 WHO (1991). Environmental Health Criteria 125-Platinum. Geneva. World Health Organisation, International programme on Chemical Safety.
- 50 WHO (2013). In: Chartier Y, et al. editors. World Health Organisation. Safe Management of Wastes from Health-care Activities, 2<sup>nd</sup> ed.

## **Studie II**

### **Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays**

Neuroendocrinology Letters

2018: 39 (6), 441-453.

# Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays

Gabriela JÍROVÁ<sup>1,2</sup>, Alena VLKOVÁ<sup>1,3</sup>, Martina WITTLEROVÁ<sup>2</sup>, Markéta DVOŘÁKOVÁ<sup>3,5</sup>, Lucie KAŠPAROVÁ<sup>2</sup>, Jan CHRZ<sup>3,4</sup>, Kristina KEJLOVÁ<sup>3</sup>, Zdeňka WITTLINGEROVÁ<sup>1</sup>, Magdaléna ZIMOVÁ<sup>1,2</sup>, Barbora HOŠÍKOVÁ<sup>4</sup>, Jana JIRAVOVÁ<sup>4</sup>, Hana KOLÁŘOVÁ<sup>4</sup>

- 1 Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Praha - Suchdol, 165 00, Czech Republic
- 2 National Institute of Public Health, Centre of Health and Environment, Šrobárova 48, Praha 10, 100 42, Czech Republic
- 3 National Institute of Public Health, Centre of Toxicology and Health Safety, Šrobárova 48, Praha 10, 100 42, Czech Republic
- 4 Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Hněvotínská 3, Olomouc, 775 15, Czech Republic
- 5 Charles University in Prague, Third Faculty of Medicine, Ruská 87, Praha 10, 100 00, Czech Republic

*Correspondence to:* Gabriela Jírová, M.Sc.  
Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague,  
Kamýcká 129, Praha - Suchdol, 165 00, Czech Republic.  
TEL: + 420 267082564; E-MAIL: jirovag@fzp.czu.cz

*Submitted:* 2018-06-20 *Accepted:* 2018-09-17 *Published online:* 2018-11-28

*Key words:* **wastewater; health care facilities; wastewater toxicity; ecotoxicity; genotoxicity; reprotoxicity; bioassays**

Neuroendocrinol Lett 2018; **39**(6):441–453 PMID: 30796794 NEL390618A01 © 2018 Neuroendocrinology Letters • [www.nel.edu](http://www.nel.edu)

## Abstract

**OBJECTIVES:** The purpose of this study was to determine toxicity of wastewater from hospitals in the Czech Republic using traditional and alternative toxicological methods. The pilot study comprised weekly dynamics of sewage ecotoxicity of treated wastewater from one hospital in two different seasons. A detailed investigation of wastewater ecotoxicity, genotoxicity and reprotoxicity followed in five different hospitals.

**METHODS:** The seven following bioassays were used in this study: algal growth inhibition test (ISO 8692), *Vibrio fischeri* test (ISO 11348-2), *Daphnia magna* acute toxicity test (ISO 6341), *Allium cepa* assay, Ames test (OECD TG 471), Comet assay and YES/YAS assay.

**RESULTS:** The wastewater ecotoxicity during one week showed no differences in separate working days, however, higher toxicity values were recorded in May compared to November. In the following study, samples from two of the five hospitals were classified as toxic, the others as non toxic. Genotoxicity has not been confirmed in any sample. In several cases, wastewater samples exhibited agonist activity to the estrogen and androgen receptors.

**CONCLUSION:** The study demonstrated different levels of toxicity of treated hospital wastewater. Variable sensitivity of individual bioassays for tested wastewater samples was recognized. A more extensive study including proposal for improvement of hospital wastewater treatment within the Czech Republic can be recommended with the aim to decrease the discharge of toxic chemicals into the local sewage system and the environment.

#### Abbreviations:

WW	- wastewater
HWW	- hospital wastewater
UWW	- urban wastewater
WWTP	- wastewater treatment plant
PHs	- pharmaceuticals
EDs	- endocrine disruptors
EC <sub>50</sub>	- effective concentration of the tested substance that causes negative effect (inhibition, immobilization) in 50% of the organisms
EC <sub>20</sub>	- effective concentration of the tested substance that causes negative effect (inhibition, immobilization) in 20% of the organisms
TU	- toxic unit

## INTRODUCTION

Wastewater from health care facilities (HWW) differs from classical urban wastewater (UWW) mainly due to the content of wider spectrum and higher quantity of pharmaceuticals (PHs) and chemicals. The main substances that can be found in HWW are antibiotics, analgesics and anti-inflammatories, psychiatric drugs,  $\beta$ -blockers, anaesthetics, disinfectants, chemicals from laboratory activities, developer and fixer solutions from photographic film processing and X-ray contrast media (WHO 2013).

The occurrence of PHs in wastewater is limited by the amount of drugs and chemicals used (varying in different countries and evolving over time), entry into sewage, degradation in sewage treatment plants and occurrence in surface and groundwater (Váňa *et al.* 2010). If these substances are not sufficiently removed, the contamination of the aquatic environment will inevitably increase and affect all the relevant ecosystems. Hence, a better understanding of the effect of PHs in the environment is required.

In Europe, no specific directive or guideline for the management of hospital effluents has been adopted yet. Liquid waste must not be discharged into a foul sewer but treated as a waste and collected and disposed as such. For the effluents from the hospital foul sewer there is no specific regulation issued and so each member state of the European Union has its own distinct legislation (EU 2000).

The principles of drainage and subsequent purification of HWW in the Czech Republic are indicated in the standard ČSN 75 6406. The methods of WW and sludge treatment are further regulated with regard to the occurrence, character and amount of germs, radioactive substances and local conditions. Health care facilities are obliged to disinfect WW if the facilities are designed to isolate and treat transmissible diseases or to manipulate infectious material (ČSN 75 6406).

PHs and personal care products are considerably resistant to current procedures of WW treatment. It has been demonstrated that the majority of these substances and mixtures are not totally eliminated from the liquid phase during WW treatment, especially

substances with low lipophilicity (Suarez *et al.* 2009). If sewage treatment takes place only at the point of origin (in the hospital sewage treatment plant), the cleaning efficiency is around 90%. The maximum cleaning effect is achieved with the double cleaning of HWW, i.e. at the place of origin of the hospital treatment plant and subsequent purification by a municipal cleaning plant (Pauwels *et al.* 2006).

In most cases, HWW is diluted with municipal sewage, and this usually leads to a reduction in pharmaceutical compounds amount in the final WW (Verlicchi *et al.* 2012). However, distinct drugs, even in small concentrations, may be still toxic to the environment. In their review, Orias and Perrodin (2013) summarized data on observed concentrations of 297 pollutants measured in the HWW including pharmaceutical and non-pharmaceutical compounds (disinfectants, alcohols, detergents, heavy metals). Metals as elements associated with medical care are non-negligible components of sewage water with a great variability of possible concentrations. Therefore, in our study, selected metals were determined in order to extend the characteristics of the WW samples. Mercury is used in manometers for measuring and controlling pressure, in thermometers, in dental amalgam fillings, esophageal dilators and gastrointestinal tubes. Chemical compounds of mercury are used as antiseptics in pharmaceuticals, as reagents in laboratories, and as catalysts. Health care facilities are one of the main sources of mercury release into the environment (Rustagi & Singh 2010). They release 5% of the mercury to water bodies through untreated WW, and e.g. in the United Kingdom, more than 50% of total mercury emissions come from mercury contained in dental amalgam and laboratory and medical devices (WHO 2013). In spite of successfully reduced emissions into the aquatic environment in the past, mercury continues to be one of the heavy metals whose discharged volume is still high. Mercury ultimately accumulates at the bottom of water bodies, where it is transformed into its more toxic organic form, methyl mercury, which accumulates in fish tissue. Platinum-based cytotoxic drugs are among the most used for the treatment of testicular, prostate, colon and breast tumors. Most of the platinum series cytotoxic agents are excreted via the urine and thus enter the HWW (Kümmerer *et al.* 1999). Gadolinium complexes are used in magnetic resonance. The concentrations measured in hospital effluents are in the range of a few  $\mu\text{g/l}$  to 100  $\mu\text{g/l}$  (Kümmerer *et al.* 2000). For its antimicrobial properties, silver is a frequent ingredient of creams, wound dressings and antimicrobial coatings on medical devices. Silver is also used in bone prostheses, reconstructive orthopedic surgery and cardiac devices (Lansdown, 2006). Aluminum and alum are also used in medicine, they have contraction and anti-inflammatory effects (e.g. aluminum acetate for swelling). They are used in dentistry, PHs industry, and manufacture of surgical instruments (Goullé *et al.* 2012).



The purpose of this study was to determine toxicity of HWW in the Czech Republic using conventional and alternative toxicological methods. Our study represents the first study in the Czech Republic investigating HWW by means of a wide range of biological methods comprising not only tests of ecotoxicity, but also genotoxicity and reprotoxicity.

Standard ecotoxicity assays are a way to determine some PHs and personal care products effects, such as acute or chronic ecotoxicity, on organisms of different trophic levels. Different species of fish, crustaceans, algae are often used for this purpose; however, other microorganisms, such as bacteria, have also been used in these studies. Fish test has not been used in our study with respect to the EU directive (EU 2010) on the protection of animals used for experimental purposes requiring the reduction of animal tests and their replacement by alternative methods. In our study, the preferred ecotoxicity method was luminescence bacteria test. The luminescence inhibition bioassay with marine photobacteria *Vibrio fischeri* has been confirmed as a useful tool for estimation of acute toxicity of numerous chemicals (Rosal *et al.* 2010b; Białk-Bielińska *et al.* 2017; Väitalo *et al.* 2017). Green algae (e.g. *Desmodesmus subspicatus* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) comprise an essential component of aquatic ecosystems and they are often considered as a good indicator for anthropogenic pollution and water quality (Ma *et al.* 2006) with high sensitivity in toxicity testing (Magdaleno *et al.* 2014b; Russo *et al.* 2017; Vasconcelos *et al.* 2017). *Daphnia magna* is a fresh water cladoceran crustacean that is very sensitive to chemicals or pollutants (Flaherty & Dodson 2005; Boillot & Perrodin 2007) and it is widely used to evaluate the ecotoxicity of WW (Erbe *et al.* 2011; Kern *et al.* 2014). If it is exposed to stress factors, its life, morphology, behavior, and physiological properties may change (Jiang *et al.* 2018). Among several methods using higher plants, the *Allium cepa* test is frequently used in the biomonitoring of wide range of compounds (Herrero *et al.* 2012) or for testing toxicity of WW (Firbas & Amon 2013). The risks associated with the discharge of PHs and chemicals into the environment are based not only on their acute and chronic ecotoxicity, but also their genotoxicity and endocrine disruption (Rosal *et al.* 2010a).

Genotoxicity was studied by a combination of two tests: Ames test and Comet assay. The Ames test (OECD 1997) has been widely used to assess the genotoxic effect of various types of water, such as drinking water (Shen *et al.* 2003), water after sewage treatment (Morisawa *et al.* 2003), or water from municipal or hospital wastewater treatment plants (Jolibois & Guerbet 2006; Ferk *et al.* 2009; Sharma *et al.* 2015). *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98 strains are generally used in these assays. The Comet Assay, also known as single cell gel electrophoresis (SCRE), enables to determine whether there has been deoxyribonucleic acid (DNA) damage to a single cell from apoptosis (cell death) or cytotoxicity

(toxicity to cells) and the extent of this damage (Singh *et al.* 1988; Tice *et al.* 2000).

Endocrine disruption (ED) endpoints for testing of biotic systems are of great concern since EDs are recent common contaminants of aquatic ecosystems. Important sources of EDs are effluents from sewage treatment plants including those in health care facilities. Certain EDs, such as natural and synthetic hormones are not completely removed with the use of conventional wastewater treatment systems. With regard of these concerns, there is increasing pressure to develop advanced wastewater treatment methods and also an appropriate battery of tests that will include endocrine disruption endpoints (Hecker & Hollert 2011). Certain *in vitro* methods based on transfected cell lines have been already included in the OECD concept and *in vitro* methods based on yeast strains have been standardized in the ISO standard system, e.g. Draft ISO 19040 (OECD, 2012; ISO, 2017). Both biological systems are effective to be used for hazard identification within (eco)toxicological purposes. In our study, the yeast-based microplate assay YES/YAS was used for determination of estrogenic and androgenic potential of concentrated WW samples.

Due to relative simplicity, sensitivity, low cost of experimentation and small amount of sample required all implemented short-term bioassays have proved to be an important tool in genotoxic and reprotoxic studies.

## MATERIAL AND METHODS

### Wastewater samples

This study involved investigation of WW from five hospitals (H1–H5) located in the central region of the Czech Republic. Table 1 shows the characteristics of the selected hospitals. In order to monitor the weekly variation of HWW ecotoxicity, the samples from hospital H1 were collected in two different seasons. The first sampling series was done in November 2016 (Nov. 21–Nov. 25, 2016), the second sampling in May 2017 (May 22–May 26, 2017). Five composite samples were taken in separate working days during the week in both of the series. The sampling scheme was designed in accordance with literature data (Goullé *et al.* 2012) documenting decreasing amount of toxic substances in WW on Saturdays and Sundays because of the absence of typical medical activities.

The sampling of effluent from five different hospitals was performed in February 2018 (Feb. 13–Feb. 22, 2018) with the aim of detailed evaluation of ecotoxicity, genotoxicity and reprotoxicity. One composite sample was taken from each hospital.

Our composite samples were collected in the course of the maximal WW flow, i.e. from 9 a.m. to 1 p.m., taking a partial sample every hour. This scheme was in concordance with findings of Boillot *et al.* (2008) reporting in their study of daily ecotoxicological fluctuations of HWW that toxicity peak occurred from

**Tab. 1.** Characteristics of the selected hospitals.

	H1	H2	H3	H4	H5
Type of hospital	university	general	oncology	general	university
Total capacity (number of beds)	2189	996	245	476	1375
Wastewater generation (m <sup>3</sup> /day)	50–100*	51*	124	10*	250
Wastewater treatment process	mechanical - biological	mechanical - biological	mechanical - biological	mechanical - biological	mechanical - biological
Disinfection process	NaOCl	NaOCl	NaOCl	Cl <sub>2</sub>	Cl <sub>2</sub>
Wastewater discharges	urban sewer system	urban sewer system	water flow	urban sewer system	urban sewer system

\* WW only from one part of the hospital.

9 a.m. to 1 p.m. during the period of the maximum flow rate and the highest frequency of care activities. Our samples were taken after treatment activities in the discharge site either into the urban sewer system or into the water flow. The samples were transferred immediately to the laboratory in cooling boxes and stored at  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  prior to analysis. With the exception of Ames test and Comet assay, which methodically require sterile samples, the analyses were performed on non filtered samples. To ensure sterile samples, filtration was performed using DURAPORE membrane filter (MILLIPORE) – hydrophilic, porosity 0.22  $\mu\text{m}$ . WW samples tested for estrogenic and androgenic potential using the YES/YAS assay were 250 $\times$  concentrated in compliance with Draft ISO/DIS 19040-1:2017(E) standard (ISO 2017).

The values of physical and chemical parameters of the samples are displayed in Table 2 (a) samples from hospital H1 collected in November 2016 and May 2017, (b) samples from hospitals H1–H5 collected in February 2018. The physicochemical characteristics were determined according to standard methods: temperature (ČSN 75 7342), pH (ISO 10523), conductivity (ISO 7888), dissolved substances (ČSN 75 7346), free and total chlorine (ISO 7393-2). The measurements of the temperature and the free chlorine were performed in-the-field in order to monitor their values during sampling. The analysis of metals and iodine was performed as follows: Total mercury concentration was determined using an atomic absorption spectrophotometer AMA 254 Trace Mercury Analyzer (Altec). The samples were analysed without sample pre-treatment. Total gadolinium, platinum, lead, silver, aluminium and iodine concentrations were determined using an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS Elan DRC-e, Perkin Elmer). For determination of gadolinium, platinum, lead, silver and aluminium, the water samples were diluted 1 to 100 times using 1% (v/v) solution of nitric acid and germanium, indium and rhenium were used as internal standards. For iodine determination, the water samples

were diluted 10 to 100 times using 1% tetramethylammonium hydroxide (TMAH), 0,02% TRITON X-100 and tellurium was used as an internal standard. The reference material (drinking water) from the interlaboratory comparison and reference material Seronorm™ Trace Elements Urine L-2 was used for the laboratory quality control.

#### Toxicological bioassays

This study represents the first study exploring HWW in the Czech Republic by means of a wide range of biological methods. Seven different traditional and alternative toxicological bioassays were employed. Their characteristics are listed in Table 3.

#### Algal growth inhibition test

The test was carried out using freshwater algae *Desmodesmus subspicatus* (BRINKMANN 1953/SAG 86.81) obtained from the Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA).  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  was used as positive control for monitoring the sensitivity of algae culture. Five test sample dilutions in triplicates were prepared in every test run. The test flasks were inoculated by algal cells to obtain  $10^4$  cells.ml<sup>-1</sup> and incubated under  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  with constant illumination intensity of 6000–10000 lx and color temperature 4300 K. After 72 h exposure, direct cell count measurement was performed using microscope OLYMPUS CH30. The probit method was used for the calculation of EC<sub>50</sub>. Inhibition of specific growth rate was calculated in relation to negative control samples (test growth medium) growing under the same standard conditions.

#### Luminescent bacteria test

Liquid-dried luminescent marine bacteria *Vibrio fischeri* NRRL- B-11177 (HACH LANGE) were used. Bacteria sensitivity was monitored using positive controls ( $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). Bacteria were reconstituted by adding reactivation solution. Samples salinity was corrected by NaCl. The suspensions of diluted WW samples and bacteria were maintained at  $15\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**Tab. 2.** Physicochemical characteristics of the samples.  
a) samples from hospital H1 collected in November 2016 and May 2017.

Parameter	Temperature*		pH		Conductivity		Free chlorine*	
	°C				µS.cm <sup>-1</sup>		mg.l <sup>-1</sup>	
	X/2016	V/2017	X/2016	V/2017	X/2016	V/2017	X/2016	V/2017
Monday	10.0	13.5	8.05	8.01	2010	1125	0.04	0.25
Thursday	10.4	13.5	8.01	8.03	2130	1186	0.05	0.32
Wednesday	11.0	13.0	8.12	8.07	2150	1205	0.07	0.15
Thursday	10.6	13.4	8.02	8.07	2090	1206	0.07	0.17
Friday	11.0	13.0	8.03	8.09	2160	1232	0.05	0.20

\* in-the-field measurements-average values of five partial samples.

b) samples from hospitals H1-H5 collected in February 2018.

Parameter	Unit	H1	H2	H3	H4	H5
Temperature *	°C	6.5	6.5	13.0	4.0	6.0
pH		7.91	7.51	7.88	7.65	7.81
Conductivity	µS.cm <sup>-1</sup>	1163	869	979	811	23800
Dissolved substances	mg.l <sup>-1</sup>	580	532	707	465	1970
Free chlorine *	mg.l <sup>-1</sup>	0.04	0.08	0.20	0.08	0.14
Total chlorine	mg.l <sup>-1</sup>	0.06	0.53	0.42	>6.00	2.09
I	µg.l <sup>-1</sup>	130	1577	86	1390	183
Hg	µg.l <sup>-1</sup>	1.48	0.50	<0.30	0.52	0.47
Ag	µg.l <sup>-1</sup>	0.58	0.09	0.04	0.15	0.92
Gd	µg.l <sup>-1</sup>	1.55	2.75	0.15	5.01	1.51
Pt	µg.l <sup>-1</sup>	0.17	0.05	0.45	0.11	0.13
Pb	µg.l <sup>-1</sup>	0.35	0.58	0.19	0.70	0.42
Al	mg.l <sup>-1</sup>	3.71	1.82	1.33	2.00	2.37

\* in-the-field measurements-average values of five partial samples.

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

Method	Organism	Standard	Sample preparation	Biological parameter and exposure time	Endpoint
Algal growth inhibition test	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	ISO 8692	non filtered	growth inhibition 72 h	EC <sub>50</sub> [%] / TU
Luminescent bacteria test	<i>Vibrio fischeri</i>	ISO 11348-2	non filtered	bioluminescence inhibition 15 min, 30 min	EC <sub>50</sub> [%] / TU
Crustacean immobilization test	<i>Daphnia magna</i>	ISO 6341	non filtered	mobility inhibition 24 h, 48 h	EC <sub>50</sub> [%] / TU
<i>Allium cepa</i> assay	<i>Allium cepa</i>	----	non filtered	inhibition of bulb 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	NIH 3T3 mouse fibroblasts	----	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



Solution of 2% NaCl was used as negative control. Bioluminescence was recorded after 15 min and 30 min of exposure to eight increasing sample concentrations. Every concentration was measured in two replicates using luminometer Sirius (Berthold Detection Systems) and thermostat LUMISTherm (HACH LANGE). EC<sub>50</sub> which causes 50% inhibition of the bacteria light emission with respect to the negative control was calculated for each sample.

#### Crustacean immobilization test

The test was performed using less than 24 h old specimens of *Daphnia magna* Straus. Neonates of at least third generation originated from the laboratory culture. The sensitivity of crustaceans was controlled by regular tests with K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and test medium was used as a negative control in all runs. Six sample concentrations were used per test. Five organisms in four replicates (for a total of twenty organisms) were exposed to each concentration for 48 h with 16:8 light:dark cycle without feeding. Temperature during the test was maintained at 20±2 °C. For the test validity, the oxygen concentration had to be ≥2 mg.l<sup>-1</sup>. The percentage of immobilization in the control group had to be ≤10%. *Daphnia* immobility was the test endpoint and the EC<sub>50</sub> after 24 h and 48 h exposure was determined.

#### Allium cepa assay

The experiment was performed using small onion (*Allium cepa* L.) bulbs of the size 16–18 mm, free from any chemical treatment. The sensitivity of the test onion bulbs was controlled by 1% MMS (methylmethanesulfonate) as positive control. The bulbs were exposed for 72 h to undiluted samples and negative control (tap water) in six replicates. The test temperature was maintained at 22±2 °C with protection against direct sunlight. At the end of the experiment the root length was measured with a precision of 1 mm and inhibition of root elongation relative to negative control was calculated.

#### Data evaluation of ecotoxicity tests

The EC<sub>50</sub> values calculated for each species were transformed to toxic units (TU) using the formula:

$$TU = (1/EC_{50}[\%]) \times 100$$

**Tab. 4.** Toxicity classification system by Persoone et al. 2003.

Toxic unit	Toxicity class	Toxicity
TU < 0.4	I	non toxic
0.4 ≤ TU < 1.0	II	low toxic
1.0 ≤ TU < 10.0	III	toxic
10.0 ≤ TU < 100.0	IV	very toxic
TU > 100	V	extremely toxic

High TU value indicated high toxic effect on the organism.

Many authors applied TU to evaluate ecotoxicity of industrial, urban and hospital WW (e.g. Manusadžianas et al. 2002; Zgórska et al. 2011; Vasquez & Fatta-Kassinos 2013; Maselli et al. 2015; Hamjinda et al. 2015; Laquaz et al. 2017). Our samples were ranked by toxicity classification system (Table 4) based on the calculation of TU as suggested by Persoone et al. (2003). The samples were classified into five classes on the basis of the highest TU value shown by one of the organisms applied.

#### Statistical analysis of ecotoxicity tests

To evaluate the results of the pilot study of the weekly and seasonal variability of ecotoxicity, three-way analysis of variance (ANOVA) was used to assess the difference between factors (method, day and month). When statistically significant effects were identified, comparisons of means were further examined by Bonferroni correction to ascertain which specific means differed. Two-way ANOVA was used to assess the differences between individual levels of day and month factors for all ecotoxicity methods. Values of *p*<0.05 were taken as statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS software package for Windows (version 23).

#### Bacterial Reverse Mutation Test (Ames test)

Two tester strains to detect point mutations, which involve base pair substitution (TA100) and frameshift mutations (TA98), were used in the study. A cofactor-supplemented post-mitochondrial fraction (S9) prepared from the liver of rodents (Wistar rat) treated with enzyme-inducing agent (polychlorinated biphenyl Delor) was used for modeling of mammalian metabolic activation.

In each run, relevant positive and negative controls were included, both with and without metabolic activation. The samples and controls were tested in triplicates. Briefly, the mixture of 2 ml TOP agar with His/Bio solution, 100 µl of bacterial culture, 100 µl of the test sample, 500 µl S9 mix (S9+) or 500 µl PBS (S9-) was added to sterile test tubes maintained in a dry box (cca 37 °C). The contents of each tube was mixed and poured over the surface of minimal agar plates. The overlay agar was allowed to solidify and then the plates were placed upside down into the incubator (37 °C) for 72 hours of incubation. The number of revertant colonies was counted by automatic computer of bacterial colonies Schuett colony Quant HD (Schuett Biotec) for the tested samples and compared to the number of spontaneous revertant colonies on negative control plates. The dose dependence of the mutagenic effect was expressed as Mutagenic Index = MI. Generally, the sample eliciting at least twofold increase of revertants compared to the control revertants is considered to be mutagenic.

### Comet assay

DNA damage was tested using NIH 3T3 cells (mouse embryonic fibroblasts) according to the protocol described in previous studies (Tomankova *et al.* 2011; Manisova *et al.* 2015). Briefly, the cells were incubated in DMEM with the tested water samples in ratio 1:1 for a period of 24 hours. Then the cells were trypsinized, centrifuged and the cell pellet was dispersed in PBS and vortexed. 1% low melting point agarose was added to this solution and this suspension was placed on the solidified agarose on the pre-coated microscope slides and covered by coverslips. After the agarose had solidified, the coverslips were immersed in lysis buffer at 4°C for a period of 60 min. After lysis the slides were placed in an electrophoretic tank and dipped for 40 min in a cool electrophoretic solution. The electrophoresis was run at 350 mA and 0.8 V cm<sup>-1</sup> for 20 min. Following completion of the electrophoretic separation the slides were carefully rinsed twice for 10 min with a neutralisation buffer at 4°C, stained by means of SYBR Green and manually scored using fluorescence microscope with CCD camera CometScore 1.5 software. 80 cells from each sample were randomly chosen and median values of the amount of the Olive moment, DNA in tail, and DNA in the head, which is directly proportional to the intact DNA, were evaluated as follows:

**Olive Moment** = (tail mean – head mean) × % of DNA in the tail

**Head % DNA** = 100 × (I<sub>h</sub> / I<sub>c</sub>)

I<sub>h</sub> = total intensity of the head

I<sub>c</sub> = total intensity of the comet (head and tail together)

**Tail % DNA** = 100 – Head % DNA.

### Statistical analysis of Comet assay

Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction was performed for the statistical analysis of the % DNA in head.

### YES/YAS microplate assay

Microplate assay (XenoScreen YES/YAS, Xenometrix®, Switzerland), based on genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains, expressing human estrogen and androgen receptors, was performed according to the provided standard operating procedure, using the supplied standardized material and chemicals in order to study agonistic activity of WW samples to human estrogen and androgen receptors. WW samples were 250x concentrated in compliance with Draft ISO/DIS 19040-1:2017(E) standard, dissolved in DMSO and applied to the yeast culture for 48 h. The optical density of the red product resulting from conversion of the yellow substrate after secretion of β-galactosidase, indicating the endocrine activity of the tested substance, was measured on Biotec Eon™ High Performance Microplate Spectrophotometer.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Weekly dynamics and seasonal variability of wastewater ecotoxicity

In the pilot study, focused on investigation of the weekly variation of sewage ecotoxicity, the samples of treated WW from one large hospital (H1) have been analysed. In addition to comparison of individual working days, two different seasons (spring vs. autumn) were compared. In their review Orias and Perrodin (2013) recommended to assess the HWW ecotoxicity during a day, a week and a year in order to gain more wealth of information.

For the purpose of our work three different species have been used: *D.subspicatus*, *V.fischeri* and *A.cepa*. The results are shown in Figure 1. No statistically significant differences were found in separate working days (from Monday to Friday) for *D.subspicatus* ( $p=0.601$ ), TU values lay in the range of 2.46–3.58 in November and 4.14–5.40 in May. For *V.fischeri* (15 min and 30 min) TU values showed considerable fluctuation on Mondays that was probably related to weekend hospital activities. Therefore, subsequently only values from Tuesday through Friday were compared. The results showed no significant differences for *V.fischeri* 15 min ( $p=0.337$ ) with TU values between 3.15–3.76 in November and 3.47–4.86 in May and for *V.fischeri* 30 min ( $p=0.359$ ) with TU values between 2.27–2.94 in November and 4.16–4.73 in May. These findings differed from results of Magdaleno *et al.* (2014a), who discovered big differences of raw HWW samples (from stimulating effect to growth inhibition 44.5%) during a week using the green algae *P.subcapitata*.

Regarding seasonal variation, in our study higher toxicity values were recorded in May compared to November (from Tuesday to Friday). The statistical analysis of results obtained in these two months confirmed significant difference for *D.subspicatus* ( $p=0.039$ ) and *V.fischeri* 30 min ( $p=0.002$ ) while no significant difference was found for *V.fischeri* 15 min ( $p=0.085$ ). Seasonal differences could be caused by a wide range of specific hospital therapeutic activities and their variability over time. Similar results were seen in other studies, e.g. Coutu *et al.* (2013) discovered high seasonal fluctuation in ambulatory and hospital consumption of antibiotics. Laquaz *et al.* (2017) investigated HWW and UWW and they found high variability of ecotoxicity for *P.subcapitata* during the year. They supposed that seasonal differences were due to e.g. seasonal pathologies or disinfection campaigns which may have led to the release of high quantities of toxic compounds. Magdaleno *et al.* (2014a) found that growth inhibition of *P.subcapitata* varied widely during the period from April to September. These results were also confirmed by Vasquez and Fatta-Kassinou (2013) in their study in which higher toxicity of treated UWW for *P.subcapitata*, *D.magna* and *V.fischeri* was observed in spring and summer in comparison with autumn and

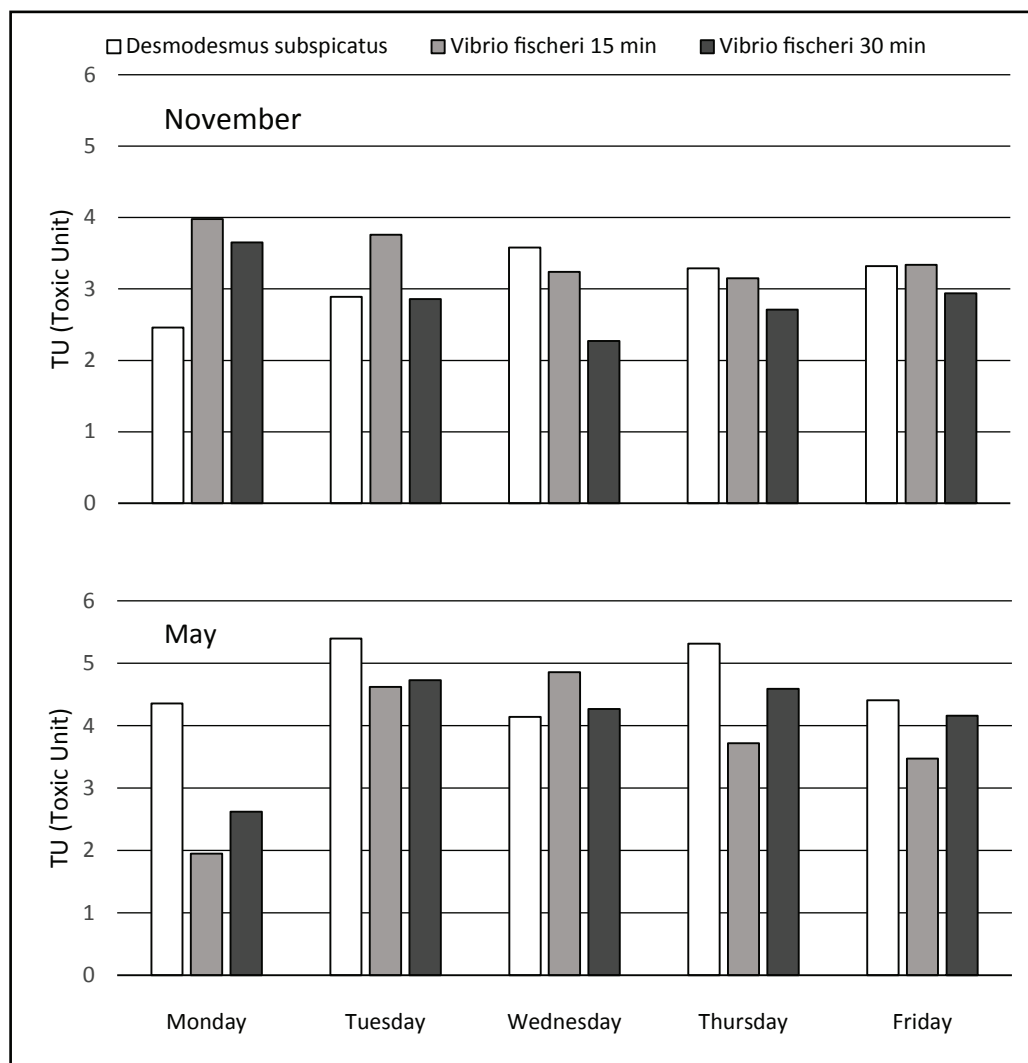


Fig. 1. Weekly dynamics of wastewater ecotoxicity from hospital H1 – comparison between November and May.

winter, potentially due to decreased dilution during the summer dry period or different composition of the WW.

In our study, *A. cepa* was less sensitive to all tested samples compared to *D. subspicatus* and *V. fischeri*. Although the data showed toxic responses of *A. cepa* with values of inhibition of bulbs roots elongation from 7.2% to 29.7% after exposure to undiluted samples, they did not achieve 50% inhibition and thus it was not possible to calculate  $EC_{50}$ . Therefore, TU was described as 0. Similar results related to sensitivity of this organism were seen in the study by Firbas and Amon (2013) who reported, that treated UWW induced equal root lengths of *A. cepa* bulbs as the negative control.

#### Comparison of wastewater toxicity from different hospitals

WW samples from five hospitals with different dimensions were studied. In order to provide true information of their quality and evaluate their individual impact on

the receiving UWW or directly on the water flow, a detailed investigation of ecotoxicity, genotoxicity and reprotoxicity was performed using seven conventional and alternative methods.

Ecotoxicity was determined by the use of a bioassay battery consisting of four test organisms: *D. subspicatus*, *V. fischeri*, *D. magna* and *A. cepa*. Table 5 presents the summary results for all the tested species. In order to describe and compare their ecotoxicological potential, hospitals have been classified by the toxicity classification system described in Table 4. The obtained data demonstrated different levels of ecotoxicity of samples from individual hospitals. The TU values indicated that two hospitals belong to toxicity class III as toxic and three hospitals belong to toxicity class I as non toxic.

In the study published by Hamjinda *et al.* (2015), which examined treated HWW, TU values calculated for freshwater algae *Scenedesmus quadricauda* lay in the range of 1.15–2.18 and for *Chlorella vulgaris* in the range of 1.94–2.42. Zgórska *et al.* (2011) investigated

HWW before treatment. Based on the test results estimated for *P.subcapitata* (TU = 5.32), *D.magna* (TU = 4.81), *V.fischeri* (TU = 2.16) and crustaceans *Thamnocephalus platyurus* (TU = 4.42) and *Artemia salina* (TU = 1.67), they classified their samples in toxicity class III as toxic. Numerous studies indicated that HWW are characterized by higher ecotoxicological potential than UWW. This assertion was confirmed by Laquaz *et al.* (2017). For *D.magna* 24 h the TU of UWW samples reached a maximum of 1.9. For *P.subcapitata* the TU values of raw HWW samples calculated using EC<sub>20</sub> were 1.6–6.8 and TU values of UWW were up to 3.3. 21 industrial and urban WW samples before and after treatment were analysed by Manusadžianas *et al.* (2002) using six test species. Two samples were characterized as non toxic (class I), six as slightly toxic (class II), nine as toxic (class III), four as very toxic (class IV) and none of them as extremely toxic (class V).

When we drew a comparison between our tested organisms, we could observe numerous differences. As can be seen in Table 5, the rank of species' reactions levels was for samples of hospital H1: *D.subspicatus* > *V.fischeri* > *D.magna* > *A.cepa* and of hospital H4: *D.magna* > *D.subspicatus* > *V.fischeri* > *A.cepa*. In summary, the samples of H1 and H4 were highly toxic to *D.subspicatus*, *V.fischeri* and *D.magna*, whereas *A.cepa* was affected much less with the values of inhibition of root elongation 26.3% (H1) and 19.8% (H4).

The samples of H2, H3 and H5 had low toxic effect on *D.subspicatus*, *V.fischeri* and *A.cepa*. Immobilization of *D.magna* was not observed at all. Inhibition values of these undiluted samples did not exceed 50%, therefore

it was impossible to calculate EC<sub>50</sub> and TU was represented as 0. The *D.subspicatus* and *A.cepa* tests showed both inhibition and stimulation of growth with the values from –12.7% to 2.7% (*D.subspicatus*) and from –9.4% to 27.9% (*A.cepa*). For *V.fischeri* EC<sub>20</sub> was calculated and the values lay between 30.3%–92.0% (15 min) and 25.1%–82.1% (30 min).

Although we have found certain differences among species in sensitivity to the HWW samples, TU values of *D.subspicatus*, *V.fischeri* and *D.magna* were at the same level of classification (the same toxicity class) in all cases of samples from the selected hospitals. It implies that these three species are equally suitable for the estimation of HWW ecotoxicological potential and this bioassays battery could be used for routine HWW testing. These conclusions are in agreement with Zgórska *et al.* (2011). On the other hand, according to our findings it can be assumed that *A.cepa* test that is based only on measuring of onion bulbs roots is not sufficiently sensitive for ecotoxicity assessment of HWW but it could be suitable for detection of genotoxicity as was demonstrated in numerous studies (*e.g.* Herrero *et al.* 2012; Kerm *et al.* 2014; Magdaleno *et al.* 2014a). The test *Allium cepa* is validated by the International Program on Chemical Safety (IPCS) as an efficient test for analysis and in situ monitoring of the genotoxicity of environmental substances (Bagatini *et al.* 2009). We may consider such analysis in next studies, however, in the present study the Ames test and Comet assay for genotoxicity were employed.

The outcome of genotoxicity and reprotoxicity assays is summarized in Table 6. Genotoxicity of the

**Tab. 5.** Toxicity classification based on ecotoxicity tests results.

Organism	H1			H2			H3			H4			H5		
	EC <sub>50</sub> [%]	TU	toxicity class	EC <sub>50</sub> [%]	TU	toxicity class	EC <sub>50</sub> [%]	TU	toxicity class	EC <sub>50</sub> [%]	TU	toxicity class	EC <sub>50</sub> [%]	TU	toxicity class
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	25.3	3.95	III toxic	ND	0	I non toxic	ND	0	I non toxic	35.3	2.83	III toxic	ND	0	I non toxic
<i>Vibrio fischeri</i> 15 min	42.6	2.35	III toxic	ND	0	I non toxic	ND	0	I non toxic	43.1	2.32	III toxic	ND	0	I non toxic
<i>Vibrio fischeri</i> 30 min	28.9	3.46	III toxic	ND	0	I non toxic	ND	0	I non toxic	41.3	2.42	III toxic	ND	0	I non toxic
<i>Daphnia magna</i> 24 h	67.6	1.48	III toxic	ND	0	I non toxic	ND	0	I non toxic	39.3	2.54	III toxic	ND	0	I non toxic
<i>Daphnia magna</i> 48 h	61.3	1.63	III toxic	ND	0	I non toxic	ND	0	I non toxic	24.3	4.12	III toxic	ND	0	I non toxic
<i>Allium cepa</i>	ND	0	I non toxic	ND	0	I non toxic	ND	0	I non toxic	ND	0	I non toxic	ND	0	I non toxic

ND (not detected): < 50% inhibition in the undiluted sample, TU (toxic unit)=[1/EC<sub>50</sub> in %]×100



**Tab. 6.** Genotoxicity and reprotoxicity tests results.

Method	H1	H2	H3	H4	H5
Ames test	negative	negative	negative	negative	negative
Comet assay	negative	negative	negative	negative	negative
YES	positive	positive	negative	positive	negative
YAS	positive	negative	negative	positive	negative

tested WW samples has not been confirmed by the plate Ames test, where filtered samples were tested on two strains with and without S9 activation. The number of revertants elicited by the test samples never achieved a twofold increase in numbers compared to the negative controls. Results of the Comet assay showed no significant differences in the amount of fragmented DNA in samples H1 and H4 compared to control cells. Significant differences were observed in samples H2, H3 and H5, however, the average difference higher than 5% in the amount of fragmented DNA was not observed in either of these samples, suggesting minimal genotoxic effect. Eukaryotic cells have a DNA repair mechanism that makes it possible to repair damaged DNA (Chu 2014). Based on the results of the viability tests, it can be assumed that the detected amount of the fragmented DNA did not affect the viability of NIH 3T3 cells.

A literary review showed, that most of the untreated HWW samples had a mutagenic effect (Vlková *et al.* 2016). In contrast, the genotoxicity of treated WW samples was found significantly reduced (Sharma *et al.* 2015, Gupta *et al.* 2009). With regard to the method principles, the Ames test and Comet assay require pre-treatment of the samples and/or sterilization. The simplest and most commonly used preparation technique is filtration through a filter (e.g. cellulose nitrate, acetate cellulose filter) with a pore size of 0.45 µm (Jolibois & Guerbet 2006; Hartmann *et al.* 1999) or 0.22 µm (Paz *et al.*, 2006, Magdaleno *et al.*, 2014a). However, White *et al.* (1996) reported that during filtration some chemical substances may be captured on the filters, thus causing a loss of genotoxicity potential, and the study of Ferk *et al.* (2009) confirmed the significant effect of membrane filtration on the overall genotoxic effect, the decrease was in the range of 62 % – 77 %. In the YES/YAS assay, WW samples (250x concentrated stock samples), in 4 final concentrations (1% – 0.325% – 0.1% – 0.0325%) exhibited agonistic activity to human estrogen receptor, showing a concentration-dependent curve in two highest non-cytotoxic concentrations (1%, 0.325%), in case of samples H1, H2, and H4. Agonistic activity to human androgen receptor was confirmed in one non-cytotoxic concentration (1%), in case of samples H1 and H4. The advantage of methods based on yeasts is the absence of complex mechanisms regulating the expression of the reporter gene. Yeast based methods are not influenced by cross-

cellular signaling interferences, and thus detect only a specific interaction with the receptor and are effective for screening and hazard identification.

Toxicity differences of WW from different hospitals may be caused by a number of factors. As complex mixtures of many substances, HWW are generated intermittently by different hospital services (e.g. medical care, diagnostics, disinfection, cleaning, laboratory and research activities). Therefore, HWW quality is influenced by the type and specialization of the hospital (e.g. general, oncologic, pediatric), number of inpatients, type and number of wards, season or day of the week, hospital location and also country. Orias & Perrodin (2014) recommended to continue determining the cumulative ecotoxic effects of the HWW compounds corresponding to different hospitals, size of the hospital and different locations. Hamjinda *et al.* (2015) showed a good correlation between antibiotic concentrations in HWW and amount of usage. According to Santos *et al.* (2013), the impact of hospitals to the input of PHs in UWW was in concordance with their dimensions. The contribution of great hospitals was considerably higher in comparison with smaller facilities. The variability of pharmaceutical concentrations between the WW from four hospitals were related to pharmaceutical consumption, which was connected with the number of beds, number and type of wards and units. These conclusions are in agreement with other similar studies (e.g. Al Aukidy *et al.* 2014; Verlicchi *et al.* 2012).

The quality of treatment processes is one of the crucial points which affect HWW composition before discharge into the sewage system or water flow. Although HWW is often treated before discharge into the sewage system or directly into the water flow, numerous studies confirmed a lot of residues of pharmaceutical products in HWW after treatment processes either because of deficiencies of the treatment or resistance of certain substances to the applied process. Hamjinda *et al.* (2015) investigated HWW characteristics focusing on antibiotic contamination in three hospitals, revealing the removal efficiency of different treatment processes from 0% to 99% depending on the type of drug. Similar results were reported by Santos *et al.* (2013), who discovered that removal efficiency of WWTP may vary from over 90% for PHs as acetaminophen and ibuprofen to absolutely no removal for β-blockers and salbutamol. Ketamine and its metabolites with a high ecotoxic potential to aquatic organisms cannot be removed or degraded by conventional WWTPs (Li *et al.* 2017). Wiest *et al.* (2017) found 11 of 13 monitored PHs in HWW and UWW after treatment with median concentrations from 19 ng/l to 810 ng/l and confirmed that antibiotic concentrations remained higher in HWW than in UWW. Chonova *et al.* (2015) evaluated efficiency of biological treatment with conventional activated sludge and discovered relatively high concentrations of antibiotics and analgesics in HWW after treatment, despite good removal during treatment

(antibiotics 95.1%, analgesics 99.9%), because of their high initial concentrations. The membrane bioreactor had emerged as an efficient compact technology for WW treatment. The results of the study of Albasi *et al.* (2009) proved that WW treatment using membrane reactors provides a suitable process for lowering anticancer drug cyclophosphamide concentrations before discharge into the aqueous environment. Despite this clear benefit of membrane bioreactors, removal is only partially achieved and a tertiary treatment is necessary for the complete elimination of cytostatic agents compounds. Other studies (Chiarello *et al.* 2016) showed that the membrane bioreactor also was effective in the removal of enalapril, tetracycline and paracetamol up to 94 %. The elimination efficiency of carbamazepine is very low due to the specific characteristics of the molecule such as resistance to degradation and low capacity to attach to the sludge (Ternes *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2008).

Another important aspect that may affect living organisms is disinfection as the final stage of the treatment process performed with the aim to prevent the spread of pathogenic microorganisms. The most widely used methods of HWW treatment are disinfection with chlorine, sodium hypochlorite, chlorine dioxide, ultraviolet radiation or ozonization (Drinan & Spellman 2012; Chen *et al.* 2014). During the disinfection process, undesirable by-products such as trihalomethanes are formed by reaction of disinfectants with natural organic matters (Richardson *et al.* 2007). Sodium hypochlorite (used in H1, H2 and H3 hospitals in our study) contains about 5–20% of free chlorine. Its toxicity is lower than pure chlorine, but it can not be neglected, especially because of the amount of trihalomethanes produced. The advantages of sodium hypochlorite furthermore include greater stability, trivial handling and lower operating costs. However, it is necessary to mention its negatives, which include higher energy consumption, strong corrosivity and overall lower disinfection efficiency (Chen *et al.* 2014). Gaseous chlorine (used in hospitals H4 and H5) is a very powerful oxidizing agent and has been commonly used to disinfect HWW. The free chlorine content in Cl<sub>2</sub> is close to 100% (it also contains impurities), so its sterilization capability is high (Chen *et al.* 2014). According to the findings of Emmanuel *et al.* (2004) or Park *et al.* (2016) organohalogen compounds are ecotoxic and genotoxic for aquatic organisms and are considered as persistent environmental contaminants.

## CONCLUSIONS

HWW is a complex mixture of many diverse compounds that have proved toxic effects on living organisms. The main problem is the insufficient knowledge of the quality of treated hospital effluent discharged to the sewage system or surface water. In our study we

wanted to highlight the necessity of solving this question within the Czech Republic. For our investigation we selected seven biological methods, conventional and alternative, with the intention to compare their sensitivity and suitability for toxicological examination of HWW.

The WW ecotoxicity during one week showed no differences in separate working days, however, higher toxicity values were recorded in May compared to November. Our work demonstrated considerably different levels of toxicity of treated WW between different hospitals. The samples from two of the five hospitals have been assessed as toxic, the others as non toxic based on the evaluation by the toxicity classification system. We found that the battery of three organisms consisting of *D.subspicatus*, *D.magna* and *V.fischeri* may be appropriate for routine testing of ecotoxicological potential of HWW.

Variable sensitivity of individual bioassays for tested WW samples was determined. According to our results, *A. cepa* test based on testing the onion bulb root elongation is not sufficiently sensitive and effective for detection of HWW ecotoxicity as it has not identified any differences between the samples and classified all of them as nontoxic.

Genotoxicity has not been confirmed neither by Ames test, nor Comet assay in any sample. It can be assumed that the results of Ames test and Comet assay may be influenced by sample sterilization (by filtration) which might have caused a loss of genotoxic and reprotoxic activity as certain chemicals may be captured on the filters. The study will continue with optimization of sample preparation.

Estrogenic and androgenic potential of certain WW samples has been detected. WW is a heterogenous mixture of natural and synthetic residues and unknown hormonally active micropollutants, certain of which may be persistent or bioaccumulative. *In vitro* methods are thus effective for screening of WW treatment effectivity and for detection of potential hazard of bioaccumulative effects of endocrine disruptors from chronic exposure to low doses of these micropollutants from the aquatic environment.

Our study signalized insufficiency in the hospital sewage treatment processes. A more extensive study including proposal for improvement of HWW treatment within the Czech Republic may be recommended with the aim to decrease the discharge of toxic chemicals into the sewage system and thus to contribute to the improvement of the environment.

## ACKNOWLEDGMENTS

Supported by ERDF/ESF project „International competitiveness of NIPH in research, development and education in alternative toxicological methods“ (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000860).

## REFERENCES

- Al Aukidy M, Verlicchi P, Voulvoulis N (2014). A framework for the assessment of the environmental risk posed by pharmaceuticals originating from hospital effluents. *Sci Total Environ.* **493**: 54–64.
- Albasi C, Delgado C, Dorandeu L.F, Faucet-Marquis C, Marion V, Lleszkowicz B, et al. (2009). Cytotoxicity and cytostatic drug removal in a membrane bioreactor from wastewater. In: 2nd International Congress on Green Process Engineering, 2nd European Process Intensification Conference, 14–17 June 2009, Venice, Italy.
- Bagatini MD, Vasconcelos TG, Laughinghouse HD 4th, Martins AF, Tedesco SB (2009). Biomonitoring hospital effluents by the *Allium cepa* L. test. *B Environ Contam Tox.* **82**(5): 590–2.
- Białk-Bielińska A, Mulkiewicz E, Stokowski M, Stolte S, Stepnowski P (2017). Acute aquatic toxicity assessment of six anti-cancer drugs and one metabolite using biotest battery – Biological effects and stability under test conditions. *Chemosphere.* **189**: 689–698.
- Boillot C, Bazin, C, Tissot-Guerraz F, Droguet J, Perraud M, Cetre J.C et al. (2008). Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *Sci Total Environ.* **403**(1–3): 113–29.
- Boillot C, Perrodin Y (2007). Joint-action ecotoxicity of binary mixtures of glutaraldehyde and surfactants used in hospitals: use of the Toxicity Index model and isoblogram representation. *Ecotox Environ Safe.* **71**: 252–259.
- Coutu S, Rossi L, Barry DA, Rudaz S, Vernez N (2013). Temporal variability of antibiotics fluxes in wastewater and contribution from hospitals. *PLoS One.* **8**: e53592.
- ČSN 75 6406 (1996). Wastewater discharge and treatment from health facilities.
- ČSN 75 7346 (2002). Water quality-Determination of dissolved substances.
- ČSN 75 7342 (2013). Water quality-Determination of temperature.
- Drinan JE, Spellman F (2012). *Water and wastewater treatment: A guide for the nonengineering professional.* 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.
- Emmanuel E, Keck G, Blanchard JM, Vermande P, Perrodin Y (2004). Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environ Int.* **30**(7): 891–900.
- Erbe MC, Ramsdorf WA, Vicari T, Cestari MM (2011). Toxicity evaluation of water samples collected near a hospital waste landfill through bioassays of genotoxicity piscine micronucleus test and comet assay in fish *Astyanax* and ecotoxicity *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology.* **20**(2): 320–8.
- EU (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *European Union. OJ, L327*, 22 December 2000, 1–72.
- EU (2010). European Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *OJ, L 276*, 20 October 2010, 33–79.
- Ferk F, Misik M, Grummt T, Majer B, Fuerhacker M, Buchmann C, et al. (2009). Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward. *Mutat Res.* **672**(2): 69–75.
- Firbas P, Amon T (2013). *Allium Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia.* *J Bioremed Biodeg.* **4**: 189.
- Flaherty CM, Dodson SI (2005). Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere.* **61**: 200–207.
- Goullé J.-P, Sausseureau E, Mahieu L, Cellier D, Spiroux J, Guerbet M (2012). Importance of Anthropogenic Metals in Hospital and Urban Wastewater: Its Significance for the Environment. *B Environ Contam Tox.* **89**(6): 1220–4.
- Gupta P, Mathur N, Bhatnagar P, Nagar P, Srivastava S (2009). Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters. *Ecotox Environ Safe.* **72**(7): 1925–1932.
- Hamjinda NS, Chiemchaisri W, Watanabe T, Honda R, Chiemchaisri Ch (2015). Toxicological assessment of hospital wastewater in different treatment processes. *Environ Sci Pollut Res Int.* **25**(8): 7271–7279.
- Hartmann A, Golet EM, Gartiser S, Alder AC, Koller T, Widmer RM (1999). Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewater. *Arch Environ Contam Toxicol.* **36**(2): 115–119.
- Hecker M, Hollert H (2011). Endocrine disruptor screening: Regulatory perspectives and needs. *Environ. Sci. Europe.* **23**: 1–14.
- Herrero O, Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Carvajal López L, Peropadre A, Hazen MJ (2012). Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutat Res.* **743**(1–2): 20–4.
- Chen L, Zhou H, Yu B, Huang Z. W (2014). Comparison Study on Hospital Wastewater Disinfection Technology. In *Advanced Materials Research.* **51**(23): 13906–13912.
- Chiarello M, Minetto L, Giustina SV, Beal LL, Moura S (2016). Popular pharmaceutical residues in hospital wastewater: quantification and qualification of degradation products by mass spectroscopy after treatment with membrane bioreactor. *Environ Sci Pollut Res Int.* **23**: 16079–16089.
- Chonova T, Keck F, Labanowski J, Montuelle B, Rimet F, Bouchez A (2015). Separate treatment of hospital and urban wastewater: A real scale comparison of effluents and their effect on microbial communities. *Sci Total Environ.* **542**: 965–975.
- Chu G (2014). Double strand break repair. *J Biol Chem.* 1–15, DOI 10.1007/978-1-4614-6436-5\_63-3.
- ISO 7888 (1985). Water quality-Determination of electrical conductivity.
- ISO 7393-2 (1995). Water quality-Determination of free chlorine and total chlorine -- Part 2: Colorimetric method using N,N-diethyl-1,4-phenylenediamine, for routine control purposes.
- ISO 11348-2 (2007). Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 2: Method using liquid dries bacteria.
- ISO 10523 (2010). Water quality – Determination of pH.
- ISO 8692 (2012). Water quality – Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae.
- ISO 6341 (2012). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test.
- ISO 19040-1 Draft (2017). Water quality – Determination of the estrogenic potential of water and waste water – Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*).
- Jiang J, Shan Z, Wang X, Zhu Y, Zhou J (2018). Ecotoxicity of the nonsteroidal ecdysone mimic RH-5849 to *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res Int.* **25**(11): 10730–10739.
- Jolibois B, Guerbet M (2006). Hospital Wastewater Genotoxicity. *Ann Occup Hyg.* **50**(2): 189–196.
- Kern D, Schwaickhardt Rde O, Lutterbeck CA, Kist LT, Alcayaga EA, Machado ÊL (2014). Ecotoxicological and genotoxic assessment of hospital laundry wastewaters. *Arch Environ Contam Toxicol.* **68**(1): 64–73.
- Kümmerer K, Helmers E, Hubner P, Mascart G, Milandri M, Reinthaler F et al. (1999). European hospitals as a source for platinum in the environment in comparison with other sources. *Sci Total Environ.* **225**: 2155–165.
- Kümmerer K, Helmers E (2000). Hospitals as a source of gadolinium in the aquatic environment. *Environ Sci Technol.* **34**: 573–577.
- Lansdown AB (2006). Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr. Probl. Dermatol. Curr Probl Dermatol.* **33**: 17–34.
- Laquaz M, Dagot CH, Bazin CH, Bastide T, Gaschet M, Ploy M et al. (2017). Ecotoxicity and antibiotic resistance of a mixture of hospital and urban sewage in a wastewater treatment plant. *Environ Sci Pollut Res.* **25**: 9243–9253.
- Li SW, Wang YH, Lin AY (2017). Ecotoxicological effect of ketamine: Evidence of acute, chronic and photolysis toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotox Environ Safe.* **143**: 173–179.



- 44 Ma J, Lu N, Qin W, Xu R, Wang Y, Chen X (2006). Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. *Ecotox Environ Safe*. **63**: 268–274.
- 45 Magdaleno A, Juárez AB, Dragani V, Saenz ME, Paz M, Moretton J (2014a). Ecotoxicological and Genotoxic Evaluation of Buenos Aires City (Argentina) Hospital Wastewater. *J Toxicol*. **2014**: 248461.
- 46 Magdaleno A, Saenz M.E, Juárez A.B, Moretton J (2014b). Effects of six antibiotics and their binary mixtures on growth of *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotox Environ Safe*. **113**: 72–78.
- 47 Manisova B, Binder S, Malina L, Jiravova J, Langova K, Kolarova H (2015). Phthalocyanine-mediated photodynamic treatment of tumoural and non-tumoural cell lines. *Anticancer Res*. **35**(7): 3943–51.
- 48 Manusadžianas L, Balkelytė L, Sadauskas K, Blinova I, Pöllumaad L, Kahru A (2002). Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquat Toxicol*. **63**: 27–41.
- 49 Maselli Bde S, Luna LA, Palmeira Jde O, Tavares KP, Barbosa S, Beijo LA et al. (2015). Ecotoxicity of raw and treated effluents generated by a veterinary pharmaceutical company: a comparison of the sensitivities of different standardized tests. *Ecotoxicology*. **24**: 795–804.
- 50 Morisawa T, Mizuno T, Ohe T, Watanabe T, Hirayama T, Nukaya H et al. (2003). Levels and behavior of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens in the effluent of a sewage treatment plant. *Mutat Res*. **534**(1–2): 123–32.
- 51 OECD (1997). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- 52 OECD (2012). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, No. 150, Series on Testing and Assessment. Paris, France.
- 53 Orias F, Perrodin Y (2013). Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review. *Sci Total Environ*. **454–455**: 250–276.
- 54 Orias F, Perrodin Y (2014). Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere*. **115**: 31–39.
- 55 Park KY, Choi SY, Lee SH, Kweon JH, Song JH (2016). Comparison of formation of disinfection by-products by chlorination and ozonation of wastewater effluents and their toxicity to *Daphnia magna*. *Environ Pollut*. **215**: 314–321.
- 56 Pauwels B, Verstraete W (2006). The treatment of hospital wastewater: an appraisal. *J Water Health*. **4**(4): 405–16.
- 57 Paz M, Muzio H, Mendelson A, Magdaleno A, Tornello C, Balbis N et al. (2006). Evaluation of Genotoxicity and Toxicity of Buenos Aires City Hospital Wastewater Samples. *J Braz Soc Ecotoxicol*. **1**(1): 1–6.
- 58 Persoone G, Marsalek B, Blinova I, Törökne A, Zarina D, Manusadžianas L et al. (2003). A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environ Toxicol*. **18**(6): 395–402.
- 59 Richardson SD, Plewa MJ, Wagner ED, Schoeny R, Demarini DM (2007). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutat. Res*. **636**: 178–242.
- 60 Rosal R, Rodríguez A, Perdigón-Melón JA, Petre A, García-Calvo E, Gómez MJ et al. (2010a). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res*. **44**: 578–588.
- 61 Rosal R, Rodea-Palomares I, Boltes K, Fernández-Piñas F, Leganés F, Gonzalo S et al. (2010b). Ecotoxicity assessment of lipid regulators in water and biologically treated wastewater using three aquatic organisms. *Environ Sci Pollut Res*. **17**: 135–144.
- 62 Russo C, Lavorgna M, Česen M, Kosjek T, Heath E, Isidori M (2017). Evaluation of acute and chronic ecotoxicity of cyclophosphamide, ifosfamide, their metabolites/transformation products and UV treated samples. *Environ Pollut*. **233**: 356–363.
- 63 Rustagi N, Singh R (2010). Mercury and health care. *Indian J Occup Environ Med*. **14**(2): 45–48.
- 64 Santos L, Gros M, Rodríguez-Mozaz S, Delerue-Matos C, Pena A, Barceló D et al. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci Total Environ*. **461–462**: 302–316.
- 65 Sharma P, Mathur N, Singh A, Sogani M, Bhatnagar P, Atri R et al. (2015). *Environ Monit Assess*. **187**(1): 4180.
- 66 Shen L, Wu JY, Lin GF, Shen JH, Westendorf J, Huehnerfuss H (2003). The mutagenic potentials of tap water samples in Shanghai. *Chemosphere*. **52**: 1641–1646.
- 67 Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. **175**(1): 184–91.
- 68 Suarez S, Lema JM, Omil F (2009). Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation–flocculation and flotation. *Bioresource Technol*. **100**: 2138–2146.
- 69 Ternes TA, Bonerz M, Herrmann N, Teiser B, Andersen HR (2007). Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: an option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere*. **66**(5): 894–904.
- 70 Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H et al. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen*. **35**(3): 206–21.
- 71 Tomankova K, Kejlova K, Binder S, Daskova A, Zapletalova J, Bendova H et al. (2011). In vitro cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. *Toxicol In Vitro*. **25**(6): 1242–50.
- 72 Váilitalo P, Kruglova A, Mikola A, Vahala R (2017). Toxicological impacts of antibiotics on aquatic micro-organisms: A mini-review. *Int J Hyg Envir Heal*. **220**(3): 558–569.
- 73 Váňa M, Wanner F, Matoušová L, Fuksa J. K (2010). Možnosti odstraňování vybraných specifických polutantů v ČOV. Vodohospodářské technologicko-ekonomické informace **52**: 1–16.
- 74 Vasconcelos EC, Dalke CR, de Oliveira CMR (2017). Influence of Select Antibiotics on *Vibrio fischeri* and *Desmodesmus subspicatus* at µg L<sup>-1</sup> Concentrations. *Environ Manage*. **60**: 157–164.
- 75 Vasquez MI, Fata-Kassinis D (2013). Is the evaluation of traditional physicochemical parameters sufficient to explain the potential toxicity of the treated wastewater at sewage treatment plants? *Environ Sci Pollut Res*. **20**: 3516 – 3528.
- 76 Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci Total Environ*. **429**: 123–155.
- 77 Vlkova A, Wittlingerova Z, Zimova M, Jírová G, Kejlová K, Janoušek S (2016). Genotoxicity of wastewater from health care facilities. *Neuroendocrinol Lett*. **37**: 25–32.
- 78 WHO (2013). In: Chartier Y, et al. editors. World Health Organisation. Safe Management of Wastes from Health-care Activities, 2<sup>nd</sup> ed.
- 79 White PA, Rasmussen JB, Blaise C (1996). Comparing the presence, potency, and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. *Environ Mol Mutagen*. **27**(2): 116–39.
- 80 Wiest L, Chonova T, Bergé A, Baudot R, Bessueille-Barbier F, Ayouni-Derouiche L et al. (2017). Two-year survey of specific hospital wastewater treatment and its impact on pharmaceutical discharges. *Environ Sci Pollut Res*. **25**: 9207–9218.
- 81 Zgórska A, Arendarczyk A, Grabinska-Sota E (2011). Toxicity assessment of hospital wastewater by the use of a biotest battery. *Arch Environ Prot*. **37**(3): 55–61.
- 82 Zhang Y, Geissen SU, Gal C (2008). Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*. **73**(8): 1151–61.



## **Studie III**

### **Qualitative and Quantitative Analysis of Certain Aspects of the Cytotoxic and Genotoxic Hazard of Hospital Wastewaters by Using a Range of *In Vitro* Assays**

Alternatives to Laboratory Animals

2021: 49(1-2), 33-48

# Qualitative and Quantitative Analysis of Certain Aspects of the Cytotoxic and Genotoxic Hazard of Hospital Wastewaters by Using a Range of *In Vitro* Assays

Alternatives to Laboratory Animals  
2021, Vol. 49(1-2) 33–48  
© The Author(s) 2021  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/02611929211004956  
journals.sagepub.com/home/atl



Stanislav Janousek<sup>1</sup>, Alena Vlkova<sup>1,2</sup>, Gabriela Jirova<sup>1,2</sup>,  
Kristina Kejlova<sup>1</sup>, Daniel Krsek<sup>1</sup>, Dagmar Jirova<sup>1</sup>,  
Helena Kandarova<sup>3</sup>, Zdenka Wittlingerova<sup>2</sup>,  
Tuula Heinonen<sup>4</sup>, Marika Mannerstrom<sup>4</sup> and Marek Maly<sup>1</sup>

## Abstract

Health care facilities and hospitals generate significant amounts of wastewater which are released into the sewage system, either after a preliminary treatment or without any further treatment. Hospital wastewater may contain large amounts of hazardous chemicals and pharmaceuticals, some of which cannot be eliminated entirely by wastewater treatment plants. Moreover, hospital effluents may be loaded with a plethora of pathogenic microorganisms or other microbiota and microbiome residues. The need to monitor hospital effluents for their genotoxic hazard is of high importance, as detailed information is scarce. DNA-based information can be acquired directly from samples through the application of various molecular methods, while cell-based biomonitoring assays can provide important information about impaired cellular pathways or mechanisms of toxicity without prior knowledge of the identity of each toxicant. In our study, we evaluated samples of chlorinated hospital wastewater discharged into the sewage system after this disinfection process. The assessment of cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of the hospital effluents was performed *in vitro* by using a broad battery of biomonitoring assays that are relevant for human health effects. All the tested hospital wastewater samples could be classified as potentially genotoxic, and it is concluded that the microbiota present in hospital wastewater might contribute to this genotoxic potential.

## Keywords

cytotoxicity, genotoxicity, health hazard, hospital effluents, *in vitro* testing, microbiota contamination, wastewater safety

## Introduction

The high consumption of water in health care facilities and hospitals results in a significant volume of wastewater loaded with complex mixtures of chemical and biological toxicants, and a plethora of microorganisms.<sup>1</sup> The discharge of hospital effluent without any processing could have a massive impact on public health, through the spread of infectious microbial agents, or through the presence of other chemical/physical toxicants or pharmaceuticals. The need to monitor hospital effluents for human health safety is currently of high importance, with detailed information on the genotoxic impact of such effluents being particularly scarce.<sup>2</sup> There are no strict rules or limits on hospital wastewater treatment before discharging.<sup>3,4</sup> The application of novel methods, based

on culture-independent molecular microbiology and chemistry techniques, enables the acquisition of DNA-based information directly from wastewater samples.

<sup>1</sup> Centre of Toxicology and Health Safety, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> Centre of Experimental Medicine, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

<sup>4</sup> FICAM, Faculty of Medicine and Health Technology, Tampere University, Tampere, Finland

## Corresponding author:

Alena Vlkova, Centre of Toxicology and Health Safety, National Institute of Public Health, Šrobárova 49/48, 100 00 Prague 10, Czech Republic.  
Email: alena.vlkova@szu.cz

Direct sample analysis, such as amplicon or metagenomic DNA sequencing methods, permit the identification of microbial contamination in effluents from the hospital environment.<sup>5</sup> Moreover, the identification of various genes encoding antibiotic resistance could closely be associated with the use of certain pharmaceuticals in the treatment of infectious diseases in a clinical setting. This could lead to the modification of some of the microbiota present in the wastewater by gene transfer, in addition to promoting growth of the resistant bacteria in the wider environment. This would be facilitated by the presence of the specific antibiotics in the effluent, mostly at low concentrations, exerting high selective pressure on bacterial communities and promoting the acquisition and maintenance of resistance.<sup>6</sup> Novel approaches and advanced methodologies should be employed to evaluate microbiome or microbiota contamination, with the aim of better characterising the internal hospital environment itself and gauge its effects on the wider external environment.

For the purposes of screening hospital wastewater for potential health hazards, *in vitro* biomonitoring assays, which broadly assess genotoxicity without the prior knowledge of the identity of each toxicant, can be reasonably applied. Choosing an appropriate *in vitro* assay to monitor a given endpoint among the available options is a challenging task.<sup>7</sup> Moreover, multiplexing strategies may enable a more in-depth data evaluation from a single experiment, leading to more robust conclusions compared to a single endpoint measurement. In this study, the genotoxicity assessment of hospital wastewater was performed *in vitro* by using a series of assays, namely: the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN assay); the bacterial reverse mutation test (Ames assay); the nuclear morphology assay; and the Comet assay with mouse 3T3 BALB/c fibroblasts and chicken embryonal hepatocytes (in the chicken egg genotoxicity assay; CEGA). In addition, the microbiota of hospital wastewater has been evaluated by bright field and transmission electron microscopy (TEM).

The presence of waterborne bacterial pathogens in wastewater remains an important public health concern. Bacteriophage (phage), which are presumably non-pathogenic to humans, are the most abundant form of life. The number of phage entities is estimated to be 10 times higher than the number of bacteria, and there are an estimated more than  $10^{31}$  phage particles on the planet.<sup>8</sup> It is well known that phage play a key role in regulating the microbial balance. In addition, because phage participate in specific bacterial lysis and strict species-specific infection, they can be used for bacterial classification and identification. The phage-mediated biocontrol of wastewater, exploiting bacterial pathogens and phage-host interactions, has been proposed. While the large-scale genomic projects deal with the isolation and sequencing of the genomes of a wide range of bacteriophage, some studies have instead focused on their morphological identification. Some types of phage have

been investigated as potential model organisms for water quality assessment, with the somatic coliphage and F-specific RNA bacteriophage or bacteriophage infecting *Bacteroides fragilis* seeming to be the most feasible in this respect. In the current study, the filamentous bacteriophage *Myoviridae*, *Siphoviridae* and *Podoviridae*, were identified and quantified. Bearing in mind that the identification of filamentous phage on the basis of electron microscopic observations is prone to error, due to the risk of confusion with other filaments, we have concentrated only on tailed viral particles.

In addition, to study the survivability of bacterial species in chlorinated hospital wastewater, we carried out bacteria cluster counting (with the Coulter Counter method) and used the filter paper method for the detection of transferred bacteria on MacConkey agar plates. The filter paper count method for bacteria on MacConkey agar is not specific for one type of bacterium and several organisms can be isolated, such as coliform bacteria (e.g. *Escherichia coli*), *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., other *Streptococcus* spp., etc. The Coulter Counter method detects any microbes and particles concurrently, while the filter paper count method detects only living microbes. The hospital wastewater samples were tested in their original form whenever possible (i.e. without further processing in the laboratory), or were processed appropriately depending on the requirements of the test.

## Materials and methods

### *Chemicals, reagents, sampling and further laboratory processing of hospital wastewater*

Dimethyl sulphoxide (DMSO), Triton™ X-100, disodium ethylene diamine tetra acetate (EDTA), normal melting point agarose (NMPA), low melting point agarose (LMPA), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), SYBR Green, ethidium bromide and Neutral Red, were all obtained from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic); May-Grünwald solution (eosin methylene blue solution, modified for microscopy) and Giemsa-Romanowski (Dr Kulich Pharma, Hradec Králové, Czech Republic); Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 4.5 g glucose (DMEM high glucose; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), fetal serum and trypsin-ethylenediamine-tetraacetic acid (Gibco, Prague, Czech Republic); TrypLE™ Express solution (Gibco/ThermoFisher Scientific, Denmark) and penicillin-streptomycin (10,000 U/ml penicillin and 10,000 U/ml streptomycin; Lonza, Kourim, Czech Republic). The chemicals and reagents used were all of high analytical grade.

Balb/3T3c mouse fibroblasts (3T3-L1) were purchased from the European Collection of Authenticated Cell Cultures, Great Britain (ECACC No. 86052701). The cell cultures were kept in a subconfluent state in standard

cell culture conditions (37°C, 5% v/v CO<sub>2</sub> and 95% humidity; Heraeus electronic incubator, Germany). They were maintained in complete DMEM (4.5 g glucose) containing 10% v/v fetal serum and 1% v/v penicillin–streptomycin (10,000 U/ml penicillin and 10,000 U/ml streptomycin), and were passaged at 1:10 ratio by using trypsin–EDTA (1×).

Wastewater samples were collected in pre-cleaned glass bottles. The samples were taken during maximal hospital activity periods (09:00–13:00). One composite sample was taken from each hospital following the schedule of one sampling per hour during the interval of 09:00–13:00 inclusive (i.e. the five combined samplings represent one composite sample). All collected hospital wastewater samples were immediately placed on ice, transported to the laboratory and frozen (–20°C) for subsequent analyses.

The physicochemical characteristics of the samples were determined according to standard methods: temperature (CSN 75 7342)<sup>9</sup>; pH (CSN ISO 10523)<sup>10</sup>; conductivity (ISO 7888)<sup>11</sup>; dissolved substances (CSN 75 7346)<sup>12</sup>; and free and total chlorine (ISO 7393-2).<sup>13</sup> The measurements of temperature and free chlorine content were performed in the field, in order to monitor their values during sampling. The analyses of metals and iodine were performed as follows: total mercury concentration was determined by using an atomic absorption spectrophotometer (AMA 254 Trace Mercury Analyzer, Altec); total gadolinium, platinum, lead, silver, aluminium and iodine concentrations were determined by using an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS Elan DRC-e; Perkin Elmer). For the determination of gadolinium, platinum, lead, silver and aluminium, the water samples were used undiluted or diluted up to 100× in 1% (v/v) nitric acid solution — germanium, indium and rhenium were used as internal standards. For the determination of iodine, the water samples were diluted by a series of factors between 10× and 100× in 1% tetramethylammonium hydroxide containing 0.02% Triton X-100 — tellurium was used as the internal standard.

Unless specified, the samples were analysed without any further processing. However, when necessary, the hospital wastewater samples were passed through an appropriate filter series (1.6 µm, 0.45 µm and 0.22 µm nylon filters) or autoclaved (121°C for 1.5 hours). Wastewater samples from five hospitals (referred to as H1–H5), located in the central region of the Czech Republic, were evaluated by using the methods described in the following sections.

#### Determination of cell viability: Neutral Red Uptake assay

The method used was regulatorily accepted in EU member states as DB-ALM Protocol No. 46.<sup>14</sup> Balb/c 3T3 fibroblasts were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's

Medium (DMEM) supplemented with newborn calf serum (10% v/v), subcultured in 96-well plates (1 × 10<sup>4</sup> cells/well) and incubated for 24 hours at 37°C prior to use. The cells were exposed to hospital wastewater samples (up to a maximum of 1.3× DMEM dilution) for another 24 hours. Neutral Red uptake (i.e. cell viability) was determined with a fluorescence/luminescence reader FLx800TBI (BioTek, Winooski, VT, USA). The viability of the wastewater-exposed cells was expressed as the percentage viability as compared to the baseline control (i.e. cells exposed to culture medium only).

#### Determination of cell viability: Nuclear morphology assay

For the detection of nuclear morphological changes with a fluorescence microscope, 3T3 Balb/c cells were incubated in 6-well plates for 24 hours in standard DMEM and exposed to non-processed (i.e. neither filtered nor autoclaved) wastewater samples (up to a maximum of 1.3× DMEM dilution) for another 24 hours. Then, they were washed with phosphate buffered saline and stained with SYBR Green. Fluorescent microscopy images were taken with an Olympus BH2 RFCA microscope, photographed with an Imaging Source camera and analysed with NIS Elements (advanced imaging software; Nikon, Japan) and PASW 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Morphometric parameters were determined for each single image of the nucleus, and characteristic changes were determined for approximately 200 cells from each hospital sample. The data were compared with those from the control sample exposed to double distilled water. The measurements were calculated according to the following formulae or definitions:

- area, as a principal size criterion;
- elongation, as a ratio of Max Feret and Min Feret features, where the Max or Min Feret are the maximal or minimal values of the set of Feret's diameters at different angles  $\alpha$ ;
- perimeter (as the total boundary measure), as calculated from four projections in the directions 0, 45, 90 and 135 degrees by using Crofton's formula:  $\text{Perimeter} = \Pi (\text{Pr}0 + \text{Pr}45 + \text{Pr}90 + \text{Pr}135)/4$ ;
- circularity =  $4 \Pi (\text{area})/(\text{perimeter})^2$ ;
- shape factor =  $4 \Pi (\text{area})/(\text{convex hull perimeter})^2$ ; and
- roughness =  $(\text{convex hull perimeter})/(\text{perimeter})$ .

*Elongation* is a useful feature by which to characterise the shape of an object. *Circularity* equals 1 only in circles; all other shapes are characterised by circularity smaller than 1. *Roughness* indicates the degree to which the object is rough; a value of 1 indicates minimal roughness. For the

purposes of statistical analysis, the Nuclear Index (NI) was defined as:

$$\text{NI} = -\text{elongation} + \text{perimeter} + \text{circularity} \\ + \text{shape factor} + \text{roughness}$$

The selection of the measurement features used, and the NI formula given above, were based on the results of dimension reduction (Principal Component Analysis) using PASW 18 statistics and NIS Elements advanced image software.

#### **Determination of mutagenicity: Bacterial reverse mutation assay (Ames test)**

The Ames test was performed in accordance with OECD TG 471.<sup>15</sup> Three *Salmonella typhimurium* tester strains with point mutations (namely, a base pair substitution in TA100, and a frameshift mutation in TA98 and in TA1535) were used in the study. A cofactor-supplemented post-mitochondrial fraction (S9 mixture), prepared from the livers of Wistar rats treated with an enzyme-inducing agent (the polychlorinated biphenyl, Delor), was used for modelling mammalian metabolic activation in the assay, and prepared as follows: The experimental process for the preparation of rodent liver homogenate was performed in accordance with Directive 2010/63/EU<sup>16</sup> on the protection of animals used for scientific purposes, and the validity of the experimental project No. 46/2019 was approved by the Ministry of Health of the Czech Republic.

Five days after Delor application, the animals were sacrificed by cervical dislocation and the livers removed. The tissue was placed in ice-cold sterile 0.15 M KCl solution (3 ml/1 g liver) and mechanically homogenised by using a Potter-Elvehjem tissue grinder with a PTFE tip in combination with a tube of borosilicate glass mortar, at a maximal speed of 400 rpm and constant cooling of the tube on crushed ice. The resulting mixture was centrifuged (9000g for 20 minutes) and aliquots of the supernatant were immediately frozen (−80°C). The preparation of the homogenate was performed under sterile conditions and at 4°C. Prior to use, the protein content (mg) in 1 ml of homogenate was determined by using a Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Prague, Czech Republic). The optimal amount of homogenate for use in the S9 mixture was determined, based on the responses of individual strains to mutagens at different protein concentrations. In our case, the protein content of the homogenate was 32 mg/ml, and 0.26 ml of the homogenate was used in 10 ml of S9 mixture (comprising also 4 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 33 mM KCl, 100 mM sodium phosphate, pH 7.4 and distilled water).

For the Ames test, the samples of wastewater were sterilised by filtration (i.e. filtered water; FW). The material left on the used filters was also evaluated (i.e. filter

extracts; FE). These samples were prepared by placing the used filters in 15 ml DMSO on a shaker for 18 hours at 4–8°C. The samples and the controls were tested in triplicate. The dose-dependency of the mutagenic effect was expressed as the Mutagenic Index (MI), which represents the average number of revertants per sample plate divided by the average number of revertants per negative control plate. A sample eliciting at least a two-fold increase in the number of revertants compared to that of the control was considered to be mutagenic.

#### **Determination of genotoxicity: Hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN assay)**

Fertilised eggs (COBB 500 and ROSS 308) were obtained from a commercial hatchery (Habry, Czech Republic), and placed in an upright position with the blunt end upper-most and incubated vertically at 37.5 ± 0.5°C, with a relative humidity of 70.5 ± 5.5%. The incubation commenced on day 0 (D0), so D1 was considered to be an incubation period of 24 hours. The test samples were applied at D8, as suggested by Wolf et al.<sup>17</sup> Six eggs were used per sample. Two different cell lines were assessed: a) a line of definite erythrocytes (EII), consisting of immature erythroblasts, proerythroblasts, early-, middle- and late-polychromatic erythrocytes (PCEs), and mature normochromatic erythrocytes (NCEs); and b) a line of primitive erythrocytes (EI), consisting exclusively of mature, normochromatic cells, at least within the experimental window. The PCE/NCE ratio was calculated as the quotient  $r = [\text{percentage of PCE}] / [\text{percentage of NCE (including EI)}]$ .

#### **Determination of genotoxicity: In vitro Comet assay with mouse 3T3 BALB/c fibroblasts**

Microscope slides were first pre-coated with 1% w/v high melting point (HMP) agarose dissolved in double distilled water and placed in a drying oven for 30 minutes at 60°C. An aliquot of 85 µl of 1% HMP agarose in PBS was applied onto each of the pre-coated slides, covered with a coverslip and placed in a refrigerator in order to enhance the setting of the agarose. DNA damage was tested by using mouse 3T3 BALB/c fibroblasts according to the protocol described previously,<sup>18</sup> with the minor modification of the cells being harvested with TrypLE™ Express solution (applied for 15 minutes at 4°C).

Electrophoresis was performed at 300 mA and 0.73 V/cm for 20 minutes at 4°C. Following completion of the electrophoretic separation, the slides were carefully rinsed twice with a neutralisation buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) for 10 minutes at 4°C. The samples were stained with SYBR Green and visualised with a fluorescence microscope (Olympus BH2 RFCA). Photographs were taken with an Imaging Source camera and scored with CometScore 1.5 software (TriTek, Wilmington, NC, USA).

### Determination of genotoxicity: Chicken egg genotoxicity assay (CEGA)

As indicated for the HET-MN assay described above, the fertilised eggs were placed in an upright position with the blunt end upper-most and incubated vertically at  $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , in  $70.5 \pm 5.5\%$  relative humidity. The incubation commenced on day 0 (D0), so D1 was considered to be an incubation period of 24 hours. All injections were made into the air-sac. The dose regimen consisted of a single injection of hospital wastewater sample (10–100  $\mu\text{l}$ ) on D8. At the end of the experiment, on D10, the eggs were opened and the fetuses were decapitated. The fetal abdominal cavity was accessed and the liver removed, rinsed with ice-cold PBS buffer containing 20 mM EDTA and 10% v/v DMSO, minced into fine pieces with a glass pestle, filtered through a nylon mesh and allowed to settle before Comet assay procedures were initiated. Aliquots of the cell suspensions were assayed immediately, following the procedure described above for the Comet assay with mouse fibroblasts.

### Electron microscopic examination

Non-processed (i.e. neither filtered nor autoclaved) hospital wastewater samples were centrifuged (10,000g, 60 minutes) and a 500  $\mu\text{l}$  aliquot of the pelleted sediment was placed on two formvar/carbon-coated TEM grids laid onto parafilm, and allowed to stand for 20 minutes. The grids were pre-treated with 1% w/v Alcian blue to increase hydrophilicity. One of the grids was stained with a 2% w/v aqueous solution of ammonium molybdate and the other grid stained with a 2% w/v aqueous solution of uranyl acetate. The grids were analysed under a transmission electron microscope (Hitachi HT-7800, Hitachi, Tokyo, Japan). For detailed phage classification, the following morphometric parameters were determined:

- head diameter (hd; width perpendicular to the tail);
- head length (hl; along the tail axis);
- tail diameter (td); and
- tail length (tl).

Particles with  $tl < 40$  nm were classified as *Podoviridae*; for viruses with longer tails, the td value was used to classify them as either *Myoviridae* ( $td \geq 16$  nm) or *Siphoviridae* ( $td < 16$  nm), according to previously published morphometric rules.<sup>19</sup>

### Microbiome, bacteria, particle and cell counting

The method described by Smither<sup>20</sup> for particle/bacteria or microbe counts, and the filter paper method based on MacConkey agar plates,<sup>21</sup> were used. The cells were counted with a Model FN Coulter Counter (Beckman, Bromma, Sweden).

**Table 1.** Physical characteristics of the wastewater from the different hospitals.

Parameter (unit)	H1	H2	H3	H4	H5
T ( $^\circ\text{C}$ )	6.5	6.5	13.0	4.0	6.0
pH	7.91	7.51	7.88	7.65	7.81
$\sigma$ (mS/m)	116.3	86.9	97.9	81.1	2380.0
Cl (mg/l)	0.04	0.08	0.20	0.08	0.14

H1–H5 refer to the five hospitals sampled.

### Data analysis

The differences between test sample and control groups were analysed with a one-way analysis of variance (ANOVA) test, and multiple pair-wise comparisons were performed with the Sidak's multiple comparison post-test. The Chi-squared test, Student's *t*-test and Mann–Whitney test were used to verify the significance at  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed by means of PASW 18.0 software (SPSS Inc.).

## Results

### Cell viability and cytotoxicity determination

The hospitals featured in this study are described in detail in our previous paper.<sup>22</sup> They are characterised according to: the type of hospital; the number of beds; the volume of wastewater produced; the type of wastewater discharged; and the treatment/disinfection processes used. Thus, the hospital wastewater samples (labelled H1–H5) originated from the same batches of wastewater sampled previously.<sup>22</sup> Generally, there were no evident anomalies in the tested physical properties of the hospital effluents H1–H5, except for H5 conductivity being very high (see Table 1). With regard to their chemical composition, it was evident that H5 had a higher level of 'dissolved substances', and that H2 had a higher iodine concentration relative to other samples (see Table 2). This assessment of chemical composition focused on selected elements, such as trace metals and/or elements that represent high risk for human health.

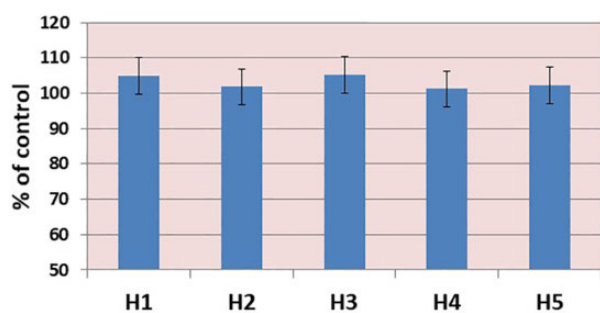
In terms of cytotoxic effects to 3T3 BALB/c fibroblasts, according to the Neutral Red Uptake assay, the tested wastewater samples did not induce cytotoxicity (at up to a maximum  $1.3 \times$  dilution of the culture medium), as depicted in Figure 1. When the morphology of the 3T3 BALB/c fibroblasts exposed to the test samples was examined by microscopy (Figure 2), cells with atypical patterns of nuclear pyknosis or nuclei fragmentation were observed, suggesting a significant cellular impact. In addition, the nuclear changes detected were quantified according to the principles proposed by Mandelkowitz et al.<sup>23</sup> Briefly, apoptosis can ordinarily be demonstrated by the assessment of apoptosis-specific molecular events like nuclear DNA fragmentation (e.g. terminal deoxynucleotidyl transferase-UTP nick-end labelling, caspase enzyme activity, or microscopic analysis of

**Table 2.** Chemical composition of the hospital wastewater samples.

Parameter (unit)	H1	H2	H3	H4	H5
Total chlorine (mg/l)	0.06	0.53	0.42	>0.60	2.09
Dissolved substances (mg/l)	580	532	707	465	1970
Hg ( $\mu\text{g/l}$ )	1.48	0.50	<0.30	0.52	0.47
I ( $\mu\text{g/l}$ )	130	1577	86	390	186
Ag ( $\mu\text{g/l}$ )	0.58	0.09	0.04	0.15	0.92
Gd ( $\mu\text{g/l}$ )	1.55	2.75	0.15	5.01	1.51
Pt ( $\mu\text{g/l}$ )	0.17	0.05	0.45	0.11	0.13
Pb ( $\mu\text{g/l}$ )	0.35	0.58	0.19	0.70	0.42
Al (mg/l)	3.71	1.82	1.33	2.00	2.37

H1–H5 refer to the five hospitals sampled. Only selected elements, i.e. trace metals and/or those representing high risk for human health, were assessed.

Hospital characteristics at the time of sampling (i.e. the type of hospital, number of beds, volume of wastewater produced, type of wastewater discharge, treatment and disinfection processes applied) are described in our previous paper.<sup>22</sup>



**Figure 1.** The evaluation of hospital wastewater cytotoxicity to 3T3 BALB/c fibroblasts, by using the Neutral Red Uptake (NRU) assay. 3T3 BALB/c fibroblasts were exposed to wastewater samples from five hospitals (H1–H5) and cytotoxicity evaluation was performed by using the NRU assay. The data are expressed as the % of control (100% viability of cells in standard DMEM), and are presented as the mean  $\pm$  SD of three independent measurements.

phosphatidylserine translocation to the outer face of the cytoplasmic membrane). It is also possible to apply microscopy techniques to detect apoptosis-specific nuclear changes morphometrically. While apoptosis assays based on molecular events are restricted to the assessment of a single apoptotic stage, assays based on nuclear morphology cover various stages — for example, early stages such as chromatin condensation, as well as late and very late stages (e.g. nucleus shrinking or the formation of apoptotic bodies). Although membrane destruction is a universal indicator of cell death and evidence of the cytotoxic effects of a compound, it does not reveal the earlier mechanisms leading to the cell death. Fluorescent microscopy was used in this study to investigate changes to 3T3 BALB/c fibroblasts exposed to hospital wastewater samples, with the aim of detecting apoptotic-specific and/or necrotic modulations of cellular

nuclei. The data from the morphometric analysis are given in Table 3.

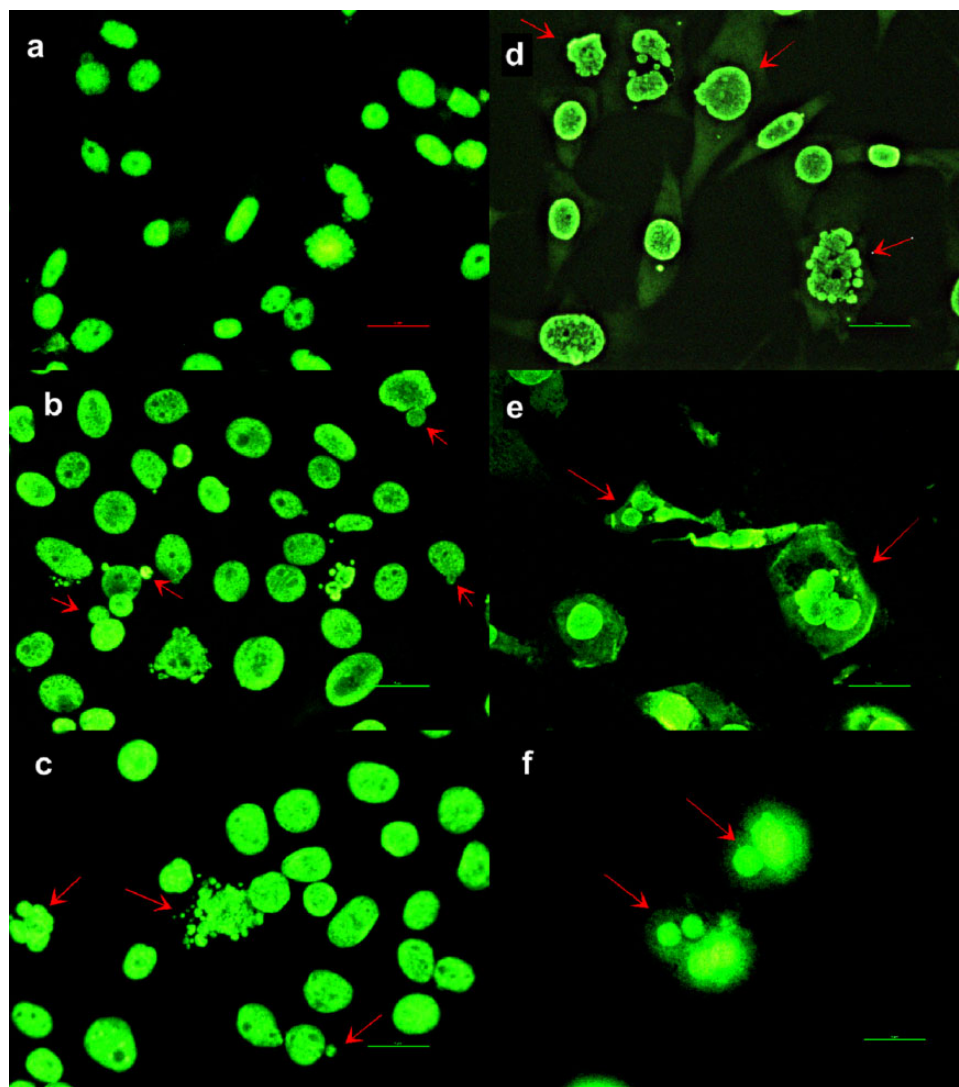
Any observed nuclear fragmentation is an important issue in relation to the results of the Comet assay. It has previously been considered, for instance, whether the Comet ‘ghost’ morphology was related to apoptotic or non-apoptotic cells. It has been argued that only the latter cells are repairable, and that apoptotic cells are not repairable due to the irreversible nature of the process.<sup>24</sup> In our study, the wastewater-exposed 3T3 BALB/c fibroblasts proliferated well, even under bacterial/microbiota overgrowth and under an antibiotic shield (i.e. 3T3 BALB/c fibroblasts were always maintained in DMEM medium containing 1% penicillin/streptomycin solution 10,000 U/ml penicillin and 10,000 U/ml streptomycin). This observation may suggest a high rate of 3T3 BALB/c fibroblasts proliferation or cell senescence (or both, at different stages) during exposure to hospital wastewater. The nuclear fragmentation detected by microscopy might signal the presence of cytotoxic/genotoxic stressors, as well as the occurrence of apoptotic/necrotic cellular growth modulation, due to the bacterial overgrowth of the cell culture.

### Genotoxicity and mutagenicity testing

In order to evaluate the genotoxic hazard of hospital wastewaters, the *in vitro* Comet assay and the bacterial reverse mutation assay (Ames test) were carried out. Genotoxicity is a term that refers to the ability of a xenobiotic to interact with DNA and/or the cellular apparatus that ensures the integrity of the genome (i.e. DNA, spindle apparatus and enzymes involved in the maintenance of the genetic material). On the other hand, mutagenicity refers to the induction of permanent transmissible changes in the structure of the genetic material of cells or organisms. These changes may involve a single gene or a block of genes, such as a given chromosome segment. To assess genotoxicity and/or mutagenicity, different possibilities must be considered — for example, besides the induction of point mutations, a compound can induce changes in chromosome number (e.g. polyploidy or aneuploidy) or structure (e.g. breaks, deletions, rearrangements). Mutagenicity/genotoxicity testing includes the assessment of DNA primary damage that can be repaired and is therefore reversible, as well as the detection of stable and irreversible damage (i.e. gene mutations and chromosome aberrations) that can be transmissible to the next generation if it occurs in germ cells.

There was no mutagenic effect evident for any of the hospital wastewater samples, when tested in the bacterial reverse mutation assay (Ames test) at a dose level of 100  $\mu\text{l}$  per plate. None of the water samples induced a greater than two-fold increase in the number of revertants, as compared to negative controls, in any of the three histidine-deficient strains of *Salmonella typhimurium* used, with or without metabolic activation. The Mutagenic Index (MI) values





**Figure 2.** Examples of the morphological appearance of 3T3 BALB/c fibroblasts after exposure to hospital wastewater. Images show: (a) control nuclei; (b) nuclear blebbing; (c) different forms of nuclei fragmentation; (d) nuclear line membrane disintegration; (e) multinucleated cell formation; (f) large nuclear blebs with chromatin super-aggregation. SYBR Green stain, scale bar = 5  $\mu$ m, original magnification = 400 $\times$ .

Note: The colour version of this image is available online.

**Table 3.** The morphometric features of 3T3 BALB/c fibroblast nuclei following exposure to hospital wastewater samples.

Morphometric feature	Control (DW)	H1	H2	H3	H4	H5
Area	6.32 $\pm$ 2.84	3.34 $\pm$ 3.78***	2.32 $\pm$ 4.15***	4.14 $\pm$ 4.06***	3.54 $\pm$ 4.77***	3.21 $\pm$ 4.95***
Perimeter	9.53 $\pm$ 2.93	5.97 $\pm$ 5.84***	4.63 $\pm$ 5.28***	7.18 $\pm$ 5.33***	6.27 $\pm$ 5.89***	5.52 $\pm$ 5.70***
Circularity	0.83 $\pm$ 0.13	0.79 $\pm$ 0.20*	0.72 $\pm$ 0.23***	0.76 $\pm$ 0.25***	0.71 $\pm$ 0.24***	0.73 $\pm$ 0.23***
Elongation	1.37 $\pm$ 0.41	1.96 $\pm$ 4.11	2.00 $\pm$ 3.90	1.87 $\pm$ 3.96	2.24 $\pm$ 5.04*	1.59 $\pm$ 0.53
Shape factor	0.91 $\pm$ 0.16	0.89 $\pm$ 0.16	0.84 $\pm$ 0.20***	0.87 $\pm$ 0.18	0.83 $\pm$ 0.20***	0.85 $\pm$ 0.18***
Roughness	0.95 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.10***	0.88 $\pm$ 0.08***	0.89 $\pm$ 0.11***	0.89 $\pm$ 0.09***	0.88 $\pm$ 0.09***
$\Sigma$ NI <sup>a</sup>	10.86 $\pm$ 2.90	6.60 $\pm$ 7.02***	5.08 $\pm$ 6.18***	7.83 $\pm$ 6.62***	6.47 $\pm$ 7.51***	6.39 $\pm$ 5.63***

H1–H5 refer to samples from the five hospitals sampled; double distilled water (DW) was used as the control sample.

<sup>a</sup>Nuclear Index (NI) =  $-\text{Elongation} + \text{Perimeter} + \text{Circularity} + \text{Shape factor} + \text{Roughness}$ . Data are shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ); each group consisted of 200 cells approximately. ANOVA statistics for NI: F-ratio = 29.58; significance between groups  $p < 0.001$ . All values shown are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (asymptotic significance compared to control).



**Table 4.** Mutagenic Index (MI) values of the different hospital wastewater samples.

		TA98				TA100				TA1535			
		S9–		S9+		S9–		S9+		S9–		S9+	
H1	FW	1.03	0.97	1.25	1.14	1.12	0.96	0.99	1.01	1.20	1.03	0.92	1.24
	FE	1.18	1.00	0.87	1.22	1.22	0.93	1.10	0.96	0.79	1.23	1.16	1.73
H2	FW	1.23	0.80	1.35	0.93	1.13	1.04	1.13	1.21	0.80	0.86	1.25	0.76
	FE	1.48	1.18	0.99	1.27	1.08	1.01	1.04	1.11	0.91	1.38	0.92	1.45
H3	FW	1.30	1.10	1.22	1.07	0.92	1.09	1.00	1.20	1.00	1.04	1.35	1.13
	FE	1.34	1.06	1.16	1.37	1.01	1.12	1.00	1.00	0.66	1.38	1.13	0.91
H4	FW	1.38	0.95	1.22	1.21	1.17	1.19	1.03	1.03	0.86	0.76	1.12	1.32
	FE	1.19	1.16	0.89	0.91	1.24	1.21	1.06	1.03	0.72	1.74	1.00	1.03
H5	FW	1.03	0.90	1.12	1.10	0.98	1.09	1.16	0.99	0.81	0.87	0.80	1.02
	FE	0.81	0.99	1.22	1.08	1.04	0.97	1.20	0.90	1.12	1.48	0.83	0.95

H1–H5 refer to the five hospitals sampled in the study. FW = filtered water; FE = filter extract.

S9–: without metabolic activation (samples with 0.5 ml buffer); S9+: with metabolic activation (samples with 0.5 ml S9 mixture). The two columns of data underneath each S9– or S9+ heading represent two independent experimental runs.

Positive control MI values (MI values of  $\geq 2$  are considered to be mutagenic.):

TA98 (S9–): 4-nitro-*o*-phenylenediamine, 10  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , in the range of 24.4–39.3

TA98 (S9+): 2-aminofluorene, 5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , in the range of 56.9–89.6

TA100 (S9–): sodium azide, 5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , in the range of 13.3–14.7

TA100 (S9+): 2-aminofluorene, 5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , in the range of 13.8–16.4

TA1535 (S9–): sodium azide, 5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ; in the range of 33.3–64.2

TA1535 (S9+): cyclophosphamide, 5  $\text{mg}/100 \mu\text{l}$ ; in the range of 26.8–44.5

**Table 5.** Characteristics of DNA damage in the population of 3T3 BALB/c fibroblasts exposed to hospital wastewaters, as assessed in the *in vitro* alkaline Comet assay.

Comet parameters assessed	DW	H1	H2	H3	H4	H5
Cells observed (n)	n = 666	n = 830	n = 827	n = 748	n = 895	n = 719
% DNA in head	96.14 $\pm$ 8.76	87.17 $\pm$ 11.43***	86.42 $\pm$ 20.63***	90.97 $\pm$ 18.70***	81.15 $\pm$ 24.67***	90.36 $\pm$ 16.25***
% DNA in tail	3.85 $\pm$ 2.76	12.82 $\pm$ 5.43***	13.57 $\pm$ 7.63***	9.02 $\pm$ 8.70***	18.85 $\pm$ 14.64***	9.60 $\pm$ 6.24***
Tail length (mm)	2.80 $\pm$ 1.95	11.27 $\pm$ 9.35***	13.70 $\pm$ 12.00***	9.86 $\pm$ 10.68***	24.53 $\pm$ 17.05***	8.93 $\pm$ 10.70***
Tail moment	0.75 $\pm$ 3.59	17.93 $\pm$ 9.87***	17.78 $\pm$ 9.61***	12.91 $\pm$ 8.14***	23.65 $\pm$ 9.10***	1.59 $\pm$ 4.10
Olive moment	1.14 $\pm$ 1.16	10.45 $\pm$ 4.16***	11.21 $\pm$ 5.20***	7.65 $\pm$ 5.18***	1.07 $\pm$ 2.20	1.11 $\pm$ 2.18
$\Sigma$ CDI <sup>a</sup>	4.70 $\pm$ 18.71	39.65 $\pm$ 10.5***	42.70 $\pm$ 10.31***	30.42 $\pm$ 10.97***	63.35 $\pm$ 12.71***	18.97 $\pm$ 4.73**

<sup>a</sup> Comet Damage Index (CDI) = tail length ( $\mu\text{m}$ ) + tail moment + olive moment. Data are shown as mean  $\pm$  SD of each group exposed (H1–H5, with respect to the control DW = double distilled water). TriTec CometScore 1.5 software was used for the Comet parameter calculations.

ANOVA statistics: *F*-ratio = 43.17; significance between groups  $p < 0.001$ . All values are shown as mean  $\pm$  SD in triplicates; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (asymptotic significance compared to control).

recorded were in the range of 0.9–1.7; therefore, the samples were considered to be non-mutagenic. The detailed data are shown in Table 4. It is important to stress here that, before the bacterial reverse mutation assay was performed, the hospital wastewater samples had to be sterilised (or filtered) because of unspecified bacterial presence. This disqualifies the use of the Ames test for hospital wastewater testing without further laboratory processing of the collected samples. However, numerous previous studies<sup>25,26</sup> have shown that potential genotoxic effects were not successfully detected as a result of such sample filtration, which may lead to the removal of the toxicants. In this study, analogous effects (i.e. negative results) were also evident following autoclaving of the wastewater samples.

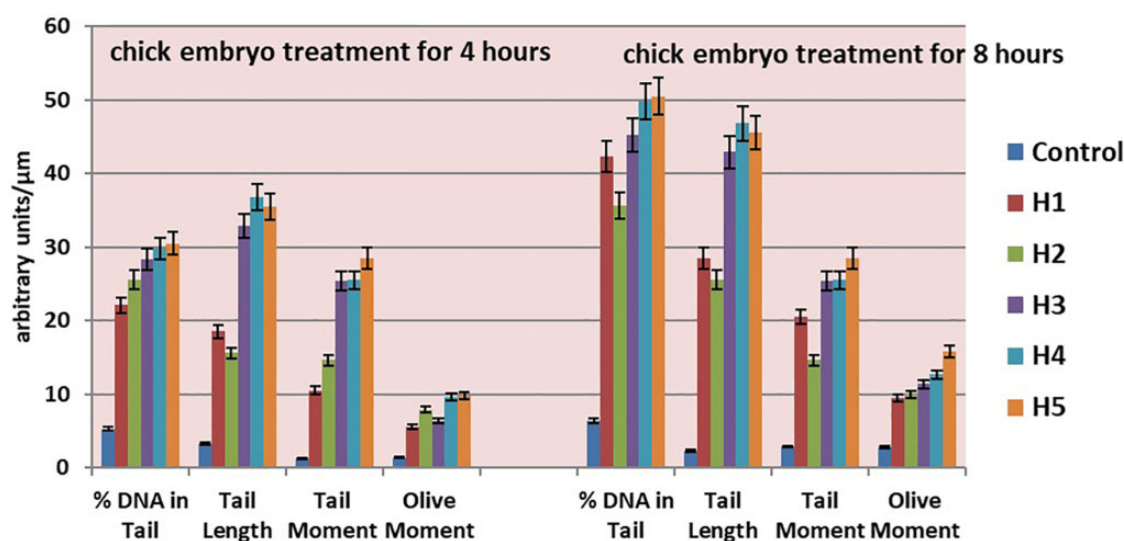
Contrary to the results of the Ames test, the results from the *in vitro* alkaline Comet assay showed a genotoxic impact of hospital effluents on 3T3 BALB/c mouse fibroblasts. Parameters such as % DNA in head, % DNA in tail, tail moment or olive moment, were determined by using TriTec CometScore 1.5 software (see Table 5). However, the Comet assay data indicated that any potential genotoxic effects were only apparent in the hospital wastewater samples that had not been subjected to further processing. Thus, when the samples were passed through an appropriate filter series (1.6  $\mu\text{m}$ , 0.45  $\mu\text{m}$  and 0.22  $\mu\text{m}$  nylon filters) or autoclaved (at 121°C for 1.5 hours), the results of the Comet assay with the 3T3 BALB/c mouse fibroblasts were negative. Furthermore, the CEGA and the HET-MN assay also

**Table 6.** Erythroid cell suppression and micronuclei induction in chicken embryos exposed to hospital wastewater (HET-MN assay).

Sample	PCE <sub>early</sub> (% ± SD)	PCE <sub>middle</sub> (% ± SD)	PCE <sub>late</sub> (% ± SD)	NCE (% ± SD)	EI (% ± SD)	PCE/NCE (ratio)	MNEII (% ± SD)
NC	0.7 ± 0.1	4.3 ± 0.7	33.8 ± 0.7	56.1 ± 1.5	8.4 ± 0.6	0.59 ± 0.1	1.0 ± 0.3
PC	0.3 ± 0.1**	1.5 ± 0.5**	10.1 ± 0.9***	82.3 ± 1.1***	4.8 ± 1.2**	0.14 ± 0.1***	12.7 ± 1.9***
H1	2.4 ± 0.6**	3.5 ± 0.9	15.9 ± 1.1***	72.4 ± 1.8**	5.8 ± 1.3*	0.21 ± 0.2*	3.7 ± 0.6**
H2	4.4 ± 0.8**	2.5 ± 0.8	14.9 ± 1.2***	71.4 ± 1.5**	6.8 ± 0.9*	0.16 ± 0.1**	2.7 ± 0.9**
H3	3.4 ± 0.8**	2.5 ± 1.1*	25.3 ± 1.1***	70.7 ± 1.9**	6.2 ± 2.1*	0.21 ± 0.3*	3.3 ± 0.9**
H4	4.4 ± 0.9**	1.5 ± 0.3**	28.9 ± 1.2**	69.7 ± 1.2**	5.9 ± 0.8**	0.25 ± 0.2*	4.7 ± 0.3**
H5	3.4 ± 0.9**	1.5 ± 0.4**	22.9 ± 1.1***	73.4 ± 1.7**	6.8 ± 0.9	0.20 ± 0.1*	4.2 ± 0.3*

H1–H5 refer to the five hospitals sampled in the study. All values are shown as mean ± SD in triplicates; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (asymptotic significance compared to control; Mann–Whitney, one-sided test). Double distilled water was used as the negative control (NC), and 100 mM methylmethane sulphonate as the positive control (PC).

EI = primitive erythrocytes; EII = definite erythrocytes; PCE = proerythroblasts (early-, middle-, and late-polychromatic, as indicated); NCE = normochromic erythrocytes; PCE/NCE = ratio percentage of PCE/percentage of NCE (including EI); MNEII = micronucleated EII.



**Figure 3.** An overview of the results obtained with chicken egg genotoxicity assay (CEGA). The Comet assay was performed with embryonal chicken hepatocytes (CEGA). Parameters of tail length, % DNA in tail, olive and tail moments, were used to assess the extent of DNA damage in liver cells exposed to non-processed hospital wastewater samples (H1–H5) and double distilled water control. Data are shown as mean ± SD of each group exposed (H1–H5, with respect to the control), six eggs comprised each experimental run. ANOVA statistics:  $F$ -ratio = 53.12; significance between groups  $p < 0.001$ .

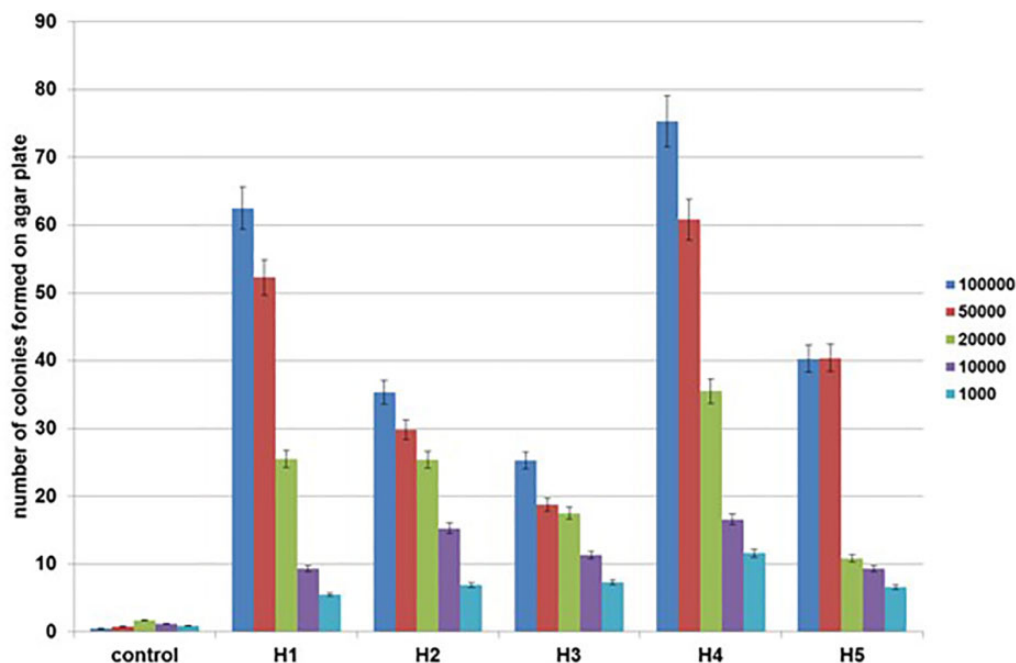
confirmed the genotoxic potential of the non-processed wastewater samples, but not of the further processed ones (i.e. those filtered or autoclaved). The results of the HET-MN assay and the CEGA, with the non-processed (i.e. neither filtered nor autoclaved) wastewater samples, are summarised in Table 6 and Figure 3, respectively. Moreover, when chick embryos were exposed to the non-processed hospital wastewaters, nearly all embryos died within 72 hours of exposure to a single dose of wastewater sample (data not shown).

### Microbiota examination

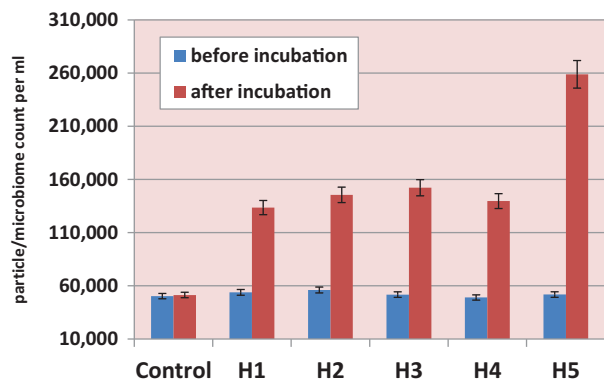
A simple screening for possible microbial contamination of the tested hospital wastewater samples, by means of

bacteria cluster counting (Coulter Counter method) and with the filter paper method for the detection of transferred bacteria on MacConkey agar plates, revealed significant bacterial and other microbial contamination.

Appropriate dilutions of hospital wastewater samples were prepared in order to obtain microbe/particle initial concentrations of around 1000, 10,000, 50,000 and 100,000 microbe/particles per millilitre. The filter paper strips were dipped into each of these dilutions and the foot of the strip was placed on a MacConkey agar plate. After incubation for 24 hours at 37°C, the number of colonies in the inoculated area was counted. The number of colonies counted in each area was closely related to the microbe/particle count in the wastewater sample. The results of the filter paper transfer method and the Coulter Counter



**Figure 4.** Relationship between the number of colonies formed on a MacConkey agar plate and the number of microbes/particles per ml of wastewater, as determined by the Coulter Counter method. H1–H5 refer to the five hospitals sampled in the study. Determination in triplicate of 1000, 10,000, 20,000, 50,000 and 100,000 microbes/particles per ml, as determined by the Coulter Counter method (double distilled water was used as the control). The mean difference between groups (multiple comparisons);  $p < 0.001$  (one-way ANOVA).



**Figure 5.** Microbe/particle counts of non-processed hospital wastewaters before and after a 24-hour incubation period at 37°C, as evaluated by the Coulter Counter method. Determination of the microbe/particle count per ml of each hospital wastewater (samples tested in triplicate; control = double distilled water). Paired sample  $t$ -test, significance (2-tailed),  $p < 0.001$ . H1–H5 refer to the five hospitals sampled in the study.

method are shown in Figures 4 and 5, respectively. In addition, a plethora of microbiota were observed by means of brightfield microscopy and TEM. A range of bacteria, such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus*, as well as fungal entities such as *Aspergillus flavus* and *Candida albicans*, were detected. Finally, a simple morphotype identification of filamentous

**Table 7.** Morphological characteristics of the filamentous phage identified in the wastewater samples.

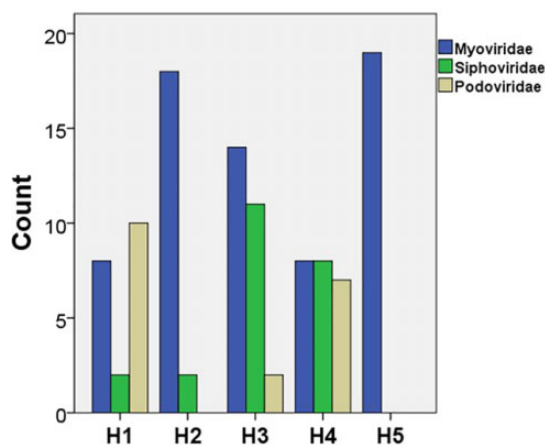
Hospital	Phage					
	<i>Myoviridae</i>		<i>Siphoviridae</i>		<i>Podoviridae</i>	
	R	SD	R	SD	R	SD
H1	0.982	0.113	1.197	0.195	1.010	0.145
H2	1.145	0.144	1.082	0.100	n.d.	n.d.
H3	1.095	0.142	1.053	0.132	1.033	0.289
H4	1.047	0.195	1.659	0.866	1.156	0.195
H5	1.143	0.140	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

H1–H5 refer to the five hospitals sampled in the study. The morphological characteristics, namely the ratio between head length/head diameter (R), was used to identify the type of filamentous phage. n.d. = not detected; SD = standard deviation. ANOVA statistics:  $F$ -ratio = 3.58; significance between groups  $p = 0.031$ .

phage was performed, in order to compare their incidence in the individual hospital wastewater samples (see Table 7 and Figure 6). Examples of the biodiverse microbiota, as detected by electron and bright field microscopy in the hospital wastewater samples, are illustrated in Figure 7.

## Discussion

In our previous publication, we studied the potential ecotoxicity of hospital effluents.<sup>22</sup> In this current study, we obtained



**Figure 6.** The incidence of filamentous phage particles in the hospital wastewater samples. H1–H5 refer to the five hospitals sampled in the study. According to the previously published morphometric rule,<sup>19</sup> particles with a tail length (tl) < 40 nm were classified as *Podoviridae*, and the tail diameter (td) measurement was used to classify viruses with longer tails as *Myoviridae* (td ≥ 16 nm) or *Siphoviridae* (td < 16 nm). Chi-squared tests, asymptotic significance (2-sided)  $p < 0.001$ .

additional data about the potential hazards of the hospital wastewater by using a broader battery of *in vitro* biomonitoring assays that are relevant to human health effects. The evaluation of cytotoxicity is considered to be a useful initial step in determining the potential genotoxicity of a test substance.<sup>27</sup> Confirmed cytotoxicity is often considered in association with the concentration at which an increased incidence of genotoxicity or enhanced mutation frequency occurs. This means that genotoxic compounds commonly show positive effects in *in vitro* genotoxicity assays at low levels of concurrent cytotoxicity. For example, the upper limits of cytotoxicity have been defined as a greater than 50% reduction in cell number or culture confluency, or 50% inhibition of the mitotic index. On the other hand, a high cytotoxicity of a tested compound may disqualify its genotoxicity results (as being non-relevant or threshold results). This phenomenon may frequently be associated with a compound that is cytotoxic as a result of its indirect action on DNA — for example, when a compound is above a certain critical level, it might affect DNA by mechanism(s) and cellular physiological processes that may not be operative at doses below that critical threshold. To distinguish true genotoxins from those acting indirectly in this manner, the detailed quantitation of cytotoxicity is a necessity.

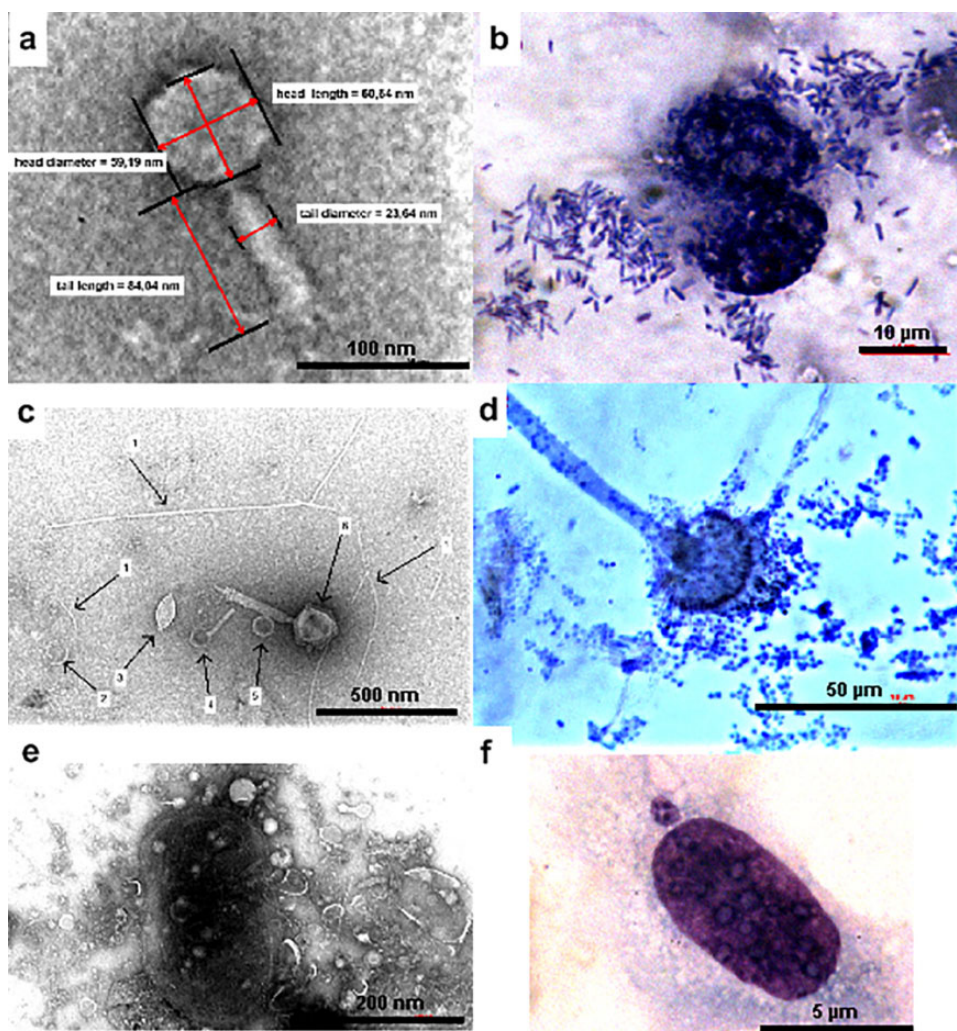
In this study, no cytotoxic effects on the proliferation of mouse 3T3 BALB/c fibroblasts were apparent, for either the further processed or non-processed hospital wastewater samples. It should be noted here that some differences were observed regarding the physical parameters and inorganic element composition of the individual hospital wastewater samples tested, namely: conductivity; ‘dissolved substances’; and iodine concentration. In this respect, the conductivity and

‘dissolved substances’ content of H5, as well as the iodine concentration of H2, were relatively higher than the other samples tested. Moreover, it is noteworthy that the aluminium levels (at 1.3 to 3.7 mg/ml) were found to be high in all of the hospital samples tested (H1–H5), as compared to the levels of the other inorganic elements analysed (Hg, I, Ag, Gd, Pt and Pb). Aluminium has long been utilised in various medical applications — for example, as an adjuvant in vaccines and as an inert metal coating for medical surfaces.

Iodine concentrations in the hospital wastewaters were found to be in the range of 86 to 1577 µg/ml, and this could originate from various iodine treatment procedures in the clinical setting. Neither aluminium nor iodine levels exceeded the EQS (Environmental Quality Standard), according to Government Regulation No. 401/2015 Coll.<sup>28</sup> for wastewaters discharged into surface water. Hospital wastewater is destined to become drinking water after passage through a water treatment plant, and as such the concentrations of both of these elements (aluminium and iodine) should be carefully monitored. In general, although higher levels of iodine exposure may occur in specific instances, extended periods of exposure to this element are still thought to be unlikely, and a guideline value for daily iodine exposure has not been recommended as yet. However, an adequate iodine intake of between 70 and 200 µg/day, and upper total intake levels of 1100 µg/day, have been proposed by the World Health Organisation.<sup>29</sup>

To monitor processes in the wastewater treatment plant, conductivity estimates can be used as an indicator of water quality (for guidance), especially as a function of the amount of dissolved salt.<sup>30</sup> A high conductivity estimate is commonly associated with corrosion in the sewage pipe network,<sup>31</sup> and microbial nutrient removal has also been proposed to reduce the conductivity of wastewater through the reduction of inorganic species such as phosphate, nitrate, carbonate, bicarbonate, chloride and sulphate.<sup>32,33</sup> Nevertheless, the abundance of microbiota and bacteriophage, in association with urine and faecal contamination, may affect the levels of inorganic or organic elements (including solid particles) in hospital wastewater. Wastewater treatment plants are relatively able to reduce the presence of bacteria in their final product of effluent water. However, any genetic material or phage present can escape such treatment. Virions cannot ordinarily be removed by conventional filter systems designed for bacterial removal. Some extent of virus removal through filtration systems is possible, if they are closely attached to bacteria or to solid particles. For example, most wastewaters entering a treatment plant contain a bacteriophage load of between  $10^5$  and  $10^8$  plaque forming units (pfu) per litre.<sup>34–37</sup> Through conventional treatments, these numbers can still be reduced significantly. It has been shown that certain phage (e.g. coliphage) are more sensitive to filtration processes than the majority of other phage.<sup>38</sup> While the current technologies implemented in wastewater plants are efficient in





**Figure 7.** The biodiversity of the hospital wastewater microbiota, as detected by TEM and bright field microscopy. TEM and bright field microscopy (BFM) examination of hospital wastewater, showing: a) Indications for phage morphology parameter measurement (TEM); (b) bacterial overgrowth of a 3T3/c mouse fibroblast culture (BFM); c) phage morphotype detection (TEM): namely, *Inoviridae* [1], a *Cystoviridae* fragment [2], *Fuselloviridae* [3], *Siphoviridae* [4], and *Microviridae* [5 and 6]; (d) *Aspergillus flavus* with conidia and conidiospores in DMEM culture (BFM); e) viral infection and bacteria lysis (TEM); (f) 3T3/c BALB fibroblast with nucleolus (BFM). Uranyl acetate stain was used for images (a), (c) and (e); Giemsa-Romanowski stain was used for images (b), (d) and (f).

Note: The colour version of this image is available online.

removing most bacterial species, it is evident that bacteriophage survive the treatment processes, thus affecting the bacterial infection load of the wastewater.

### Genotoxicity and mutagenicity of hospital wastewater

No single *in vitro* or *in vivo* test for the detection of mutagenicity or genotoxicity can adequately detect gene mutations as well as structural and numerical chromosomal damage. Therefore, a battery of tests usually needs to be applied. Numerous OECD-validated *in vitro* methods are currently available to evaluate genotoxic effects in somatic cells, and many of these methods have practical relevance in regulatory safety assessment.<sup>39</sup>

One highly effective tool for the evaluation of genotoxicity is the Comet assay (or 'single cell gel electrophoresis'), which is a very sensitive test that can be performed with any type of eukaryotic cell, as long as it can be individually isolated. The alkaline (pH > 13) Comet assay was developed to permit the detection of DNA single-strand breaks, alkali-labile sites, DNA-DNA or DNA-protein cross-linking and single-strand breaks related to incomplete excision repair sites.<sup>40</sup> Compared to other genotoxicity tests, the major advantage of this assay is its high sensitivity for the detection of very low levels of DNA damage.<sup>41</sup> When the Comet assay was performed in the current study, both with 3T3 BALB/c fibroblasts and embryonal chicken hepatocytes (CEGA), overall

positive outcomes indicative of genotoxicity were obtained with all tested groups and both cell types.

With regard to mutagenicity testing with the Ames test, none of the hospital wastewater samples tested exhibited any mutagenic effects. Analogous findings have been documented in other studies.<sup>42</sup> However, numerous studies have proposed that any potential mutagenic effects of hospital wastewaters perhaps remained undetected because of sample filtration, which may lead to the removal of toxicants.<sup>43</sup> It is likely that this crucial phenomenon might have similarly affected the results of the Ames test in the current study. The hospital wastewater samples had to be further processed prior to the assay, by passing through an appropriate filter series because overgrowth by unspecified microbial contamination that otherwise occurred. One final important point to consider is that, with regard to the results of the Comet assay and Ames test, one should keep in mind that a species-specific response to toxicity exists. The bacterial response to toxicity is a mutation to adapt and survive, whereas the mammalian cell default reaction to toxicity is predominantly cell death.<sup>44</sup>

### Chicken embryo exposure

In contrast to other 'animal-free' micronucleus assays, the physiological conditions of the incubated hen's egg are more similar to the conditions present in mammals than those of any other *in vitro* systems. The incubated hen's eggs are used to monitor micronucleus induction in erythroid cells formed in the yolk sac. This approach provides a simple and rapid indirect measure of induced structural and numerical chromosome aberrations.<sup>17</sup> Here, a significant increase in the number of micronuclei in circulating peripheral erythrocytes was detected after exposure to the non-processed (i.e. neither filtered nor autoclaved) hospital wastewater samples. The onset of fetal erythropoiesis might be an alert signal for potential cytotoxic effects. In the current study, this was demonstrated by an increased frequency of polychromatic definitive erythrocytes (PCE). However, the appearance of a disproportionate increase in the frequency of PCE<sub>early</sub> among the PCE<sub>early/middle/late</sub> population might be a significant endpoint along the continual decrease in the PCE/NCE ratio that is used as a proliferation marker. This ratio can also indicate chromosomal instability and signal potential micronuclei formation. These positive outcomes might indicate both inherent metabolic activity and an incompetency of the chicken embryo immune system during the early incubation periods.

A low chicken embryo survival rate was continually apparent in this assay, despite the fact that no cell cytotoxicity was detected in mouse 3T3 BALB/c fibroblast cultures. Nearly all of the chicken embryos died within 72 hours post-exposure, and this high mortality rate following exposure to further non-processed hospital wastewater is particularly worrying. Indeed, exposure to hospital wastewater involves potential contact with a number of

unknown pathogens and toxins, and while acute or subacute effects are well-known, the evidence related to long-term exposure is less clear.

When 3T3 BALB/c fibroblast cultures were visualised under the microscope, a plethora of microbial entities was apparent. Particularly, the identification of *Aspergillus flavus* contamination could be a potential life-threatening issue, and this could perhaps be the reason for the early fetal chicken mortality and embryotoxicity. Fungi are known to occur widely in wastewaters, and *Aspergillus* spp. is the second most common isolate identified during sewage treatment.<sup>45</sup> Health hazards associated with the inhalation of wastewater aerosols, including those containing the conidia of *Aspergillus* spp., have been reported.<sup>46</sup> Aflatoxin B1 is produced by two specific *Aspergillus* spp., and exposure may result in severe health problems, including cancers arising from mutagenesis and carcinogenesis. One of the main mechanisms of aflatoxin B1-induced carcinogenesis is its biological activation and interaction with DNA.<sup>47</sup> Aflatoxins are highly thermostable. However, studies have shown that aflatoxin B1 levels are significantly reduced by heating at temperatures between 100 and 150°C for 90 minutes. Our data support this observation, since chicken embryos that were exposed to hospital wastewater samples that had been further processed by autoclaving at 121°C for 1.5 hours, had a markedly improved survival rate.

### The impact of the microbiota

As mentioned above, in contrast with the poor survival rate exhibited by the exposed chicken embryos, no cytotoxic effects were detected in *in vitro* tissue cultures. The 3T3 BALB/c fibroblasts proliferated well, even in the presence of bacteria overgrowth and under an antibiotic shield, as was demonstrated microscopically. In some respects, exposure to microbial contamination can in fact be considered as exposure to microbial exotoxins and endotoxins. The use of pharmaceuticals in hospitals, including antibiotic and cytostatic drugs, can lead to the release of residues of these and other drugs into the environment, and this could promote the development of antibiotic resistant bacteria.<sup>48</sup> In this study, the filter paper method for the detection of bacteria on MacConkey agar demonstrated the survivability of a range of bacteria in hospital wastewater disinfected prior to release by a chlorination treatment. TEM microscopy examination documented an extensive microbiota contamination in the hospital wastewaters sampled.

A difference was identified between the incidence of the *Myoviridae* phage family (which was generally more prevalent) and that of *Siphoviridae* or *Podoviridae* families. In particular, none of the latter two phage types were identified in the samples from hospital H5. This might indicate a higher resilience of *Myoviridae* virions and/or a greater resistance of their bacterial hosts to the disinfection

treatment. In a study into the biodiversity of bacteriophage in urban sewage,<sup>49</sup> the *Myoviridae* family were more frequently evident than other phage types, under conditions that were potentially challenging to their respective host bacteria.

Such challenging environmental conditions may affect not only the survivability of phage and bacterial species but also their diversity. Bactericidal treatments, including chlorination, decrease the survivability of bacteria and lessen the infection load of the wastewater. However, a fraction of the bacteria may still survive the disinfection treatment. Moreover, bacteriophage can also survive the disinfection processes and remain able to infect the microbiota, transfer resistance genes and establish a reservoir of antibiotic resistant bacteria.<sup>50</sup> Phage can not only kill bacteria, but can also alter their pathogenicity, lending them virulence while acting as prophage.<sup>51</sup> Phage themselves can carry virulence genes and non-phage DNA is frequently packaged in phage capsids and transferred into other bacteria upon downstream phage infection.

Furthermore, microbial entities may generate free radicals that cause nuclear genomic damage. This damage may involve a single gene or a block of genes. It is well-known that protein genotoxins can target cellular DNA, causing single and double strand breaks. Keeping in mind that the chlorinated hospital wastewater that is discharged to urban sewage or other water flow systems was tested in this study, the results obtained require appropriate attention. In view of the evident surviving microbiota, and presumably the presence of microbiome residues, including genes encoding antibiotic resistance, the potential inadequacy of current disinfection procedures needs further elucidation and more in-depth study. Culture-independent methods, such as direct DNA sequencing, can be used to reveal the entire toxin or microbiome profile of hospital wastewater. In addition, as this study shows, *in vitro* cell-based models are feasible and appropriate, and as such could be used for these types of studies.

## Conclusions

All the hospital wastewater samples tested in this study could be classified as potentially genotoxic with respect to the results of individual *in vitro* assays, except the bacterial reverse mutation test (Ames assay). However, the performance of this assay was strongly limited by the presence of bacterial contamination, with the procedures necessary for its removal potentially interfering with the assay results obtained. The microbial contamination in the samples appeared to play a particularly important role in the chicken embryo assay (CEGA). The relatively high frequency of nuclear abnormalities could be considered to be a significant indicator of chromosomal instability, potentially leading to pre-mutagenic lesions and

genotoxicity risk. Moreover, the overall positive results of the mammalian *in vitro* Comet assays in this study could be readily linked to these observations.

Based on an in-depth understanding of *in vivo* and *in vitro* toxicological processes, new specific toxicological endpoints should be defined, in order to facilitate an expanded evaluation of the issues and concerns arising from this study. The implementation of an efficient and robust *in vitro* testing strategy, based on molecular methods (such as specific, multiplex and real-time PCR, DNA sequencing, hybridisation techniques, etc.) is urgently needed. For screening purposes, however, *in vitro* biomonitoring assays, which assess genotoxicity without any prior knowledge of each toxicant's identity and/or its physicochemical properties, could be reasonably applied. Nevertheless, with regard to the *in vitro* genotoxicity testing of wastewater, it is important to consider the potential differences between results obtained from further processed (i.e. filtered or autoclaved) and non-processed samples, as demonstrated in this study. Finally, it must be mentioned that adequate public health and environmental policies should be established, in order to properly evaluate and ensure hospital wastewater safety, both to humans and the wider environment.

## Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Ethical approval

Ethics approval was not required for this research paper.

## Informed consent

Informed consent was not required for this research paper.

## Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Supported by the ERDF/ESF project, 'International Competitiveness of NIPH in Research, Development and Education in Alternative Toxicological Methods' (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000860), and by the Ministry of Health, Czech Republic — Conceptual Development of Research Organisation (National Institute of Public Health — NIPH, IN: 75010330).

## References

1. Hawkshead JJ. Hospital wastewater containing pharmaceutically active compounds and drug-resistant organisms: a source of environmental toxicity and increased antibiotic resistance. *J Residuals Sci Technol* 2008; 5: 51–60.
2. Váľitalo P, Kruglova A, Mikola A, et al. Toxicological impacts of antibiotics on aquatic micro-organisms: a mini-review. *Int J Hyg Environ Health* 2017; 220: 558–569.

3. Yilmaz G, Kaya Y, Vergili I, et al. Characterization and toxicity of hospital wastewaters in Turkey. *Environ Monit Assess* 2017; 189: 55.
4. Beltifa A, Alibi S and Mansour HB. Monitoring hospital wastewaters for their probable genotoxicity. *J Water Health* 2020; 18: 1–7.
5. Christoff AP, Sereia AFR, Hernandez C, et al. Uncovering the hidden microbiota in hospital and built environments: new approaches and solutions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2019; 244: 534–542.
6. Larsson DGS. Antibiotics in the environment: a review. *Ups J Med Sci* 2014; 119: 108–112.
7. Menyhárt O, Harami-Papp H, Sukumar S, et al. Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1866: 300–319.
8. Comeau A, Hatfull G, Krisch H, et al. Exploring the prokaryotic virosphere. *Res Microbiol* 2008; 159: 306–313.
9. Czech Agency for Standardisation. Technical Standard ČSN 75 7342:2013. Water quality — determination of temperature, <http://seznamcsn.agentura-cas.cz/Vysledky.aspx> (2013, accessed 26 February 2021).
10. International Organization for Standardization. ISO 10523: 2008. Water quality — determination of pH, <https://www.iso.org/standard/51994.html> (2008, accessed 26 February 2021).
11. International Organization for Standardization. ISO 7888: 1985. Water quality — determination of electrical conductivity, <https://www.iso.org/standard/14838.html> (1985, accessed 26 February 2021).
12. Czech Agency for Standardisation. Technical Standard ČSN 75 7346:2002. Water quality — determination of dissolved substances, <http://seznamcsn.agentura-cas.cz/Vysledky.aspx> (2002, accessed 26 February 2021).
13. International Organization for Standardization. ISO 7393-2: 2017. Water quality — determination of free chlorine and total chlorine — Part 2: colorimetric method using *N,N*-diethyl-1,4-phenylenediamine, for routine control purposes, <https://www.iso.org/standard/65560.html> (2017, accessed 26 February 2021).
14. EURL ECVAM. *DB-ALM Protocol No. 46: BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Cytotoxicity Test*. Ispra: EURL ECVAM, 2013, 13 pp.
15. OECD. *Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2020, 11 pp.
16. European Commission. *Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Off J Euro Union* 2010; L276, 20.10.2010: 33–77.
17. Wolf T, Niehaus-Rolf C, Banduhn N, et al. The hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN): novel analyses with a series of well-characterized substances support the further evaluation of the test system. *Mutat Res* 2008; 650: 150–164.
18. Manisova B, Binder S, Malina L, et al. Phthalocyanine-mediated photodynamic treatment of tumoural and non-tumoural cell lines. *Anticancer Res* 2015; 35: 3943–3951.
19. Ackermann HW. Tailed bacteriophages: the order *Caudovirales*. *Adv Virus Res* 1998; 51: 135–201.
20. Smither R. Rapid screening for significant bacteriuria using a Coulter Counter. *J Clin Pathol* 1977; 30: 1158–1162.
21. Ryan WL, Hoody S and Luby R. A simple quantitative test for bacteriuria. *J Urol* 1962; 88: 838–840.
22. Jirova G, Vlkova A, Wittlerova M, et al. Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays. *Neuro Endocrinol Lett* 2019; 39: 441–453.
23. Mandelkow R, Gumbel D, Ahrend H, et al. Detection and quantification of nuclear morphology changes in apoptotic cells by fluorescence microscopy and subsequent analysis of visualized fluorescent signals. *Anticancer Res* 2017; 37: 2239–2244.
24. Lorenzo Y, Costa S, Collins AR, et al. The Comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis* 2013; 28: 427–432.
25. Marple B, Roland P and Benninger M. Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in nasal solutions: an overview of conflicting data and opinions. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 131–141.
26. Ferk F, Misik M, Hoelzl C, et al. Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB) — two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations. *Mutagenesis* 2007; 22: 363–370.
27. Fowler P, Smith R, Smith K, et al. Reduction of misleading (“false”) positive results in mammalian cell genotoxicity assays. II. Importance of accurate toxicity measurement. *Mutat Res* 2012; 747: 104–117.
28. Anon. Government Regulation No 401/2015 Coll. on the indicators and values of permissible surface water and wastewater pollution, details of the permit to discharge wastewater into surface water and sewage systems, and on sensitive areas, <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2015-401/zneni-20160101> (2016, accessed 26 February 2021).
29. WHO. *Iodine status worldwide: Global WHO Database on Iodine Deficiency*. Geneva: World Health Organisation, 2004, 58 pp.
30. Levlin E. Conductivity measurements for controlling municipal waste-water treatment. In: Plaza E and Levlin E (eds) *Research and application of new technologies in wastewater treatment and municipal solid waste disposal in Ukraine, Sweden and Poland: proceedings of a Polish–Swedish–Ukrainian seminar*. Stockholm: KTH Royal Institute of Technology, 2010, pp. 51–62.
31. Lee H, Rasheed U and Kong M. A study on the comparison of corrosion in water supply pipes due to tap water (TW) and reclaimed water (RW). *Water* 2018; 10: 496.



32. Maurer M and Gujer W. Monitoring of microbial phosphorus release in batch experiments using electric conductivity. *Water Res* 1995; 29: 2613–2617.
33. Sonune A and Ghate R. Developments in wastewater treatment methods. *Desalination* 2004; 167: 55–63.
34. Hantula J, Kurki A, Vuoriranta P, et al. Ecology of bacteriophages infecting activated sludge bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 2147–2151.
35. Carducci A and Verani M. Effects of bacterial, chemical, physical and meteorological variables on virus removal by a wastewater treatment plant. *Food Environ Virol* 2013; 5: 69–76.
36. Yahya M, Hmaied F, Jebri S, et al. Bacteriophages as indicators of human and animal faecal contamination in raw and treated wastewaters from Tunisia. *J Appl Microbiol* 2015; 118: 1217–1225.
37. McMinn BR, Ashbolt NJ and Korajkic A. Bacteriophages as indicators of faecal pollution and enteric virus removal. *Lett Appl Microbiol* 2017; 65: 11–26.
38. Jebri S, Hmaied F, Yahya M, et al. Total coliphages removal by activated sludge process and their morphological diversity by transmission electron microscopy. *Water Sci Technol* 2016; 74: 318–323.
39. Dal Negro G, Eskes C, Belz S, et al. One science-driven approach for the regulatory implementation of alternative methods: a multi-sector perspective. *Regul Toxicol Pharmacol* 2018; 99: 33–49.
40. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184–191.
41. Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35: 206–221.
42. Ferik F, Misik M, Grummt T, et al. Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward. *Mutat Res* 2009; 672: 69–75.
43. Kreuzinger N, Fuerhacker M, Scharf S, et al. Methodological approach towards the environmental significance of uncharacterized substances quaternary ammonium compounds as an example. *Desalination* 2007; 215: 209–222.
44. Kirkland D, Zeiger E, Madia F, et al. Can *in vitro* mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or *in vivo* genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014; 775–776: 55–68.
45. Fakhrol-Razi A, Alam MZ, Idris A, et al. Filamentous fungi in Indah Water Konsortium (IWK) sewage treatment plant for biological treatment of domestic wastewater sludge. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2002; 37: 309–320.
46. Tang JW, Li Y, Eames I, et al. Factors involved in the aerosol transmission of infection and control of ventilation in health-care premises. *J Hosp Infect* 2006; 64: 100–114.
47. Fetaih HA, Dessouki AA, Hassanin AA, et al. Toxopathological and cytogenetic effects of aflatoxin B1 (AFB1) on pregnant rats. *Pathol Res Pract* 2014; 210: 1079–1089.
48. Druzhinin VG, Matskova LV and Fucic A. Induction and modulation of genotoxicity by the bacteriome in mammals. *Mutat Res* 2018; 776: 70–77.
49. Jurczak-Kurek A, Gąsior T, Nejman-Faleńczyk B, et al. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Sci Rep* 2016; 6: 34338.
50. Lood R, Ertürk G and Mattiasson B. Revisiting antibiotic resistance spreading in wastewater treatment plants — bacteriophages as a much neglected potential transmission vehicle. *Front Microbiol* 2017; 21: 2298.
51. Canchaya C, Fournous G and Brüssow H. The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol Microbiol* 2004; 53: 9–18.

## **Studie IV**

### **Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos to Hospital Effluent Compared to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri***

Physiological Research

2020: 69 (4), S681- S691.

# Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos to Hospital Effluent Compared to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*

Martina WITTLEROVÁ<sup>1</sup>, Gabriela JÍROVÁ<sup>1,2</sup>, Alena VLKOVÁ<sup>1,2</sup>, Kristina KEJLOVÁ<sup>1</sup>, Marek MALÝ<sup>1</sup>, Tuula HEINONEN<sup>3</sup>, Zdeňka WITTLINGEROVÁ<sup>2</sup>, Magdaléna ZIMOVÁ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic, <sup>3</sup>Faculty of Medicine and Health Technology, Tampere University, Tampere, Finland

Received October 8, 2020

Accepted November 26, 2020

## Summary

The Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test was adopted by the Organisation for Economic Co-operation and Development as OECD TG 236 in 2013. The test has been designed to determine acute toxicity of chemicals on embryonic stages of fish and proposed as an alternative method to the Fish Acute Toxicity Test performed according to OECD TG 203. In recent years fish embryos were used not only in the assessment of toxicity of chemicals but also for environmental and wastewater samples. In our study we investigated the acute toxicity of treated wastewater from seven hospitals in the Czech Republic. Our main purpose was to compare the suitability and sensitivity of zebrafish embryos with the sensitivity of two other aquatic organisms commonly used for wastewater testing – *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. For the aim of this study, in addition to the lethal endpoints of the FET test, sublethal effects such as delayed heartbeat, lack of blood circulation, pericardial and yolk sac edema, spinal curvature and pigmentation failures were evaluated. The comparison of three species demonstrated that the sensitivity of zebrafish embryos is comparable or in some cases higher than the sensitivity of *D. magna* and *A. fischeri*. The inclusion of sublethal endpoints caused statistically significant increase of the FET test efficiency in the range of 1-12 %. Based on our results, the FET test, especially with the addition of sublethal effects evaluation, can be considered as a sufficiently sensitive and useful additional tool for ecotoxicity testing of the acute toxicity potential of hospital effluents.

## Key words

Fish Embryo Toxicity (FET) test • Hospital wastewater • Acute toxicity • Aquatic organisms • Sublethal endpoints

## Corresponding author

G. Jírová, National Institute of Public Health, Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10, Czech Republic. E-mail: gabriela.jirova@szu.cz

## Introduction

The Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET test) was adopted by the Organisation for Economic Co-operation and Development as OECD TG 236 in 2013 (OECD 2013). The method using fish embryos as the testing organisms has been primarily designed to determine acute toxicity of chemicals. Fish embryos as non-feeding developmental stages are not categorized as protected vertebrates according to the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes (European Parliament and Council 2010). Therefore, the FET test is considered as an alternative to experiments with adult fish with a good correlation with the Fish Acute Toxicity Test by OECD TG 203 (OECD 2019) as reported in studies by Lammer *et al.* (2009) and Dang *et al.* (2017). Recently, its use has been extended also to the assessment of complex mixtures (e.g. environmental samples, wastewater (WW), construction products). The zebrafish embryos represent a useful model with a wide range of possible applications in environmental hazard and risk assessment (Scholz *et al.* 2008). However, the FET test sensitivity to substances is variable and its applicability domain has not yet been fully defined (Dang *et al.* 2017, Sobanska *et al.* 2017).

Hospital wastewater (HWW) is a source of

diverse pollutants which may have negative impact mainly on the aquatic environment (Pérez-Alvarez *et al.* 2018). Hospital effluents are prone to higher ecotoxicological potential than urban wastewater (Laquaz *et al.* 2017). This fact is due to the content of wider spectrum and higher quantity of pharmaceutical compounds (Santos *et al.* 2010, Wiest *et al.* 2018) and other chemicals. In their review Orias and Perrodin (2013) highlighted a great diversity of the substances present within hospital effluents, and in some cases their high ecotoxicity. Due to the requirements of the EU Water Framework Directive (European Parliament and Council 2000), the quality of surface waters in the EU has been constantly improving in recent decades. One of the main objectives is to improve the treatment processes at WW treatment plants aiming to significantly reduce the discharge of undesirable substances, including pharmaceuticals, pesticides, industrial substances and human care products. Although HWW is mostly treated by WW treatment plants before discharge into the sewage system or the environment, numerous pharmaceuticals and other chemicals are insufficiently removed during treatment and end up in surface water (Wigh *et al.* 2016, Vålitalo *et al.* 2017). Therefore, in our research we investigated HWW to evaluate the efficacy of the treatment processes within the Czech Republic. Moreover, WW samples were selected from different hospital types and sizes with the intention to consider the variability of their composition.

In the review focused on conventional and alternative bioassays suitable for ecotoxicological evaluation of WW, Jirova *et al.* (2016) highlighted the need to supplement the conventional methods (based on bacteria, algae, crustaceans, fish and seeds) with the FET test as an alternative approach to vertebrate ecotoxicity tests and a useful tool for efficient detection of acute toxicity. However, scientific data regarding the sensitivity and suitability of the FET test for hospital effluent testing are scarce so far. Therefore, the primary objective of our study was to extend knowledge of this issue and make a comparative assessment of the tests based on the zebrafish embryos and other used aquatic species.

For the determination of ecotoxicity of WW from health care facilities, a battery of three bioassays with *Daphnia magna* (ISO 6341), *Aliivibrio fischeri* (ISO 11348-2) and *Desmodesmus subspicatus* (ISO 8692) is recommended by the Czech standard ČSN 756406 (2020). In the study investigating treated effluents from

five different hospitals, Jirova *et al.* (2018) concluded that the battery of three species consisting of *D. magna*, *A. fischeri* and *D. subspicatus* may be appropriate for routine testing of ecotoxicological potential of hospital effluents. For our purpose, based on the conclusions of foregoing and numerous other studies (Abbas *et al.* 2018, Ellepola *et al.* 2020, Laquaz *et al.* 2017, Li *et al.* 2017, Vasconcelos *et al.* 2017), *D. magna* and *A. fischeri* were selected as sufficiently sensitive comparative test organisms.

The international standard ISO 15088 was adopted in 2007 and its merit is to determine acute toxicity of WW to zebrafish eggs after 48 hpf (hours post fertilization) of exposure. Therefore, in the present study we compared the results of two final test exposure times 48 hpf (according to the ISO 15088) and 96 hpf (according to the FET test).

Based on their experience with the FET test, many authors recommend the inclusion of further endpoints to increase the sensitivity of the assay. Braunbeck *et al.* (2015) recommended more research to better define the domain of applicability of the FET test and suggested modifications of the method with addition of more endpoints for the detection of a multitude of toxic effects. In a comparative study, Stelzer *et al.* (2018) indicated the need to complement the FET test with sublethal metrics which would increase its efficiency, and also highlighted the necessity to validate this statement by further studies using other WW samples. For the aim of our study, in addition to the lethal endpoints of the FET test (coagulated embryos, lack of somite formation, non-detachment of the tail and lack of heartbeat), sublethal effects comprising delayed heartbeat, lack of blood circulation, pericardial and yolk sac edema, spinal curvature and pigmentation failures were evaluated.

In this study the WW samples from seven different hospitals were investigated to compare the suitability and sensitivity of zebrafish embryos with the sensitivity of two other aquatic organisms – *D. magna* and *A. fischeri*. Other purposes were to evaluate the sensitivity of the FET test after inclusion of sublethal parameters and to confirm the increase in efficiency of the method after prolongation of exposure time.

## Methods

### *Wastewater samples*

The samples were collected in 2019 from the outlets of WW treatment plants of seven different

hospitals located in the central, southern and eastern regions of the Czech Republic. Table 1 shows general characteristics of the hospitals and their WW treatment plants. The sample H1 was a mixture of treated HWW and untreated hospital laundry WW. One sample was

taken from each hospital. The samples were collected after treatment activities before discharging into the urban sewer system, stored in cooling boxes, transported to the laboratory and deep frozen at  $\leq 18$  °C prior to analysis.

**Table 1.** Characteristics of hospitals and their wastewater treatment plants.

Hospital	Type of hospital	Sizing (beds)	Wastewater treatment process	Wastewater generation ( $\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ )	Disinfection process
H1	General	476	Mechanical-Biological	10	$\text{Cl}_2$
H2	University	1006	Mechanical-Biological	50	NaClO
H3	University	2199	Mechanical-Biological	50-100	NaClO
H4	General	500	Mechanical-Biological	30-50	$\text{Cl}_2$
H5	General	423	Mechanical-Biological	40	Do not chlorinate
H6	General	1447	Mechanical-Biological	360	$\text{Cl}_2$
H7	University	1600	Mechanical-Biological	100-120	NaClO

#### Ecotoxicological tests

Ecotoxicological potential of hospital WW was described using three organisms which represented three trophic levels: *A. fischeri* (formerly *Vibrio fischeri*) as a decomposer, *D. magna* as a primary consumer and *Danio rerio* as a secondary consumer. Characteristics of bioassays used in the study are summarized in Table 2.

As a first step, undiluted samples were analyzed by means of *D. magna* and *D. rerio* assays. In the case of *A. fischeri* test, 80 % concentration of the sample was used in accordance with the method procedure. The

results were expressed as percentage of toxic effect on each species.

If the values of toxic effect exceeded 50 %,  $\text{EC}_{50}$  or  $\text{LC}_{50}$  (effective or lethal concentration of the sample that caused negative impact in 50 % of the tested organisms) were calculated by the probit method. The experiments were conducted using a series of increasing concentrations depending on the level of HWW toxicity.

Every test was performed in two independent runs and the results were expressed as mean.

**Table 2.** Characteristics of bioassays used in the study.

Method	Organism	Standard	Exposure time	Endpoint
<i>Daphnia immobilization test</i> ( <i>D. magna</i> )	<i>Daphnia magna</i>	ISO 6341	48 h	Immobility [%] $\text{EC}_{50}$ [%]
<i>Luminescence inhibition test</i> ( <i>A. fischeri</i> 15 min, 30 min)	<i>Aliivibrio fischeri</i>	ISO 11348-2	15 min 30 min	Luminescence inhibition [%] $\text{EC}_{50}$ [%]
<i>FET test</i> ( <i>FET</i> 48 h)	<i>Danio rerio</i> embryo	OECD TG 236	48 hpf	Mortality [%] $\text{LC}_{50}$ [%]
<i>FET test</i> ( <i>FET</i> 96 h)	<i>Danio rerio</i> embryo	OECD TG 236	96 hpf	Mortality [%] $\text{LC}_{50}$ [%]
<i>FET test</i> ( <i>FET</i> 96 h+sub)	<i>Danio rerio</i> embryo	OECD TG 236 modified	96 hpf	Mortality + sublethal effects [%] $\text{LC}_{50}$ [%]

hpf: hours post fertilization.

### Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test

The FET test was performed according to OECD TG 236 (OECD 2013). Three different protocols of the method were carried out: the test with basic exposure time 96 hpf (hours post fertilization), the test with reduction of exposure time to 48 hpf and the test with addition of five sublethal endpoints with exposure time 96 hpf.

The breeding stock of AB line of *D. rerio* wild type was maintained in Zebrafish Housing System ZebTEC Stand-Alone (Tecniplast) with continuous treatment and monitoring of important water parameters including pH, conductivity and temperature. Mature zebrafish aged between 6 and 18 months were used to obtain fertilized fish eggs, which were collected from a minimum of three breeding groups and selected for testing at random.

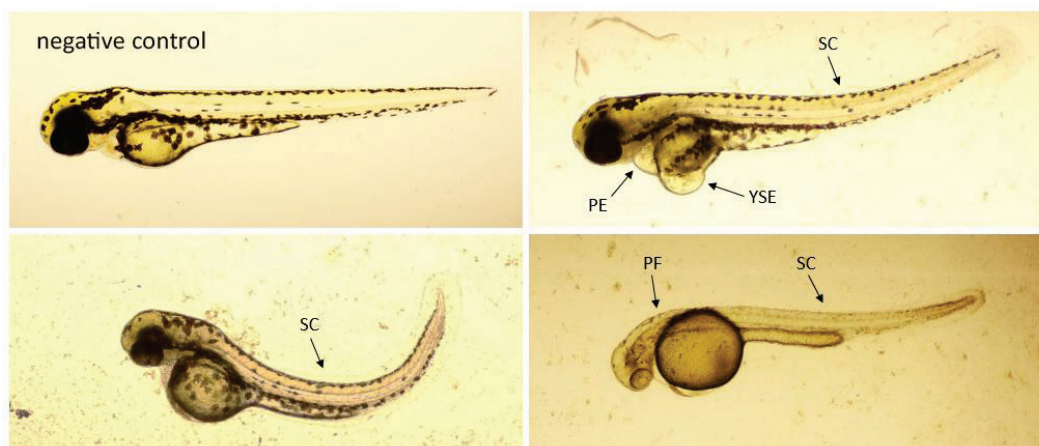
Spawning took place in two-liter breeding tanks which capitalize on the fish natural tendency to spawn in shallow water. After spawning, the eggs were rinsed with maintenance water adjusted to pH 6.5 to 7.5 and final hardness 70 to 100 mg·l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>. The eggs were checked under inverted microscope. Viable embryos maximally at the 16 cell-stage without obvious irregularities were individually placed into polystyrene 24-well plates and incubated under 26±1 °C with 16:8 light:dark cycle. Each well contained 2 ml of test solution. Five sample concentrations were prepared in each test run. 20 eggs per concentration were exposed to the samples. Dilution water with a final concentration of 294.0 mg·l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 123.3 mg·l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 63.0 mg·l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 5.5 mg·l<sup>-1</sup> KCl (as defined in ISO 7346-2) was used for the preparation of the test concentrations and negative controls. The sensitivity of embryos was controlled by

3,4-dichloroaniline (4 mg/l) as positive control in each test run. All experiments were carried out in a static way without change of exposure solution. The test was considered as valid when oxygen concentration was maintained above 80 % during the test and mortality in the negative controls did not exceed 10 %.

Embryos were observed for four lethal and five sublethal effects. Lethal parameters described in the OECD TG 236 (OECD 2013) comprised coagulation of embryos, lack of somite formation, non-detachment of the tail and lack of heartbeat. Added sublethal endpoints included delayed heartbeat, lack of blood circulation, presence of edema (pericardial or yolk sac), spinal curvature and pigmentation failures. Examples of the observed sublethal effects are illustrated in Figure 1. Embryos placed in the culture plates were examined separately using inverted microscope Olympus CKX53 equipped with a digital camera Canon EOS 2000D. For determination of heart rate, embryos were video recorded and heartbeat was counted when the video was slowed down. The heart rate of embryos exposed to the samples was evaluated in relation to the negative control groups.

The cumulative mortality of zebrafish embryos was recorded at 48 hpf (termed FET 48 h) and 96 hpf (termed FET 96 h) in experimental and control groups. The results were calculated as percentage of mortality (toxic effect) of the tested embryos, or as LC<sub>50</sub>.

After the addition of sublethal effects to the lethal endpoints, the embryos development was evaluated at 96 hpf (termed FET 96 h+sub). Sublethal criteria were counted only if lethal parameters were not observed. The results were calculated as percentage of toxic effects on the tested embryos, or as EC<sub>50</sub>.



**Fig. 1.** Representative sublethal abnormalities of zebrafish embryos after 96 hpf (hours post fertilization) exposure to the hospital wastewater samples. PE=pericardial edema, YSE=yolk sac edema, SP=spinal curvature, PF=pigmentation failure.

### *Daphnia immobilization test*

The acute toxicity test with *D. magna* Straus was carried out according to ISO 6341 (2012). Neonates (less than 24 h old specimens of *D. magna*) of at least third generation originated from laboratory culture were exposed to five designated dilutions of samples. 20 organisms were placed in each concentration and negative control (dilution water according to ISO 6341 was identical to the dilution water used in the FET test mentioned above) and incubated 48 h under the following test conditions: temperature  $20 \pm 2$  °C, 16:8 light:dark cycle, oxygen concentration  $\geq 2$  mg·l<sup>-1</sup>, no feeding. For the experiment validity, the inhibition of mobility in the negative controls had to be  $\leq 10$  %. The sensitivity of test organisms was monitored by regular tests with K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> used as positive control.

The results were expressed as percentage of *Daphnia* immobilization (toxic effect), or as EC<sub>50</sub> after 48 h exposure.

### *Aliivibrio bioluminescence inhibition test*

The luminescent bacteria test followed ISO 11348-2 (2007). The test was performed using liquid-dried bacteria *A. fischeri* NRRL-B-11177 (HACH LANGE). Bacteria were activated by rehydration with reactivation solution. For the experiments, the conductivity of the samples was  $>10$  mS·cm<sup>-1</sup>, pH 6.0 to 8.5 and oxygen concentration  $>3$  mg·l<sup>-1</sup>. 2 % NaCl solution was used as dilution water and negative control. The suspensions of bacteria and diluted samples (ten sample concentrations in replicates) were incubated at  $15 \pm 1$  °C. Luminescence was measured after 15 min and 30 min of exposure to the sample concentrations series by luminometer Sirius (Berthold Detection Systems). The bacteria sensitivity was controlled using positive control (ZnSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O).

The results were presented as percentage of inhibition of the bacteria light emission (toxic effect) with respect to the negative control, or as EC<sub>50</sub>.

### *Statistical analysis*

Linear mixed model was used to evaluate the results of the monitoring of wastewater ecotoxicity and to assess the difference between methods (fixed effect) while taking into account the variability between hospitals (random effect). The dependent variable was angularly transformed percentage (of toxic effect). Transformed percentages more closely approximate the normal distribution (Sokal and Rohlf 1995). When

statistically significant effects were identified, Šidák's multiple comparisons procedure was applied to ascertain which specific methods differed. Values of  $p < 0.05$  were considered as indicating a statistically significant result. All statistical analyses were performed using Stata software package, release 14.2 (Stata Corp LP, College Station, TX, USA).

## Results

### *Comparison of the methods sensitivity based on the toxic effects values*

To compare the sensitivity of three aquatic species to the acute toxicity of HWW, the samples from seven different hospitals were investigated. In the first part of the study, the percentage of immobility (*D. magna*), luminescence inhibition (*A. fischeri*), mortality and sublethal effects (*D. rerio* embryos) after exposure to HWW samples were expressed as toxic effects. The results are shown in Figure 2a. The obtained data demonstrated highly variable toxic impact of hospital effluents on the studied organisms. The tests FET 96 h and FET 96 h+sub indicated high sensitivity of zebrafish embryos to five samples out of seven samples (i.e. H1, H3-H6) with toxic effect values in the range of 62.5-100 %. The results of other methods for these five samples were more variable with values ranging from 0 % to 100 % of crustacean immobility and fish embryo mortality (FET 48 h) and from 0 % to 98.4 % of bacteria luminescence inhibition. Based on the results of all samples, no statistically significant differences were found between FET tests (FET 48 h, FET 96 h, FET 96 h+sub) and *D. magna* test ( $p=0.123$ ,  $p=0.507$ ,  $p=0.275$  respectively). However, the results showed statistically significant differences between FET 96 h and *A. fischeri* 15 min, 30 min ( $p=0.018$ ,  $p=0.024$  respectively) and between FET 96 h+sub and *A. fischeri* 15 min, 30 min ( $p=0.006$ ,  $p=0.008$  respectively).

### *Comparison of methods sensitivity based on the EC<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub> values*

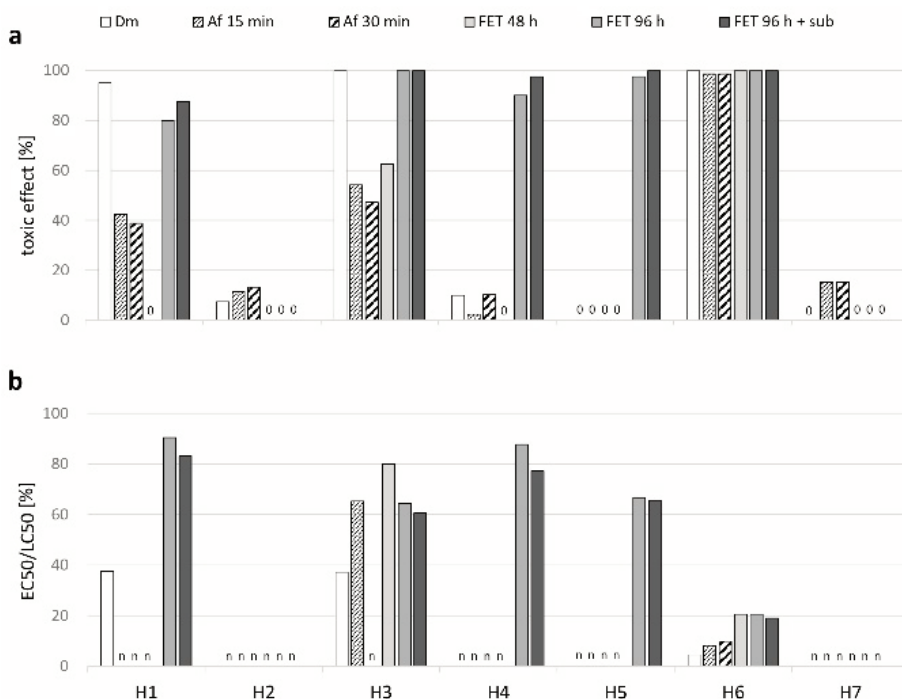
In the following study, if the values of toxic effect exceeded 50 % (H1, H3-H6), EC<sub>50</sub> or LC<sub>50</sub> values were calculated. The results are presented in Figure 2b. In the case of samples which were assessed as the most toxic and which negatively affected the majority of the test species (H1, H3, H6), *D. magna* was the most sensitive organism with EC<sub>50</sub> values ranging from 4.5 to 37.6 %. The method sensitivity to the samples H1 and

H3 decreased in the following order: *D. magna*>FET 96 h+sub>FET 96 h>*A. fischeri* 15 min>FET 48 h and to sample H6: *D. magna*>*A. fischeri* 15 min>*A. fischeri* 30 min>FET tests.

*Comparison within the FET tests*

When we made a comparison within the different protocols of the FET test, a decreasing sensitivity of each method was observed as follows: FET 96 h+sub>FET 96 h>FET 48 h. Mortality was manifested most frequently by lack of heartbeat, growth retardation, and less commonly by coagulation of embryos. As shown in Figure 2b, the inclusion of sublethal endpoints has reduced the LC<sub>50</sub> values for all samples with statistically

significant increment of the FET test sensitivity (p=0.026) in the range of 1-12 %. The presence of sublethal effects was variable not only between different samples but it also varied depending on the exposure time (Table 3). Prolonged exposure time caused a statistically significant increase of the zebrafish embryos sensitivity (p<0.001) in 57 % of the tested samples. The frequency of occurrence of sublethal criteria was: spinal curvature 34.5 %, lack of blood circulation 26.4 %, delayed heartbeat 25.7 %, pigmentation failures 12.7 %, occurrence of edema 0.7 % of all sublethal parameters we observed. According to Kimmel *et al.* (1995), embryos development in control groups was normal during all the experiments.



**Fig. 2.** Ecotoxicity of wastewater samples from different hospitals (H1-H7) expressed as: (a) toxic effect [%] of undiluted samples and (b) EC<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub> values [%]. Comparison between *Daphnia magna* (Dm), *Aliivibrio fischeri* (Af) and *Danio rerio* embryos. FET=Fish Embryo Acute Toxicity Test.

**Table 3.** Overview of the observed sublethal effects on zebrafish embryos after 48 hpf and 96 hpf (hours post fertilization) exposure to the wastewater samples from different hospitals (H1-H7). Sublethal effects were measured only if lethal effects were not observed.

Sublethal effects	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
	48 hpf/96 hpf						
<i>Delayed heartbeat</i>	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-
<i>Lack of blood circulation</i>	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-
<i>Presence of edema</i>	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-
<i>Spinal curvature</i>	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-
<i>Pigmentation failures</i>	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-

- not observed, + observed.



## Discussion

The problem of the discharge of chemical contaminants from hospitals into wastewater and subsequently into the aquatic ecosystems is well-known (Datel *et al.* 2020). The presence of micropollutants such as pharmaceuticals, disinfectants and personal care products in treated effluents poses considerable ecological risk for the aquatic environment (Meza *et al.* 2020, Rogowska *et al.* 2020). Numerous studies have been carried out to determine ecotoxicity of target substances commonly detected in HWW (Halling-Sørensen *et al.* 2000, Cleuvers 2003, Cleuvers 2005, Brandhof *et al.* 2010, Martins *et al.* 2012, Li *et al.* 2016, Romanucci *et al.* 2019). However, examination of individual target compounds, causing ecotoxicity does not enable to determine the interactions between all known and unknown hazardous substances which are present in HWW and to evaluate their overall impact on aquatic organisms. The mixture of two or more substances may produce synergistic, antagonistic and additive interactions which may increase or decrease the resulting WW ecotoxicity (Emmanuel *et al.* 2005, Godoy *et al.* 2019).

Therefore, it is necessary to investigate the whole effluent as a complex mixture of substances. In our present study a high variability of toxic effects of WW samples from individual hospitals on the used aquatic organisms was demonstrated. Similarly to these conclusions, Jírová *et al.* (2018) confirmed considerable different levels of ecotoxicity of treated wastewater from five hospitals. This variability relates to the different wastewater quality which may be influenced by a number of factors comprising current therapeutic procedures, the type and specialization of the hospital, its location, number of inpatients, flow rate, season, the day of the week and the daily period (Boillot *et al.* 2008). Good correlation was demonstrated between the amount of antibiotics in the wastewater and their volume currently being administered to patients (Hamjinda *et al.* 2015). Additionally, the insufficient degradability of certain substances during the cleaning process in the wastewater treatment plants causes the presence of residues of pollutants in wastewater (Li *et al.* 2017). A literary review showed that the quality of treatment processes is another important factor which affects the treated wastewater composition (Verlicchi *et al.* 2015).

A specific type of effluents is generated from the hospital laundry. It has a different composition from WW

produced by other hospital departments having a high concentration of organic and microbial loads depending on the washing stage. In the study of Kern *et al.* (2015), acute toxicity of hospital laundry WW was investigated by *D. magna* immobilization test and adult *D. rerio* lethality test. The obtained data showed extremely toxic impact on *D. magna* (48 h EC<sub>50</sub>=2.01 %) and lower acute toxicity for *D. rerio* (48 h LC<sub>50</sub>=29.25 %). In our study, the sample that can be considered as the most toxic (H6) because of its low EC<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub> values (Fig. 1), was the mixture of treated hospital WW and untreated laundry WW before discharging to the sewage system. It can be assumed that the high level of acute toxicity was caused by the complement of untreated laundry effluent to common HWW.

Ecotoxicological evaluation of WW should be performed using the battery of indicator organisms from different trophic levels as different species may show diverse levels of sensitivity to the pollutants. The results of our study, as well as those of Jirova *et al.* (2018), showed the suitability of *D. magna* and *A. fischeri* for routine testing of HWW ecotoxicity. To our knowledge, the information on effects of HWW on fish early life stages using the FET test, is scarce. Stelzer *et al.* (2018) compared the FET test and other standard fish protocols used worldwide for WW analyses. LC<sub>50</sub> value of untreated hospital effluent determined by the FET test was 53.5 %. Based on findings of this study, the zebrafish embryos may not represent the most sensitive developmental stage of *D. rerio* compared to larvae and juvenile. In another study, a mixture of urban and hospital effluents was evaluated for ecotoxicity by Wigh *et al.* (2016). After 96 h of exposure to the untreated WW, 100 % of zebrafish embryos died. The mortality decreased to 13 % after the WW treatment. The addition of sublethal criteria for evaluation, such as the presence of edema, blood circulation defects, malformation of the heart, yolk sac, tail, head, spine, an abnormal eye development and pigmentation, resulted in a considerable improvement of the test efficiency.

By adding sublethal parameters, we wanted to explore the potential of the FET test for the evaluation of hospital effluent toxicity. Our conclusions are in agreement with findings of numerous studies which have reported an increase in the FET test sensitivity after addition of sublethal endpoints (Babić *et al.* 2017, Krzykwa *et al.* 2019, Cedron *et al.* 2020). We selected five sublethal effects, which may be easily determined: delayed heartbeat, lack of blood circulation, presence of

edema (pericardial or yolk sac), spinal curvature and pigmentation failures. Tenorio-Chávez *et al.* (2020) investigated treated WW from one hospital using zebrafish embryos and obtained LC<sub>50</sub> value 6.1 %. EC<sub>50</sub> value of sublethal malformations was 2.5 % which means higher sensitivity of sublethal parameters compared to lethal endpoints. The main effects identified were pericardial edema, yolk sac malformation, hypopigmentation, hatching abnormalities, tail and chorda deformation, without fin, chorion and craniofacial malformation. Stelzer *et al.* (2018) observed an increase in embryo test sensitivity of >30 % after addition of three sublethal parameters comprising immobility, formation of edema and nonhatching.

According to our results, when we draw a comparison between FET 48 h and FET 96 h, we can see the increase in efficiency of the method caused by the prolonged exposure time from 48 hpf to 96 hpf. In our study, the LC<sub>50</sub> values of FET 48 h were constantly higher than those of FET 96 h. We are of the opinion that these findings could be related, besides other factors, to the chorion as a possible barrier for some chemicals, mainly substances with very high molecular weight (Braunbeck *et al.* 2015, Sobanska *et al.* 2017). This limit disappears during the hatching period of embryonic development from about 72 hpf to 96 hpf (Kimmel *et al.* 1995). Similar results were presented by Stelzer *et al.* (2018), who, based on analyses of HWW samples, discovered less sensitivity of FET 48 h (LC<sub>50</sub>=56.5 %) compared to FET 96 h (LC<sub>50</sub>=53.5 %).

## Conclusions

The Fish Embryo Acute Toxicity Test is used worldwide for ecotoxicological research as an alternative method to the experiments with adult fish. Considering the lack of scientific data regarding the suitability of *D. rerio* embryos as the testing organisms for HWW

investigation, the main purpose of our study was to make a comparison between zebrafish embryos and two other aquatic organisms commonly used for WW analyses.

The results of our study demonstrated highly variable toxic impacts of WW samples from different hospitals on all the test species. With respect to determining acute toxicity of HWW, the obtained data indicate that the sensitivity of zebrafish embryos is comparable or in some cases higher than the sensitivity of *D. magna* and *A. fischeri* and the FET test may be considered as a sufficiently effective and appropriate method for routine HWW testing.

The prolonged exposure time of the test from 48 hpf to 96 hpf significantly improved the sensitivity of zebrafish embryos in 57 % of the tested samples.

In addition to the lethal endpoints, five sublethal criteria were evaluated as a modification of the FET test. The inclusion of sublethal parameters comprising delayed heartbeat, lack of blood circulation, pericardial and yolk sac edema, spinal curvature and pigmentation failures caused statistically significant increase of the FET test sensitivity ( $p=0.026$ ) in the range of 1-12 %.

Our study highlights the necessity of further validation of the FET test applicability for the assessment of hospital effluents by examination of WW samples from a larger set of hospitals. The choice of a suitable battery of sublethal effects in addition to the lethal endpoints of the FET test may be recommended to extend the method efficiency.

## Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

## Acknowledgements

Supported by ERDF/ESF project "International competitiveness of NIPH in research, development and education in alternative toxicological methods" (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000860).

## References

- ABBAS M, ADIL M, EHTISHAM-UL-HAQUE S, MUNIR B, YAMEEN M, GHAFAR A, SHAR GA, TAHIR MA, IQBAL M: *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Sci Total Environ* 626: 1295-1309, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.066>
- BABIĆ S, BARIŠIĆ J, VIŠIĆ H, KLOBUČAR RS, TOPIĆ POPOVIĆ N, STRUNJAK-PEROVIĆ I, ČOŽ-RAKOVAC R, KLOBUČAR G: Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish embryo using multiple endpoint testing. *Water Res* 115: 9-21, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.049>
- BOILLOT C, BAZIN C, TISSOT-GUERRAZ F, DROGUET J, PERRAUD M, CETRE JC, TREPO D, PERRODIN Y: Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *Sci Total Environ* 403: 113-129, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.04.037>

- BRANDHOF EJ, MONTFORTS M: Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicol Environ Saf* 73: 1862-1866, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.031>
- BRAUNBECK T, KAIS B, LAMMER E, OTTE J, SCHNEIDER K, STENGEL D, STRECKER R: The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environ Sci Pollut Res* 22: 16247-16261, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3814-7>
- CEDRON VP, WEINER AMJ, VERA M, SANCHEZ L: Acetaminophen affects the survivor, pigmentation and development of craniofacial structures in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biochem Pharmacol* 174: 113816, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113816>
- CLEUVERS M: Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett* 142: 185-194, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7)
- CLEUVERS M: Initial risk assessment for three beta-blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59: 199-205, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.090>
- ČSN 75 6406: Wastewater discharge and treatment from health facilities, 2020.
- DANG Z, VAN DER VEN LTM, KIENHUIS AS: Fish embryo toxicity test, threshold approach, and moribund as approaches to implement 3R principles to the acute fish toxicity test. *Chemosphere* 186: 677-685, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.047>
- DATEL JV, HRABANKOVA A: Pharmaceuticals load in the Svihov water reservoir (Czech Republic) and impacts on quality of treated drinking water. *Water* 12: 1387, 2020. <https://doi.org/10.3390/w12051387>
- ELLEPOLA N, OGAS T, TURNER DN, GURUNG R, MALDONADO-TORRES S, TELLO-ABURTO R, PATIDAR PL, ROGELJ S, PIYASENA ME: A toxicological study on photo-degradation products of environmental ibuprofen: Ecological and human health implications. *Ecotoxicol Environ Saf* 188: 109892, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109892>
- EMMANUEL E, HANNA K, BAZIN C, KECK G, CLÉMENT B, PERRODIN Y: Fate of glutaraldehyde in hospital wastewater and combined effects of glutaraldehyde and surfactants on aquatic organisms. *Environ Int* 31: 399-406, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.08.011>
- EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL: DIRECTIVE 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action in the field of water policy (EU Water Framework Directive). *Official Journal of the European Union L* 327: 1-73, 2000.
- EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL: DIRECTIVE 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union L* 276: 33-79, 2010.
- GODOY AA, OLIVEIRA ÁC, SILVA JGM, JESUS AZEVEDO CC, DOMINGUES I, NOGUEIRA AJA, KUMMROW F: Single and mixture toxicity of four pharmaceuticals of environmental concern to aquatic organisms, including a behavioural assessment. *Chemosphere* 235: 373-382, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.200>
- HALLING-SØRENSEN B, HOLTEN LÚTZHØFT H-C, ANDERSEN HR, INGERSLEV F: Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 46: 53-58, 2000. [https://doi.org/10.1093/jac/46.suppl\\_1.53](https://doi.org/10.1093/jac/46.suppl_1.53)
- HAMJINDA NS, CHIEMCHAI SRI W, WATANABE T, HONDA R, CHIEMCHAI SRI CH: Toxicological assessment of hospital wastewater in different treatment processes. *Environ Sci Pollut Res* 25: 7271-7279, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4812-0>
- ISO 11348-2: Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 2: Method using liquid-dried bacteria, 2007.
- ISO 15088: Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*), 2007.
- ISO 6341: Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test, 2012.
- ISO 7346-2: Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]-Part 2: Semi-static method, 1999.
- ISO 8692: Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae, 2012.

- JIROVA G, VLKOVA A, WITTLEROVA M, DVORAKOVA M, KASPAROVA L, CHRZ J, KEJLOVA K, WITTLINGEROVA Z, ZIMOVA M, HOSIKOVA B, JIRAVOVA J, KOLAROVA H: Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays. *Neuro Endocrinol Lett* 39: 441-453, 2018.
- JIROVA G, WITTLINGEROVA Z, ZIMOVA M, VLKOVA A, WITTLEROVA M, DVORAKOVA M, JIROVA D: Bioindicators of wastewater ecotoxicity. *Neuro Endocrinol Lett* 37: 17-24, 2016.
- KERN DI, OLIVEIRA SCHWAICKHARDT R, LUTTERBECK CA, KIST LT, ALCAYAGA EAL, MACHADO ÊL: *Arch Environ Contam Toxicol* 68: 64-73, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0072-0>
- KIMMEL CHB, BALLARD WW, KIMMEL SR, ULLMANN B, SCHILLING TF: Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203: 253-310, 1995. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- KRZYKWA JC, SAEID A, JEFFRIES MKS: Identifying sublethal endpoints for evaluating neurotoxic compounds utilizing the fish embryo toxicity test. *Ecotoxicol Environ Saf* 170: 521-529, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.118>
- LAMMER E, CARR GJ, WENDLER K, RAWLINGS JM, BELANGER SE, BRAUNBECK T: Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Phys C* 149: 196-209, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>
- LAQUAZ M, DAGOT CH, BAZIN CH, BASTIDE T, GASCHET M, PLOY M-C, PERRODIN Y: Ecotoxicity and antibiotic resistance of a mixture of hospital and urban sewage in a wastewater treatment plant. *Environ Sci Pollut Res* 25: 9243-9253, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9957-6>
- LI Q, WANG P, CHEN L, GAO H, WU L: Acute toxicity and histopathological effects of naproxen in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Environ Sci Pollut Res* 23: 18832-18841, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7092-4>
- LI S-W, WANG Y-H, LIN AY-C: Ecotoxicological effect of ketamine: Evidence of acute, chronic and photolysis toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 143: 173-179, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.040>
- MARTINS N, PEREIRA R, ABRANTES N, GONÇALVES F, MARQUES CR: Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. *Ecotoxicology* 21: 1167-1176, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0871-x>
- MEZA LC, PIOTROWSKI P, FARNAN J, TASKER TL, XIONG B, WEGGLER B, MURRELL K, DORMAN FL, HEUVEL JPV, BURGOS WD: Detection and removal of biologically active organic micropollutants from hospital wastewater. *Sci Total Environ* 700: 134469, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134469>
- OECD: Test Guideline No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, Paris, France, 2019.
- OECD: Test Guideline No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, Paris, France, 2013.
- ORIAS F, PERRODIN Y: Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review. *Sci Total Environ* 454-455: 250-276, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.064>
- PÉREZ-ALVAREZ I, ISLAS-FLORES H, GÓMEZ-OLIVÁN LM, BARCELÓ D, DE ALDA ML, SOLSONA SP, SÁNCHEZ-ACEVES L, SANJUAN-REYES N, GALAR-MARTÍNEZ M: Determination of metals and pharmaceutical compounds released in hospital wastewater from Toluca, Mexico, and evaluation of their toxic impact. *Environ Pollut* 240: 330-341, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.116>
- ROGOWSKA J, CIESZYNSKA-SEMENOWICZ M, RATAJCZYK W, WOLSKA L: Micropollutants in treated wastewater. *Ambio* 49: 487-503, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01219-5>
- ROMANUCCI V, SICILIANO A, GALDIERO E, GUIDA M, LUONGO G, LIGUORI R, FABIO G, PREVITERA L, ZARRELLI A: Disinfection by-products and ecotoxic risk associated with hypochlorite treatment of tramadol. *Molecules* 24: 693, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24040693>
- SANTOS LHMLM, ARAÚJO AN, FACHINI A, PENA A, DELERUE-MATOS C, MONTENEGRO MCBSM: Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater* 175: 45-95, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>
- SCHOLZ S, FISCHER S, GÜNDEL U, KÜSTER E, LUCKENBACH T, VOELKER D: The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res* 15: 394-404, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z>

- SOBANSKA M, SCHOLZ S, NYMAN A-M, CESNAITIS R, ALONSO SG, KLÜVER N, KÜHNE R, TYLE H, KNECHT J, DANG Z, LUNDBERGH I, CARLON C, COEN W: Applicability of the Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (OECD 236) in the Regulatory Context of Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH). *Environ Toxicol Chem* 37: 657-670, 2017. <https://doi.org/10.1002/etc.4055>
- SOKAL RR, ROHLF FJ: *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 3rd Edition.* W.H. Freeman and Co., New York, 1995, 887 p.
- STELZER JAA, ROSIN CK, BAUER LH, HARTMANN M, PULGATI FH, ARENZON A: Is Fish Embryo Test (FET) According to OECD 236 sensible enough for delivering quality data for effluent risk assessment? *Environ Toxicol Chem* 37: 2925-2932, 2018. <https://doi.org/10.1002/etc.4215>
- TENORIO-CHÁVEZ P, CERRO-LÓPEZ M, CASTRO-PASTRANA LI, RAMÍREZ-RODRIGUES MM, OROZCO-HERNÁNDEZ JM, GÓMEZ-OLIVÁN LM: Effects of effluent from a hospital in Mexico on the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Sci Total Environ* 727: 1-11, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138716>
- VASCONCELOS EC, DALKE CR, OLIVEIRA CMR: Influence of select antibiotics on *Vibrio fischeri* and *Desmodesmus subspicatus* at  $\mu\text{g L}^{-1}$  concentrations. *J Environ Manage* 60: 157-164, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0841-4>
- VÄLITALO P, MASSEI R, HEISKANEN I, BEHNISCH P, BRACK W, TINDALL AJ, PASQUIER D, KÜSTER E, MIKOLA A, SCHULZE T, SILLANPÄÄ M: Effect-based assessment of toxicity removal during wastewater treatment. *Water Res* 126: 153-163, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.09.014>
- VERLICCHI P, AL AUKIDY M, ZAMBELLO E: What have we learned from worldwide experiences on the management and treatment of hospital effluent? - An overview and a discussion on perspectives. *Sci Total Environ* 514: 467-491, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.020>
- WIEST L, CHONOVA T, BERGÉ A, BAUDOT R, BESSUEILLE-BARBIER F, AYOUNI-DEROUCHE L, VULLIET E: Two-year survey of specific hospital wastewater treatment and its impact on pharmaceutical discharges. *Environ Sci Pollut Res* 25: 9207-9218, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9662-5>
- WIGH A, DEVAUX A, BROSELIN V, GONZALES-OSPINA A, DOMENJOUR B, AÏT-AÏSSA S, CREUSOT N, GOSSET A, BAZIN CH, BONY S: Proposal to optimize ecotoxicological evaluation of wastewater treated by conventional biological and ozonation processes. *Environ Sci Pollut Res* 23: 3008-3017, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5419-1>
-

## **Poster I**

### **Genotoxicity of wastewater from health care facilities**

21<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference TOXCON 2016

22. – 24. června 2016, Stará Lesná, Slovenská republika



# Genotoxicity of wastewater from health care facilities



Alena Vlková<sup>1,2</sup>, Zdeňka Wittlingerová<sup>1</sup>, Magdalena Zimová<sup>1,2</sup>,  
Gabriela Čárová<sup>1,2</sup>, Kristina Kejlová<sup>2</sup>, Stanislav Janoušek<sup>2</sup>, Dagmar Jírová<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic  
<sup>2</sup> Centre of Toxicology and Health Safety, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic  
\*alena.vlkova@szu.cz



## Introduction

Health care facilities use for therapeutic purposes, diagnostics, research, and disinfection a high number of chemical compounds such as pharmaceuticals (e.g. antibiotics, cytostatics, antidepressants), disinfectants, surfactants, metals, radioactive elements, bleach preparations, etc. Hospitals consume significant amounts of water (in the range of 400 to 1200 liters/day/bed) corresponding to the amount of wastewater discharge.

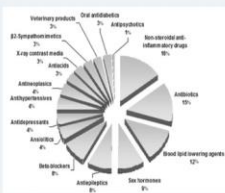
Some of these chemicals are not eliminated in wastewater treatment plants and are the source of pollution for surface and groundwater supplies. Hospital wastewater (WW) represents chemical and biological risks for public and environmental health as many of these compounds might be genotoxic and are suspected to contribute to the increased number of cancers observed during the last decades.

The presented poster summarizes the current situation in wastewater pollution from health care facilities with regard to genotoxicity and suitable biological tests.

## Sources of genotoxicity

### Pharmaceuticals (Phs)

- Around 3000 different Phs are used in human medicine in Europe
- Phs and their metabolites are persistent and bioaccumulative
- Phs and their metabolites in urine, stool and improper disposal enter via wastewater into the environment
- Phs are effective at very low concentrations from ng/l to µg/l
- Cytostatics exhibit intrinsic mutagenic effects
- Elimination of Phs in a wastewater treatment plant is 10% -90%



### Disinfectants

- Commonly used disinfectants are based on chlorine or contain aldehydes and their derivatives, classified as carcinogen I group (IARC)
- Chlorine reacts with organic substances present in wastewater, leading to the formation of chlorinated halogens (trichloromethane, tetrachloroethylene)



### Heavy metals

- Mercury is possibly carcinogenic to humans (IARC)
- Health care facilities contribute to cca 5% of mercury release to aquatic system in the UK
- More than 50% of total mercury emissions come from dental amalgam and medical devices
- Mercury is found in diagnostic substances (Thimerosal), disinfection (Merbromin), diuretics and medical equipment
- Cis-platinum is a widely used cytostatic, classified as carcinogen I group (IARC)



### Radioactive elements

- Patients undergoing radiotherapy release radioactive isotopes via their excreta
- The main concern is iodine 131, however, detection of this radioisotope in wastewater is reported below public dose limit (ICRP)

## Comparison of different genotoxicity studies on hospital WW

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 & Guerbart (2005)	France	71	65 % *	Ames fluct. test, SOS chromotest
Jolibois & Guerbart (2006)	France	38	82 % *	Ames fluct. test, SOS chromotest
Jolibois & Guerbart (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
Bogaliriy 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
Jabbour et al. (2016)	Libanon	90	46%	Ames fluct. test, SOS chromotest

\* positive at least one test, \*\* untreated samples, CA- chromosomal aberrations, MNC- micronucleus test

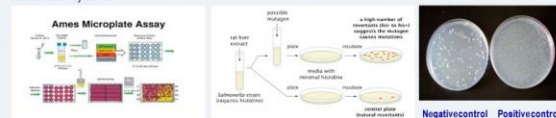
## Assessment of genotoxicity

The quantification of risk associated with chemical pollutants from health care facilities is extremely difficult as they usually occur in concentrations too low to allow analytical determination and the synergic effects of mixtures cannot be evaluated by means of chemical analytical methods. Therefore, genotoxicity is preferentially evaluated using biological tests which do not require the exact knowledge of toxicant identity and physico-chemical properties of the wastewater sample.

## Methods

### Ames agar plate test / Ames fluctuation test

The objective of this assay is to evaluate the mutagenic potential of test chemicals or mixtures by studying their effect on several histidine deficient strains *Salmonella typhimurium* in the absence and presence of liver metabolism system.



### SOS chromotest / Umu C test

The SOS chromotest (*Escherichia coli* PQ 37) and Umu C (*Salmonella typhimurium* Tat535 pSK 1002) are biological assays evaluating DNA damage or inhibition of DNA replication in cells with induced SOS repair system DNA. This colorimetric assay measures the expression of genes induced by genotoxic agents by means of a fusion with the structural gene for β-galactosidase.

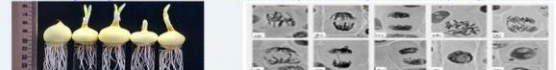
### Comet assay

The comet assay (single-cell gel electrophoresis) is a simple method for measuring DNA strand breaks in eukaryotic cells. Electrophoresis at high pH results in structures resembling comets, observed by fluorescence microscopy; the intensity of the comet tail relative to the head reflects the number of DNA breaks.



### Test Allium cepa

The Allium test is inexpensive and easy to perform. The root tip cells constitute a convenient system for macroscopic (growth, EC50) as well as for microscopic parameters (c-mitosis, stickiness, chromosome breaks, micronuclei). Since the cells possess important plant activation enzymes, results from the Allium test have shown good agreement with results from other cell systems, eukaryotic as well as prokaryotic.



### In vitro mammalian chromosomal aberration test

Cell cultures are exposed to the test substance both with and without metabolic activation. At predetermined intervals after exposure of cell cultures to the test substance, they are treated with metaphase-arresting substance (e.g. colchicine), harvested, stained and metaphase cells are analyzed microscopically for the presence of chromosomal aberrations.



## Wastewater treatment technologies

**Chemical oxidation** - formation of OH radicals from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by UV radiation, ozonation, Fenton reaction (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup> → HO• + OH• + Fe<sup>3+</sup>), radiolysis, electrolysis, photolysis

**Membrane processes** - nanofiltration, reverse osmosis, separation Phs from urine

**Activated carbon** - adsorption and incineration

Combinations of these techniques increase the efficiency of pollutant removal



## Conclusions

Results from the available scientific literature indicate that untreated wastewater from medical facilities frequently exhibits genotoxic effects. However, the evaluation of genotoxic effects of a given compound in wastewater is not an easy task due mainly to the variable characteristics of wastewaters, which depend on the type of hospital activity (care, diagnostic tests, analysis and research activities, numbers of inpatients or outpatients, etc.).

Further long-term and regular monitoring will be necessary for proper evaluation of the genotoxic risks posed by wastewater from health care facilities. In order to obtain relevant results, utilizable for the development of limits for the legal regulation of genotoxic substances contained in wastewaters, it will be essential to develop a single genotoxicity testing battery and produce standardized methodologies for the individual tests to enable comparison of the published results. In addition to the conventional chemical analysis, biological genotoxicity assays should be included as additional parameters in WW monitoring.

A more in-depth investigation should be conducted and specific treatment proposed with the aim to decrease the discharge of genotoxic chemicals into the local sewage system and environment.

In August 2013, in the framework of the adoption of Directive 2013/39/EU as regards 10 priority substances in the field of water policy, the Commission was asked to develop a strategic approach to pollution of water by pharmaceutical substances by the end of 2015 but the term has been prolonged until 2017.

The research was supported by Ministry of Health, Czech Republic - conceptual development of research organization (NIPH, IN: 75010330) and by ERDF/ESF project "International competitiveness of NIPH in research, development and education in alternative toxicological methods" (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/000/0860).

## **Poster II**

### **National Institute of Public Health - Contact Point and Reference Laboratory for Alternative Methods According to Directive 2010/63/EU**

22<sup>nd</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference TOXCON 2017

21.-23. června 2017, Plzeň, Česká republika



# National Institute of Public Health - Contact Point and Reference Laboratory for Alternative Methods According to Directive 2010/63/EU



Alena Vlková<sup>1,2</sup>, Kristina Kejlová<sup>1</sup>, Dagmar Jírová<sup>1</sup>, Dvořáková Markéta<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Centre of Toxicology and Health Safety, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup> Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic, <sup>3</sup> Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

## Introduction

Czech Republic as a member state of the EU has implemented the Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes into the Act No. 359/2012, amending Act No. 246/1992, on the protection of animals against cruelty. The new directive and amended act include the protection of animals used for scientific purposes and for toxicological testing. The aim of the new directive is the reduction of animals in tests (Reduction), refinement limiting their suffering (Refinement) and replacement of animal testing by alternative *in vitro* methods utilizing cells and tissues of human origin (Replacement).

## Member States are required by Directive 2010/63 / EU:

- to ensure support to alternative methods and disseminate information on their use
- to nominate a single point of contact to provide advice on the regulatory relevance and suitability of alternative approaches respecting the 3Rs, which becomes a member of PARERE network
- to nominate suitable specialized and qualified laboratories to the European Commission to carry out validation studies within the EU NETVAL network
- to establish a specific committee for the protection of animals for scientific purposes at the Ministry of Agriculture

The Ministry of Agriculture has nominated as the contact point and specialized laboratory the National Institute of Public Health (NIPH) in Prague, namely the National Reference Laboratory for Experimental Immunotoxicology at the Centre of Toxicology and Health Safety, headed by Dagmar Jírová, M.D., Ph.D.

Following a selection procedure, the nominated specialized laboratory at NIPH has been appointed into the network of 37 national reference laboratories (EU NETVAL). The appointment is based on internationally recognized scientific, personal and laboratory qualification of the facility in the field of development and implementation of alternative methods in toxicological practice, participation in a number of national and international scientific projects and personal reputation of team members, who were appointed as members of EURL-ECVAM Scientific Advisory Committee, or members of working groups and committees of the OECD and ECHA (European Chemical Agency).

The presented poster summarizes the range of activities of the contact point and reference laboratory.

## Main tasks of the Reference Laboratory and Contact Point

- basic and applied research in the area of alternative approaches
- participation in validation studies organized by EURL-ECVAM
- advice on validated and scientifically recognized alternative methods as a centre for information exchange within the Czech Republic
- information for professional, public and state administration authorities on the possibilities of using alternative methods for health risk assessment of chemicals and consumer products
- participation in working groups of ECVAM organizations, OECD and ICCVAM in the process of peer-review for new alternative approaches
- demonstrations and training in alternative approaches, seminars, training of the members of the committee for approval of experimental projects
- seminars for inspectors supervising the implementation of animal protection alternatives
- promoting dialogue between legislators, standards makers and industry representatives, biomedical scientists, consumer organizations and animal welfare associations, on the development, validation, legal recognition and use of alternative approaches

## Global cooperation on the validation of alternative methods



ECVAM European Centre for Validation of Alternative Methods  
 OECD Organization for Economic Co-operation and Development  
 PARERE Network for Preliminary Assessment of Regulatory Relevance  
 ESTAF ECVAM Stakeholder Forum  
 ESAC ECVAM Scientific Advisory Committee  
 EU NETVAL European Union Network of Laboratories for Validation of Alternative Methods  
 ICATM International Cooperation on Alternative Test Methods

## Alternative methods performed in NIPH

Preferred alternative methods are based on cells and tissues of human origin in model systems of tissues and organs *in vitro*.

## Assessment of local toxicity

### Irritation / corrosion for skin and mucous membrane

- **In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE)**  
OECD 431; Regulation (EC) No. 440/2008 (B.40a)
- **In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis**  
OECD 439; Regulation (EC) No. 440/2008 (B.46)

### Irritation / corrosion for eyes

- **Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane Test (HET-CAM)**  
INVITTOX Protocol No. 47 (<http://ecvam-dbaln.jrc.ec.europa.eu>)
- **Test on a Reconstructed Cornea Model**  
OECD 492; MatTek Corporation, SK - EpiOcular

### Skin absorption and penetration

- **Skin Absorption: In Vitro Method**  
OECD 428; Regulation (EC) No. 440/2008 (B.45)

### Skin sensitization

- **Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA**  
OECD 442A; Regulation (EC) No. 440/2008 (B.50)
- **In Chemico Skin Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay**  
OECD 442C; Regulation (EC) No. 440/2008 (B.59)
- **In Vitro Skin Sensitization: ARE/Nrf2 Luciferase Test Method**  
OECD No. 442D; Regulation (EC) No. 440/2008 (B.60)

### Phototoxicity

- **In Vitro: 3T3 NRU Phototoxicity Test**  
OECD 432; Regulation (EC) No. 440/2008 (B.41)
- **Phototoxicity Test on the 3D Skin Model EpiDerm**  
INVITTOX Protocol No.121 (<http://ecvam-dbaln.jrc.ec.europa.eu>)

## Assessment of systemic toxicity

### Acute toxicity

- **3T3 NRU In Vitro Cytotoxicity Test Method to Identify Substances Not Requiring Classification for Acute Oral Toxicity**  
OECD GD 126

### Genotoxicity / mutagenicity

- **Bacterial Reverse Mutation Test**  
OECD 471; Regulation (EC) No. 440/2008 (B.13/14)
- **In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test**  
OECD 473; Regulation (EC) No. 440/2008 (B.10)
- **Test Allium cepa**  
Validated by the International Program on Chemical Safety (IPCS)
- **In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**  
OECD TG 489; Regulation (EC) No. 440/2008 (B.62)
- **Mammalian Cells Micronucleus Test**  
OECD 487; Regulation (EC) No. 440/2008 (B.49)

### Reproductive - endocrine disruptors

- **In Vitro Assays to Detect ER/AR Agonists and Antagonists**  
OECD TG 455/457;
- **YES/YAS - Yeast based reporter gene assays**  
Using *Saccharomyces cerevisiae*

### Estimation of toxicological effects

- **QSAR analysis - Quantitative Structure - Activity Relationships**

Supported by Ministry of Health, the Czech Republic - conceptual development of research organization ("National Institute of Public Health - NIPH, IN: 75010330").



## **Poster III**

### **Cytotoxicity and Genotoxicity Hazard of Hospital Wastewaters Evaluated by Alternative *In Vitro* Assays**

25<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference TOXCON 2020

3. – 5. září 2020 Praha, Česká republika



# CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY HAZARD OF HOSPITAL WASTEWATERS EVALUATED BY ALTERNATIVE *IN VITRO* ASSAYS



Vlková A.<sup>1,2</sup>, Janoušek S.<sup>1</sup>, Jírová G.<sup>1,2</sup>, Kejlová K.<sup>1</sup>, Heinonen T.<sup>3</sup>,  
Mannerström M.<sup>3</sup>, Wittlingerová Z.<sup>2</sup>, Malý M.<sup>1</sup>



1 Centre of Toxicology and Health Safety, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic  
2 Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic  
3 FICAM, Faculty of Medicine and Health Technology, Tampere University, Tampere, Finland  
alena.vlkova@szu.cz

## Abstract

Many scientific studies have confirmed that hospital wastewaters (HWWs) are often cytotoxic or genotoxic or both. However, evaluation of the cyto/genotoxic effects of the compounds in HWWs is not a simple matter, mainly due to the variable characteristics of the HWWs which depend on the type of hospital activity. We monitored the cyto/genotoxic potential of WWs from 5 hospitals (H1-H5, Table 1) in the Czech Republic by means of different *in vitro* methods. Our study confirmed that all tested HWWs samples can be assessed as potentially genotoxic or mutagenic based on the results of the used *in vitro* tests, with the exception of the bacterial Ames test. Contamination of chlorinated WWs by microbiological agents appears to be the key factor causing significant cellular and nuclear damage in this study.

**Tab. 1. Characteristics of the hospital (H1-H5) wastewaters samples**

Hospital characteristics	H1	H2	H3	H4	H5
Type of hospital	university	general	oncology	general	university
Number of beds	2189	996	245	476	1375
Wastewaters (m <sup>3</sup> /day)	50-100	51	124	10	250
Wastewater treatment	mechanical-biological	mechanical-biological	mechanical-biological	mechanical-biological	mechanical-biological
Disinfection process	NaOCl	NaOCl	NaOCl	Cl <sub>2</sub>	Cl <sub>2</sub>
Wastewater discharges	urban sewer system	urban sewer system	water flow	urban sewer system	urban sewer system

The results indicated that none of the tested samples showed any significant abnormalities of physicochemical characteristics.

## Methods/Results

### Bacterial reverse mutation test (AMES test)

The test performed according to OECD TG 471 on 3 histidine deficient strains of *Salmonella typhimurium* in the absence and presence of liver metabolism system did not reveal any mutagenic effects of the tested samples. Negative results of this test may be affected by the necessary sample sterilization (filtration) leading to removal of genotoxics.

### Bacteria, particle and cell counting in HWWs samples

The method described by Smither (1977) and filter paper method using McConkey agar plates were used. The results are summarized in Fig.1 and 2.

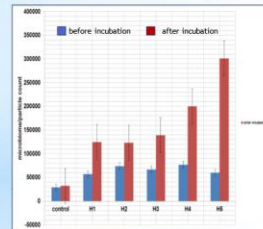


Fig. 1. Microbiome/particle counts of untreated HWWs (H1-H5) before and after 24-hour incubation

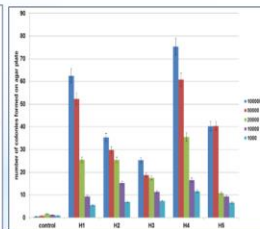


Fig. 2. Number of colonies formed on agarplate with regard to the number of the microbiome/particle count transferred by filter paper strips

### Allium cepa genotoxicity assay

The root tip cells of *Allium cepa* were utilized for evaluation of genotoxicity by analysis of microscopic parameters (c-mitosis, stickiness, chromosome breaks, micronuclei) (Fig. 3 and 4) and by single cell gel electrophoresis - Comet Assay (Fig. 5). Clear evidence of DNA damage was obtained in this test.

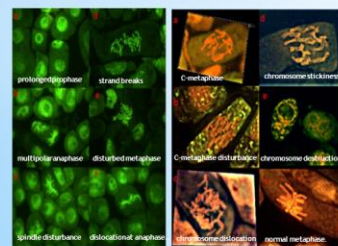


Fig. 3. Chromosomal aberrations in root tip cell A. cepa

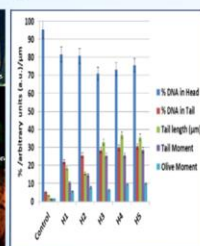


Fig. 5. Results of Comet assay performed on root meristem cells of A. cepa

## Cell based methods

Cell line Balb/c 3T3 murine fibroblasts was used in the following six methods:

Cell viability determination by **Neutral Red Uptake Assay**, metabolic activity determination by **Cell counting kit-8**, **Comet Assay**, apoptosis/necrosis evaluation using **AnnexinV-FITC apoptosis detection kit**, **Nuclear morphology assay**, and **Cell transformation assay (CTA)**.

Cytotoxicity of all samples was recorded by Cell counting Kit-8 and their genotoxic impact was confirmed in the Comet Assay. All samples induced apoptosis/necrosis (Fig. 6), morphological changes (Fig. 7), and formation of foci III in the culture of Balb/c 3T3 murine fibroblasts.

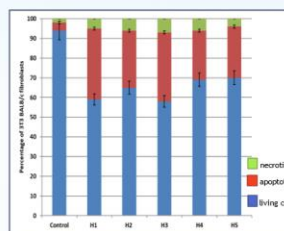


Fig. 6. Apoptosis/necrosis assay

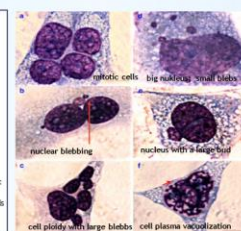


Fig. 7. Morphological appearance

## Chicken egg based bioassays

The following two methods were used in the study:

### Chicken egg genotoxicity assay (CEGA), Hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN).

The non-sterile HWWs samples showed high toxicity for the chicken embryos. Both tests indicated positivity for genotoxic hazard for all test samples, expressed as DNA damage of hepatocytes (Fig. 8) or micronuclei induction in erythrocytes (Fig. 9).

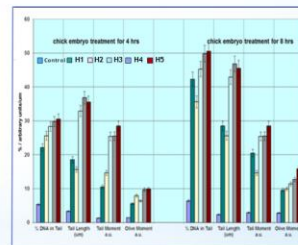


Fig. 8. Results of the chicken egg genotoxicity assay (CEGA)

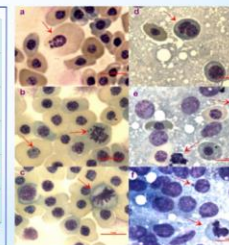


Fig. 9. Examples of micronuclei induction (HET-MN).

## Conclusions

- 1/ The HWWs samples tested in this study could be classified as potentially genotoxic or mutagenic with respect to the results of each performed *in vitro* assay, except the bacterial Ames assay.
- 2/ The tests revealed high frequency of cells with apoptotic features as well as aneuploidy or polyploidy, ie. chromosomal instability, confirming a genotoxic and/or mutagenic risk.
- 3/ Good concordance between mammalian and non-mammalian cell and tissue based methods *in vitro* was observed.
- 4/ The low survival rate of the chick embryos exposed to untreated hospital wastewaters could be associated with microbiome/bacterial contamination.
- 5/ Contamination by microbiological agents of chlorinated WWs appears to be the key factor causing significant cellular and nuclear damage in this study.
- 6/ Choosing a battery of *in vitro* tests for cyto/genotoxicity testing of wastewater is a complex task with regard to limitations of individual tests and the need for optimization of test sample preparation.
- 7/ An adequate public health and/or environmental policy should be established in order to relevantly evaluate and ensure hospital wastewater safety.

Supported by ERDF/ESF project "International competitiveness of NIPH in research, development and education in alternative toxicological methods" (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000860) and by Ministry of Health, Czech Republic - conceptual development of research organization (National Institute of Public Health - NIPH, IN: 750103307).

## PUBLIKAČNÍ PŘEHLED

### Příspěvky v časopise s IF

Janousek S., **Vlkova A.**, Jirova G., Kejlova K., Krsek D., Jirova D., Kandarova H., Wittlingerova Z., Heinonen T., Mannerstrom M., Maly M., **2021**: Qualitative and Quantitative Analysis of Certain Aspects of the Cytotoxic and Genotoxic Hazard of Hospital Wastewaters by Using a Range of In Vitro Assays. *Altern Lab Anim.* 49 (1-2), 33-48.

Svobodová L., Rucki M., **Vlkova A.**, Kejlova K., Jírová D., Dvorakova M., Kolarova H., Kandárová, H., Pôbiš, P., Heinonen, T., Maly M., **2021**:“Sensitization potential of medical devices detected by in vitro and in vivo methods”, *ALTEX.* 38 (3), 419-430.

Rucki M., Kejlova K., **Vlkova A.**, Jirova D., Dvorakova M., Svobodova L., Kandarova H., Letasiova S., Kolarova H., Mannerstrom M., Heinonen T, **2021**: Evaluation of toxicity profiles of rare earth elements salts (lanthanides). *Journal of Rare Earths.* 39 (2), 225-232.

Wittlerova M., Jirova G., **Vlkova A.**, Kejlova K., Maly M., Heinonen T., Wittlingerova Z., Zimova M., **2020**: Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos to Hospital Effluent Compared to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Physiol Res.* 69 (4), S681-S691.

Kejlová K., Bendová H., Chrz J., Dvořáková M., Svobodová L., **Vlková A.**, Kubáč L., Kořínková R., Černý J., Očadlíková D., Rucki M., Heinonen T., Jírová D., Letašiová S., Kandarova H., Kolářová H., **2020**: Toxicological testing of a photoactive phthalocyanine-based antimicrobial substance. *Regul Toxicol Pharmacol.* 115, 104685.

Chrz J., Hošíková B., Svobodová L., Očadlíková D., Kolářová H., Dvořáková M., Kejlová K., Malina L., Jírová G., **Vlková A.**, Mannerström M., **2020**: Comparison of methods used for evaluation of mutagenicity/genotoxicity of model chemicals – parabens. *Physiol Res.* 69 (4), S661-S679.

Jirova G., **Vlkova A.**, Wittlerova M., Dvorakova M., Kasparova L., Chrz J., Kejlova K., Wittlingerova Z., Zimova M. Hosikova B., Jiravova J., Kolarova H., **2018**: Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays. *Neuro Endocrinol Lett.* 39 (6), 441-453.

Chrz J., **Vlkova A.**, Jirova G., Wittlerova M., Wittlingerova Z., Zimova M., Kolarova H., **2017**: Wastewater from health care facilities - Toxicity for human health and the environment. *Toxicol Lett.* 280S, S202–S213.

**Vlková A.**, Wittlingerová Z., Zimová M., Jírová G., Kejlová K., Janoušek S., Jírová D., **2016**: Genotoxicity of wastewater from health care facilities. *Neuro Endocrinol Lett.* 37 (1), 101-102.

Jírová G., Wittlingerová Z., Zimová M., **Vlková A.**, Wittlerová M., Dvořáková M., Jírová D., **2016**: Bioindicators of wastewater ecotoxicity. *Neuro Endocrinol Lett.* 37 (1), 17-24.

Rencová J., **Vlková A.**, Čuřík R., Holuša R., Veselá G., **2004**: Influence of heavy metals upon the retention and mobilization of polonium-210 in rats. *Int J Radiat Biol.* 80 (10), 769-776.

# ODBORNÝ ŽIVOTOPIS

## Osobní informace:

---

*Jméno:* Mgr. Alena Vlková

*VŠ, fakulta:* Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta životního prostředí

*Pracoviště:* Katedra aplikované ekologie

*Forma studia:* prezenční forma

*Studijní obor:* Aplikovaná a krajinná ekologie

*Odborné zaměření:* Stanovení genotoxicity v odpadních vodách

## Vzdělání:

---

*2016 – současnost:* Doktorské studium, Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta životního prostředí

*2007:* Osvědčení k výkonu zdravotnického povolání bez odborného dohledu v oboru Odborný pracovník v laboratorních metodách a v přípravě léčivých přípravků

*1999:* Osvědčení o způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů dle zákona ČR č.246/1992Sb. na ochranu zvířat proti týrání

*1990:* Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, obor - obecná biologie

## Pracovní zkušenosti:

---

*1998 - současnost:* Státní zdravotní ústav, Praha,

Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti, Oddělení alternativních toxikologických metod, Oddělení biomedicíny a welfare laboratorních zvířat, vedoucí Národní referenční laboratoře na ochranu zvířat

Centrum pracovního lékařství, Odborná skupina toxikologické analýzy

Centrum pracovního lékařství, Odborná skupina radiotoxikokinetiky

*1990 – 1998:* Hygienická stanice hl. města Prahy, Oddělení autovakcín

## **Účast na projektech:**

---

2018 – 2023: Mezinárodní konkurenceschopnost SZÚ ve výzkumu, vývoji a vzdělávání v alternativních toxikologických metodách, reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000860, financovaného z EFRR/ESF

2015 – 2018: Ekotoxicita odpadních vod ze zdravotnických zařízení. Institucionální podpora výzkumné organizace. Státní zdravotní ústav, Praha

2017 – 2019: Příprava vzorků pro stanovení mutagenity odpadních vod ze zdravotnických zařízení. Institucionální podpora výzkumné organizace. Státní zdravotní ústav, Praha

2016 -2019: Grantový projekt: Identifikace zdravotních rizik z potravinářských obalů na bázi papíru a lepenky, reg.č. NT14375-3/2013

2001-2003: Vliv chemických a fyzikálních faktorů na kinetiku a dekorporaci alfa-emitujících radionuklidů u hlodavců, IGA MZČR, reg. č. 67772-3

## **Vybrané konference**

---

2021: Konference Analytika odpadů, 21. – 22. 10. 2021, Kutná Hora

2020: TOXCON 2020 - 25<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference. 3. – 5. 9. 2020, Praha

2019: 14<sup>th</sup> Felasa Congress 2019, Federation of European Laboratory Animal Science Associations Congress, 10. – 13. 6. 2019, Praha

2019: Ames MPF / Ames II User Meeting, 25. – 26. 5. 2019, Basilej, Švýcarsko

2019: 46. ročník konference Průmyslové toxikologie a ekotoxikologie, 28. – 30. 5. 2019 Kouty nad Desnou

2019: Konference Analytika odpadů, 5. – 6. 11. 2019, Třebíč

2018: 45. ročník Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie, 29. - 31. 5. 2018, Kouty nad

Desnou

2017: TOXCON 2017, 22<sup>nd</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference, 21. – 23. 6. 2017,  
Plzeň

2016: TOXCON 2016, 21<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference, 22. - 24. 6. 2016,  
Vysoké Tatry - Stará Lesná, Slovenská republika

2014: 9<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 24. – 28.8.  
2014, Praha

### **Ostatní**

---

Řidičské oprávnění: B

Jazyky: Anglický jazyk (B2)

Práce na počítači: MS Office, EcoTox,