

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Katedra aplikované ekologie



Indikátory rizik ekotoxicity odpadních vod

DISERTAČNÍ PRÁCE typu “SOUBOR PRACÍ”

Autor: Ing. Gabriela Jírová

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 „Indikátory rizik ekotoxicity odpadních vod“ 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, květen 2021

.....

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování MUDr. Magdaleně Zimové, CSc. za odbornou pomoc a cenné rady během celé doby vedení mé disertační práce. Rovněž bych chtěla poděkovat prof. Ing. Zdeňce Wittlingerové, CSc. za podporu a vedení při studiu. Poděkování za pomoc při analýzách vzorků patří pracovnímu kolektivu ekotoxikologické laboratoře Státního zdravotního ústavu.

Praha, 2021

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	4
3.1	Úvod	4
3.2	Charakteristika odpadních vod z nemocnic	5
3.2.1	Kontaminace léčivý	6
3.2.2	Mikrobiologická kontaminace.....	9
3.2.3	Kontaminace genotoxickými látkami.....	10
3.3	Toxikologie.....	11
3.4	Ekotoxikologie.....	12
3.5	Obecný postup při hodnocení ekotoxicity	14
3.6	Vybrané příklady ekotoxikologických testů	15
3.6.1	Testy na bakteriích	16
3.6.2	Testy na řasách	17
3.6.3	Test se semeny hořčice bílé.....	18
3.6.4	Test na cibuli kuchyňské	19
3.6.5	Testy na perloočkách.....	19
3.6.6	Testy na rybách	20
3.6.7	Fish embryo test	21
3.7	Genotoxikologické metody.....	24
4	VLASTNÍ PRÁCE	26
5	KOMENTÁŘE K PUBLIKACÍM	28
5.1	Studie I.....	28
5.2	Studie II	30
5.3	Studie III.....	31
5.4	Studie IV.....	38
5.5	Praktický výstup	43
6	ZÁVĚR.....	44
7	SEZNAM LITERATURY	46
8	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	54
9	PŘÍLOHY.....	55

1 ÚVOD

Problematika nemocničních odpadních vod se stává stále více řešeným tématem. Z mnoha celosvětových výzkumů je patrné, že právě tyto odpadní vody mají kvůli svému obsahu mnoha nebezpečných látek a jejich směsí, výrazný ekotoxikologický potenciál a mohou mít i značný vliv na lidské zdraví. Především v nemocnicích a nejrůznějších zdravotnických zařízeních jsou využívána léčiva v mnohem větším množství než v běžných odpadních vodách z domácností, měla by jim proto být věnována mnohem vyšší pozornost.

Čistírny odpadních vod zastupují klíčovou roli v udržování uspokojivé jakosti povrchových vod, ovšem ačkoli mnoho nemocnic před vypouštěním do městských kanalizací čistí vypouštěnou odpadní vodu, rezidua farmaceutických prostředků nejsou obvykle dostatečně odstraněna. Běžné čistírny odpadních vod řeší především mikrobiologickou kontaminaci. Zvýšení účinnosti v odstraňování léčiv a chemických látek lze dosáhnout například připojením vhodné čistící technologie (Angeles et al. 2020).

U takto potenciálně nebezpečných odpadních vod je proto nutné posuzovat rizika pro životní prostředí. K jejich vyhodnocení mohou velmi dobře posloužit zkoušky ekotoxicity (Hamjinda et al. 2015). Posuzování míry toxicity vypouštěných odpadních vod lze provést pomocí chemicko-fyzikální analýzy, anebo na základě provedených ekotoxikologických testů. Z hlediska ochrany životního prostředí je nejvhodnější kombinace obou přístupů, jelikož výstupy z několika studií (Teodorović et al. 2008, Norberg-King et al. 2018) prokázaly významnou ekotoxicitu vzorků, i když nebyly při chemické analýze prokázány překročené koncentrační limity sledovaných nebezpečných látek v odpadních vodách. Kromě hodnocení ekotoxicity nemocničních odpadních vod bylo do této disertační práce zařazeno i hodnocení genotoxicity, které je příhodným doplňkovým nástrojem k ověření zda odpadní vody obsahují látky poškozující genetické informace v buňce a způsobující mutace.

V současné době, kdy je k dispozici velké množství biotestů využívajících nejrůznější zkušební organismy, je důležité vhodně zvolit testovací baterii, jelikož je obecně známé, že každý organismus může reagovat s jinou mírou citlivosti na danou matici vzorku. Rovněž je patrné, že je zapotřebí využít větší soubor vyhovujících biotestů, protože pouze tímto způsobem je možné odhalit veškeré rizikové faktory působící na životní prostředí. V disertační práci bylo nahlíženo na tyto doporučení, a proto byla zvolena rozmanitá testovací baterie pro vyhodnocení ekotoxicity a genotoxicity vybraných nemocničních odpadních vod.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané práce bylo rozšířit dostupné informace o aktuální kvalitě odpadních vod ze zdravotnických zařízení z hlediska toxicity, neboť tato zařízení disponují nejednotným a často nedostatečným systémem čištění odpadních vod. Je pravděpodobné, že tato skutečnost může mít závažný dopad na znečištění povrchových vod a toxické účinky pro vodní ekosystémy i následně pro člověka.

Předmětem výzkumu bylo vzorky odpadní vody odebrané celkem z 8 zařízení lokalizovaných v různých oblastech České republiky, a to v různých časových periodách s cílem zachytit variabilitu kvality odpadní vody v závislosti na aktuální intenzitě provozu daného zařízení v průběhu týdne a ročním období.

Baterie testů ekotoxicity zahrnovala nejen konvenční metodiky, ale nově byla sada rozšířena o alternativní toxikologickou metodu bez použití obratlovců na embryích (FET test) v souladu s progresivní etickou strategií 3R, která naplňuje požadavky aktuálních závazných předpisů v toxikologii. Odpadní voda byla zkoušena i pomocí genotoxické metody – Ames test.

Předmětem výzkumu bylo provést porovnání výsledků konvenčních metod a alternativní metody na embryích ryb (FET test) s cílem posoudit případné výhody a nevýhody alternativní metody. Biologické testy poskytují skutečný důkaz o kvalitě odpadních vod a na rozdíl od chemických analytických testů ukazují komplexní účinky znečištění na životní prostředí a lidské zdraví. Některé normalizované konvenční biologické zkoušky nejsou dostatečně citlivé na ekotoxikologické hodnocení odpadních vod a je zde velká potřeba vybírat pouze vhodné citlivé biologické zkoušky, aby bylo možné správně charakterizovat zbytkovou toxicitu upravených odpadních vod.

V rámci nové testovací strategie bylo cílem vyhodnotit vypovídavost jednotlivých metod pro klasifikaci toxicity u odpadních vod. Pro hodnocení kvality odpadní vody byla sestavena aktualizovaná baterie testů ekotoxicity v návaznosti na novelizaci normy ČSN 75 6406.

Dílní kroky jsou řešeny v jednotlivých studiích v rámci souboru prací následovně:

- I. **Jírová G.**, Wittlingerová Z., Zimová M., Vlková A., Wittlerová M., Dvořáková M., Jírová D., 2016: Bioindicators of wastewater ecotoxicity. *Neuroendocrinology Letters* 37(1): 17-24.

Cíl práce: Zpracovat literární rešerši na 3 hlavní témata:

- Charakteristika nemocničních odpadních vod

- Využití a citlivost ekotoxických konvenčních testů pro vzorky odpadních vod z nemocnic
 - Nahrazení testu na obratlovcích alternativní metodou
- II. Vlková A., Wittlingerová Z., Zimová M., **Jírová G.**, Kejlová K., Janoušek S., Jírová D., 2016. Genotoxicity of wastewater from health care facilities. *Neuroendocrinology Letters* 37(1): 101-108.
Cíl práce: Vypracovat přehled dostupné literatury o mutagenitě/genotoxicitě odpadních vod ze zdravotnických zařízení.
- III. **Jírová G.**, Vlková A., Wittlerová M., Dvořáková M., Kašparová L., Chrz J., Kejlová K., Wittlingerová Z., Zimová M., Hošíková B., Jiravová J., Kolářová H., 2018: Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays. *Neuroendocrinology Letters* 39: 101–113.
Cíl práce: Stanovit toxicitu vybraných odpadních vod z nemocnic v České republice pomocí tradičních a alternativních toxikologických metod.
- IV. Wittlerová M., **Jírová G.**, Vlková A., Kejlová K., Malý M., Heinonen T., Wittlingerová Z., Zimová M., 2020: Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos to Hospital Effluent Compared to *Daphnia magna* and *Allivibrio fischeri*. *Physiological Research* 69(4): S681-S691.
Cíl práce: Hlavním účelem bylo porovnat vhodnost a citlivost testu na embryích ryb s citlivostí dvou dalších vodních organismů běžně používaných pro testování odpadních vod.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Úvod

Životní prostředí je tvořeno soustavou živých a neživých přírodních prvků (ovzduší, voda, horniny, půda, organismy, ekosystémy a energie), které spolu fungují jako komplexní a propojený systém. Jakékoli narušení vede ke globálním hrozbám, jako je změna klimatu, vyčerpání přírodních zdrojů nebo všudypřítomné rozšíření perzistentních bioakumulativních chemikálií v životním prostředí. Tyto problémy ohrožují zdraví ekosystémů na celém světě, a proto chránit složky životního prostředí je nezbytným krokem pro zajištění udržitelného rozvoje i pro další generace. Dodržování platných zákonů a norem, umožní využívání životního prostředí tak, aby nedocházelo k jeho poškození (Franjic, 2018). Přítomnost toxických látek vede k narušení funkčnosti ekosystémů a tím ke snížení jejich schopnosti plnit pro člověka důležité funkce, nepostrádat v krajině dostatek zdrojů pitné vody, mít k potřebě dostatek biotických surovin či nenarušit přirozenou eliminaci škodlivých látek rozkladem nebo imobilizací (Kočí, 2006). Země má velkou přirozenou rekuperační sílu, a jakmile je odstraněn zdroj znečištění, složky životního prostředí mají tendenci vrátit se do původního stavu. Péče o vodní zdroje, ať již jde o vodu povrchovou či podzemní nelze zanedbávat. Voda je nejrozšířenější látka na Zemi, je základní složkou biosféry, je nezbytná pro život všech organismů a je hlavním médiem pro transport živin, jejich přijímání a vylučování. Co se týče ochrany životního prostředí, je značně důležité monitorovat možné zdroje znečištění a hodnotit jejich nežádoucí účinky (Raven et al. 2015).

Základním právním předpisem Evropského parlamentu a Rady týkající se činnosti v oblasti vodní politiky je směrnice 2000/60/ES z 23. října 2000, která usiluje o udržení a zlepšení vodního prostředí. Požaduje od členských států dosažení nebo udržení přinejmenším dobrého stavu vod, a to prostřednictvím stanovení a zavedení nezbytných opatření v rámci integrovaných programů opatření.

Ochranu vodních zdrojů, nakládání s nimi a práva k nim upravuje v České republice zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon). Každoročně předkládá Ministerstvo životního prostředí a Ministerstvo zemědělství vládě zprávu o stavu vodního hospodářství v České republice. Zpráva obsahuje přehled činností souvisejících s vodní politikou, nově od roku 2019 informuje o monitoringu specifických látek. Ministerstvo životního prostředí vede odbor ochrany vod, který se zabývá především:

- ochranou množství a jakosti povrchových a podzemních vod

- ochranou před povodněmi
- plánováním v oblasti vod na národní a mezinárodní úrovni
- mezinárodní spolupráci v oblasti ochrany vod
- tvorbou legislativy, norem

V oblasti odpadních vod je zásadního významu zákon č. 274/2001 Sb. o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu, v platném znění.

3.2 Charakteristika odpadních vod z nemocnic

Odpadní vodu lze definovat jako vodu zhoršené kvality po užití lidskou činností. Důvodem zhoršené kvality je obsah široké škály kontaminujících látek, jejichž množství a koncentrace závisí na jejich zdroji. Znečišťující látky mohou být kategorizovány jako fyzikální, chemické a biologické. Hlavními složkami znečištění jsou složité organické materiály, těžké kovy a sloučeniny bohaté na dusík a fosfor. Z biologického hlediska odpadní vodu znečišťují patogenní organismy (bakterie, viry, prvoci a řasy). V menším množství jsou v odpadních vodách také přítomny syntetické organické chemikálie, anorganické chemikálie, mikroplasty, sedimenty, radioaktivní látky, ropa, tuk a mnoho dalších znečišťujících látek (Verlicchi et al. 2018).

Odpadní vody mohou být různého charakteru, nejběžnější jsou komunální odpadní vody, vzniklé každodenní lidskou činností, pocházející z měst a obcí. Další běžnou skupinou jsou odpadní vody průmyslové, vznikající v nejrůznějších průmyslových podnicích. Odpadní vody vypuštěné z nemocnice do kanalizace pro veřejnou potřebu podléhají normě ČSN 75 6406 (Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení (ZZ) vypouštěnými do stokové sítě pro veřejnou potřebu). Norma požaduje od zdravotnických zařízení nejnižší možnou produkci odpadních vod a vypouštění nejmenšího množství nebezpečných a sledovaných látek, případně dalších rizikových polutantů a biologických činitelů. Z hlediska předpokládaného výskytu biologických činitelů v odpadních vodách byly odpadní vody rozřazeny do tří kategorií: neinfekční, infekční a vysoce infekční. Pokud ve zdravotnickém zařízení vznikají infekční vody, je nutno tyto vody předčistit a dezinfikovat, a to tak, aby bylo dosaženo významné redukce biologických činitelů. Na základě posouzení rizik dle normy ČSN ISO 31000 je určena technologie předčištění infekčních odpadních vod. Nejvhodnější technologie pro dekontaminaci jsou různé fyzikální způsoby (působení tepla nebo tlaku), ozonizace, dezinfekce UV zářením a podobně (ČSN 75 6406).

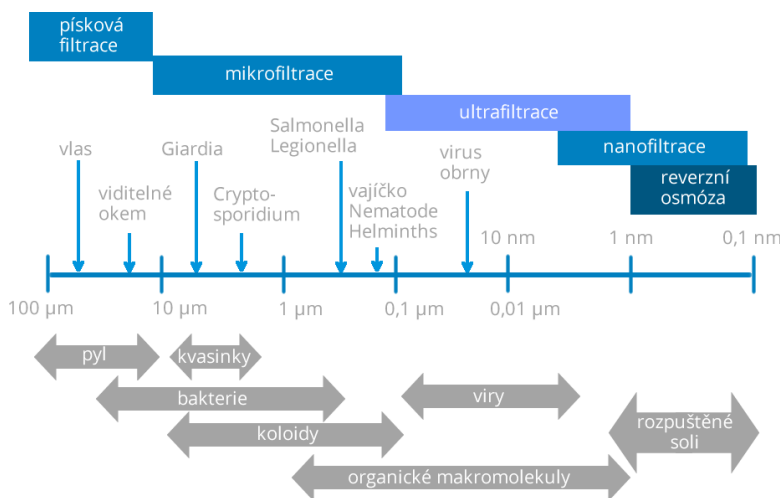
Ve městě či obci musí být odpadní voda z domácností, škol, úřadů apod. sváděna pomocí systému stok do čistírny odpadních vod. Od roku 2001 je na veřejnou kanalizaci napojeno více než 80% obyvatel České republiky. Po procesu čištění, které probíhá nejobvykleji mechanicko-biologickým procesem je odpadní voda vypuštěna do recipientu, což je vodní útvar (řeka, rybník, nádrž a podobně). (Hlavínek, 2000).

3.2.1 Kontaminace léčivy

Mezi hlavní zdroje kontaminující životní prostředí léčivy, můžeme zařadit farmaceutický průmysl, zdravotnická zařízení, veterinární činnost, chov ryb a likvidaci nepoužitých léčivých přípravků (Boxall et al. 2012). Zdravotnická zařízení většinu léčiv vypustí prostřednictvím svých odpadních vod. Nemocniční odpadní voda je 5–15krát více toxická než voda pocházející z domácností (Akin, 2016). V posledních letech velmi vzrostla pozornost zabývající se výskytem a osudem farmaceutik a jejich metabolitů v odpadních vodách. Přítomnost léčiv ve vodním prostředí a účinky znečištěných sedimentů již prokázaly mnohé studie (Vincze et al. 2015, Minguez et al. 2016, Kot-Wasik et al. 2016). Vzhledem ke specifickému složení nemocničních odpadních vod se předpokládá, že mohou zapříčinit sníženou účinnost čistících procesů probíhajících na čistírnách odpadních vod (Oliveira et al. 2015).

Klasické mechanicko-biologické čištění odpadních vod odstraní některá léčiva pouze z části, spíše je přeměňuje na jiné metabolity, které někdy mohou působit ještě více toxicky. Účinnost odstranění léčiv z odpadních vod je spojena s vlastnostmi molekuly (Wiest et al. 2018). Velký význam pro trvale udržitelné hospodaření s vodou a snížení množství mikropolutantů v nich (léčiv, chemických látek, pesticidů, těžkých kovů a dalších) mají výzkumy zaměřené na zdokonalování čistících procesů probíhajících na čistírnách odpadních vod. Jako velmi přínosné technologie se v poslední době využívají adsorpce (pískovými filtry nebo aktivním uhlím), ozonace či membránové procesy (Margot et al. 2013). Výzkumy prokazují, že tyto techniky dokážou snížit koncentraci řady léčiv, včetně některých antidepresiv a antibiotik, ve vodě o více než 95% (Hsu, 2020). Na perzistentní organické látky a látky narušující endokrinní systém jsou účinné pokročilé oxidační procesy. Mikrofiltrace v odstraňování léčiv příliš vhodné nejsou, a to z důvodu přílišné velikosti pórů. Naproti tomu reverzní osmóza, která funguje na principu protékání rozpouštědla membránou, rozpuštěné soli a nízkomolekulární složky zachycuje. Hromadění nečistot probíhá před filtrem a pouze vyčištěná voda prochází dále. Průběh osmózy je založen na aplikaci vnějšího tlaku ze strany roztoku, který je koncentrovanější, což způsobí obrácení přirozeného jevu osmózy. Udává se,

že membrána je schopná průměrně odstranit více než 95 % všech rozpuštěných látek a přes 99% všech látek organických (Kotas, 2016).



Obrázek 1 Schéma účinnosti čistících procesů (Kotas, 2016)

Například odstranění diklofenaku je pomocí reverzní osmózy dosaženo z 95% (Kimura et al. 2007). Reverzní osmóza se osvědčila v odstraňování i dalších léků, především antibiotik, hormonů, orální antikoncepce, antiepileptik nebo analgetik. Ve studii Snyder et al. (2007) bylo zjištěno, že reverzní osmóza významně zbavuje odpadní vody také látek z výrobků osobní péče, často obsahující chemikálie narušující endokrinní systém. Problém však nastává u kalů, kde se léčiva, která projdou procesem čištění, mohou ve značném množství koncentrovat. Další problém pak nastává při využívání kalů na zemědělské půdě.

Množství určitých skupin léčiv v odpadní vodě ze zdravotnických zařízení přímo souvisí s užíváním léků pacienty tohoto zařízení. Z posbíraných dat (Verlicchi et al. 2012) vyplývá, že nejvyšší koncentrace na přítocích do čistíren odpadních vod byly prokázány u léčiva ze skupiny nesteroidních antiflogistik, a to ibuprofenu, který se používá na tlumení bolesti, zánětů a horečky. Tyto výsledky jsou i ve shodě s analýzami Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL), který v nejnovějších šetřeních udává, že ibuprofen je nejvíce distribuované léčivo na trhu podle kusů balení (SÚKL, 2016). Z výzkumů je prokázáno, že 30-90 % účinné léčivé látky je po požití vyloučena a vstupuje prostřednictvím odpadní vody do životního prostředí (Warhurst, 2014).

Francouzský výzkum (Wiest et al. 2018), který se zajímal o účinnost odstranění léčiv z nemocniční a městské vody, potvrzuje, že tyto oba typy vody kontaminují léčivý životní prostředí, ale že mezi nemocničními a městskými odpadními vodami jsou značné rozdíly.

Vzorky byly odebírány na přítoku a odtoku z nemocniční a městské vody 24 hodin denně (od 8:00 do 8:00). Ačkoliv nemocniční čistírna dosahuje uspokojivé účinnosti, koncentrace antibiotik po čistícím procesu byla u nemocniční vody mnohonásobně vyšší oproti městské odpadní vodě. Ve vyšších koncentracích byly nalezeny tři protizánětlivé látky (ketoprofen, diklofenak a ibuprofen) a atenol. V závěru práce bylo konstatováno, že účinnost odstranění léčiv byla mezi 75 a 100% v nemocniční odpadní vodě a mezi 30 a 100% v městské odpadní vodě. Účinnost odstraňování paracetamolu, kyseliny salicylové, ibuprofenu, ketoprofenu, atenololu a antibiotik ciprofloxacinu a vankomycinu bylo vyšší než 90%. Léčiva propranolol, sulfamethoxazol, diklofenak a karbamazepin byly odstraněny v relativně malém množství. Tyto sloučeniny jsou také často odolné vůči biodegradaci ve vodních a suchozemských ekosystémech. Kromě toho existují obavy, že antibiotika v prostředí mohou významně přispět ke zvýšení problému rezistence bakterií (Karkman et al. 2018).

Léčiva v životním prostředí také ohrožují volně žijící zvířata. Velmi známým případem je otrava milionů supů v Asii z důvodu požití masa krav, kterým bylo podáno protizánětlivé léčivo (Cuthbert et al. 2014). Další velmi známý fakt se pojí s vysokým výskytem hormonálních látek ve vodním prostředí spojených s užíváním antikoncepce a léčbou menopauzy. Může tím docházet k feminizaci ryb (Carnevali et al. 2018). Jinak tomu není ani u zvyšujícího se podávání veterinárních přípravků v intenzivních chovech zvířat či v akvakulturách. K úniku farmaceutik do prostředí dochází skrz hnůj a kejdu, které kontaminují především zemědělskou půdu. IWW Water centre v Německu hledal v prostředí léčiva a transformační produkty léčiv a našel jich celkem 713. V nejvyšších koncentracích byly nalezeny: diklofenak (proti bolesti a zánětu), karbamazepin (antiepileptikum), ibuprofen (proti bolesti a zánětu), sulfamethazol (antibiotikum), naproxen (proti bolesti a zánětu), trimethoprim (antibiotikum), paracetamol (proti bolesti), ciprofloxacin (antibiotikum), ofloxacin (antibiotikum), norfloxacin (antibiotikum), kyselinu acetylsalicylovou (aspirin, lék proti bolesti), hormonálně aktivní látky, estron, 17p-estradiol, 17a-ethinyl estradiol a estriol (IWW, 2014). Některá z těchto léčiv byla nalezena v malé koncentraci i v pitné vodě.

Jiný výzkum (Aydin et al. 2019) se také zabýval hodnocením možného negativního dopadu odpadních nemocničních vod na životní prostředí. Hodnocení bylo provedeno pomocí detailně vybraných zkoušek ekotoxicity, podrobného chemického a fyzikálního měření a zhodnocení genotoxicity. Studie provedla odběry odpadních vod v letním a zimním období celkem z 16 zařízení. Pro výzkum byly vybrány 3 univerzitní nemocnice (velké zařízení, počet lůžek: 903 - 1 298), 1 dětská nemocnice (středně velké zařízení, počet lůžek: 363 lůžek) a 14 všeobecných nemocnic (středně velké zařízení, počet lůžek: 194 – 600). Žádná z nemocnic

nemá svoji vlastní čistírnu odpadních vod, odpadní vodu vypouští rovnou do městské kanalizace. Vzorby byly ve stejný den odebrány také na přítoku a odtoku z čistírny odpadních vod. Zařízení provádí klasické mechanicko-biologické čištění. Výzkum byl zaměřen na výskyt antibiotik v odpadní vodě, účinnost odstranění antibiotik z odpadních vod a zhodnocení potenciálních rizik při vypouštění vod do životního prostředí. Koncentrace antibiotik zjištěné v odpadních vodách v zimě byly významně vyšší než v létě. Azitromycin, claritromycin a ciprofloxacin byly nalezené v nejvyšší koncentraci.

Odpadní vody z nemocnic denně uvolňují značné množství léčiv a chemických látek do životního prostředí. Výsledky mnoha studií potvrzují (Ramírez-Morales et al. 2020, Kosma et al. 2014, Papageorgiou et al. 2019, Khan et al. 2020), že tyto specifické vody obsahují mnohonásobně vyšší koncentrace a širší spektrum léčivých látek než komunální odpadní vody a že tuto skutečnost nelze ignorovat. Je prokázáno, že riziko představují nejen léčiva, ale také jejich směsi a produkty jejich přeměny, které mohou být dokonce více toxické. Léčiva jsou ve vodním prostředí často odolná vůči biodegradaci. Po spotřebování léčiv pacientem se vylučují do kanalizace ve formě mateřské sloučeniny v množství 30–90% jako aktivní látky (Lyons, 2014). Jelikož spotřeba léčiv je značná a stále se zvyšuje, je přínosné toxicitu odpadních vod průběžně sledovat. Nedostatečného odstraňování léčiv v průběhu čistících procesů v čistírnách odpadních vod vyvolává značné obavy z jejich negativního dopadu na vodní ekosystémy a na zdraví člověka.

3.2.2 Mikrobiologická kontaminace

Odpadní vody z nemocnic tvoří ideální prostředí pro patogenní mikroorganismy, zejména pro bakterie, viry a prvoky. Do odpadní vody se dostávají ve velkém množství vylučováním skrz nemocné pacienty. Mezi nebezpečné patogeny patří nejvíce bakterie způsobující cholera, tyfus a tuberkulózu; viry způsobující infekční hepatitidu či aktuální velmi nakažlivé onemocnění covid-19; prvoci způsobující úplavici, a nejrůznější vajíčka parazitických červů (Abdel-Raouf et al. 2012). Jelikož je aktuálně velmi řešena problematika související s onemocněním covid-19, řada výzkumů se zabývá detekcí koronaviru v nemocničních odpadních vodách. Koronavirus způsobující onemocnění covid-19 zasáhl v letech 2019-2021 více než 34 milionů lidí a způsobil vysokou úmrtnost po celém světě (WHO, 2020a). Na základě výzkumu několika vědců (Wu et al. 2020, Yang et al. 2020, Ling et al. 2020), kteří potvrdili přítomnost RNA koronaviru (nazývaný SARS-CoV-2) ve stolici infikovaných pacientů, byl virus v nemocniční odpadní vodě skutečně nalezen. Přítomnost

SARS-CoV-2 v odpadních vodách byla potvrzena několika studii z různých zemí světa (Mlejnková et al. 2020, Tai et al. 2020, Green et al. 2020). Mlejnková dále uvádí, že monitorování výskytu koronaviru v odpadní vodě by mohl poskytnout informace při aktuálním sledování přítomnosti viru v populaci.

Odpadní vody z nemocnic jsou rovněž prokázaným zdrojem antibiotické rezistence (odolnost mikroorganismů vůči působení antibiotika), a to z důvodu vysokého obsahu bakterií v odpadní vodě a léčbě nemocných pacientů antibiotickými přípravky, které jsou následně z těla vyloučeny prostřednictvím exkrementů (Rizzo et al. 2013). Z literatury zabývající se šířením antirezistentních bakterií v rozvojových zemích vyplývá, že jelikož nemají v mnoha případech zavedený systém čištění odpadní vod, bude riziko šíření mnohem vyšší než ve vyspělých zemích. Antibiotická rezistence je potenciální globální hrozbou pro lidské zdraví, protože infekce způsobené bakteriemi rezistentními na antibiotika, zejména gramnegativních bakterií rezistentních vůči více lékům, jsou spojeny se zvýšenou úmrtností pacientů, nutností hospitalizace, prodlouženou délkou léčby a vyššími náklady na zdravotní péči (Cosgrove, 2006). Pacienti, kteří jsou infikováni rezistentním patogenem, mají sníženou účinnost léčby, často jim musí být podávána větší dávka léčiv, a je u nich zvýšená potřeba chirurgických zákroků. Z těchto dat plyne závěr, že prevence proti šíření antimikrobiálně rezistentních organismů je zásadního významu. Riziko pro lidské zdraví související s kontaminací patogeny rezistentními na antibiotika může vzniknout při konzumaci zeleniny pěstované na polích zavlažovaných kontaminovanými vodami. Dalším případným zdrojem jsou kaly z čištění odpadních vod, pokud se využívají jako hnojivo na zemědělská pole.

Amouei et al. (2015) ve své studii odebral celkem 96 vzorků odpadní vody ze 4 iránských nemocnic. Cílem bylo stanovit základní chemicko-fyzikální faktory a celkový počet koliformních a heterotrofních bakterií. Průměrný celkový počet koliformních a heterotrofních bakterií nalezených v odpadních vodách byl $5,4 \times 10^8$ MPN/100 ml (MPN - nejpravděpodobnější počet mikroorganismů), respektive $2,6 \times 10^{10}$ KTJ/ml (KTJ - kolonii tvořící jednotka). Z výzkumu plyne, že v nemocnicích, kde jsou hospitalizováni pacienti s enterickými chorobami je zvýšené riziko výskytu enterálních patogenů včetně bakterií, virů, prvoků a helmintů, které se navíc snadno přenášejí vodou.

3.2.3 Kontaminace genotoxickými látkami

Genotoxické látky (mutageny) se vyskytují ve všech složkách životního prostředí. Po vdechnutí, požití nebo proniknutí kůží mohou vyvolat nebo zvýšit četnost výskytu genetických

poškození. Mezi známé genotoxické látky patří především: polycyklické aromatické uhlovodíky, pesticidy, kaly z čistíren odpadních vod, dusíkatá hnojiva, herbicidy, těžké kovy, insekticidy, fungicidy, mykotoxiny, některé druhy léků a mnoho dalších.

Nemocnice patří k jednomu ze zdrojů těchto nebezpečných látek, proto je i známý zvýšený výskyt genotoxických látek v nemocničních odpadních vodách. Ovšem ježikož se obvykle vyskytují v příliš nízkých koncentracích, je obtížné kvantifikovat riziko spojené s těmito chemickými znečišťujícími látkami. Pomocí analytických metod často nelze vyhodnotit toxické účinky směsí, proto se genotoxicita hodnotí především pomocí biologických testů bakteriální genotoxicity.

Ve studii (Jolibois et Guerbet, 2006) byla zkoumána genotoxicita nemocničních odpadních vod z univerzitní nemocnice mající 2 600 lůžek. Vzorky byly odebrány po dobu šesti týdnů v období od května 2001 do dubna 2003. Genotoxicita byla studována kombinací dvou testů: SOS chromotestu a Amesova flukтуаčního testu na s kmenech *Salmonella typhimurium* (TA 98, TA 100 a TA 102). Z celkem 38 testovaných vzorků bylo 31 pozitivních alespoň v jednom testu (82%).

Další studie (Beltifa et al. 2020) zabývající se genotoxicitou nemocničních odpadních vod se zaměřila na detekci těžkých kovů, antibiotik a změkčovadel v odpadních vodách ze tří nemocnic v Tunisku. Byl použit cytotoxický test provedený na geneticky modifikované *Salmonella typhimurium* TA104 a test detekce fragmentace DNA s použitím jater samců myši švýcarských albínů. Získané výsledky vyhodnotily odpadní vody jako možné toxikologické riziko a poukazovaly na jejich cytotoxické a genotoxické vlastnosti. Výsledky ukázaly, že všechny vzorky odpadních vod způsobovaly významná kvalitativní a kvantitativní rizika v jaterní DNA. Ovšem stanovení pomocí cytotoxického testu neprokázalo žádnou významnou genotoxicitu na *Salmonella typhimurium* TA104. Pro zachycení genotoxicity je proto vhodné kombinovat více druhů testů.

Studie prokázaly, že nemocnice jsou jedním ze zdrojů produkujících genotoxické sloučeniny v odpadních vodách, tudíž by bylo příhodné, aby nemocnice kontrolovaly své odpadní vody a zlepšily čistící technologie.

3.3 Toxikologie

Toxikologie je multidisciplinární věda studující vliv chemických látek na živé organismy. Přináší poznatky o otravách xenobiotiky a endogenních fyziologických změnách v organismech. Název pochází z řeckého τοξικον (toxikon), což v překladu znamená jedovatou

látku, do které byla namáčena špička šípů. Její kořeny lze vysledovat od začátků vývoje lidstva, neboť právě přežití našich předků záviselo na rozlišování mezi jedlými a jedovatými rostlinami a zvířaty (Tompa et Balázs 2018). Toxikologie se opírá o poznatky z biologie, patofyziologie, histologie, genetiky, farmakologie a imunofarmakologie. K objasnění povahy zkoumaných látek nejčastěji využívá analytickou a fyzikální chemii. Pomocí analytické chemie se s přesností může určit složení látek a směsí, fyzikální chemie určí makroskopické vlastnosti látky na molekulární úrovni (Burcham, 2014).

V průběhu času vzniklo mnoho odvětví toxikologie, patří mezi ně zejména: popisná toxikologie (popisuje poškození organismu toxickou látkou), predikční toxikologie (odhad toxicity ze struktury chemické látky), soudní lékařství (využívá se v kriminalistice k prokázání usmrcení otravou), klinickou toxikologii (zabývá se analýzami xenobiotik v biologickém materiálu a léčbou otrav), průmyslovou toxikologii (sleduje látky produkované chemickým průmyslem, jejich výskyt v chemických provozech a jejich nebezpečnost), toxikologii potravin a aditiv (zahrnuje detekci toxických látek v potravinách a aditivech, charakterizuje jejich vlastnosti, studuje jejich osud v těle (absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování) a zkoumá jejich škodlivé účinky na zdraví), toxikologii psychotropních a omamných látek (studuje poškození organismu při užívání psychotropních a omamných látek), toxikologii agrochemikálií (zkoumá toxické účinky pesticidů a hnojiv) ekotoxikologii (působení škodlivých látek na ekosystémy) a vodní toxikologii (studium účinků toxických látek na vodní organismy). Současná moderní toxikologie je vědní obor studující toxické účinky xenobiotik na člověka, faunu a floru, i na celé ekosystémy. Studuje především jejich povahu, mechanismus jejich účinku (prahový, bezprahový) a pravděpodobnost jejich výskytu (Pappas et al. 1999).

3.4 Ekotoxikologie

Ekotoxikologie se jakožto specifické odvětví toxikologie zabývá studiem škodlivých účinků látek přírodního či lidského původu na živé organismy. Sleduje vliv látek nejen na jednotlivé formy života, ale i na celé populace a ekosystémy (Walker et al. 2007). Obor vznikl především z vědeckých disciplín jako je biologie, toxikologie, ekologie, farmakologie, medicína, biochemie a environmentální chemie (Valavanidis, 2015). Propojení těchto vědeckých disciplín vedlo k porozumění působení toxických látek na živé organismy, populace či rovnováhu ekosystémů. Později se z těchto věd stal samostatný interdisciplinární obor ekotoxikologie. Zkoušky toxického působení na živé organismy byly prováděny v různých formách po staletí. V dřívějších dobách nebylo hlavním cílem zkoušení vyhodnotit škodlivé

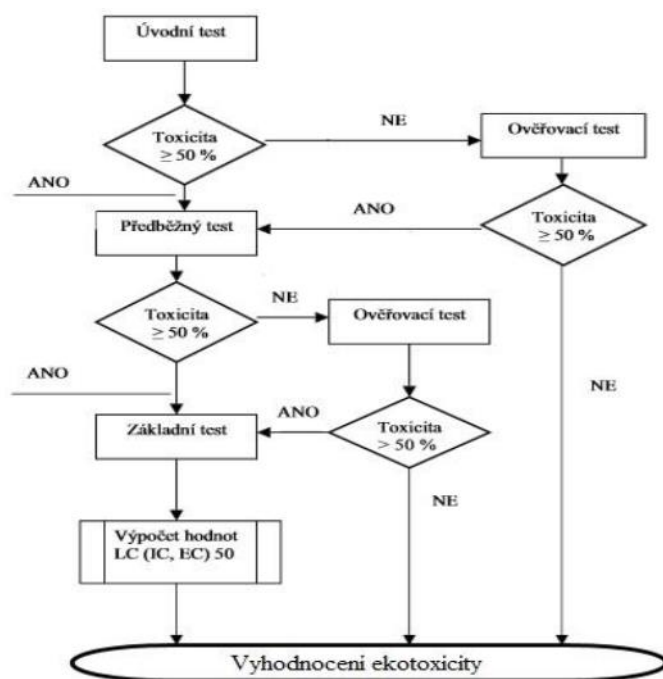
účinky na rostlinné a živočišné jedince, nýbrž na člověka. Až na konci 19. století se rozvinula snaha získat informace o dopadech lidské činnosti také na životní prostředí. Penny a Adams v roce 1863 poprvé provedli první akvatický akutní test s průmyslovou odpadní vodou. V roce 1945 bylo americkou společností „The American Society for Testing and Materials“ přijata první standardní metoda publikovaná Hartem (Hart et al. 1945). Metoda se zaměřovala na běžný výskyt populací a společenstevch v daném vodním ekosystému. Jejich nepřítomnost naznačovala zhoršenou vhodnost podmínek v daném prostředí. Metoda prokázala spolehlivý a citlivý ukazatel kvality vody a mohla doplňovat již existující chemické a fyzikální měření (Hoffman et al. 2003). Vodní toxikologie se vyvinula ze dvou vědních disciplín, a to biologie znečištění vody a limnologie. První výzkumy se zaměřovaly na pozorování a identifikaci rostlin a živočichů žijících v různých vodních zdrojích. Cílem dalších výzkumů bylo objasnit, jak živá složka snižuje organické znečištění vod. V roce 1877 byla Schoesingem a Muntz Stephenem objevena role bakterií v nitrifikačním procesu. V roce 1924 byla vydána studie Kathleen Carpenter o toxicitě těžkých kovů (olovo a zinek) na ryby (Hoffman et al. 2003). Po této publikaci se testy toxicity těžkých kovů na vodních organismech velmi rozmohly. V 80. letech začala organizace OECD prosazovat testování chemických látek pomocí ekotoxických testů. Získaná data se s výhodou využívala ke stanovení bezpečnosti především u chemických přípravků, pesticidů a průmyslových chemikálií (OECD, 2019). Ve 20. století došlo k rychlému rozvoji analytických metod, což velmi pomohlo pracovníkům při hlubším zjišťování příčin otrav. Na základě zjištěných informací mohly být stanoveny toxické metabolické účinky na různé orgány a hodnoty toxických dávek (Pappas et al. 1999).

Podstatou ekotoxikologických testů je kontakt zkoušené látky nebo jejího vodného výluhu s organismem a vyhodnocení toxického působení této látky na daný organismus, na jeho přežití, růst, reprodukci a chování. Zkoušky na živých organismech mohou prokázat, zda jsou zkoušené látky biologicky dostupné a mají tak možnost poškozovat biologické systémy živých struktur. Zkoušenou látku je možné testovat v mnoha koncentracích a tím prokázat, kdy látka na organismus ještě neúčinkuje a naopak kdy již organismus poškozuje (Walker et al. 2007). Další možností v testování je délka expozice. Ta přináší výsledek, zda látka navozuje akutní účinky po jednorázové dávce či chronické toxické účinky po opakovaných dávkách, které jsou často podprahové. Krátkodobé expozice organismu zkoušené látce, při snaze zjistit její účinek způsobující škodlivé účinky obvykle nepřesahuje 15 dní. K akutnímu účinku látky dochází velmi často v krátké době po expozici, lze ho tak relativně dobře rozpoznat a snadno kvantifikovat z hlediska účinků na zdraví. K zaznamenání akutního účinku je obvykle nutná vysoká koncentrace zkoušené látky. V životním prostředí jsou však vysoké koncentrace

jednotlivých chemikálií či směsí velmi nepravděpodobné, mnohdy koncentrace toxické látky nepřekračují ng/l. Vysoké koncentrace toxikantů se obvykle vyskytují pouze v případě havárií. Chronické účinky lze určovat po dlouhodobější expozici, která je zpravidla delší než 3 měsíce. Aby neklesla koncentrace zkoušené látky, musí se podávat opakovaně (Kočí, 2006). Chronickými testy se u zkoušených látek vyhodnocují karcinogenní, mutagenní, teratogenní či kumulační vlastnosti. Škodlivé efekty jsou pozorovány a zaznamenány až na potomcích nebo dalších vývojových stádiích. Další možností je sledovat, zda dochází ke snížení porodnosti, ke sníženému růstu, ke změnám chování nebo k přenosu genetických vad.

3.5 Obecný postup při hodnocení ekotoxicity

Doporučený postup při ekotoxikologickém testování popisuje Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí 11/2007 v uvedeném schématu, viz obrázek č. 2.



Obrázek 2 Doporučený postup při testování

Testovací strategie se zahajuje úvodním testem, který se provádí s neředěným výluhem vzorku pouze v jedné paralele a má sloužit pro odhad ekotoxicity. Pokud je toxický účinek menší než 50 %, provede se následně ověřovací test, který slouží k ověření negativního účinku. Ověření se provede nejméně s třemi paralely. V případě, kdy vyjde úvodní test toxický víc než 50%, provede se test předběžný. Tento test slouží k určení rozmezí koncentrací, kde se přibližně

bude pohybovat hodnota EC50 (IC50, LC50). Často je prováděna široká koncentrační řada, (od 1mg/l do 100mg/l), každá pouze s jednou zkušební nádobou. Předběžný test poskytuje informace o nejvyšší koncentraci, která ještě nezpůsobuje úhyn organismů, a zároveň o nejnižší koncentraci, která již způsobuje inhibici, imobilitu či letalitu organismů. Na základě výsledků předběžného testu se volí užší koncentrační řada pro test základní, což je konečný test pro vyhodnocení hodnoty EC50 (IC50, LC50). Je třeba zvolit koncentrace tak, aby okolo hodnoty EC50 došlo k účinku u 5 - 95 % organismů. U základního testu se pro každou koncentraci nasazují 2 -3 paralely pro dosažení přesnějších výsledků.

Vzhledem k rostoucímu využívání laboratorních zvířat ve vědě a výzkumu se v roce 1959 Russell a Burch zaměřili na vypracování pokynů, které by zajistily dobré životní podmínky zvířat a etické aspekty spojené s jejich vystavením bolesti a stresu. Touha podpořit výzkumnou komunitu a zároveň zajistit společné dodržování pokynů ke snížení počtu použitých pokusných zvířat a ke zmírnění bolesti a utrpení při experimentech se stala koncepcí tzv. 3R : Replacement, Reduction and Refinement. Hlavním cílem bylo vytvořit strategii, která by zlepšila zacházení s laboratorními zvířaty a současně i zvýšila vypovídavost studií, které používají živé obratlovce. Zásady 3R byly zapracovány do legislativy v celé řadě zemí, především v zemích EU.

“3 R” podle začátečních písmen anglických slov znamenají:

REPLACEMENT (náhrada) – Nahradit všude, kde je to možné, experimenty využívající živé obratlovce jinými experimenty, které nepoužívají živé obratlovce, např. pokusy *in vitro* využívající buněčné, tkáňové či orgánové kultury nebo rekonstruované modely tkání, použití bezobratlých organismů (bakterie, řasy, korýše, embrya ryb).

REDUCTION (snížení, redukce) – Provést experiment s co nejnižším počtem zvířat.

REFINEMENT (zjemnění) – Je nutné jakékoli snížení až úplně vyloučení bolestivých a stresujících situací. Prioritou je zlepšit životní podmínky pokusných zvířat, například pomocí úlevy od bolesti nebo zlepšení chovných systémů zajišťující zvířatům jejich přirozené potřeby (Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU).

3.6 Vybrané příklady ekotoxikologických testů

Níže vybrané testy toxicity poskytují údaje o růstu, reprodukci a přežití organismů s cílem posoudit ekologická rizika a znečištění životního prostředí prostřednictvím zkoušených látek. Biologické testy jsou obecně prováděny s využitím prokaryotických (bakteriálních) i eukaryotických buněk. Cílem ekotoxikologického zkoušení je interpretovat toxicitu látek na

ekosystémové úrovni, proto by měla testovací sada obsahovat organismy všech trofických úrovní; producenty, konzumenty i destruenty. Hodnocení toxicity by tak mělo vycházet z testování na několika druzích organismů. Postup, který využívá pouze jedinou baterii testů pro všechny látky a směsi není považován za přijatelný (Devillers et al. 2009). Správně by měla být navržena řada testů ekotoxicity vždy se zaměřením na charakter testovaného vzorku. Organismy se značně liší v citlivosti na různé chemické látky, výsledky mohou být proto značně odlišné. Při zkoušení nové chemikálie nebo směsi je vhodné využít co nejširší testovací baterii, bez nutnosti velkého počtu paralel. Prvotní výsledky upozorní na citlivé organismy, s kterými je vhodné provádět další testy směřující až k výsledku EC₅₀. Na druhou stranu je třeba myslet i na ekonomickou stránku věci a pravidla 3R, které předepisují, že v testovací baterii by měl být zahrnut omezený počet živých organismů a měl by být prováděn jen nezbytný, omezený počet testů. Příkladem může být zkušební baterie pro testování toxicity odpadní odpadních vod, kterou sestavili Hagendor a Diehl v roce 1999 (Hagendor et al. 1999). Zahrnuje test na dafniích, luminiscenční bakterii, řase a rybím embryu. Metodu na rybím embryu využili jako alternativu k akutní toxicitě pro ryby.

3.6.1 Testy na bakteriích

Zkouška na bakteriích *Aliivibrio fischeri* je popsána normou ČSN EN ISO 11348-1,2,3. Test vyhodnocuje inhibici emise světla luminiscenční mořské bakterie po expozici 5 min, 15 min nebo 30 min. Koncovým výsledkem je zjištění koncentrace zkoušené látky, která způsobuje 20% a 50% inhibici luminiscence. Citlivost bakterií je monitorována pomocí pozitivní kontroly s roztokem ZnSO₄·7H₂O. V této práci byly použity sušené bakterie, které se před testem oživí přidáním reaktivačního roztoku. Slanost vzorků se koriguje přidáním NaCl. Suspenze zředěných vzorků a bakterií se při testu udržují při 15°C ± 1°C. Jako negativní kontrola byl použit roztok 2% NaCl.

Čeled *Vibrionaceae* jsou pohyblivé gramnegativní tyčinky, patřící mezi nesporulující bakterie. Živí se heterotrofně a pohyb jim zajišťuje jediný polární bičík. Provádění testů na těchto bakteriích, především přírodní bioluminiscenční bakterie, jako jsou *Aliivibrio fischeri* (také nazýván *Vibrio fischeri*), *Vibrio harvey*, *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas leiognathi* lze využít pro ekotoxikologický screening a pro hodnocení potenciálně škodlivých látek (Girotti et al. 2008). Jejich výskyt v životním prostředí je především v mořském ekosystému, kde žijí jako volně žijící, symbiotické nebo parazitické organismy, je však možné je najít i ve sladké vodě (Kaeding et al. 2007). *Vibria* mohou být i

lidskými patogeny, patří mezi ně například *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* a *Vibrio vulnificus*. Nejvíce známá symbióza bakterie *Aliivibrio fischeri* je mezi chobotnicemi *Euprymna scolopes*, kde žijí v jejich světélkujícím orgánu. Světlo produkované bakteriemi je chobotnicí využíváno jako protipredátorská kamufláž (McFall-Ngai et al. 2014).

Testování na bakteriích má oproti mnohobuněčným organismům mnoho výhod. Při zkouškách na vyšších organismech jsou nevýhodou výrazně vzrůstající finanční náklady. Dále pak testovací čas, který je delší o několik dní, kvůli jejich prodloužené době reprodukce. Navíc u bakterií nemusí být zvažovány etické otázky, které vznikají při testování na vyšších organismech.

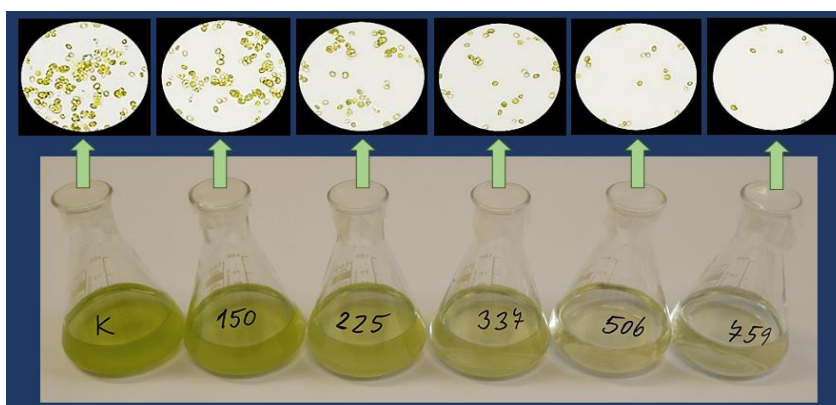


Obrázek 3 Ukázka probíhajícího testu s bakteriemi

3.6.2 Testy na řasách

K testování negativního účinku látek na řasy je běžně využívána zkouška inhibice růstu řas s využitím řasy *Desmodesmus subspicatus* (dříve známé jako *Scenedesmus subspicatus*) či *Pseudokirchneriella subcapitata* dle ČSN EN ISO 8692. Zelená řasa rodu *Desmodesmus* se vyznačuje plochými, rovnými nebo mírně zakřivenými koloniemi. Kolonie buněk jednobuněčné řasy (cenobium) jsou nejčastěji dvou až čtyřbuněčné. Buňky v cenobiu jsou vejčitého až elipsoidního tvaru, 5–12 x 2,4–7 μm velké, s široce zaoblenými vrcholy. Lehce ohnuté ostny, s délkou sahající do dvou třetin celkové délky buňky, jsou na konci okrajových buněk. Na zbývajících vrcholech se mohou vyskytovat rovné ostny vedlejší. *Desmodesmus subspicatus* je součástí planktonu a metafytonu (Metafyton – organismy rostoucí u dna ve fotické zóně bez spojení se substrátem), který se vyskytuje v zarostlých menších rybnících a nádržích (Kaštovský et al. 2018). Řasy jsou zástupci primárních producentů ve vodních ekosystémech a mají tak v ekotoxikologickém testování významnou roli. Mnoha studii

(Liguoro et al. 2012, Vasconcelos et al. 2017) je prokázána jejich vysoká citlivost a vhodné použití pro nejrozličnější toxikanty, například antibiotika nebo těžké kovy, které se právě běžně vyskytují v nemocniční odpadní vodě. Principem akutního testu toxicity je inhibice dělení jednobuněčných zelených řas. Populace řas rostoucí v prostředí s obsahem zkoušeného vzorku je porovnávána s populací rostoucí v kontrolním médiu po inkubaci 72 hodin v termostatu při $23 \pm 2^\circ\text{C}$ a intenzitě osvětlení 6 000-10 000 lx. Poté je vyhodnocena hustota řas pomocí mikroskopu a počítačící komůrky. Jako pozitivní kontrola pro monitorování citlivosti řasové kultury je použit roztok $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.



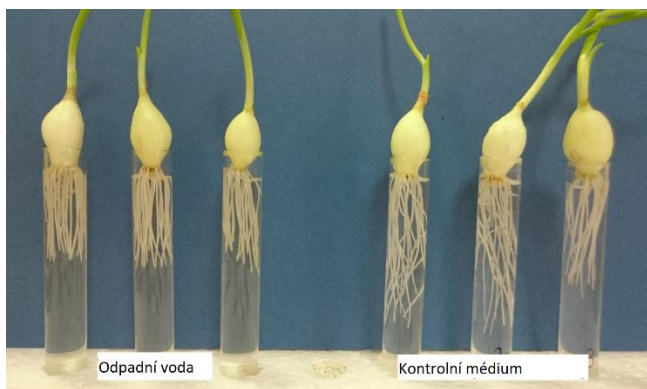
Obrázek 4 Ukázka nárůstu zelené řasy v koncentrační řadě odpadní vody

3.6.3 Test se semeny hořčice bílé

Sledování toxického či netoxického účinku na semenech hořčice bílé se doporučuje provádět pomocí testu inhibice růstu kořene na základě testovacího postupu uvedeného v příloze č. 1 Metodického pokynu odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů (2007). Principem metody je stanovení účinku látek obsažených ve vodném výluhu na klíčivost a růst kořene v počátečním vývoji rostliny. Test probíhá v termostatu 72 hodin, po jeho uplynutí se změří délka všech kořenů pomocí pravítka a vypočítá se průměr. Pro vyhodnocení výsledku se průměr délky kořene stanovený ve zkoušeném vzorku porovnává s aritmetickým průměrem délky kořene kontrolního vzorku a vypočítá se procento inhibice nebo stimulace. Pro test je potřeba minimální klíčivost semen 90%. Semena mají okrově žlutou barvu, do testu se smí využít pouze semena zdravá a středně velká. K ověření citlivosti semen se používá roztok $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

3.6.4 Test na cibuli kuchyňské

Zkouška se provádí na cibulkách (*Allium cepa L.*) o velikosti 16-18 mm. Cibule musí být bez jakéhokoli chemického ošetření. Citlivost testovaných cibulí se stanovuje pomocí 1% MMS (methylmethansulfonát), který slouží jako pozitivní kontrola. Cibule jsou vystaveny po dobu 72 hodin nezředěným vzorkům. Pitná voda z vodovodu slouží jako negativní kontrola. Test probíhá obvykle v šesti replikátech. Zkušební teplota musí být udržována na $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ s ochranou proti přímému slunečnímu záření. Na konci experimentu se provádí měření délek kořenů s přesností na 1 mm a je vypočítána inhibice prodloužení kořene vzhledem k negativní kontrole.



Obrázek 5 Ukázka testu na cibuli kuchyňské

3.6.5 Testy na perloočkách

Testy na perloočkách (*Daphnia magna*) jsou prováděny dle metody určené normou ČSN EN ISO 6341. Zkouška inhibice pohyblivosti na vodních korýších *Daphnia magna* Straus určuje koncentrace látek a směsí, které za 24h nebo 48h imobilizují 50% jedinců, vystavených podmínkám metody. Testy probíhají při denní periodě 16:8 (světlo:tma), bez krmení. Teplota během testu je udržována na $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Pro platnost testu musí být zajištěna koncentrace kyslíku $\geq 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Procento imobilizace v kontrolní skupině musí být $<10\%$. Inhibiční koncentrace se označuje 24h EC₅₀ nebo 48h EC₅₀ dle expoziční délky. Na konci testu se spočítají pohybliví jedinci a vypočte se procento imobilizace. Citlivost korýšů je kontrolována pravidelnými testy s K₂Cr₂O₇.

Perloočky pro tento typ testu představují jednoduše laboratorně kultivovatelný organismus s krátkou generační periodou. Výhodou je i vhodná velikost a snadná manipulace.

Test lze tak snadno využít pro akutní i chronické testy. Do testu musí být používány pouze jedinci mladší než 24 h, kteří jsou získáváni acyklickou parthenogenezi za definovaných podmínek chovu.

Rod *Daphnia* patří systematicky do čeledi hrotnatkovití (*Daphniidae*), řádu perloočky (*Cladocera*), do třídy korýši (*Crustacea*) a kmene členovci (*Arthropoda*). *Daphnia magna* je malý planktonický korýš (dospělý o délce 1,5–5,0 mm), který tvoří velmi důležitou součást potravního řetězce ve vodním ekosystému. Jsou důležitou potravou pro predátory, například pro ryby. Většina perlooček je schopna dvojího typu rozmnožování – partenogenetického a sexuálního. V dobrých životních podmínkách využívají především partenogenezi, kdy jsou vzniklá mláďata pouze samice podobná dospělcům a geneticky jsou shodná s matkou. Dojde-li ke zhoršení životních podmínek, začnou se rozmnožovat pohlavně a mohou produkovat i samce. Partenogenetické rozmnožování, kdy dozrává až 60 diploidních vajíček přibližně jednou za dva dny, závisí hlavně na teplotě prostředí. *Daphnie* se živí především fytoplanktonem a detritem. V laboratorním chovu se *Daphnie* krmí směsí živých a sušených zelených řas (Smirnov, 1978).



Obrázek 6 Základní test s organismem *Daphnia magna*

3.6.6 Testy na rybách

Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby se provádí dle normy ČSN EN ISO 7346-1,2,3. Doporučené druhy k ekotoxikologickému testování jsou *Poecilia reticulata* nebo *Danio rerio* Hamilton-Buchanan. Principem metody je sledování chování a přežívání ryb v odstupňovaných koncentracích testované látky po dobu 96h, která způsobí 50% mortalitu zkušebnímu organismu za podmínek daných metodou. Pro testy jsou používána obě

pohlaví. Ryby se 48 hod před testem přestanou krmit a během testu jsou bez krmení. Základní podmínkou je dobrá zdravotní kondice a nepřítomnost viditelných malformací u ryb zařazených do testu. Lze použít metodu statickou (zkoušený roztok se neobnovuje), obnovovací – semistatickou (zkoušený roztok se obnovuje po 24h nebo 48h) či průtočnou (zkoušený roztok se nepřetržitě obnovuje).

Živorodka duhová (*Poecilia reticulata*) je sladkovodní až brakická paprskoploutvá ryba z čeledi živorodkovitých (*Poeciliidae*) živící se masitou i rostlinnou složkou. Samice dosahují velikosti okolo 6 cm, samci jsou menší, dorůstají do velikosti okolo 4 cm. Danio pruhované je výhradně sladkovodní ryba patřící do čeledi kaprovitých. Tělo je podlouhlé, štíhlé, s maximální délkou do 5ti cm. Na bocích je viditelné 7–9 podélných pruhů střídajících kovově modré a zlatožluté pruhy. Existuje pohlavní dimorfismus, lze tak snadno rozlišit samce od samic. Sameček je delší, štíhlejší, žluté pruhy se kovově lesknou. Samička má zaoblenější břicho, barva těla je světlejší, pruhy jsou méně výrazné. Ryby jsou obratlovci, tudíž jako pokusná zvířata podléhají zákonu na ochranu zvířat proti týrání (Zákon č. 246/1992 Sb.). Testování mohou provádět jediné odborně způsobilé osoby. Z tohoto důvodu se doporučuje využít namísto akutního testu na rybích dospělých test na rybích jikrách (Schmitz, 1999).



Obrázek 7 *Danio rerio* a *Poecilia reticulata*

3.6.7 Fish embryo test

Fish embryo test (neboli FET test) byl přijat OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) v r. 2013 jako alternativa konvenčního testu akutní toxicity na rybách. Experimenty na rybích embryích jsou považovány za alternativu k pokusům na zvířatech, jelikož dospělé ryby jako testovací organismy jsou nahrazeny embryi ryby *Danio rerio* (Dánio pruhované) v časně fázi vývoje. Nervový systém v časně fázi embryonálního vývoje není dostatečně vyvinutý a tak embrya necítí bolest. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010, o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely nespécifikuje embrya jako pokusná zvířata, tudíž se na ně nevztahuje.

Jelikož vědecká komunita usiluje o využívání alternativních testů, vzniklo mnoho výzkumů týkající se srovnávání metody FET s klasickým testem akutní toxicity na rybách. Závěr výzkumu (Lammer et al. 2009) poukazuje na fakt, že test na rybích embryích je korelující s klasickou alternativní metodou na rybích dospělých a je vhodná k testování ekotoxicity různorodých látek a směsí. Prokázali to srovnáním metod na 77 chemikáliích. Z výsledků vyplynulo, že test na rybích embryích je rozumnou alternativou, která bude využívána v budoucnosti ve větším rozsahu. Ke stejnému závěru došel i výzkum Embry a kol., z roku 2009, kde konstatuje, že je metoda vhodná pro zkoumání nepříznivých účinků různorodých polutantů (odpadní vody, výluhy z odpadů, chemické látky) na vodní biotu i vhodný nástroj pro hodnocení embryotoxických potenciálů ve vodě a sedimentech. Test lze také úspěšně aplikovat i na látky vykazující různé režimy účinků, různě se rozpouštějící, látky těkavé i hydrofilní (Belanger et al. 2013).

Principem testu OECD TG 236 je vystavení oplodněných rybích jiker zkoušené látce a vyhodnocení její toxicity na základě indikátorů letality.

Mezi základní letální indikátory patří:

- 1) Koagulace jikry
- 2) Nepřítomnost tvorby somitů (párové oblasti mezodermu, které se vytváří v raných fázích vývoje strunatců a leží na obou bocích podél struny hřbetní, ze které vzniká škára, kosterní svaly a obratle)
- 3) Neoddělení ocasu od žloutkového váčku
- 4) Nepřítomnost srdečního tepu

Mezi subletální (nepostačující k usmrcení) indikátory patří:

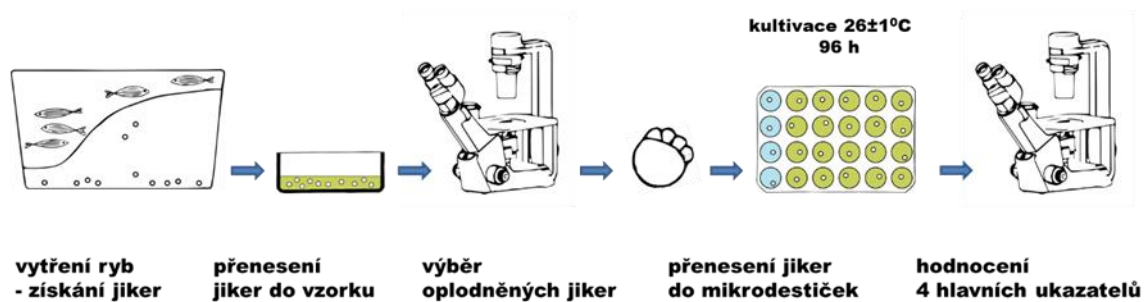
- 1) Opožděný srdeční rytmus
 - 2) Nepřítomnost krevního oběhu
 - 3) Přítomnost edému
 - 4) Zakřivení páteře
 - 5) Porucha pigmentace
- (OECD TG 236).

Na obrázcích níže jsou vidět subletální abnormality po expozici 96 hpf (hodin po oplození) vzorkům nemocniční odpadní vody. Obrázek č. 1 znázorňuje normální vývoj embrya v kontrolním médiu. Na obrázku č. 2, 3 a 4 lze pozorovat zakřivení páteře. Perikardiální edém a edém žloutkového váčku se vytvořil u embrya na obrázku č. 2. Na obrázku č. 4 je znázorněn příklad poruchy pigmentace.



Obrázek 8 Přehled subletálních abnormalit, PE = perikardiální edém, YSE = edém žloutkového vaku, SC = zakřivení páteře, PF = porucha pigmentace.

Ryby jsou nejčastěji chované v chovných systémech např: chovný systém ZebTEC od firmy Tecniplast. Systém nepřetržitě upravuje a monitoruje důležité parametry vody (pH, konduktivitu a teplotu). Jikry jsou získávány od ryb *Danio rerio* ve věku od 6 do 18 měsíců. Pro získání oplodněných jiker se ryby rozdělí podle pohlaví večer před testem do 2 litrových vytíracích akvárek. Nádrže mají nakloněnou rovinu simulující rybám břeh, u kterého se v přírodě přirozeně vytírají. Ve vytíracím akváriu je připraven čerstvý roztok destilované vody obohacený živinami. Samice a samci jsou ve vytíracím akváriu odděleni plastovým sklem. Po dvanácti hodinách se v akvarijní místnosti rozsvítí světlo, z vytíracího akvária se vyjme dělicí sklo a samci a samice se začnou vytírat. Oplozené i neoplozené jikry padají skrz děrovanou podložku na dno akvária. Jikry se po vyjmutí promyjí obohacenou destilovanou vodou (pH 6,5 – 7,5, tvrdost vody 70 – 100mg/l CaCO₃) a přenesou do zkoušeného vzorku. Embrya by měla být ponořena do vzorku nejpozději v 16-ti buněčné fázi. Pod mikroskopem se vytřídí oplodněné jikry a pipetou přendají do 24-jamkových mikrodestiček. Test musí být zahájen nejpozději do 90 minut po oplození. Mikrodestičky jsou po celou dobu zkoušky při 26±1°C a při světelné periodě 16:8 (světlo:tma). Citlivost embryí je kontrolována pomocí 3,4-dichloranilinu (4mg/l), který slouží jako pozitivní kontrola v každém testu. Test je považován za platný, pokud se koncentrace kyslíku během testu udržovala nad 80% a úmrtnost negativní kontroly nepřesáhly 10%. Po 48 hodinách po oplození jsou hodnocena 4 základní kritéria a vyhodnocena mortalita a LC₅₀ v procentech. Další hodnocení je provedeno po 96 hodinách po oplození, vyhodnocuje se mortalita, subletální indikátory a LC₅₀.



Obrázek 9 Schéma postupu u zkoušky FET

3.7 Genotoxikologické metody

Účelem testování genotoxicity je zjistit, zda testovaná látka ovlivňuje genetický materiál nebo může způsobovat rakovinu. Tyto testy lze provádět jak u prokaryotických, tak u eukaryotických buněk. Jejich vyhodnocování a monitorování je důležité především z důvodu jejich dlouhé doby latence či nepříznivému důsledku působení až na další generace.

Jelikož testování genotoxických účinků na zvířatech pomocí epidemiologických studií jsou velmi zdlouhavá, nákladná a eticky náročná, jsou mnohem častěji využívány krátkodobé testy, u kterých je potenciál rychlého odhalení existence genotoxického působení. Pro hodnocení genotoxicity bylo vyvinuto mnoho *in vitro* a *in vivo* testů, které s řadou koncových bodů detekují poškození DNA nebo její biologické důsledky u prokaryotických nebo eukaryotických organismů. Mezi nejčastěji používané metody pro detekci genotoxicity patří bakteriální Amesův test, kometový test a zkouška na chromozomové aberace u savců *in vitro* (Kaur et al. 2018).

Test „Comet assay“ neboli kometový test, poprvé publikovaný v roce 1984 Ostlingem a Johansonem, patří mezi významné krátkodobé testy genotoxicity. Test spočívá v alkalické gelové elektroforéze jednotlivých buněk. Fragmenty jaderné DNA, vzniklé působením mutagenních faktorů, mají tendenci vycestovat z jader, což po vizualizaci dává výsledek obrazu „komety“. Účelem kometového testu je identifikovat látky, které způsobují poškození DNA. Kometová zkouška je schopna detekovat jednovláknové nebo dvouvláknové zlomy. K těmto zlomům dochází v důsledku přerušení fosfodiesterové vazby mezi dvěma sousedními deoxynukleotidy. Tyto zlomy mohou vést k poškození chromozomů, které je spojeno s mnoha lidskými chorobami včetně rakoviny (OECD, 2016).

Další využívanou metodou pro hodnocení genotoxicity je zkouška na chromozomové aberace u savců *in vitro*. Účelem testu je identifikovat látky, které způsobují strukturní

chromozomální aberace v kultivovaných savčích buňkách. Expozice testovanou substancí se provádí buďto s metabolickou aktivační preparací nebo bez ní. Po expozici testované látky je zastaveno buněčné dělení a chromozómy jsou barveny. Metafázní buňky jsou pomocí mikroskopu analyzovány na chromozomální aberace. Stejně se postupuje při detekci strukturálních aberací z periferních lidských lymfocytů (OECD, 2016).

Ames test byl vyvinutý Brucem Amesem v roce 1970, jako rychlá a citlivá metoda. Tímto testem jsou velmi často testovány nové farmaceutické látky a chemikálie používané v průmyslu. Používají se v něm speciálně upravené bakteriální kmeny *Salmonella typhimurium*, u nichž byla uměle vyvolána mutace v souboru strukturních genů. Ty zodpovídají za syntézu histidinu v buňce. Aby tyto bakterie mohly růst, vyžadují přidání histidinu, který si samy nedovedou tvořit. Monitoruje se schopnost testované látky způsobit reverzní mutaci a obnovit růst bakterií v médiu bez přídavku histidinu. Zvětšený výskyt revertovaných kolonií oproti kontrole ukazuje mutagenní účinek látky (Föllmann et al. 2013).

4 VLASTNÍ PRÁCE

Práce se skládá ze souboru čtyř vědeckých studií, jejichž výsledky jsou prezentovány formou článků v odborných recenzovaných časopisech (viz PŘÍLOHY). Hlavním tématem prací je vyhodnocení ekotoxicity a genotoxicity odpadních vod z nemocnic pomocí různých biologických metod. Následným tématem bylo porovnání citlivosti Fish embryo testu se dvěma konvenčními metodami a posoudit vhodnost jeho využití v testovací baterii určené pro hodnocení vzorků nemocničních odpadních vod.

Studie má i praktický dopad. Při novelizaci normy ČSN 75 6406 - Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení (ZZ) vypouštěnými do stokové sítě pro veřejnou potřebu (vydaná 1. 2. 2020), pomohla studie s výběrem vhodné testovací baterie pro ekotoxikologické hodnocení odpadních vod z nemocnic. Z výsledků studie vyplynulo, že jako vyhovující baterii lze využívat: Zkoušku inhibice růstu sladkovodních řas (ČSN EN ISO 8692), Zkoušku na luminiscenčních bakteriích (ČSN EN ISO 11348-2) a Zkoušku inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (ČSN EN ISO 6341).

STUDIE I:

Jírová G., Wittlingerová Z., Zimová M., Vlková A., Wittlerová M., Dvořáková M., Jírová D., 2016: Bioindicators of wastewater ecotoxicity. *Neuroendocrinology Letters* 37(1): 17-24.

STUDIE II:

Vlková A., Wittlingerová Z., Zimová M., **Jírová G.**, Kejlová K., Janoušek S., Jírová D., 2016. Genotoxicity of wastewater from health care facilities. *Neuroendocrinology Letters* 37(1): 101-108.

STUDIE III:

Jírová G., Vlková A., Wittlerová M., Dvořáková M., Kašparová L., Chrz J., Kejlová K., Wittlingerová Z., Zimová M. Hošíková B., Jiravová J., Kolářová H., 2018: Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays. *Neuroendocrinology Letters* 39: 101–113.

STUDIE IV:

Wittlerová M., **Jírová G.**, Vlková A., Kejlová K., Malý M., Heinonen T., Wittlingerová Z., Zimová M., 2020: Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos to Hospital Effluent Compared to *Daphnia magna* and *Allivibrio fischeri*. *Physiological Research* 69(4): S681-S691.

PRAKTICKÝ VÝSTUP - NOVELIZACE NORMY

ČSN 75 6406. Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení (ZZ) vypouštěnými do stokové sítě pro veřejnou potřebu. Únor 2020.

Do novelizované normy ČSN 75 6406 byly začleněny na základě níže uvedených výsledků tři dostatečně citlivé ekotoxikologické testy. V normě jsou zobrazené v příloze F, spolu s dalšími ukazateli a doporučenými hodnotami pro předčištěné odpadní vody ze zdravotnických zařízení vypouštěné do veřejné kanalizace.

5 KOMENTÁŘE K PUBLIKACÍM

5.1 Studie I - Bioindicators of wastewater ecotoxicity.

Poznatky ze **studie I** upozorňují na důležitost vhodného výběru testovací baterie. Pro vyhodnocení toxicity odpadních vod na ekosystémové úrovni byly zvoleny organismy všech trofických úrovní. Zelená řasa *Desmodesmus subspicatus* a jednoděložná rostlina *Allium cepa* jako producenti, korýš *Daphnie* a ryba *Danio rerio* jako konzumenti a bakterie *Vibrio fischeri* jako destruent. Přehled všech použitých metod znázorňuje tabulka č. 1.

Tabulka 1 Charakteristika použitých metod

Metoda	Organismus	Standard	Biologické parametry a expoziční čas	Hodnocení
Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	ČSN EN ISO 8692	Růstová inhibice 72h	EC ₅₀ [%] / TU
Zkouška na luminiscenčních bakteriích	<i>Vibrio fischeri</i>	ČSN EN ISO 11348-2	Inhibice bioluminiscence 15min,30min	EC ₅₀ [%] / TU
Zkouška inhibice pohyblivosti	<i>Daphnia magna</i>	ČSN EN ISO 6341	Inhibice mobility 48h	EC ₅₀ [%] / TU
Test <i>Allium cepa</i>	<i>Allium cepa</i>		Inhibice růstu 72h	% inhibice kořenů
FET test	<i>Danio rerio</i> embryo	OECD TG 236	48h, 96h (hodin po oplození)	Úmrtnost [%], LC ₅₀ [%], Subletální efekty [%]
Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi (AMES test)	<i>Salmonella typhimurium</i>	OECD TG 471	24 h	kvalitativní stanovení

Pro hodnocení ekotoxicity nemocničních odpadních vod bylo využito ve **studii II, III a IV** celkem 6 různých organismů. Z výsledků lze zhodnotit organismy citlivé pro tento charakter vzorku a organismy k odpadní vodě nevnímavé. Na počátku **studie I** byl vyřazen test na semenech hořčice bílé. Úroveň toxicity u tohoto testu značně kolísala, a u žádného vzorku nedosáhla inhibice délky kořenů více jako 20%. Test není mezinárodně uznávaný, je využíván pouze v České republice pro účely vyhodnocení ekotoxicity odpadů ukotvený v příloze č. 1 Metodického pokynu odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. Při novelizaci normy ČSN 75 6406 (Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení (ZZ) vypouštěnými do stokové sítě pro veřejnou potřebu) se nově objevila i možnost nemocniční odpadní vody ekotoxikologicky testovat, do připravované testovací baterie metoda na semenech zařazena nebyla.

Další metoda, u níž nebyla citlivost dostatečně prokázána, byl test s *Allium cepa*. **Studie III** prokázala, že test založený pouze na měření kořenů cibulí, není dostatečně citlivý pro hodnocení ekotoxicity nemocničních odpadních vod. Ačkoli data ukázala toxické reakce *Allium cepa* s hodnotami inhibice prodloužení kořenů cibulí od 7,2% do 29,7% po expozici nezředěným vzorkům, nedosáhly 50% inhibice, a proto nebylo možné vypočítat EC50 u žádného testovaného vzorku. K podobným výsledkům týkající se citlivosti tohoto organismu dospěla i studie Firbas a Amon (2013), sledující účinnost čistírny odpadních vod typu „LIMNOWET®, kdy čistící proces zajišťuje mokřad. Test *Allium cepa* odhalil snížení stupně toxicity po procesu čištění o 29,0% na 3,5%. Test *Allium cepa* je validován Mezinárodním programem pro chemickou bezpečnost (IPCS) jako účinný test pro analýzu a monitorování genotoxicity látek v životním prostředí in situ. Jeho úspěšného využití jako genotoxického indikátoru prokázala studie (Herrero, 2012), zjišťující škodlivý účinek di-(2-ethylhexyl) ftalátu, triklosanu a propylparabenu na suchozemské rostliny. Byl zjištěn pozitivní výsledek, jak z hlediska inhibice délek kořenů oproti kontrole, tak i průkaz genotoxicity u dvou sledovaných látek. Ostatní použité testy prokázaly při testování dobrou citlivost pro zkoušené vzorky. Jedná se o organismy *Desmodesmus subspicatus*, *Allivibrio fischeri*, *Daphnia magna* a embrya *Danio rerio*. Výsledky odhalily určité rozdíly toxického působení vzorků mezi jednotlivými druhy, proto je vždy vhodné využít rozsáhlou testovací sadu. Stejnou baterii testů zařazenou pro vzorky odpadních vod využilo mnoho dalších studií (Gartiser et al. 2010, Zgorska et al. 2011, Mendonca et al. 2009).

I přes zjištěné určité rozdíly mezi druhy v citlivosti na vzorky odpadní vody, hodnoty u *D. subspicatus*, *V. fischeri* a *D. magna* byly na stejné úrovni klasifikace téměř u všech

testovaných vzorků. To vede k závěru, že tyto tři druhy organismů jsou stejně vhodné pro odhad toxicity odpadních vod a že tato baterie by mohla být užívána pro rutinní testování.

Ryby, jakožto běžná součást vodního ekosystému mohou být vhodným nástrojem pro hodnocení toxicity odpadních vod. Ovšem **studie I** upozorňuje na potřebu dodržování pravidel 3R, tj. nahradit klasické konvenční testy na obratlovcích alternativními metodami. Z tohoto důvodu nebyl do baterie zařazen test akutní toxicity na rybích dospělých (dle normy ČSN EN ISO 7346-1,2,3), i když je běžnou součástí používaných baterií při hodnocení ekotoxicity odpadů. Na doporučení ze **studie I** byl namísto toho zahrnut test na rybích embryích (FET - zkratka z anglického názvu Fish embryo test), jakožto alternativní metoda k testům na rybách.

5.2 Studie II - Genotoxicity of wastewater from health care facilities.

Závěry ze **studie II** upozorňují na fakt, že řada chemikálií obsažených v nemocniční odpadní vodě prokázala genotoxický/mutagenní účinek. Ten může být obzvláště nebezpečný, jelikož nemá žádnou prahovou úroveň a jeho účinek nelze zvrátit. Genotoxické látky způsobují změnu genetického kódu buněk a mohou přispívat k rozvoji rakoviny. Genotoxicita tak poškozuje nejen organismy, které měly s mutagenní látkou kontakt, ale může i dlouhodobě ovlivňovat další generace. Genotoxické látky vyskytující se v životním prostředí mohou tak výrazně přispívat ke zvýšení výskytu rakoviny v populaci. Z důvodu velké nebezpečnosti těchto látek byl do testovací baterie ekotoxicity zařazen jeden bakteriální test genotoxicity, a to Amesův test (test reverzní mutace *Salmonella typhimurium*). Jde o krátkodobý bakteriální test pro identifikaci nebezpečných látek, jehož výsledkem je mutagenita v bakteriích. Test reverzní mutace je jedním z nejčastěji používaných testů v toxikologii, jsou jím testovány téměř všechny nové farmaceutické látky a chemikálie používané v průmyslu (Föllmann, 2013).

Cílem studie Beltifa et al. (2020) bylo vyhodnotit metodami *in vivo* a *in vitro* genotoxicitu tří odpadních vod získaných z tuniských nemocnic. Jako model pro detekci fragmentace DNA byla použita játra myších samic švýcarských albínů. Výsledky ukázaly, že všechny nemocniční odpadní vody zkoušené v této studii způsobují významná kvalitativní a kvantitativní rizika v jaterní DNA, což vede k závěru, že tyto vody mají výrazně zvýšený genotoxický a cytotoxický potenciál. Plyne to i z detekovaného zvýšeného výskytu těžkých kovů, antibiotik a změkčovadel u všech zkoušených nemocničních odpadních vod.

V naší studii byl využit u vzorků H1 – H5. Na rozdíl od provádění analýz ekotoxicity na nefiltrovaných vzorcích, Ames test vyžaduje vzorky sterilně filtrované. Filtrace byla provedena pomocí membránového filtru DURAPORE (MILLIPORE) - hydrofilní, pórovitost

0,22 µm. Ve studii byly použity dva testovací kmeny (TA100) a (TA 98). K modelaci savčího metabolismu byl přidáván homogenát připravený z jater potkanů. V každém testování byly zahrnuty relevantní pozitivní a negativní kontroly. Vzorky a kontroly byly testovány v triplikátech. Počet revertantních kolonií byl spočítán pomocí automatického počítadla Schuett kolonie Quant HD (Schuett Biotec) a porovnán s počtem spontánních revertantních kolonií na destičkách negativní kontroly. Výsledky Amesova testu ve **studii II** jsou shrnuty v tabulce č. 2. Genotoxicita testovaných vzorků nebyla potvrzena Amesovým testem ani u jednoho vzorku odpadní vody. Počet revertantů vyvolaných testovanými vzorky nikdy nedosáhl dvojnásobného zvýšení počtu ve srovnání s negativními kontrolami. Výsledky Amesova testu mohou být ovlivněny sterilizací vzorku (filtrací), která mohla způsobit ztrátu genotoxické aktivity, protože na filtrech mohou být zachyceny určité chemikálie. Studie bude pokračovat po optimalizaci přípravy vzorků a pro zachycení případné genotoxicity bude kombinovat více druhů testů.

Tabulka 2 Výsledky Ames testu

Metoda	H1	H2	H3	H4	H5
Ames test	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní

5.3 Studie III - Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays.

Hodnocení ekotoxicity se běžně provádí dle hodnoty EC₅₀, což je koncentrace látky na kterou reaguje 50% organismů. Čím je hodnota EC₅₀ nižší, tím vyvolává hodnocená látka negativní účinek při nižší koncentraci a účinek je tudíž závažnější. Testy byly prováděny prostřednictvím koncentračních řad, korelujících v závislosti na toxicitě daného vzorku. Základní testy byly prováděny s pěti až osmi ředěními zkušební vzorku v duplikátech (test na bakterii) nebo triplikátech (test na řase, vodním korýši). Pokud hodnoty toxického účinku přesáhly 50%, EC₅₀ bylo vypočítáno probitovou metodou.

V naší studii jsme výsledné hodnoty EC₅₀ přepočítali pomocí níže uvedeného vzorce na jednotku TU, kterou jsme využili pro hodnocení konečných výsledků.

$$TU = \frac{1}{EC_{50}[\%]} \cdot 100$$

Přehledný klasifikační systém je znázorněn v tabulce č. 3. Mnoho autorů hodnotu TU používá právě pro hodnocení ekotoxicity odpadních vod (Maselli et al. 2015, Hamjinda et al. 2015, Yilmaz et al. 2017, Laquaz et al. 2019). Vzorčky jsou klasifikovány do pěti tříd na základě nejvyšší hodnoty TU, kterou vykazuje jeden ze zkoušených organismů.

Tabulka 3 Klasifikační systém

Jednotka toxicity (TU)		Toxicita
TU < 0,4	I	netoxická
0,4 ≤ TU < 1,0	II	málo toxická
1,0 ≤ TU < 10,0	III	toxická
10,0 ≤ TU < 100,0	IV	silně toxická
TU > 100	V	extrémně toxická

Bylo vybráno celkem 8 nemocnic ze 4 krajů; 3 nemocnice z Prahy, 2 ze Středočeského kraje, 2 z Jihočeského kraje a 1 z Královéhradeckého kraje. Vybraná zařízení provozují infekční oddělení, pro které je dle normy ČSN 75 6406 (Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení (ZZ) vypouštěnými do stokové sítě pro veřejnou potřebu) nařízeno odpadní vodu ošetřit základním čistícím procesem mechanicko-biologické čistírny a dezinfekcí. Zařízení si může zvolit, jaký typ dezinfekce bude využívat. Nemocnice byly z důvodu anonymity označeny H1-H8. Byly vybrány objekty odlišného zaměření a s odlišným množstvím lůžek. Do naší studie byla rovněž vybrána i největší nemocnice v České republice. Pro prohloubení studie bylo zařazeno i zařízení zaměřující se na léčbu onkologicky nemocných pacientů. V odpadních vodách z této nemocnice se předpokládá vyšší množství radiofarmak. V tabulce č. 4 jsou stručně charakterizovány důležité informace o nemocnicích. Kvůli celosvětově rostoucímu počtu pacientů léčících se s rakovinou roste používání chemoterapeutických látek. V několika evropských zemích, byly tyto léky detekovány v nemocnicích a komunálních odpadních vodách. Studie Klein et al. (2021) hledala přítomnost několika protinádorových léků (5-fluorouracilu, gemcitabinu a cyklofosfamidu, a dvou metabolitů, alfa-fluor-beta-alaninu a 2'-deoxy-2' a 2'-difluorouridin) v odpadních vodách velké onkologické nemocnice. Všechny tyto léky byly ve vodě přítomny, a to jak na přítoku do nemocniční čistírny odpadních vod, tak po procesu čištění. Hodnoty se však pohybovaly pouze v řádu ng/l, což jsou hodnoty, u kterých

nejdou jednoznačně prokázané toxické a genotoxické účinky. Ovšem kumulace směsí těchto látek v životním prostředí může mít zvýšený ekotoxikologický potenciál.

Tabulka 4 Charakteristika nemocnic

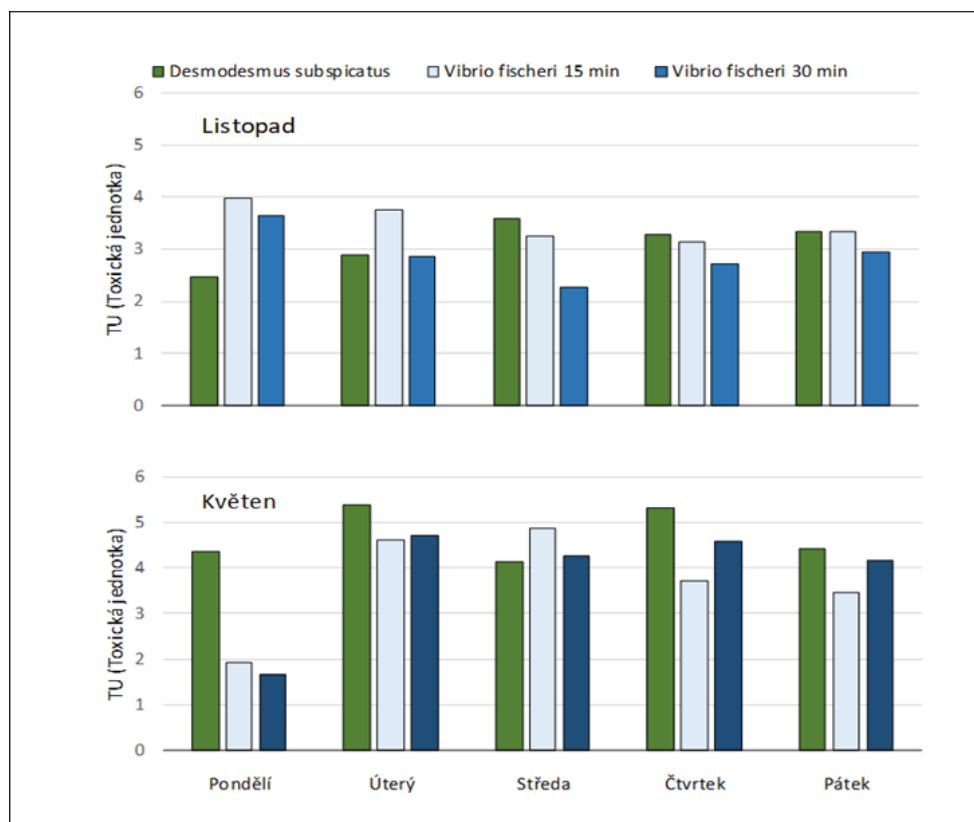
	H1	H2	H3	H4	H5
Typ nemocnice	Fakultní	Fakultní	Onkologická	Všeobecná	Fakultní
Počet lůžek	2 189	996	245	476	1 360
Průtok (m ³ /den)	50 -100	50	124	10	25
Dezinfekční proces	NaClO	NaClO	NaClO	Cl ₂	Cl ₂
ČOV	Mechanicko-biologická	Mechanicko-biologická	Mechanicko-biologická	Mechanicko-biologická	Mechanicko-biologická
Odtok	Městská kanalizace	Městská kanalizace	Recipient	Městská kanalizace	Městská kanalizace

	H6	H7	H8
Typ nemocnice	Univerzitní	Všeobecná	Všeobecná
Počet lůžek	1 600	423	1 447
Průtok (m ³ /den)	100-120	40	360
Dezinfekční proces	NaOCl	Nechloruje se	Cl ₂
ČOV	Mechanicko-biologická	Mechanicko-biologická	Mechanicko-biologická
Odtok	Městská kanalizace	Městská kanalizace	Městská kanalizace

Pilotní **studie III** zahrnovala týdenní dynamiku ekotoxicity odpadních vod z jedné nemocnice ve dvou různých ročních obdobích. První série vzorkování byla provedena v listopadu 2016 (21. – 25. Listopadu 2016), druhý odběr vzorků v květnu 2017 (22. – 26. Května

2016). Odběr vzorků byl proveden z revizní šachty, kde odpadní voda po čistícím procesu odtéká do městské kanalizace. Z hlediska charakteristiky vzorku jde o infekční splaškovou odpadní vodu předčištěnou v biologické čistírně a dezinfikovanou chlornanem sodným. Vybraná nemocnice má celkem 2 199 lůžek a patří tak mezi největší nemocnice v České republice. Vzorky byly odebírané od pondělí do pátku v době maximálního průtoku tj. od 9:00 – 13:00, každou hodinu se odebral dílčí vzorek, který byl na konci odběrového času smíchán, vznikl tak směsný vzorek časově závislý z 5-ti dílčích vzorků. V obou sériích bylo během týdne odebráno pět složených vzorků. Schéma vzorkování bylo navrženo v souladu s údaji z literatury (Goullé, 2012) dokumentující klesající množství toxických látek v odpadní vodě v sobotu a neděli z důvodu snížení typických lékařských aktivit. Ekotoxicita byla testována pomocí tří organismů: *D.subspicatus*, *V.fischeri* a *A.cepa*. Výsledné hodnoty jsou uvedeny pomocí grafu v tabulce č. 5. Výsledky u testu *A.cepa* ukázaly menší citlivost na všechny testované vzorky ve srovnání s *D.subspicatus* a *V.fischeri*. Inhibice růstu kořenů cibulí po expozici nezředěným vzorkům byla pouze od 7,2% do 29,7%. Z důvodu nedosažení inhibice 50%, nemohla být vypočtena hodnota EC₅₀, tudíž ani vypočtená TU jednotka. V grafu č. 5 proto nemůže být test *Allium cepa* zobrazen. V případě *D.subspicatus* a *V.fischeri* jsme prokázali dobrou citlivost na vzorky odpadní vody.

Tabulka 5 Výsledný graf



Pro *D.subspicatus* nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v jednotlivých pracovních dnech (od pondělí do pátku) ($p = 0,601$), hodnoty TU byly v listopadu v rozmezí 2,46 - 3,58 a 4,14 - 5,40 v květnu. V případě *V. fischeri* (15 min a 30 min) ukazovaly hodnoty TU v pondělí značné kolísání, které pravděpodobně souviselo s víkendovými nemocničními aktivitami. Proto byly následně porovnávány pouze hodnoty od úterý do pátku. Výsledky neprokázaly žádné významné rozdíly pro *V. fischeri* 15 min ($p = 0,337$) s hodnotami TU mezi 3,15 - 3,76 v listopadu a 3,47 - 4,86 v květnu a pro *V. fischeri* 30 min ($p = 0,359$) s hodnotami TU mezi 2,27 - 2,94 v listopadu a 4,16–4,73 v květnu.

Tabulka 6 Základní fyzikálně chemická a chemická charakteristika vzorků

Parametr	Jednotka	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
Teplota	°C	6,5	6,5	13	4	6	15	6,0	20,0
pH		7,91	7,51	7,88	7,65	7,81	4,91	7,60	6,54
Konduktivita	µS/cm	1 163	869	979	811	23 800	1 104	1 298	1 440
Rozpuštěné látky	mg/l	580	532	707	465	1 970	797	743	861
Volný chlor	mg/l	0,04	0,08	0,20	0,08	0,14	0,09	0	0,06
Celkový Chlor	mg/l	0,06	0,53	0,42	>6	2,09	2,22	0,05	0,08

Účelem **studie III** bylo zjistit hodnotu toxicity odpadních vod z vybraných nemocnic v České republice pomocí tradičních a alternativních toxikologických metod. Studie Barceló et al. (2020) zdůrazňuje potřebu hodnotit kvalitu odpadních vod, a to jak prostřednictvím ekotoxikologických nástrojů, tak i pomocí chemické analýzy. Kombinací více analýz by pokrylo širší škálu koncových bodů (např. ekotoxicita, genotoxicita, cytotoxicita) a lépe by došlo k určení účinnosti čistící technologie na dané čistírně odpadních vod. Zatím se však s kompletním hodnocením lze setkat pouze výjimečně.

Vzorkování pro rozsáhlý průzkum byl zahájen v únoru 2018 (13.2. - 22. 2.), kdy bylo celkem odebráno 5 nemocničních odpadních vod. Jeden kompozitní vzorek byl odebrán z každé nemocnice. Pro možnost porovnat kvalitu odpadních vod u dvou pozitivních a jedné negativní nemocnice v různých časových periodách byl v roce 2019 proveden opětovný náběr (H1, H2, H4). Navíc v tomtéž roce byly odebrány 3 vzorky ze tří nových nemocničních zařízení. Vzorky byly nabírány v době největšího průtoku ze šachty umístěné u odtoku z nemocniční čistírny. Vzorky byly okamžitě převezeny do laboratoře v chladičích boxech a skladovány při teplotě

< -18°C. V laboratoři byly změřeny základní fyzikálně chemické a chemické parametry, uvedené v tabulce č. 6.

Ve studii (Khan et al. 2020) zabývající se přehledem informací o nemocniční odpadní vodě, byla vytvořena přehledová tabulka s naměřenými hodnotami vybraných fyzikálně chemických parametrů u nemocničních odpadních vod. Zjištěné hodnoty pH (rozmezí 6,8 – 8,6) a konduktivity (rozmezí mezi 230 – 1 468 µS/cm) odpovídá naměřeným hodnotám u vzorků v naší studii.

Tabulka 7 Přehled konečných výsledků (vzorky odebrané v roce 2018)

Organismus	H1			H2			H3			H4			H5		
	EC ₅₀ [%]	TU	třída	EC ₅₀ [%]	TU	třída	EC ₅₀ [%]	TU	třída	EC ₅₀ [%]	TU	třída	EC ₅₀ [%]	TU	třída
<i>Desmodesm. subspicatus</i>	25,3	3,95	III	NS	0	I	NS	0	I	35,3	2,83	III	NS	0	I
<i>Aliivibrio fischeri</i> 15 min.	42,6	2,35	III	NS	0	I	NS	0	I	43,1	2,32	III	NS	0	I
<i>Aliivibrio fischeri</i> 30 min.	28,9	3,46	III	NS	0	I	NS	0	I	41,3	2,42	III	NS	0	I
<i>Daphnia magna</i> 24 hodin	67,6	1,48	III	NS	0	I	NS	0	I	39,3	2,54	III	NS	0	I
<i>Daphnia magna</i> 48 hodin	61,3	1,63	III	NS	0	I	NS	0	I	24,3	4,12	III	NS	0	I
<i>Allium cepa</i>	*NS	0	I	NS	0	I	NS	0	I	NS	0	I	NS	0	I
Vyhodnocená toxicita	III			I			I			III			I		

NS – nelze stanovit: Hodnoty inhibice u neředěných vzorků nepřesáhly 50%, proto nebylo možné vypočítat EC50.

Tabulka 8 Přehled konečných výsledků (vzorky odebrané v roce 2019)

Organismus	H6			H7			H8		
	EC ₅₀ [%]	TU	třída	EC ₅₀ [%]	TU	třída	EC ₅₀ [%]	TU	třída
<i>Desmodesm. subspicatus</i>	NS	0	I	NS	0	I	7,02	14,2	IV
<i>Aliivibrio fischeri</i> 15 min.	NS	0	I	NS	0	I	12,5	7,99	III
<i>Aliivibrio fischeri</i> 30 min.	NS	0	I	NS	0	I	13,1	7,60	III
<i>Daphnia magna</i> 24 hodin	NS	0	I	NS	0	I	119,7	0,84	II
<i>Daphnia magna</i> 48 hodin	NS	0	I	NS	0	I	59,4	1,68	III
Vyhodnocená toxicita	I			I			IV		

NS- nelze stanovit: Hodnoty inhibice u neředěných vzorků nepřesáhly 50%, proto nebylo možné vypočítat EC50.

Ekotoxicita byla stanovena pomocí baterie skládající se ze čtyř testovaných organismů: *D.subspicatus*, *V.fischeri*, *D.magna* a *A.cepa*. Test s *A.cepa* nebyl u vzorků odebraných v roce 2019 prováděn, jeho citlivost na vzorky odpadních vod nebyla dostatečně průkazná. Tabulka 7 a 8 uvádí souhrnné výsledky pro všechny použité testované druhy. Za účelem porovnání jejich ekotoxikologického potenciálu byly nemocnice klasifikovány podle systému klasifikace toxicity popsáno v tabulce 3. Naměřené výsledky prokázaly různé úrovně ekotoxicity vzorků z jednotlivých nemocnic. Výsledná data na základě výpočtu jednotky TU ukazují, že odpadní voda z jedné nemocnice patří do třídy IV (jako silně toxická), odpadní vody ze dvou nemocnic do třídy III (jako toxické) a pět nemocničních odpadních vod náleží do skupiny I (jako netoxické). Nemocnice H8 má spojenou výpust pro odpadní vodu z nemocniční čistírny prádla. Taková voda obsahuje řadu detergentů a bělicích prostředků, které mohly mít značný vliv na konečný výsledek. Vzorky H2, H3, H5, H6 a H7 měly nízký toxický účinek na *D.subspicatus*, *V.fischeri*. Test *Allium cepa* prováděný u vzorků H2, H3 a H5 neprokázal toxický účinek vůbec. Imobilizace *D. magna* nebyla také vůbec pozorována. Hodnoty inhibice u neředěných vzorků dle metodiky testu nepřesáhly 50%, proto nebylo možné vypočítat EC50 a TU byla vyjádřena jako 0. Testy *D.subspicatus* a *A.cepa* ukázaly inhibici i stimulaci růstu s hodnotami od -12,7%

do 2,7% (*D.subspicatus*) a od -9,4% do 27,9% (*A.cepa*). Pro *V.fischeri* byla vypočtena hodnota EC20 a hodnoty byly mezi 30,3% - 92,0% (15 minut) a 25,1% - 82,1% (30 minut).

Mezi další cíl **studie III** bylo zařazeno srovnání hodnot ekotoxicity v čase. Vzorky H1, H2 a H4 byly pro možnost srovnání odebrány za stejných podmínek v roce 2018 i 2019. Výsledná tabulka č. 9 znázorňuje výsledky z obou odběrů. Odpadní voda H2 byla v roce 2018 klasifikována do třídy I (jako netoxická), avšak v roce 2019 byla zařazena do třídy III (jako toxická). Do vyšší třídy toxicity byla přerazena vzhledem k testu s bakteriemi, pro které byl vzorek značně toxický. Nemocniční odpadní voda H1 a H4 byla zařazena do stejných tříd toxicity v obou letech. Avšak kvalita odpadních vod byla u nemocnice H1 v roce 2019 horší než v roce 2018. Kvalita vody u nemocnice H4 byla naopak v roce 2019 výrazně lepší než v roce 2018. Z výsledků **studie III** vyplývá závěr, že se odpadní vody, čištěny stále stejným čistírenským procesem, mohou v závislosti na čase značně měnit. Důvodem může být řada faktorů, jako jsou lékařské aktivity, počty nemocných či množství a druh aktuálně používaných dezinfekčních prostředků.

Tabulka 9 Výsledná tabulka vyhodnocení variability toxicity v čase

Organismus	H1		H2		H4	
	2018 TU	2019 TU	2018 TU	2019 TU	2018 TU	2019 TU
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	3,95	2,97	0	0	2,83	1,28
<i>Aliivibrio fischeri</i> 15 min.	2,35	3,97	0	1,18	2,32	0
<i>Aliivibrio fischeri</i> 30 min.	3,46	3,88	0	1,02	2,42	0
<i>Daphnia magna</i> 24 hodin	1,48	1,92	0	0	2,54	0
<i>Daphnia magna</i> 48 hodin	1,63	3,47	0	0	4,12	0
Třída	III	III	I	III	III	III

5.4 Studie IV - Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) embryos to hospital effluent compared to *Daphnia magna* and *Allivibrio fischeri*.

V současné době je zatím málo informací o používání FET testu pro hodnocení ekotoxicity nemocničních odpadních vod. Naše studie byla proto o tuto metodu rozšířena. Test na rybích embryích představuje pozitivní krok ke zlepšení životních podmínek pokusných zvířat s předpokladem, že embrya ryb na počátku vývoje pocítují žádnou bolest.

Ve **studii I** bylo zdůrazněno, že klasické konvenční baterie testů (založené na bakteriích, řasách, korýších, rybách a semenech) by se měly doplnit a nahradit testy na rybách alternativními metodami. Zdárným příkladem je nahradit akutní toxicitu na dospělých ryb alternativním testem na rybích jikrách. Metoda nejenže vyhovuje podmínkám 3R, ale navíc to může být efektivní nástroj pro detekci toxicity u vzorků odpadních vod. Aby byla prokázána účinnost a efektivita metody, byl proveden srovnávací průzkum s konvenčními metodami. Srovnávací studii byla provedena s testovací baterií skládající se z *D. magna*, *A. fischeri* a *D. subspicatus*. Z předchozího testování nemocnic (**Studie III**) byly tyto metody rozpoznány jako vhodné pro rutinní testování ekotoxikologického potenciálu nemocničních odpadních vod. Jejich dostatečnou citlivost prokázali i jiní autoři (Abbas et al. 2018, Ellepola et al. 2020, Laquaz et al. 2017, Li et al. 2016, Vasconcelos et al. 2017).

Vzorky pro srovnávací studii byly odebrány v roce 2019 ze sedmi různých nemocnic v České republice. Odpadní vody byly nabrány po procesu čištění klasickou mechanicko-biologickou čistírnou. Místo odběru bylo na odtoku do městské kanalizace. Po odebrání byly vzorky přepraveny v chladicích boxech do laboratoře, kde byly hluboce zamrazeny při teplotě $\leq 18^{\circ}\text{C}$.

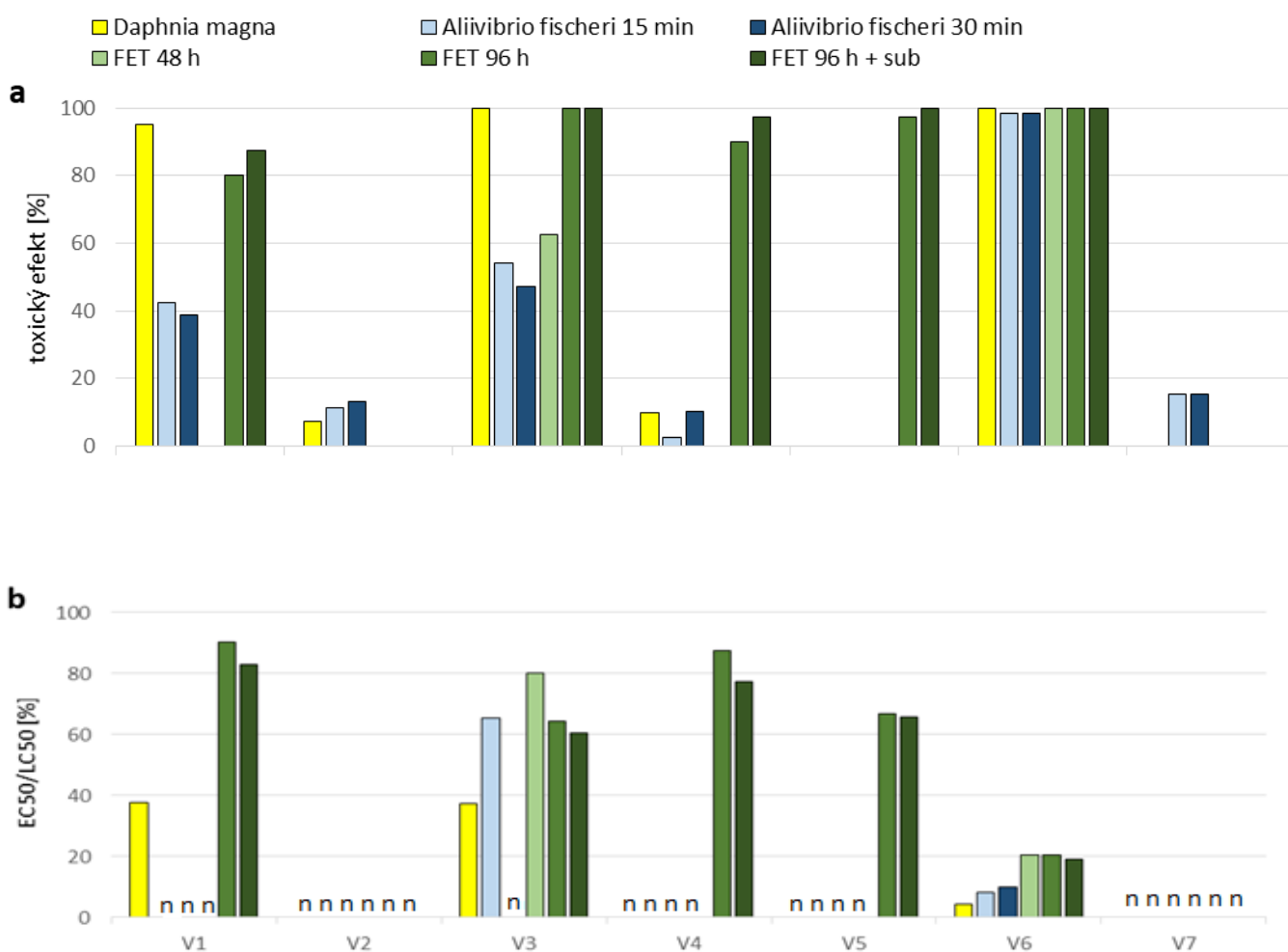
Jelikož v této části studie nejde o vyhodnocení míry toxicity u vzorků, avšak o srovnání citlivosti metod, jsou vzorky označené pouze jako vzorek (V).

Test FET byl proveden podle OECD TG 236 (OECD 2013) s třemi expozičními časy a přidánými subletálními efekty.

1. zkouška se základním expozičním časem 96 hpf (hodiny po oplodnění) (FET 96h)
2. test se zkrácenou dobou expozice na 48 hpf (FET 48h)
3. test s přidáním pěti subletálních koncových bodů s dobou expozice 96 hpf (FET 96h + sub.)

Na grafu č. 10 je znázorněno srovnání výsledků ekotoxicity všech sedmi vzorků mezi *Daphnia magna*, *Allivibrio fischeri*, a *Danio rerio*. Na grafu **a** můžeme vidět toxický účinek u neřaděných vzorků. Na grafu **b** výslednou hodnotu EC_{50} , LC_{50} [%] vypočítanou pomocí koncentrační řady základních testů. Značka (n) znamená, že toxický účinek u neřaděného vzorku nedosáhl 50%, tudíž hodnota EC_{50} , LC_{50} se nedala určit. Porovnání bylo provedeno

pouze u vzorků, které byly toxické a ovlivnily nejvíce testovaných organismů (V1, V3, V6). Graf **b** znázorňuje, že nejvíce citlivým organismem byla *Daphnia magna*, hodnoty byly zjištěny v rozmezí od 4,5 do 37,6%. Citlivost metody na vzorky V1 a V3 poklesla v následujícím pořadí: *Daphnia magna* > FET96 h + sub > FET 96 h > *Allivibrio fischeri* 15 min > FET 48 h
 U vzorku V6 klesala citlivost následovně: *Daphnia magna* > *Allivibrio fischeri* 15 min > *Allivibrio fischeri* 30 min > FET testy. Testy s mořskou bakterií a vodním korýšem velmi dobře reagovaly na vzorek V6. Testy FET 96 a FET 96 h+sub indikovaly vysokou citlivost embrya *Danio rerio* na pět vzorků (tj. V1, V3-V6) s hodnotami toxického účinku v rozmezí 62,5-100%. Test s korýši dosahoval hodnot 0-100%, stejně jako test s rybími embryi (FET 48h). Bakterie reagovaly na vzorky od 0% do 98,4% inhibice luminiscence.



Graf 10 Výsledný graf srovnávací studie

Na základě výsledků u všech vzorků, nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi testy FET (FET 48 h, FET 96 h, FET 96 h + sub) a testem u *Daphnia magna*.

Avšak mezi (FET 96 h a *Allivibrio fischeri* 15 minut, 30 minut) a (FET 96 h + sub a *Allivibrio fischeri* 15 min, 30 min) byl nalezen statisticky významný rozdíl. Ze zjištěných výsledků **studie IV** lze konstatovat, že citlivost embryí *Danio rerio* je srovnatelné nebo v některých případech vyšší než citlivost *Daphnia magna* a *Allivibrio fischeri*.

Pro prohloubení **studie IV** byl FET test srovnán ve třech možnostech provedení. Srovnávací studie může odhalit nejcitlivější testovací způsob. Citlivost na celkem 7 vzorcích odpadní vody klesala následovně. FET 96 h + sub > FET 96 h > FET 48 h. Nejčastější subletální efekty se projevily opožděným srdečním rytmem, nedostatečným krevním oběhem, zakřivením páteře a poruchou pigmentace. Zahnutí pěti subletálních koncových bodů zvýšilo citlivost FET testu o 1 – 12%.

Tabulka 11 Přehled pozorovaných subletálních efektů

Subletální efekty	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
	48 hpf/96 hpf						
Opožděný srdeční rytmus	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-
Nepřítomnost krevního oběhu	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-
Přítomnost edému	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-
Zakřivení páteře	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-
Porucha pigmentace	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-

+ pozorováno, - nepozorováno

Tabulka č. 11 znázorňuje přehled pozorovaných subletálních účinků na embrya *Danio rerio* po expozici 48 hpf a 96 hpf (hodiny po oplodnění) vzorky odpadních vod z různých nemocnic. Z tabulky č. 11 je zřejmé, že přítomnost subletálních účinků se liší mezi různými vzorky i v závislosti na době expozice. U vzorků V1, V4 a V5 se všechny pozorované subletální efekty začaly objevovat až po uplynutí 48 hodin po oplození. Pokud by se u nich neprováděla prodloužená verze FET testu, vzorky by byly vyhodnoceny jako negativní. Prodloužená doba

expozice způsobila statisticky významné zvýšení citlivosti embryí *Danio rerio* u 57% testovaných vzorků. U obdobného výzkumu Stelzer et al. (2018) bylo přidáním subletálních efektů zvýšena citlivost u vzorků odpadní vody o více než 30%. Zároveň výzkum vyhodnotil klesající senzitivitu u životních fází ryb takto: larvy > juvenilní \geq embryo. Životní stádium larvy bylo nejcitlivější pro zkoušené vzorky a naopak embryonální životní fáze u ryb byla nejméně citlivá.

Četnost výskytu subletálních kritérií u embryí bylo následující: zakřivení páteře 34,5%, nedostatek krevního oběhu 26,4%, zpomalený tep 25,7%, poruchy pigmentace 12,7%, výskyt edému 0,7%.

Studie Jeffries et al. (2015) srovnávala rozdíly v citlivosti mezi dvěma testy toxicity, FET podle OECD 236 a test provedený dle US EPA, Larval Survival and Growth Test Method 1000.0. Mezi hlavní rozdíly testů patří věk pokusných organismů a délka expozice. U FET testu jsou využita embrya od 8 buněčného stádia, zkouška EPA začíná s organismy 12 hodin po vylíhnutí. Doba FET je 96 h, u testu růstu a přežití EPA je doba jeho trvání 7 dní. Výsledky této studie neumožnily definitivní závěry o tom, který ze dvou hodnocených typů testů je více citlivý, a tudíž vhodnější k testování toxicity různorodých látek. Avšak další výsledky této studie poskytly důkaz, že zahrnutí více koncových bodů by mohlo rozšířit užitečnost testu FET. Konkrétně bylo zjištěno, že zahrnutí například perikardiálního edému jako koncového bodu zlepšuje citlivost testu FET a také nabízí pohled na potenciální subletální nebo chronické účinky. Ke stejným závěrům dospěla naše **studie IV**.

Podobný výzkum provedl i Krzykwa et al. (2019), který rovněž srovnával rozdíly v citlivosti mezi FET testem provedeným podle OECD 236 a testem provedeným dle US EPA, Larval Survival and Growth Test Method 1000.0. Metody srovnával pomocí tři známých neurotoxických látek: fluoridu (F), niklu (Ni) a kadmia (Cd). Z výsledků studie vyplynul závěr, že díky přidání více koncových bodů, dojde ke zvýšení citlivosti FET testu u dvou ze tří zkoumaných látek. Dále konstatuje, že rozdíly ve výsledcích mezi koncovými body u dvou srovnávacích metod mohou záviset na vlastnostech hodnocené chemické látky. Je tudíž vhodné se zaměřit na zkoušení toxicity u dalších různých skupin chemických prvků a jejich sloučenin.

K podobnému závěru došla i studie Glaberman et al. (2016), kde prodloužením doby testu a přidáním více koncových bodů byla prokázána zvýšená citlivost FET testu.

Fish embryo test může být dalším vhodným nástrojem při testování ekotoxicity odpadních vod. Při prodloužení délky kultivace ze 48 hodin na 96 hodin se citlivost výrazně zvýšila, z toho plyne, že FET 96 hodin může být doporučen k testování odpadních vod jako nejvhodnější.

5.5 Praktický výstup

Na základě nových poznatků této studie byly při novelizaci normy ČSN 75 6406 doplněny do přílohy F ekotoxikologické zkoušky. Příloha F znázorňuje sledované ukazatele pro předčištěné odpadní vody ze zdravotnických zařízení vypouštěné do veřejné kanalizace a jejich doporučené hodnoty. Odpadní vody obsahující jednu nebo více rizikových chemických látek mohou být vypouštěny do veřejné kanalizace pouze po předčištění a dosažení povolené limitní hodnoty v souladu s požadavky přílohy F. V tabulce č. 12 je popsána doporučená baterie ekotoxikologických testů.

Tabulka 12 Ukazatele ekotoxicity pro předčištěné odpadní vody z nemocnic vypouštěné do kanalizace pro veřejnou potřebu

Ekotoxicita (podle ISO 17616)				
Metoda	Norma	Organismus	Zředovací faktor LID	Hodnocení
Zkouška inhibice růstu zelených řas	ČSN EN ISO 8692	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	LID > 4	Inhibice růstu 25 %
Zkouška na luminiscenčních bakteriích	ČSN EN ISO 11348-2	<i>Vibrio fischeri</i>	LID > 8	Inhibice luminiscence 20 %
Zkouška pohyblivosti na vodním korýši	ČSN EN ISO 6341	<i>Daphnia magna</i>	LID > 4	Imobilizace 20 %

LID je nejnižší neúčinná hodnota zředění, např. LID 8 odpovídá zředění 1:8.

6 ZÁVĚR

Akvatické testy ekotoxicity jsou vhodným nástrojem pro hodnocení potenciálních rizik různorodých látek a směsí pro člověka i životní prostředí. V této práci byly akvatické testy ekotoxicity rozšířené navíc o ukazatele genotoxicity a byly využité pro klasifikaci odpadních vod z celkem osmi různých zdravotnických zařízení. Informací o toxicitě odpadních vod z nemocnic v České republice je velmi málo, výsledky provedených studií proto výrazně přispěly k získání základních údajů o hodnotě toxicity těchto potenciálně nebezpečných odpadních vod. Odběry vzorků byly prováděny u vybraných zdravotnických zařízení v několika periodách tak, aby kvalita odpadních vod mohla být vyhodnocena v závislosti na intenzitě provozu daného zařízení během pracovního týdne a v odlišných ročních obdobích.

Při novelizaci normy ČSN 75 6406 v roce 2018 - 2020, kdy bylo třeba sestavit testovací baterii pro vzorky nemocničních odpadních vod, poskytl výzkum provedený v rámci této práce cenné informace o citlivých organismech vhodných k rutinnímu testování vzorků odpadních vod. Nemocniční zařízení budou mít nadále dle novely normy ČSN 75 6406 doporučeno testovat ekotoxicitu produkovaných odpadních vod pomocí tří stanovených metod: Zkouška inhibice zelených řas na *Desmodesmus subspicatus*, zkouška na luminiscenčních bakteriích *Allivibrio fischeri* a zkouška pohyblivosti na vodním korýši *Daphnia magna*.

Testy na semenech hořčice bílé a testy s *Allium Cepa* byly naopak pro svoji nedostatečnou citlivost klasifikovány jako nevhodné pro zkoušení toxicity nemocničních odpadních vod.

Běžně využívaný test akutní toxicity na rybách byl v rámci studie nahrazen alternativní metodou na rybích embryích (FET test). Tento moderní a progresivní přístup respektující etické principy v toxikologii a strategii 3R je doporučován nejen odbornou veřejností a Evropským centrem pro validaci alternativních metod (EURL ECVAM) Společného výzkumného střediska Evropské komise (JRC), ale je zakotven i ve Směrnici č.201/63/EU, o ochraně zvířat využívaných pro vědecké účely. Předložená práce v souladu se strategií 3R přispěla k náhradě pokusů na obratlovcích pomocí alternativní metody na embryích (FET test), která se prokázala jako plně využitelná pro hodnocení toxicity odpadních vod namísto konvenčních pokusů na rybách. Výsledky práce prokázaly u FET testu srovnatelnou, v několika případech i vyšší citlivost pro vzorky odpadních vod ve srovnání s dvěma klasickými biotesty. Navíc, v případě použití FET testu je možno identifikovat i řadu dalších toxikologických koncových bodů v případě subletálních účinků, jako jsou např. poruchy srdečního rytmu, zpomalení růstu a

vývojová toxicita, orgánově specifické bioakumulace, genotoxicita a mutagenita, teratogenita, různé formy neurotoxicity nebo endokrinní disruptivity. Přidání multiparametrických citlivých koncových bodů činí z FET skutečnou alternativní *in vitro* analýzu a silný nástroj v toxikologii. Test na rybích embryích (FET) je identifikován jako relevantní, spolehlivá a účinná alternativní zkušební metoda *in vitro* k metodě akutní toxicity na rybách.

Přesto, že výsledky dostupné z vědecké literatury naznačují, že odpadní voda ze zdravotnických zařízení často vykazuje genotoxické účinky, v naší studii nebyla genotoxicita u vybraných vzorků prokázána. To mohlo být způsobeno sterilizací vzorku filtrací, která způsobila ztrátu genotoxických látek, jelikož na filtrech mohlo dojít k zachycení určitých chemikálií. S cílem zlepšit záchytnost metody bylo doporučeno pozměnit metodický postup při zpracovávání vzorků pro tento test.

Studie klasifikovala jednu nemocniční odpadní vodu do třídy IV (silně toxická), odpadní vody ze dvou nemocnic do třídy III (toxické) a pět nemocničních odpadních vod do skupiny I (netoxické). Z výsledků průzkumu kvality odpadních vod z vybraných nemocnic je patrná vysoká variabilita toxicity u zkoušených vzorků v závislosti na době odběru a aktuální intenzitě provozu daného zařízení. Z tohoto důvodu je vhodné výzkum nadále prohlubovat zařazením dalších zdravotnických zařízení do rutinního šetření a provádění analýzy kvality jejich odpadních vod. V případě zjištění, že vzorky odpadních vod vykazují toxické vlastnosti, je třeba spolupracovat s daným zařízením, doporučit nápravná opatření a monitorovat jejich účinnost s cílem zlepšení čistící technologie odpadní vody.

7 SEZNAM LITERATURY

Abbas A, Valek L, Schneider I, Bollmann A, Knopp G, Seitz W, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J, Wagner M. Ecotoxicological impacts of surface water and wastewater from conventional and advanced treatment technologies on brood size, larval length, and cytochrome P450 (35A3) expression in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Pollut Res Int*. 25(14):13868-13880. DOI: 10.1007/s11356-018-1605-2.

Abdel-Raouf N, Al-Homaidan A, Ibraheem I. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 19:257–275.

Akin B. 2016. Contaminant Properties of Hospital Clinical Laboratory Wastewater: A Physiochemical and Microbiological Assessment. *Journal of Environmental Protection*. 7: 635-642. DOI: 10.4236/jep.2016.75057.

Amouei A, Asgharnia H, Fallah H, Faraji H, Barari R, et al. 2015. Characteristics of Effluent Wastewater in Hospitals of Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. *Health Scope*. 4(2):e23222. DOI: 10.17795/jhealthscope-23222.

Angeles LF, Mullen RA, Huang IJ, Wilson C, Khunjar W, Sirotkin HI, McElroy AE, Aga DS. 2020. Assessing pharmaceutical removal and reduction in toxicity provided by advanced wastewater treatment systems. *Environmental Science: Water Research & Technology*. 6 (1): 62. DOI: 10.1039/C9EW00559E.

Aydin S, Aydin M, Ulvi A, Kilic H. 2019. Antibiotics in hospital effluents: occurrence, contribution to urban wastewater, removal in a wastewater treatment plant, and environmental risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*. 26: 544–558 DOI: 10.1007/s11356-018-3563-0.

Barceló D, Žonja B, Ginebreda A. 2020. Toxicity tests in wastewater and drinking water treatment processes: A complementary assessment tool to be on your radar. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. DOI:10.1016/j.jece.2020.104262.

Belanger S, Rawlings J, Carr G. 2013. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environ Toxicol Chem*. 32(8):1768-83. DOI: 10.1002/etc.2244.

Beltifa A, Alibi S, Mansour HB. 2020. Monitoring hospital wastewaters for their probable genotoxicity. *J Water Health*. 8(1):1-7.

Bergey DH, Holt JG. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.). Baltimore: Williams & Wilkins. English: Ninth edition.

Boxall A, Rudd M, Brooks B, Caldwell D, Choi K, Hickmann S and others. 2012. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environ Health Perspect*. 120(9):1221-9. DOI: 10.1289/ehp.1104477.

Burcham P. 2014. *An Introduction to Toxicology*. Springer-Verlag London. ISBN 978-1-4471-5553-9.

Cuthbert RJ, Taggart MA, Prakash V, Chakraborty SS, Deori P, Galligan T, Kulkarni M, Ranade S, Saini M, Sharma AK, Shringarpure R, Green RE. 2014. Avian scavengers and the threat from veterinary pharmaceuticals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 19: 369(1656). DOI: 10.1098/rstb.2013.0574

Cosgrove SE. 2006. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis.* 15;42 Suppl 2:S82-9. DOI: 10.1086/499406.

ČSN EN ISO 11348-1,2,3 (757734). Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi, Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi, Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi. 2009.

ČSN EN ISO 8692 (75 7740). Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. 2012.

ČSN EN ISO 6341 (757751). Jakost vod - Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Zkouška akutní toxicity. 2013.

ČSN EN ISO 7346-1,2,3 (757761). Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Část 1: Statická metoda, Část 2: Obnovovací metoda, Část 3: Průtočná metoda. 1999.

ČSN 75 6406. Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení (ZZ) vypouštěnými do stokové sítě pro veřejnou potřebu. 2020.

ČSN ISO 31000. Management rizik – Směrnice. 2018.

Devillers J. 2009. *Ecotoxicology Modeling*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. DOI: 10.1007/978-1-4419-0197-2.

Ellepola N, Ogas T, Turner DN, Gurung R, Maldonado-Torres S, Tello-Aburto R, Patidar PI, Rogelj S, Piyasena ME. 2020. A toxicological study on photo-degradation products of environmental ibuprofen: Ecological and human health implications. *Ecotoxicol Environ Saf* 188: 109892. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109892.

Embry M, Belanger S, Braunbeck T, Galay-Burgos M, Halder M, Hinton D, Léonard M, Lillicrap A, Norberg-King T, Whale G. 2009. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol.* 2010 Apr 15: 97(2):79-87. DOI: 10.1016.

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. DOI:10.4172/2155-6199.1000189.

Föllmann W, Hengstler JG. 2013. *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*. ISBN 978-0-08-096156-9.

Franjic S. Importance of Environment Protection on the Global Level. 2018. Review Article. *Scientific Journal of Research & Reviews – SJRR*. DOI:10.33552/SJRR.2018.01.000506.

Gartiser S, Hafner CH, Hercher CH, Kronenberger-Schäfer K, Paschke A. 2010. Whole effluent assessment of industrial wastewater for determination of BAT compliance. Part 2: metal surface treatment industry. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2010 Jun;17(5):1149-57. DOI: 10.1007/s11356-009-0290-6.

Girotti S, Ferri E, Fumo M, Maiolini E. 2008. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Anal Chim Acta.* 4:608(1):2-29. DOI: 10.1016/j.aca.2007.12.008.

Glaberman S, Padilla S, Barron MG. 2016. Evaluating the zebrafish embryo toxicity test for pesticide hazard screening. *Environmental Toxicology.* 36(5):1221-1226. DOI: 10.1002/etc.3641.

- Green H, Wilder M, Collins M, Fenty A, Gentile K, Kmush BL and others. 2020. Quantification of SARS-CoV-2 and cross-assembly phage (crAssphage) from wastewater to monitor coronavirus transmission within communities. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.05.21.20109181>.
- Goullé JP, 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):1220-4. DOI: 10.1007/s00128-012-0829-y.
- Hagendor U, Diehl K. 1999. Biological toxicity tests on wastewater in Germany – collection, results and evaluation. Effluent toxicity: a european perspective. society of environmental toxicology and chemistry. Brussels.
- 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. DOI: 10.1007/s11356-015-4812-0.
- Hart WB, Doudoroff P, Greenbank J. 1945. The Evaluation of the Toxicity of Industrial Wastes, Chemicals and Other Substances to Freshwater Fishes, Waste Control Laboratory, The Atlantic Refining Company.
- Herrero O, Pérez Martín JM, Freire PF, López LC, Peropadre A, Hazen MJ. 2012. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutat Res* 18: 743(1-2):20-4. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.12.028.
- Hlavínek P. 2000. Vliv návrhu a provozu stokové sítě na návrh, provoz a funkci ČOV, Mezinárodní workshop „Optimalizace inženýrských úloh ve stokování“, VUT FAST, Brno, 2000, ISBN 80-7204-134-7.
- Hoffman D, Rattner B, Burton G, Cairns J. 2003. Handbook of ecotoxicology, second edition. ISBN- 1-56670-546-0.
- Hsu CH. 2020. "How US sewage plants can remove medicines from wastewater: New research shows that technologies are available, but the upgrades can be expensive." *ScienceDaily*. <www.sciencedaily.com/releases/2020/01/200108160330.htm>.
- Jeffries MKS, Stultz AE, Smith AW, Stephens DA, Rawlings JM, Belanger SE, Oris JT. 2015. The fish embryo toxicity test as a replacement for the larval growth and survival test: A comparison of test sensitivity and identification of alternative endpoints in zebrafish and fathead minnows. *Environ Toxicol Chem.* 34(6):1369-81.
- Jírová G, Vlková A, Wittlerová M, Dvořáková M, Kašparová L, Chrz J, Kejlová K, Wittlingerová Z, Zimová M, Hošíková B, Jiravová J, Kolářová H. 2018. Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays. *Neuro Endocrinol Lett.* 39(6):441-453.
- Jirova G, Wittlingerova Z, Zimova M, Vlkova A, Wittlerova M, Dvorakova M, Jirova D. 2016. Bioindicators of wastewater ecotoxicity. *Neuro Endocrinol Lett.* 18:37(Suppl1):17-24.
- Jolibois B, Guerbet M. 2006. Hospital Wastewater Genotoxicity. *The Annals of Occupational Hygiene.* 50(2): 189-196. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mei051>.
- Kaeding A, Ast J, Pearce M, Urbanczyk H, Kimura S, Endo H, Nakamura M, Dunlap P. 2007. Phylogenetic Diversity and Cosymbiosis in the Bioluminescent Symbioses of “*Photobacterium mandapamensis*”. *Applied And Environmental Microbiology.* 73(10):3173-82 DOI:10.1128/AEM.02212-06.

Karkman A, Do TT, Walsh F, Virta MPJ. 2018. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends Microbiol.* 26(3):220228. DOI:10.1016/j.tim.2017.09.005.

Kaštovský J, Hauer T, Geriš R, Chattová B, Jurán J, Lepšová-Skáclová O, Pitelková P, Pusztai M, Škaloud P, Šťastný J, Čapková K, Bohunická M, Mühlsteinová R. 2018. Atlas sinic a řas ČR 2. powerprint, Praha, 480 s.

Kaur R, Shah TK, Kaur S, Charak SR. 2018. A review on genotoxicity in aquatic organisms and environment. *The Pharma Innovation Journal* 2018; 7(1): 353-359.

Khan NA, Ahmed S, Farooqi IH, Ali I, Vambol V, Changani F, Yousefi M, Vambol S, Khan SU, Khan AH. 2020. Occurrence, sources and conventional treatment techniques for various antibiotics present in hospital wastewaters: A critical review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 129.

Kimura, K, Hara H, Watanabe Y. 2007. Elimination of selected acidic pharmaceuticals from municipal wastewater by an activated sludge system and membrane bioreactors. *Environ. Sci. Technol.* 41: 3708–3714.

Kočí. 2006. Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí. *Chem. Listy* 100, 882–888.

Kosma CHI, Lambropoulou DA, Albanis TA. 2014. Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: occurrence, removal and environmental risk assessment. *Sci Total Environ.* 1:466-467:421-38. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.07.044.

Kot-Wasik A, Jakimska A, Śliwka-Kaszyńska M. 2016. Occurrence and seasonal variations of 25 pharmaceutical residues in wastewater and drinking water treatment plants. *Environ Monit Assess.*188(12):661. DOI: 10.1007/s10661-016-5637-0.

Kotas. 2016. Základní funkce a princip reverzní osmózy (RO). VŠCHT Praha – FTOP – Ústav technologie vody a prostředí.

Krzykwa JC, Saeid A, Jeffries MKS. 2018. Identifying sublethal endpoints for evaluating neurotoxic compounds utilizing the fish embryo toxicity test. *Ecotoxicol Environ Saf* 170: 521-529. <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. DOI:10.1016/j.cbpc.2008.11.006.

Laquaz M, Dagot CH, Bazin CH, Bastide T, Gaschet M, Ploy M. 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. DOI: 10.1007/s11356-017-9957-6.

Li Q, Wang P, Chen L, Gao H, Wu. 2016. Acute toxicity and histopathological effects of naproxen in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Environ Sci Pollut Res* 23: 18832-18841, 2016. DOI:10.1007/s11356-016-7092-4.

Liguoro M, Leva V, Bona M, Merlanti R, Caporale G, Radaelli G. 2012. Sublethal effects of trimethoprim on four freshwater organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 82:114-21. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.05.016

Ling Y, Xu SB, Lin YX, Tian D, Zhu ZQ, Dai FH and others. 2020. Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients. *Chin Med J (Engl)*. 5;133(9):1039-1043. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000774.

Lyons G (2014). Pharmaceuticals in the environment: a growing threat to our tap water and wildlife. A CHEM Trust report. <http://www.chemtrust.org/wp-content/uploads/CHEM-Trust-Pharma-Dec14.pdf>

Margot J, Kienle C, Magnet A, Weil M, Rossi L, Alencastro LF, Abegglen CH, Thonney D, Chèvre N, Schärer M, Barry DA. 2013. Treatment of micropollutants in municipal wastewater: Ozone or powdered activated carbon? *Sci Total Environ.* 1:461-462:480-98.

Maselli BS, Luna LAV, Palmeira JO, Tavares KP, Barbosa S, BeijLA, Umbuzeiro GA, Kummrow F. 2015. Ecotoxicity of raw and treated effluents generated by a veterinary pharmaceutical company: a comparison of the sensitivities of different standardized tests. *Ecotoxicology.* 24(4):795-804. DOI: 10.1007/s10646-015-1425-9.

McFall-Ngai M. 2014. The Importance of Microbes in Animal Development: Lessons from the Squid-Vibrio Symbiosis. *Annu Rev Microbiol.* 68:177-94. DOI:10.1146/annurev-micro-091313-103654.

Mendonça E, Picado A, Paixão SM, Silva L, Barbosa M, Cunha MA. 2013. Ecotoxicological evaluation of wastewater in a municipal WWTP in Lisbon area (Portugal). *J Hazard Mater.* 30:163(2-3):665-70. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.07.012.

Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. 2007. Praha.

Minguez L, Pedelucq J, Farcy E, Ballandonne C, Budzinski H, Halm-Lemeille MP. 2016. Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. *Environmental Science and Pollution Research.* 23: 4992–5001. DOI 10.1007/s11356-014-3662-5.

Mlejnkova H, Sovova K, Vasickova P, Ocenaskova V, Jasikova L, Juranova E. 2020. *Int J Environ Res Public Health.* 30;17(15):5508. DOI: 10.3390/ijerph17155508.

Norberg-King TJ, Embry MR, Belanger SE, Braunbeck T, Butler JD, Dorn PB, Farr B and others. 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. DOI: 10.1002/etc.4259.

OECD. 2019. Chemical safety and biosafety. Dostupné z: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/>.

OECD TG 471. Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2020.

OECD TG 203. Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, Paris, France, 2019.

OECD TG 473. In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Section 2, Paris, France, 2016. ISBN:9789264264649.

OECD TG 489. In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Section 2, Paris, France, 2016.

OECD TG 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, Paris, France, 2013.

Oliveira T, Murphy M, Mendola N, Wong V, Carlson D, Waring L. 2015. Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Sci Total Environ.* 15:518-519:459-78. DOI:10.1016/j.scitotenv.2015.02.104

Papageorgiou M, Zioris I, Danis T, Bikiaris D, Lambropoulou D. 2019. Comprehensive investigation of a wide range of pharmaceuticals and personal care products in urban and hospital wastewaters in Greece. *Sci Total Environ.* 1:694:133565.

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.07.371. Epub 2019 Jul 30.

Pappas AA, Massoll NA, Cannon DJ. 1999. Toxicology: past, present, and future. *Ann Clin Lab Sci* 29(4):253-262, 1999.

Ramírez-Morales D, Masís-Mora M, Montiel-Mora JR, Cambronero-Heinrichs JC, Briceño-Guevara S, Rojas-Sánchez CE, Méndez-Rivera M, Arias-Mora V and others. 2020. Occurrence of pharmaceuticals, hazard assessment and ecotoxicological evaluation of wastewater treatment plants in Costa Rica. *Sci Total Environ.* 1:746:141200. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141200. Epub 2020 Jul 26.

Raven P, Hassenzahl D, Hager M, Gift N, Berg L. 2015. *Environment*, 9th Edition. ISBN-10:1118875826, ISBN-13 : 978-1118875827.

Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassinos D. 2013. *Sci Total Environ.* 1;447:345-60. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.

Rosa EVC, Simionatto EL, Sierra MMS, Bertoli SL, Radetski CM. 2009. Toxicity-based criteria for the evaluation of textile wastewater treatment efficiency. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(4):839-45. DOI: 10.1002/etc.5620200420.

Schmitz, S. 1999. *Akvarijní ryby. - Příroda a. s., Bratislava, ISBN 80-07-01060-2.*

Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. *Official Journal of the European Union L 276/3* Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>.

Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/60/ES ze dne 23. října 2000, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky. *Úřední věstník Evropské unie.* Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32000L0060&from=CS>.

Smirnov N. *Physiology of the Cladocera.* 1978. ISBN: 978-0-12-396953-8.

Snyder S, Adham S, Redding A, Cannon F, DeCarolis J, Oppenheimer J. and others. 2007. Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.12.052>.

Státní ústav pro kontrolu léčiv. 2016. Distribuce a výdej léčiv v České republice v 1. čtvrtletí roku 2016: Hodnocení vývoje dodávek léčivých přípravků podle ATC skupin. Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv. Dostupné také z: <http://www.sukl.cz/informace-o-distribuci-leciv-lekarnamjinym-zdravotnickym-22>.

Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S. 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. DOI: 10.1038/s41423-020-0400-4.

Teodorović I, Becelić M, Planojević I, et al. 2008. The relationship between whole effluent toxicity (WET) and chemical-based effluent quality assessment in Vojvodina (Serbia). *Environ Monit Assess.* 158(1-4):381-92. DOI: 10.1007/s10661-008-0591-0.

Tompa A, Balázs P. 2018. Concise history of toxicology - from empiric knowledge to science. *Orv Hetil.* 159(3):83-90. DOI: 10.1556/650.2018.30950.

Valavanidis T. 2015. Ecotoxicity Test Methods and Ecological Risk Assessment. *Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology Tests under the Guidelines of International Organizations. Science Advances on Environmental Chemistry, Toxicology and Ecotoxicology Issues.*

Vasconcelos E, Dalke C, Oliveira C. 2017. Influence of Select Antibiotics on *Vibrio fischeri* and *Desmodesmus subspicatus* at $\mu\text{g L}^{-1}$ Concentrations. *Environ Manage.* 60(1):157-164. DOI: 10.1007/s00267-017-0841-4

Verlicchi P, Aukidy M Al, 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.* 1:429:123-55. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.028.

Verlicchi P. 2018. Hospital Wastewaters Characteristics. Management, Treatment and Environmental Risks. ISBN 978-3-319-62178-4. DOI: 10.1007/978-3-319-62178-4.

Vincze K, Scheil V, Kuch B, Köhler HR, Triebkorn R. 2015. Impact of wastewater on fish health: a case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools. *Environmental Science and Pollution Research.* 22:11822–11839. DOI: 10.1007/s11356-015-4398-6.

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.* 18:37(Suppl1):25-32.

Walker H, Hopkin S, Sibly R, Peakall D. 2007. Principles of Ecotoxicology, Third Edition. *Ecotoxicology* 16(6):483-483. DOI: 10.1007/s10646-007-0151-3

Warhurst M. 2014. Medicines in the Environment: A Growing Threat to Wildlife and Drinking Water. CHEMTrust.

WHO. World Health Organization, Coronavirus Disease (COVID-19). Situation Report (2020).

Wiest L, Chonova T, Bergé A, Baudot R, Bessueille-Barbier F, Ayouni-Derouiche L, Vulliet E. 2018. Two-year survey of specific hospital wastewater treatment and its impact on pharmaceutical discharges. *Environ Sci Pollut Res Int.* 25(10):9207-9218. DOI: 10.1007/s11356-017-9662-5.

Wittlerová M, Jírová G, Vlková A, Kejlová K, Malý M, Heinonen T, Wittlingerová Z, Zimová M. 2020. Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos to Hospital Effluent Compared to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Physiol. Res.* 69 (Suppl. 4): S681-S691.

Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, Dong X and others. 2020. Kuang Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 5(5):434-435. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30083-2.

Yang Z, Ganwen LI, Xiaoling DAI, Guirong LIU, Gang LI, Yusheng JIE. *Chinese Journal of Digestion.* 2020. (12): E002-E002.

Yilmaz G, Kaya Y, Vergili I, Gönder Z B, Özhan G, Celik B O, Altinkum SM, Bagdatli Y, Boergers A, Tuerk J. 2017. Characterization and toxicity of hospital wastewaters in Turkey. *Environ Monit Assess.* 189(2):55. DOI: 10.1007/s10661-016-5732-2.

Zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvierat proti týráni, v platném znění.

Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů, v platném znění.

Zákon č. 274/2001 Sb., o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu a o změně některých zákonů v platném znění.

Zgórska A, Arendarczyk A, Grabinska-Sota E. 2011. Toxicity assessment of hospital wastewater by the use of a biotest battery. Archives of Environmental Protection. 37(3): 55–61.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Schéma účinnosti čistících procesů (Kotas, 2016).....	7
Obrázek 2	Doporučený postup při testování.....	14
Obrázek 3	Ukázka probíhajícího testu s bakteriemi	17
Obrázek 4	Ukázka nárůstu zelené řasy v koncentrační řadě odpadní vody.....	18
Obrázek 5	Ukázka testu na cibuli kuchyňské	19
Obrázek 6	Základní test s organismem <i>Daphnia magna</i>	20
Obrázek 7	<i>Danio rerio</i> a <i>Poecilia reticulata</i>	21
Obrázek 8	Přehled subletálních abnormalit	23
Obrázek 9	Schéma postupu u zkoušky FET	24

SEZNAM TABULEK A GRAFŮ

Tabulka 1	Charakteristika použitých metod	28
Tabulka 2	Výsledky Ames testu	31
Tabulka 3	Klasifikační systém.....	32
Tabulka 4	Charakteristika nemocnic	33
Tabulka 5	Výsledný graf.....	34
Tabulka 6	Základní fyzikálně chemická a chemická charakteristika vzorků	35
Tabulka 7	Přehled konečných výsledků 2018	36
Tabulka 8	Přehled konečných výsledků 2019	37
Tabulka 9	Výsledná tabulka vyhodnocení variability toxicity v čase	38
Graf 10	Výsledný graf srovnávací studie	40
Tabulka 11	Přehled pozorovaných subletálních efektů	41
Tabulka 12	Ukazatele ekotoxicity pro předčištěné odpadní vody z nemocnic vypouštěné do kanalizace	43

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Studie I - Bioindicators of wastewater ecotoxicity.

Příloha 2: Studie II - Genotoxicity of wastewater from health care facilities.

Příloha 3: Studie III - Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassay

Příloha 4: Studie IV - Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) embryos to hospital effluent compared to *Daphnia magna* and *Allivibrio fischeri*.

Příloha 5: Odborný životopis

Příloha 6: Publikační přehled

Studie I

Bioindicators of wastewater ecotoxicity

Neuroendocrinology Letters

37(1): 17-24.

Bioindicators of wastewater ecotoxicity

Gabriela JIROVA^{1,2}, Zdenka WITTLINGEROVA¹, Magdalena ZIMOVA^{1,2}, Alena VLKOVA^{1,2},
Martina WITTLEROVA², Marketa DVORAKOVA^{2,3}, Dagmar JIROVA²

¹ Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Praha, Czech Republic

² National Institute of Public Health, Centre of Toxicology and Health Safety, Praha, Czech Republic

³ Charles University in Prague, Third Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

Correspondence to: Gabriela Čárová, M.Sc.
Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague,
Kamýčká 129, Praha 6 - Suchbát, 165 21, Czech Republic.
TEL: +420 267082564; E-MAIL: carova@fzp.czu.cz

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

Key words: wastewater toxicity; ecotoxicity; alternative methods; toxicology *in vitro*;
Fish Embryo Test (FET); wastewater from medical facilities

Neuroendocrinol Lett 2016; 37(Suppl. 1):17-24 PMID: 28263526 NEL370916A02 ©2016 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

Abstract

Wastewater, especially containing hospital effluents, exhibits high chemical complexity and specificity since it includes various chemicals, biocides, pharmaceuticals, surfactants, radionuclides, disinfectants and pathogens.

Biological tests provide true evidence of the wastewater quality and unlike chemical analytical tests show comprehensive pollution effects on the environment and human health. Normalized conventional bioassays are not sensitive enough for ecotoxicological evaluation of wastewater and there is a great need for the development of suitable sensitive bioassays in order to characterize properly the residual toxicity of treated effluents.

Provisions of binding EU legislation regarding protection of animals used for scientific purposes and legislation dealing with test methods for identification and classification of health hazard of chemicals, pharmaceuticals, biocides, medical devices and consumer products such as cosmetics for environmental ecosystems and for man require to employ alternative toxicological methods respecting the 3Rs concept with priority given to methods *in vitro*.

The Fish Embryo Test (FET) is identified as a relevant, reliable and efficient alternative test method *in vitro* for determination of acute toxicity for fish. Using the FET, additional toxicological endpoints may be investigated to assess organ specific bioaccumulation, genotoxicity and mutagenicity, developmental toxicity, teratogenicity, various forms of neurotoxicity or endocrine disruptivity. The addition of multiparametric sensitive endpoints makes the FET a true alternative *in vitro* assay and a powerful tool in toxicology.

INTRODUCTION

Development and use of new pharmaceuticals and the spectrum of new chemicals is increasing due to innovations of industry. The priority of the European Union strategy is to support sustainable

use of water and long-term efforts to reach progressive reduction of pollutants released into the aquatic environment. This aim is formulated in the EU Water Framework Directive (2000/60/ES). This directive is considering the water economy from general point of view and its main aim is to

.....
To cite this article: Neuroendocrinol Lett 2016; 37(Suppl. 1):17-24

avoid any deterioration of water quality and to protect and improve the state of water ecosystems and adjacent wetlands. Implementation of the directive does not only mean application of new technical standards but also the need to establish completely new and complex management of water and water resources.

Chemical substances and pharmaceuticals which are released into the environment, can have undesirable effects also on organisms, for which they were not originally intended (Oehlmann *et al.* 2006). Wastewater can pose health risk not only for humans, but also for ecosystems of the environment. Series of studies conducted so far with industrial, urban or hospital wastewater were focused only on chemical analysis and detection of selected groups of substances. Simple chemical analysis of wastewater can not reflect all possible reactions of present substances. Toxicity of these substances should be evaluated simultaneously by chemical analysis and by conventional and newly developed biological ecotoxicity tests (Zgórska *et al.* 2011; Wing 2016).

WASTEWATER

Wastewater can be dangerous for human health and for the environment considering a high content of chemicals coming from different types of industries, from urban waste, from household waste, from services or from hospital effluent. A large part of chemical contaminants found in wastewater may pass from wastewater treatment plant directly to the aquatic environment (Fent 2006b).

A wide range of activities carried out in hospitals, as medical care, diagnostics, hygiene, maintenance or research, requires use of large amounts of chemicals and pharmacologically active substances. Wastewater from hospitals therefore contains a mixture of different drugs, radionuclides, anionic, cationic and amphoteric surfactants, disinfectants and pathogenic microorganisms (Jean *et al.* 2012). The problem with most of drugs is that, even after the cleaning process, they are still present in wastewater (Escher *et al.* 2009). Wastewater from hospitals are loaded with these substances as a result of handling them, or from the patient excreta with remnants of drugs, pathogenic and potentially pathogenic microorganisms. All of these substances and their metabolites end as waste and are released to the environment, where they may further react and interfere. Hospital wastewater is moreover a highly selective environment and it contributes to high resistance of bacteria to antibiotics. It has been demonstrated that higher numbers of, resistance bacteria are found in wastewater from hospitals. Antibiotic resistance was found not only in pathogenic organisms, but also in organisms inhabiting terrestrial and aquatic habitats (Moges, *et al.* 2014).

Wastewater treatment plants eliminate a large number of pollutants, but often show only limited ability to reduce micropollutants (Kümmerer 2004).

Even low concentrations of micropollutants may have adverse effects on aquatic organisms (Wick *et al.* 2009).

The activated sludge treatment with an elevated SRT of 18 d was the only process which led to a significant removal of certain beta blockers and psychoactive drugs. The removal efficiency was below 60% for all compounds except for the natural opium alkaloids codeine and morphine being removed by more than 80%.

Sorption batch experiments within this study (Wick *et al.* 2009) and literature data confirmed that sorption onto activated sludge is negligible and thus, any removal of the examined beta blockers and psychoactive drugs can be exclusively referred to as biological transformation.

A serious negative effect with long-term impact is endocrine disruption. The toxicity of various mixtures of micropollutants with additive or synergistic effect raises concern. In the past it was shown that a mixture of estrogenic substances, used in concentrations which separately did not have estrogenic activity, had induced estrogenic activity, as demonstrated for example in trout (Brian 2005). A similar effect was observed in the case of pharmaceuticals in algae and *Daphnia magna* (Fent 2006b). Hormones in the environment can change sex in juveniles animals. For adults they can cause infertility, damage eggs and embryos and may induce tumor growth (Reeder *et al.* 2004). The tests of cattle feedlot effluent demonstrated the effects of feminization in males and defeminization in females for the fish *Pimephales promelas*. Manifestation in males included eg. reduced testosterone production, decrease in testicle size or change in the morphology of head (Knacker *et al.* 2010). This species is highly susceptible to changes of water pH. Although the decrease of pH did not affect the life span, changes in the behaviour of fish were observed, such as manifestations of stress (hyperactivity, swimming at the surface), or changes in morphology (decreasing of the size of head, changes in colour, increasing the size of the eggs, but also their fragility).

Including an ozonization step after the biological treatment of wastewater can reduce pollutant concentrations and toxic effects in aquatic organisms (Margot *et al.* 2013). However, biological processes and chemical oxidation often lead to degradation of organic matter and the formation of hazardous by-products, such as halo-acid, halo-ketones, bromine, non-halogenated carboxylic acid and other substances. These substances give rise to a reasonable suspicion of inducing a variety of adverse biological effects on aquatic organisms, such as cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity, developmental toxicity, neurotoxicity or toxicity for reproduction (Erbe *et al.* 2011). Through the above effects the original substances (although they are found at very low ineffective concentrations) can impair health and number of population of aquatic organisms and subsequently in the long term ecological balance under conditions of chronic exposure (Fent *et al.* 2006a).

DETERMINATION OF WASTEWATER TOXICITY

Diagnostics of health in populations of aquatic organisms should include sensitive indicators and the use of multi-parameter approach. Conventional classical bioassay is not always sensitive enough to evaluate the ecotoxicity of wastewater in the long term and sublethal doses. Given an excellent correlation of the FET with the acute fish toxicity test and the fact that non-feeding developmental stages of fish are not categorized as protected stages according to the new European Directive 2010/63/EU on the protection of animals purposes, the FET is ready as a true alternative for the acute fish toxicity test, as required for a multitude of national and international regulations (Braunbeck 2014). It is therefore highly desirable to develop more convenient and sensitive bioassays for the efficient characterization of possible residual toxicity after cleaning waste discharges. Sensitive indicators of ecosystem health in a variety of aquatic organisms are particularly cytotoxicity, life span, growth and reproduction, abnormalities in embryos and DNA integrity (Wigh *et al.* 2016). Newly developed, introduced and validated methodologies *in vitro* make it possible to supplement conventional methods with sensitive evaluation of specific indicators of ecotoxicity. Determination of the life span, growth and reproductive ability is complemented by the evaluation of adverse mechanisms, e.g. determination of potential endocrine disrupting activity and genotoxicity.

Fish are an indispensable part of routine examinations of toxicity to aquatic environment. Globally they are the most widely used species for ecotoxicity testing. Fish are consumers of higher order in the food pyramid of aquatic organisms and play an important role in the regulation of aquatic ecosystems. Increased production of chemicals and waste, however, has increased the number of ecotoxicological tests and thus the use of fish as vertebrates for ecotoxicity tests. The current, obligatory legislation for testing the hazardous properties of chemicals and consumer products strictly requires the use of alternative toxicological methods without tests on vertebrate animals, if available. The current EU strategy on the protection of animals includes the implementation of the concept called 3Rs, to reduce the number of animals in experiments (Reduction), to reduce the deprivation in the course of the experiments (Refinement) and the target is to completely replace testing on vertebrate animals (Replacement) by alternative *in vitro* methods in practice of testing and research facilities. If an alternative method is available, it must always be used instead of conventional toxicology test on live vertebrates. 3Rs strategy is part of the REACH Regulation (EU 2006) and CLP Regulation (EU 2008) for chemicals, the Cosmetics Regulation (EU 2009), and in particular the directive on the protection of animals used for scientific purposes (EU 2010). In the

case of fish, the optimal method that meets the ethical requirement to replace vertebrate testing scheme by an alternative method is the Fish Embryo Test (FET) (OECD 2013).

TRADITIONAL/CLASSICAL ECOTOXICITY TESTS

The authors of recent scientific publications (Wigh 2016, Braunbeck 2014) suggest rational assembly methods for ecotoxicity tests which allow individual methods to evaluate long-term adverse effects of substances on aquatic ecosystem. The tests with different types of organisms are included in test strategies. They represent several trophic levels in the hierarchy of the ecosystem such as decomposers bacteria, algae and higher plants as primary producers, primary consumers such as zooplankton and fish as secondary consumers. The principle of conventional tests, which are generally performed in the Czech Republic in accordance with harmonized standards, is the determination of toxicity based on the inhibitory or lethal effects of the test substance on the whole organism. Zgorska (2011) used a battery of tests with bacteria, algae and crustaceans to evaluate the ecotoxicity of wastewater. Results of the study showed that for each organism the wastewater is differently toxic. The most sensitive to wastewater toxicity was the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Test on bacteria *Vibrio fischeri* is described in the standard EN ISO 11348-1, 2, 3 and ISO 21338. The principle of the test is the determination of the inhibition of light emission of luminescent marine bacteria after exposure to the test material for 5 min, 15 min or 30 min. The test result is the concentration of test substance which causes 20% and 50% inhibition of luminescence.

Toxicity testing using freshwater algae is carried out according to the standard EN ISO 8692. *Desmodesmus subspicatus* or *Pseudokirchneriella subcapitata* can be used as the test organisms. The method is based on determination of the test substance concentration causing 50% inhibition of specific growth rate relative to control samples growing under the same standard conditions for 72h.

Seeds of *Sinapis alba* are used to determine the acute toxicity in seeds of higher plants. The principle of the method is the assessment of root growth in the initial development of the plants in comparison with control samples. By measuring the root length after exposure of 72 hours, the inhibitory concentration for 50% of organisms can be calculated.

Test for acute toxicity of substances on freshwater crustacean *Daphnia magna* Straus is carried out according to the standard EN ISO 6341. The merit of the method is to determine the concentration of the test substance that causes 50% of newborns immobilization of *Daphnia magna* Straus, gained by acyclic parthenogenesis.

Determination of the acute lethal toxicity of substances for freshwater fish is done according to the standard EN ISO 7346-1, 2, 3. Suggested species are *Poecilia reticulata* or *Danio rerio* Hamilton-Buchanan. The essence of the method is the determination of the concentration of a test substance, which after 96 h of exposure causes 50% mortality of the test organism under the method conditions.

ALTERNATIVE METHODS IN THE EVALUATION OF ECOTOXICITY

Fish Embryo Test (FET)

One of the most renowned alternative approaches to testing on fish is the fish embryo test (FET) (Lammer *et al.* 2009). FET gained importance and application in relation to the estimated up to 20-fold increase in the ecotoxicity tests within the testing strategies of chemicals according to REACH (Hartung and Rovida 2009) and the current requirement of obligatory use of alternative *in vitro* tests instead of experiments on vertebrates.

Fish embryo test on freshly fertilized ova of fish *Danio rerio* (zebrafish) was introduced in the EU initially in Germany as so called "fish egg test" in 2001. It became a part of DIN standard (DIN 2001). Originally, the test was performed for 48 hours and (as indicators of toxicity) it included the evaluation of acute lethality, coagulation of embryos and formation of intraembryonal opaque clots, inseparation of tail bud and disappearance of heartbeat. According to the current test methodologies the test is completed within 96 hours, which is reliably 2/3 of the time of embryo development, when the development of the nervous system reaches the stage when vertebrates may begin to feel pain. FET therefore fully meets the definition of alternative methods in terms of compensation (Replacement) experiments on living vertebrate animals (fish). *Danio rerio* are fish, which are easy to treat and produce transparent, non-adherent eggs (diameter about 1 mm) throughout the year.

According to the methodology of OECD TG 236 (OECD 2013) the freshly fertilized embryos are exposed to the test material for 96 hours. Every 24 hours (four observation periods) four main indicators of toxicity (Braunbeck *et al.* 2005b; Knobel *et al.* 2012; Braunbeck 2014) are evaluated and LC50 is determined, i.e. the concentration which causes toxic changes in 50% of individuals. The indicators that are assessed as positive at any time of observation are: coagulation of fertilised eggs, lack of somite formation, lack of detachment of the tail-bud from the yolk sac and lack of heartbeat. In order to capture the very early negative effects of the test material on the development of embryos it is necessary to perform exposure as soon as possible, i.e. 1.5 hours after fertilization.

Validation studies demonstrated an excellent correlation of FET with conventional acute toxicity test on fish (Belanger *et al.* 2013; Knobel *et al.* 2012). Certain

restrictions of FET were reported in the case of high-molecular substances such as polymers, or substances subject to biotransformation, such as allyl alcohol (Braunbeck 2014).

Braunbeck *et al.* (2005) in their earlier work reported that the FET principle can also be applied using other types of eggs of fish, e.g. *Oryzias latipes* or *Pimephales promelas*. Further they demonstrated that the variability between the results of FET on zebrafish embryos and other species of fish is not higher than the variability of the conventional test of acute toxicity for fish using various species of fish. Unlike the Fish Embryo Test which shows excellent correlation of results with tests carried out on adult fish for chemicals and wastewater (Castano 2003), cell cultures derived from fish, which have been used by some laboratories, showed generally lower sensitivity compared to the complete body of fish (Scholz *et al.* 2013).

METHODS IN VITRO

Determination of genotoxicity and teratogenicity

FET test on *Danio rerio* embryos can be preferably enriched by determination of genotoxic potential of waste material for cells of an embryo using Comet assay. Comet assay is a known method which is used for measuring DNA breakages in cells. This test is now widely accepted as a standard method of assessing DNA damage and is used in a wide range of applications from biomonitoring in humans, genotoxicology testing, to monitoring of genotoxicity in ecology (Kosmehl *et al.* 2008). The method is based on gel electrophoresis of individual cells. The presence of DNA breaks causes local relaxation of supercoiled structure. When a small electrical charge passes through the gel, relaxed structure of DNA loops migrates toward the anode, creating the so-called Comet's tail. Head of the comet represents undamaged DNA, which for its size cannot proceed in gel (Liao *et al.* 2009). The advantage of the test is the possibility to obtain information on the level of individual cells, which is crucial for robust statistical analysis. Further advantages are the need to have only a small quantity of cells for testing an individual sample, high sensitivity of detection of DNA damage and suitability of the method for any eukaryotic cells. Limitation of the method is the requirement for cell viability. If the cell suspension contains mostly necrotic or apoptotic cells it is not possible to obtain accurate information on the presence of lesions and breaks. After completion of the 96-hour exposure, i.e. at the end of the FET test, it is possible to isolate the cells from whole embryos and evaluate primary DNA damage, e.g. using a modified Comet assay with FPG (formamidopyrimidine DNA glycosylase). The Comet assay showed, according to some authors, an increased sensitivity for the detection of DNA damage due to oxidation and alkylation. The combination of FET and Comet assay using cells isolated from the whole

embryo is advantageous for multiple assessment to detect embryotoxicity and genotoxicity (Kienzler *et al.* 2012; Wigh 2016).

Zebrafish embryo is a useful model for studying vertebrate evolution because of its transparency, low cost of breeding and known transcription of the genome. It is proposed as a model for screening of teratogenicity not only for fish (Hruscha *et al.* 2013; Hwang *et al.* 2013), but also for mammals (Brannen *et al.* 2013). The relationship between developmental toxicity and neurotoxicity during exposure to industrial chemicals was documented in studies that described the use of FET for identifying e.g. subclinical brain dysfunctions, spinal malformations, defects of the eye and other organ failures during the development of vertebrates (Selderslaghs *et al.* 2013; Sipes *et al.* 2011).

A separate, recently widely proposed test of acute toxicity and genotoxicity for the soil and aquatic ecosystems, is a test using the bulbs of *Allium cepa* L. The principle of the test is to determine ratio of chromosomal aberrations in cells of the bulb root after exposure to wastewater. The advantage of the test is no need of wastewater sample modification before application on bulbs and low cost of the assay. The indicator of general toxicity of the test material is inhibition of length of roots grown from bulbs after exposure to the wastewater sample (Firbas 2011; INVITTOX – PROTOCOL 8, IP-8, 1989).

At present the most widely used tests of genotoxicity are based on bacteria *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* known as Ames test or UmuC test or SOS chromotest. Ames test and its liquid version Ames fluctuation test are the longest used bacterial reverse mutation assays for evaluation of the mutagenic potential of chemicals or mixtures by detecting their effect on histidine deficient strains *Salmonella typhimurium* in the absence and presence of liver metabolic activation. Addition of liver metabolic activation enables to detect promutagenic properties of the test material in cases when the genotoxic effect occurs only after metabolic activation. The Ames test has been recognized as advantageous for identification of genotoxicity of different types of wastewater, including urban or hospital effluents (Sharma *et al.* 2015).

Endocrine disruption and neurotoxicity

Zebrafish embryos can serve as a suitable model for identifying endocrine disruption, namely for estrogenic activity (Schiller *et al.* 2014). Typical biomarkers of estrogenic activity in fish such as vitelogenin, receptors for estradiol α and β and zona pelucida protein can be easily identified and measured already in early stages of zebrafish development (Braunbeck 2014). Besides estrogenic activity it is also possible to monitor anti-estrogenic, androgenic and anti-androgenic effects. Some reports suggest the possibility to use zebrafish embryos for screening of negative effects on the thyroid (Wang 2013).

For the determination of endocrine disruptive activity other methods can be also used, e.g. Melno cell line or MDA-KB2, which are capable of identifying androgen and glucocorticoid agonists and antagonists (Wilson *et al.* 2002). The stabilized cell line of human origin MDA-KB2 is expressing androgen receptors and glucocorticoid receptors and contains a luciferase reporter gene linked to the MMTV promoter derived from MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus) which is activated by these two receptors. A positive response in the test means that there was a response by binding to androgen or glucocorticoid receptors. In order to distinguish whether it is the activation of the androgen receptor or a glucocorticoid, complementary exposure with specific androgen antagonist (flutamide) or glucocorticoid antagonist (RU486) is carried out. Information about stimulation of receptors for glucocorticoids is significant, as municipal and hospital wastewater are known sources of substances from the group of glucocorticoids, which are then identified in water systems (Creusot *et al.* 2014).

The cell line MELN (Balaguer *et al.* 1999) stably expresses the luciferase reporter gene under the transcriptional control of an endogenous estrogen receptor. Methodology for determining the hormonal activity of wastewater can be advantageously used according to various recent publications (Kinane *et al.* 2010, Creusot *et al.* 2010). In principle, wastewater is first extracted using an extraction column, eluted in methanol / dichloromethane and dissolved in DMSO. The hormonal activity is determined in a microplate against standards / controls, namely estradiol, dexamethasone, and dihydrotestosterone. The result is expressed as an equivalent of hormonal activity of standard substances.

A method based on genetically modified strains of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, commercially available from company Xenometrics as a standard kit Xenoscreen YES/YAS, can be used for screening of both activating (agonistic) and inhibitory (antagonistic) effects of chemical substances and their mixtures. Suitable samples are aqueous solutions, extracts and tinctures from different materials, and also the wastewater. Agonistic or antagonistic activity is always set relatively to the values for the physiological steroids (17- β estradiol for method Xenoscreen YES and 5 α -dihydrotestosterone method for Xenoscreen YAS). Commercial kit Xenoscreen YES / YAS contains genetically modified strains of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in which the DNA sequences of genes for the human estrogen receptor (gene hER α) and androgen receptor (Har gene) are stably integrated into the chromosomes of the cells. The cells also contain a plasmid carrying a reporter gene, lacZ encoding the enzyme β -galactosidase and estrogen (YES) or androgen (YAS) responsive elements (Routledge & Sumpter 1996). The method detects also cytotoxic effect, which leads to growth arrest or cell lysis. Cytotoxicity is measured as a reduction in light scattering measured at 690 nm. Cur-

rently, validation studies of methods based on similar systems – yeast cells – are ongoing. In the future this method can be useful as a marker for endocrine disruptive potential of different sample types, including wastewater.

CONCLUSIONS

Wastewater, particularly from health care facilities, can be dangerous for human health and components of the environment due to the complex of chemicals, pharmacologically active substances, biocides, radionuclides, detergents, disinfectants and pathogenic microorganisms. Unlike chemical analyses, biological tests provide true information on the quality of wastewater and its effect on environmental ecosystems and human health. Currently it is desirable to develop and use new sensitive methods capable of correct characterization of residual toxicity. By performing simple chemical analysis it is not possible to assess cross-reaction between substances and their actual effects on biological systems.

According to binding regulations on determination of hazardous properties of chemicals, biocides, medical devices and consumer products, and respecting the EU directive on the protection of animals used for experimental purposes, it is the responsibility of testing laboratories to use alternative toxicological methods based on 3Rs principle. The priority is given to methods *in vitro* instead of conventional tests on vertebrates.

Conventional classic bioassays are not always sensitive enough to evaluate the ecotoxicity of wastewater, especially under conditions of prolonged exposure and in sublethal doses. Diagnostics of health in populations of aquatic organisms should include sensitive indicators and the use of multi-parameter approach. It is therefore desirable to supplement the conventional method with a sensitive evaluation of specific indicators of ecotoxicity, such as cytotoxicity, life span, growth, reproduction, and the ability to evaluate the mechanisms of action of tested noxious agents for example by determining potential endocrine disrupting activity and potential genotoxicity.

For ecotoxicity bioassays the Fish Embryo Test (FET) can be used as an alternative method to tests on fish because it meets the ethical requirement to replace vertebrate testing scheme by an alternative method, and it is a good tool for efficient detection of possible residual toxicity. FET allows to determine not only the acute toxicity for fish, but also developmental toxicity, endocrine disruption, neurotoxicity and integrity of DNA in a genotoxicity test.

ACKNOWLEDGEMENT

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

REFERENCES

- Act No. 246/1992 Coll., on protection of animals against cruelty.
- Balaguer P, Francois F, Comunale F, Fenet H, Boussioux AM, Pons M, *et al.* (1999). Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci Total Environ.* **233**(1–3): 47–56.
- Belanger SE, Rawlings JM, Carr GJ (2013). Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environ Toxicol Chem.* **32**: 1768–1783.
- Brannen KC, Charlap JH, Lewis EM (2013). Zebrafish teratogenicity testing. *Methods Mol Biol.* **947**: 383–401.
- Braunbeck T, Böttcher M, Hollert H, Kosmehl T, Lammer E, Leist E, *et al.* (2005). Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. *ALTEX.* **22**: 87–102.
- Braunbeck T, Kais B, Lammer E, Otte J, Schneider K, Stengel D, *et al.* (2014). The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environ Sci Pollut Res.* **22**(21): 16247–61.
- Brian JV, Harris CA, Scholze M, Backhaus T, Booy P, Lamoree M, *et al.* (2005). Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environ Health Perspect.* **113**: 721–728.
- Castano A, Bols B, Braunbeck T, Dierckx P, Halder M, Isomaa B, *et al.* (2003). The use of fish cells in ecotoxicology B The report and recommendations of ECVAM workshop 47. *ATLA.* **31**: 317–351.
- Creusot N, Ait-Aissa S, Tapie N, Pardon P, Orion F, Sanchez W, *et al.* (2014). Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Environ Sci Technol.* **48**: 3649–3657.
- Creusot N, Kinani S, Balaguer P, Tapie N, LeMenach K, Maillot-Marechal E, *et al.* (2010). Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples. *Anal Bioanal Chem.* **396**: 569–583.
- DIN (2001) German standard methods for the examination of water, waste water and sludge – Subanimal testing (group T) – Part 6: Toxicity to fish. Determination of the non-acute-poisonous effect of waste water to fish eggs by dilution limits (T6). DIN 38415-6; German Standardization Organization.
- EC (2006). Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Official Journal L 396*, 30.12.2006: 1–851.
- EC (2008). Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. *Official Journal L 353*, 31.12.2008: 1–1355.
- EC (2009). Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. *Official Journal L 342*, 22.12.2009: 59–208.
- EN ISO 6341 Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test (ISO 6341: 1996).
- EN ISO 11348-1 Water quality – Determination of the inhibitory effect of waste samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 1: Method using freshly prepared bacteria (ISO 11348-1: 1998).
- EN ISO 11348-2 Water quality – Determination of the inhibitory effect of waste samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 2: Method using liquid-dried bacteria (ISO 11348-2: 1998).
- EN ISO 11348-3 Water quality – Determination of the inhibitory effect of waste samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria (ISO 11348-3: 1998).

- 19 Erbe MCL, 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**: 320–328.
- 20 Escher BI, Bramaz N, Ort C (2009). JEM spotlight: monitoring the treatment efficiency of a full scale ozonation on a sewage treatment plant with a mode-of-action based test battery. *J Environ Monit*. **11**: 1836–1846.
- 21 EU (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council, on protection of animals used for scientific purposes.
- 22 Fent K, Escher C, Caminada D (2006a). Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. *Reprod Toxicol*. **22**: 175–185.
- 23 Fent K, Weston AA, Caminada D (2006b). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol*. **76**: 122–159.
- 24 Firbas P (2011). Kemizacija okolja in citogenetske poškodbe; ALLIUM METODA: relevantna indikativna metoda za ugotavljanje ksenobiotikov v okoljskih vzorcih. EKSLIBRIS, Ljubljana.
- 25 Hartung T, Rovida C, (2009). Chemical regulators have overreached. *Nature*. **460**: 1080–1081.
- 26 Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, Heinrich V, Hecht J, Haass C, Schmid B (2013). Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*. **140**: 4982–4987.
- 27 Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. **31**: 227–229.
- 28 ISO 7346-1 (1996) Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (Brachydanio Rerio Hamilton –Buchanan (teleostei, cyprinidae)) – Part 1: Static method.
- 29 ISO 7346-2 (1996) 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.
- 30 ISO 7346-3 (1996) Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (Brachydanio Rerio Hamilton –Buchanan (teleostei, cyprinidae)) – Part 3: Flow-through method.
- 31 ISO (2007) Water quality-determination of acute toxicity of wastewater to zebrafish eggs (Danio rerio). ISO 15088. International Organization for Standardization.
- 32 ISO (2007) International Standard Water quality –Determination of the acute toxicity of wastewater to zebrafish eggs (Danio rerio). ISO 15088: 2007(E). International Organization for Standardization.
- 33 ISO (2010) Water quality – Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test). ISO 21338.
- 34 ISO 8692 (2012) Water quality –Freswater algal growth inhibition test with unicellular green algae.
- 35 Jean J, Perrodin Y, Pivrot C, Trepo D, Perraud M, Drogue J, et al. (2012). Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. *J Environ Manag*. **103**: 113–121.
- 36 Kosmehl T, Hallare A.V, Braunbeck T, Hollert H (2008). DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (Danio rerio) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutat. Res*. **650**(1): 1–14.
- 37 Kienzler A, Tronchère X, Devaux A, Bony A (2012). Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. *Toxicol in Vitro*. **26**: 500–510.
- 38 Kinani S, Bouchonnet S, Creusot N, Bourcier S, Balaguer P, Porcher JM, et al. (2010). Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environ Pollut*. **158**: 74–83.
- 39 Knacker T, Boetcher M, Ruffli H, Frische T, Stolzenberg HC, Teigler M, et al. (2010). Environmental effect assessment for sexual-endocrine disrupting chemicals – fish testing strategy. *Integr. Environ. Assess. Manag*. **6**: 653–662.
- 40 Knöbel M, Busser FJM, Rico-Rico A, Kramer NI, Hermens JLM, Hafner C, et al. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environ Sci Technol*. **46**: 9690–9700.
- 41 Kümmerer K (2004). Pharmaceuticals in the environment, 2nd edn. Springer Verlag, Heidelberg-Berlin. ISBN: 978-3-540-74663-8.
- 42 Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*.
- 43 Liao W, McNutt MA, Zhu WG (2009). The comet assay. A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*. **48**: 46–53.
- 44 Margot J, Kienle K, Magnet A, Weil M, Rossi L, de Alencastro LF, et al. (2013). Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon. *Sci Total Environ*. **461–462**: 480–498.
- 45 Moges F, Endris M, Belyhun, Worku W (2014). Isolation and characterization of multiple drug resistance bacterial pathogens from waste in hospital and non-hospital environments, Northwest Ethiopia.
- 46 OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No.157. OECD, Paris, France (<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>).
- 47 OECD (2013) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic systems. Test Guideline No.236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. OECD, Paris, France (<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>).
- 48 Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Oetken M, Lutz I, Kloas W, et al. (2006). Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environ Health Perspect*. **114**: 127–133.
- 49 Orton F, Ermler S, Kugathas S, Rosivatz E, Scholze M, Kortenkamp A (2014). Mixture effects at very low doses with combinations of antiandrogenic pesticides, antioxidants, industrial pollutant and chemicals used in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol*. **278**: 201–208.
- 50 Reeder AL, Ruiz MO, Pessier A, Brown LE, Levengood JM, Phillips CHA, Wheeler MB, Warner RE, Beasley VR (2004). Intersexuality and the Cricket Frog Decline: Historic and Geographic Trends. *Environ Health Perspect*. **113**: 261–265.
- 51 Routledge EJ, Sumpter J (1996). Estrogenic Activity of Surfactants and Some of Their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **15**(3): 241–248.
- 52 Selderslaghs I, Hooyberghs J, Blust R, Witters HE (2013). Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. *Neurotoxicol Teratol*. **37**: 44–56.
- 53 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.
- 54 Schiller V, Zhang X, Hecker M, Schäfers C, Fisher R, Fenske R (2014). Species-specific considerations in using the fish embryo test as an alternative to identify endocrine disruption. *Aquat Toxicol*. **155**: 62–72.
- 55 Scholz S, Sela E, Blaha L, Braunbeck T, Galay-Burgos M, García-Franco, et al. (2013). A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. **67**: 506–530.

- 56 Sipes NS, Padilla S, Knudsen TB (2011). Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Res.* **93C**: 256–267.
- 57 Wang Q, Liang K, Liu J, Guo Y, Liu C, Bingsheng Z (2013). Exposure of zebrafish embryos/larvae to TDCPP alters concentration of thyroid hormones and transcription of genes involved in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Aquat Toxicol.* **126**: 207–213.
- 58 Wick A, Fink G, Joss A, Siegrist H, Ternes TA (2009) Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment. *Water Res.* **43**: 1060–1074.
- 59 Wigh A, Devaux A, Brosselin V, Gonzalez-Ospina A, Domenjoud B, Ait-Aissa S (2016). Proposal to optimize ecotoxicological evaluation of wastewater treated by conventional biological and ozonation processes. *Environ Sci Pollut Res.* **23**: 3008–3017.
- 60 Wilson V, Bobseine K, Lambright C, Gray LE (2002). A novel cell line, MDA-kb2 that stably expresses an androgen- and glucocorticoid- responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicol Sci.* **66**: 69–81.
- 61 Zgórska A, Arendaryczyk A, Grabińska-Sota E (2011). Toxicity assessment of hospital wastewater by the use of biotest battery. *Archives of Environmental Protection.* **37**(3): 55–61.

Studie II

Genotoxicity of wastewater from health care facilities

Neuroendocrinology Letters

37(1): 101-108.

Genotoxicity of wastewater from health care facilities

Alena VLKOVÁ^{1,2}, Zdeňka WITTLINGEROVÁ¹, Magdalena ZIMOVÁ^{1,2}, Gabriela JÍROVÁ^{1,2}, Kristina KEJLOVÁ², Stanislav JANOUŠEK², Dagmar JÍROVÁ²

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

Correspondence to: Alena Vlková,
Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague,
Kamýčká 129, Praha 6 - Suchbátol, 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

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; Magdaleño *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 & Guérbet 2005; WHO

To cite this article: Neuroendocrinol Lett 2016; 37(Suppl. 1):101-108

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, karbazepin, 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. Gouille *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; Ferk *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 β -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 Ferik *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, NH₄, NO₂, NO₃, *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

- 1 Alabi OA, Shokunbi OS (2011). Toxicological effects of hospital wastewater using animal bioassays. *Ann Biol Res.* **2**(2): 265–275.

- 2 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.
- 3 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.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 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.
- 12 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.
- 13 EU (2013). Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council amending Directives 200/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. European Union. OJ, L226, 24 August 2013, 1–17.
- 14 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.
- 15 Ferik 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.
- 16 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.
- 17 Goullé JP, 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.
- 18 Gupta P, Mathur N, Bhatnagar P, Nagar P, Srivastava S (2009). Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters. *Ecotoxicol Environ Saf.* **72**(7): 1925–1932.
- 19 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.
- 20 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-Mozas 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, 2nd ed.

Studie III

Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays

Neuroendocrinology Letters

39: 101–113.

Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays

Gabriela JÍROVÁ^{1,2}, Alena VLKOVÁ^{1,3}, Martina WITTLEROVÁ², Markéta DVOŘÁKOVÁ^{3,5},
Lucie KAŠPAROVÁ², Jan CHRZ^{3,4}, Kristina KEJLOVÁ³, Zdeňka WITTLINGEROVÁ¹,
Magdaléna ZIMOVÁ^{1,2}, Barbora HOŠÍKOVÁ⁴, Jana JIRAVOVÁ⁴, Hana KOLÁŘOVÁ⁴

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: 2018-20-06 Accepted: 2018-17-09 Published online: 2018-00-00

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

Neuroendocrinol Lett 2018; 39():101-113 PMID: ----- NEL390 18AXX © 2018 Neuroendocrinology Letters • 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.

To cite this article: Neuroendocrinol Lett 2018; 39():101-113

1	Abbreviations:
2	WW - wastewater
3	HWW - hospital wastewater
4	UWW - urban wastewater
5	WWTP - wastewater treatment plant
6	PHs - pharmaceuticals
7	EDs - endocrine disruptors
8	EC ₅₀ - effective concentration of the tested substance that causes negative effect (inhibition, immobilization) in 50% of the organisms
9	EC ₂₀ - effective concentration of the tested substance that causes negative effect (inhibition, immobilization) in 20% of the organisms
10	TU - toxic unit
11	
12	
13	
14	

15 INTRODUCTION

16
17 Wastewater from health care facilities (HWW) differs
18 from classical urban wastewater (UWW) mainly due
19 to the content of wider spectrum and higher quantity
20 of pharmaceuticals (PHs) and chemicals. The main
21 substances that can be found in HWW are antibiotics,
22 analgesics and anti-inflammatories, psychiatric drugs,
23 β -blockers, anaesthetics, disinfectants, chemicals from
24 laboratory activities, developer and fixer solutions from
25 photographic film processing and X-ray contrast media
26 (WHO 2013).

27 The occurrence of PHs in wastewater is limited by
28 the amount of drugs and chemicals used (varying in
29 different countries and evolving over time), entry into
30 sewage, degradation in sewage treatment plants and
31 occurrence in surface and groundwater (Vána *et al.*
32 2010). If these substances are not sufficiently removed,
33 the contamination of the aquatic environment will
34 inevitably increase and affect all the relevant ecosys-
35 tems. Hence, a better understanding of the effect of PHs
36 in the environment is required.

37 In Europe, no specific directive or guideline for the
38 management of hospital effluents has been adopted
39 yet. Liquid waste must not be discharged into a foul
40 sewer but treated as a waste and collected and dis-
41 posed as such. For the effluents from the hospital foul
42 sewer there is no specific regulation issued and so each
43 member state of the European Union has its own dis-
44 tinct legislation (EU 2000).

45 The principles of drainage and subsequent purifica-
46 tion of HWW in the Czech Republic are indicated in
47 the standard ČSN 75 6406. The methods of WW and
48 sludge treatment are further regulated with regard to
49 the occurrence, character and amount of germs, radio-
50 active substances and local conditions. Health care
51 facilities are obliged to disinfect WW if the facilities are
52 designed to isolate and treat transmissible diseases or to
53 manipulate infectious material (ČSN 75 6406).

54 PHs and personal care products are considerably
55 resistant to current procedures of WW treatment. It
56 has been demonstrated that the majority of these sub-
57 stances and mixtures are not totally eliminated from
58 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 pharma-
ceutical compounds amount in the final WW (Verlic-
chi *et al.* 2012). However, distinct drugs, even in small
concentrations, may be still toxic to the environment.
In their review, Orias and Perrodin (2013) summa-
rized data on observed concentrations of 297 pollut-
ants 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 compo-
nents 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 gas-
trointestinal 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 con-
tinues 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 fre-
quent ingredient of creams, wound dressings and anti-
microbial coatings on medical devices. Silver is also
used in bone prostheses, reconstructive orthopedic
surgery and cardiac devices (Lansdown, 2006). Alu-
minum and alum are also used in medicine, they have
contraction and anti-inflammatory effects (e.g. alumi-
num acetate for swelling). They are used in dentistry,
PHs industry, and manufacture of surgical instruments
(Goullé *et al.* 2012).

1 The purpose of this study was to determine toxic-
2 ity of HWW in the Czech Republic using conventional
3 and alternative toxicological methods. Our study repre-
4 sents the first study in the Czech Republic investigating
5 HWW by means of a wide range of biological methods
6 comprising not only tests of ecotoxicity, but also geno-
7 toxicity and reprotoxicity.

8 Standard ecotoxicity assays are a way to determine
9 some PHs and personal care products effects, such as
10 acute or chronic ecotoxicity, on organisms of different
11 trophic levels. Different species of fish, crustaceans,
12 algae are often used for this purpose; however, other
13 microorganisms, such as bacteria, have also been used
14 in these studies. Fish test has not been used in our
15 study with respect to the EU directive (EU 2010) on
16 the protection of animals used for experimental pur-
17 poses requiring the reduction of animal tests and their
18 replacement by alternative methods. In our study, the
19 preferred ecotoxicity method was luminescence bac-
20 teria test. The luminescence inhibition bioassay with
21 marine photobacteria *Vibrio fischeri* has been con-
22 firmed as a useful tool for estimation of acute toxicity of
23 numerous chemicals (Rosal *et al.* 2010b; Bialk-Bielińska
24 *et al.* 2017; Väitalo *et al.* 2017). Green algae (e.g. *Des-*
25 *modesmus subspicatus* and *Pseudokirchneriella sub-*
26 *capitata*) comprise an essential component of aquatic
27 ecosystems and they are often considered as a good
28 indicator for anthropogenic pollution and water quality
29 (Ma *et al.* 2006) with high sensitivity in toxicity testing
30 (Magdaleno *et al.* 2014b; Russo *et al.* 2017; Vasconcelos
31 *et al.* 2017). *Daphnia magna* is a fresh water cladoceran
32 crustacean that is very sensitive to chemicals or pol-
33 lutants (Flaherty & Dodson 2005; Boillot & Perrodin
34 2007) and it is widely used to evaluate the ecotoxic-
35 ity of WW (Erbe *et al.* 2011; Kern *et al.* 2014). If it is
36 exposed to stress factors, its life, morphology, behavior,
37 and physiological properties may change (Jiang *et al.*
38 2018). Among several methods using higher plants, the
39 *Allium cepa* test is frequently used in the biomonitoring
40 of wide range of compounds (Herrero *et al.* 2012) or
41 for testing toxicity of WW (Firbas & Amon 2013). The
42 risks associated with the discharge of PHs and chemi-
43 cals into the environment are based not only on their
44 acute and chronic ecotoxicity, but also their genotoxic-
45 ity and endocrine disruption (Rosal *et al.* 2010a).

46 Genotoxicity was studied by a combination of two
47 tests: Ames test and Comet assay. The Ames test (OECD
48 1997) has been widely used to assess the genotoxic effect
49 of various types of water, such as drinking water (Shen
50 *et al.* 2003), water after sewage treatment (Morisawa *et al.*
51 *et al.* 2003), or water from municipal or hospital wastewa-
52 ter treatment plants (Jolibois & Guerbet 2006; Ferk *et al.*
53 *et al.* 2009; Sharma *et al.* 2015). *Salmonella typhimurium*
54 TA100 and TA98 strains are generally used in these
55 assays. The Comet Assay, also known as single cell gel
56 electrophoresis (SCRE), enables to determine whether
57 there has been deoxyribonucleic acid (DNA) damage to
58 a single cell from apoptosis (cell death) or cytotoxicity
59

(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 stan-
dardized in the ISO standard system, e.g. Draft ISO
19040 (OECD, 2012; ISO, 2017). Both biological sys-
tems 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 hos-
pital 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 hospi-
tals 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 fluc-
tuations 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	1 375
Wastewater generation (m ³ /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 ₂	Cl ₂
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 $10^4\ \text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ and incubated under $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ with constant illumination intensity of $6000\text{--}10\,000\ \text{lx}$ and color temperature $4\,300\ \text{K}$. After 72 h exposure, direct cell count measurement was performed using microscope OLYMPUS CH30. The probit method was used for the calculation of EC_{50} . 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*	
	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	$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	1163	869	979	811	23800
Dissolved substances	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	580	532	707	465	1970
Free chlorine *	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0.04	0.08	0.20	0.08	0.14
Total chlorine	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0.06	0.53	0.42	>6.00	2.09
I	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	130	1577	86	1390	183
Hg	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	1.48	0.50	<0.30	0.52	0.47
Ag	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	0.58	0.09	0.04	0.15	0.92
Gd	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	1.55	2.75	0.15	5.01	1.51
Pt	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	0.17	0.05	0.45	0.11	0.13
Pb	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	0.35	0.58	0.19	0.70	0.42
Al	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	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 ₅₀ [%] / TU
Luminescent bacteria test	<i>Vibrio fischeri</i>	ISO 11348-2	non filtered	bioluminescence inhibition 15 min, 30 min	EC ₅₀ [%] / TU
Crustacean immobilization test	<i>Daphnia magna</i>	ISO 6341	non filtered	mobility inhibition 24 h, 48 h	EC ₅₀ [%] / TU
<i>Allium cepa</i> assay	<i>Allium cepa</i>	----	non filtered	inhibition of bulb root elongation 72 h	EC ₅₀ [%] / 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

1 Solution of 2% NaCl was used as negative control. Bio-
 2 luminescence was recorded after 15 min and 30 min
 3 of exposure to eight increasing sample concentrations.
 4 Every concentration was measured in two replicates
 5 using luminometer Sirius (Berthold Detection Systems)
 6 and thermostat LUMIStherm (HACH LANGE). EC₅₀
 7 which causes 50% inhibition of the bacteria light emis-
 8 sion with respect to the negative control was calculated
 9 for each sample.

10 Crustacean immobilization test

12 The test was performed using less than 24 h old speci-
 13 mens of *Daphnia magna* Straus. Neonates of at least
 14 third generation originated from the laboratory culture.
 15 The sensitivity of crustaceans was controlled by regu-
 16 lar tests with K₂Cr₂O₇ and test medium was used as a
 17 negative control in all runs. Six sample concentrations
 18 were used per test. Five organisms in four replicates (for
 19 a total of twenty organisms) were exposed to each con-
 20 centration for 48 h with 16:8 light:dark cycle without
 21 feeding. Temperature during the test was maintained at
 22 20±2°C. For the test validity, the oxygen concentration
 23 had to be ≥2 mg.l⁻¹. The percentage of immobilization
 24 in the control group had to be ≤10%. *Daphnia* immo-
 25 bility was the test endpoint and the EC₅₀ after 24 h and
 26 48 h exposure was determined.

28 Allium cepa assay

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

42 Data evaluation of ecotoxicity tests

43 The EC₅₀ values calculated for each species were trans-
 44 formed to toxic units (TU) using the formula:

$$46 \text{ TU} = (1/\text{EC}_{50}[\%]) \times 100$$

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

49 Toxic unit	50 Toxicity class	51 Toxicity
52 TU < 0.4	I	non toxic
53 0.4 ≤ TU < 1.0	II	low toxic
54 1.0 ≤ TU < 10.0	III	toxic
55 10.0 ≤ TU < 100.0	IV	very toxic
56 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 (TA 98), 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 40 °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⁻¹ 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_h / I_c)

I_h = total intensity of the head

I_c = 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-Kassinos (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

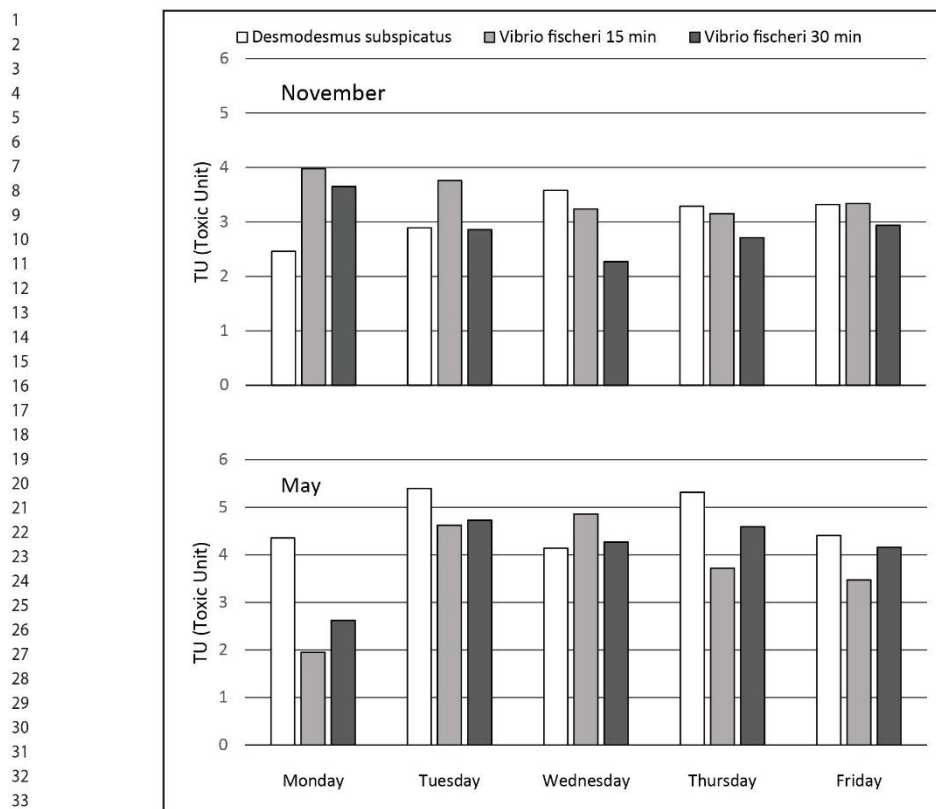


Fig. 1. Weekly dynamics of wastewater ecotoxicity from hospital H1 – comparison between November and May.

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

42 In our study, *A. cepa* was less sensitive to all tested
43 samples compared to *D. subspicatus* and *V. fischeri*.
44 Although the data showed toxic responses of *A. cepa*
45 with values of inhibition of bulbs roots elongation from
46 7.2% to 29.7% after exposure to undiluted samples, they
47 did not achieve 50% inhibition and thus it was not
48 possible to calculate EC_{50} . Therefore, TU was described as
49 0. Similar results related to sensitivity of this organism
50 were seen in the study by Fírbas and Amon (2013) who
51 reported, that treated UWW induced equal root lengths
52 of *A. cepa* bulbs as the negative control.

53 Comparison of wastewater toxicity 54 from different hospitals

55 WW samples from five hospitals with different dimen-
56 sions were studied. In order to provide true information
57 of their quality and evaluate their individual impact on
58

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 classifica-
tion 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 EC₂₀ 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.cepae* and of hospital H4: *D.magna* > *D.subspicatus* > *V.fischeri* > *A.cepae*. In summary, the samples of H1 and H4 were highly toxic to *D.subspicatus*, *V.fischeri* and *D.magna*, whereas *A.cepae* 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.cepae*. 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 EC₅₀ and TU was represented as 0. The *D.subspicatus* and *A.cepae* 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.cepae*). For *V.fischeri* EC₂₀ 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.cepae* 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 cepae* 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 ₅₀ [%]	TU	toxicity class	EC ₅₀ [%]	TU	toxicity class	EC ₅₀ [%]	TU	toxicity class	EC ₅₀ [%]	TU	toxicity class	EC ₅₀ [%]	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 cepae</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/EC₅₀ 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 ozonation (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 Cl₂ 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 heterogeneous 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 signaled 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

- 1 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.
- 2 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.
- 3 Bagatini MD, Vasconcelos TG, Laughinghouse HD 4th, Martins AF, Tedesco SB. Biomonitoring hospital effluents by the *Allium cepa* L. test. *Bull Environ Contam Toxicol.* **82**(5): 590–2.
- 4 Białk-Bielińska A, Mulkiewicz E, Stokowski M, Stolte S, Stepnowski P (2017). Acute aquatic toxicity assessment of six anticancer drugs and one metabolite using biotest battery – Biological effects and stability under test conditions. *Chemosphere.* **189**: 689–698.
- 5 Boillot C, Bazin, C, Tissot-Guerraz F, Droguez 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.
- 6 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **71**: 252–259.
- 7 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.
- 8 ČSN 75 6406 (1996). Wastewater discharge and treatment from health facilities.
- 9 ČSN 75 7346 (2002). Water quality-Determination of dissolved substances.
- 10 ČSN 75 7342 (2013). Water quality-Determination of temperature.
- 11 Drinan JE, Spellman F (2012). *Water and wastewater treatment: A guide for the nonengineering professional.* 2nd ed. Boca Raton: Crc Press.
- 12 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.
- 13 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.
- 14 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.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 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.
- 18 Flaherty CM, Dodson SI (2005). Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere.* **61**: 200–207.
- 19 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. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* **89**(6): 1220–4.
- 20 Gupta P, Mathur N, Bhatnagar P, Nagar P, Srivastava S (2009). Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters. *Ecotoxicol Environ Saf.* **72**(7): 1925–1932.
- 21 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.
- 22 Hartmann A, Golet EM, Gartner 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.
- 23 Hecker M, Hollert H (2011). Endocrine disruptor screening: Regulatory perspectives and needs. *Environ. Sci. Europe.* **23**: 1–14.
- 24 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.
- 25 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.
- 26 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.
- 27 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. *Science of the Total Environment.* **542**: 965–975.
- 28 Chu G (2014). Double strand break repair. *Molecular Life Sciences.*
- 29 ISO 7888 (1985). Water quality-Determination of electrical conductivity.
- 30 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.
- 31 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.
- 32 ISO 10523 (2010). Water quality – Determination of pH.
- 33 ISO 8692 (2012). Water quality – Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae.
- 34 ISO 6341 (2012). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test.
- 35 ISO 19040-1 Draft (2017). Water quality – Determination of the estrogenic potential of water and waste water – Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*).
- 36 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.
- 37 Jolibois B, Guerbet M (2006). Hospital Wastewater Genotoxicity. *Ann Occup Hyg.* **50**(2): 189–196.
- 38 Kern D, Schwaickhardt Rde O, Lutterbeck CA, Kist LT, Alcajaga EA, Machado ÉL (2014). Ecotoxicological and genotoxic assessment of hospital laundry wastewaters. *Arch Environ Contam Toxicol.* **68**(1): 64–73.
- 39 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. *Science of The Total Environment.* **225**: 2155–165.
- 40 Kümmerer K, Helmers E (2000). Hospitals as a source of gadolinium in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 573–577.
- 41 Lansdown AB (2006). Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr. Probl. Dermatol. Current Problems in Dermatology.* **33**: 17–34.
- 42 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.
- 43 Li SW, Wang YH, Lin AY (2017). Ecotoxicological effect of ketamine: Evidence of acute, chronic and photolysis toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf.* **143**: 173–179.

- 1 44 Ma J, Lu N, Qin Y, Xu R, Wang Y, Chen X (2006). Differential
2 responses of eight cyanobacterial and green algal species,
3 to carbamate insecticides. *Ecotoxicology and Environmental
4 Safety*. **63**: 268–274.
- 5 45 Magdaleno A, Juárez AB, Dragani V, Saenz ME, Paz M, Moretton
6 J (2014a). Ecotoxicological and Genotoxic Evaluation of Buenos
7 Aires City (Argentina) Hospital Wastewater. *Journal of Toxicology*.
8 **2014**: 248461.
- 9 46 Magdaleno A, Saenz M.E, Juárez A.B, Moretton J (2014b). Effects
10 of six antibiotics and their binary mixtures on growth of *Pseudo-*
11 *kirchneriella* subcapitata. *Ecotoxicology and Environmental
12 Safety*. **113**: 72–78.
- 13 47 Manisova B, Binder S, Malina L, Jiravova J, Langova K, Kolarova
14 H (2015). Phthalocyanine-mediated photodynamic treatment
15 of tumoural and non-tumoural cell lines. *Anticancer Research*.
16 **35**(7): 3943–51.
- 17 48 Manusadžianas L, Balkelytė L, Sadauskas K, Blinova I, Pöllumaad
18 L, Kahru A (2002). Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian
19 wastewaters: selection of the biotests, and correspondence
20 between toxicity and chemical-based indices. *Aquatic Toxicology*.
21 **63**: 27–41.
- 22 49 Maselli Bde S, Luna LA, Palmeira Jde O, Tavares KP, Barbosa S,
23 Beijo LA et al. (2015). Ecotoxicity of raw and treated effluents
24 generated by a veterinary pharmaceutical company: a comparison
25 of the sensitivities of different standardized tests. *Ecotoxicology*.
26 **24**: 795–804.
- 27 50 Morisawa T, Mizuno T, Ohe T, Watanabe T, Hirayama T, Nakaya
28 H et al. (2003). Levels and behavior of 2-phenylbenzotriazole-
29 type mutagens in the effluent of a sewage treatment plant. *Mutat Res*.
30 **534**(1–2): 123–32.
- 31 51 OECD (1997). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD
32 Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Organisation
33 for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- 34 52 OECD (2012). Guidance Document on Standardised Test Guidelines
35 for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, No. 150,
36 Series on Testing and Assessment. Paris, France.
- 37 53 Orias F, Perrodin Y (2013). Characterisation of the ecotoxicity
38 of hospital effluents: A review. *Sci Total Environ*. **454–455**:
39 250–276.
- 40 54 Orias F, Perrodin Y (2014). Pharmaceuticals in hospital waste-
41 water: Their ecotoxicity and contribution to the environmental
42 hazard of the effluent. *Chemosphere*. **115**: 31–39.
- 43 55 Park KY, Choi SY, Lee SH, Kweon JH, Song JH (2016). Comparison
44 of formation of disinfection by-products by chlorination and
45 ozonation of wastewater effluents and their toxicity to *Daphnia*
46 magna. *Environ Pollut*. **215**: 314–321.
- 47 56 Pauwels B, Verstraete W (2006). The treatment of hospital waste-
48 water: an appraisal. *Journal of Water and Health*. **4**(4): 405–16.
- 49 57 Paz M, Muzio H, Mendelson A, Magdaleno A, Tornello C, Balbis N
50 et al. (2006). Evaluation of Genotoxicity and Toxicity of Buenos
51 Aires City Hospital Wastewater Samples. *J Braz Soc Ecotoxicol*.
52 **1**(1): 1–6.
- 53 58 Persoone G, Marsalek B, Blinova I, Törökne A, Zarina D, Manusadžianas
54 L et al. (2003). A practical and user-friendly toxicity
55 classification system with microbiotests for natural waters and
56 wastewaters. *Environ Toxicol*. **18**(6): 395–402.
- 57 59 Richardson SD, Plewa MJ, Wagner ED, Schoeny R, Demarini DM
58 (2007). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated
59 and emerging disinfection by-products in drinking water: a
60 review and roadmap for research. *Mutat Res*. **636**: 178–242.
- 61 60 Rosal R, Rodríguez A, Perdígón-Melón JA, Petre A, García-Calvo
62 E, Gómez MJ et al. (2010a). Occurrence of emerging pollutants
63 in urban wastewater and their removal through biological treat-
64 ment followed by ozonation. *Water Res*. **44**: 578–588.
- 65 61 Rosal R, Rodea-Palomares I, Boltes K, Fernández-Piñas F, Leganés
66 F, Gonzalo S et al. (2010b). Ecotoxicity assessment of lipid regu-
67 lators in water and biologically treated wastewater using three
68 aquatic organisms. *Environ Sci Pollut Res*. **17**: 135–144.
- 69 62 Russo C, Lavorgna M, Cesen M, Kosjek T, Heath E, Isidori M
70 (2017). Evaluation of acute and chronic ecotoxicity of cyclophos-
71 phamide, ifosfamide, their metabolites/transformation products
72 and UV treated samples. *Environmental Pollution*. **233**: 356–363.
- 73 63 Rustagi N, Singh R (2010). Mercury and health care. *Indian J
74 Occup Environ Med*. **14**(2): 45–48.
- 75 64 Santos L, Gros M, Rodríguez-Mozaz S, Delerue-Matos C, Pena A,
76 Barceló D et al. (2013). Contribution of hospital effluents to the
77 load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of
78 ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of The Total Envi-
79 ronment*. **461–462**: 302–316.
- 80 65 Sharma P, Mathur N, Singh A, Sogani M, Bhatnagar P, Atri R et al.
81 (2015). *Environ Monit Assess*. **187**(1): 4180.
- 82 66 Shen L, Wu JY, Lin GF, Shen JH, Westendorf J, Huehnerfuss H
83 (2003). The mutagenic potentials of tap water samples in Shang-
84 hai. *Chemosphere*. **52**: 1641–1646.
- 85 67 Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple tech-
86 nique for quantitation of low levels of DNA damage in individual
87 cells. *Exp. Cell Res*. **175**(1): 184–91.
- 88 68 Suarez S, Lema JM, Omil F (2009). Pre-treatment of hospital
89 wastewater by coagulation-flocculation and flotation. *Biore-
90 source Technology*. **100**: 2138–2146.
- 91 69 Ternes TA, Bonerz M, Herrmann N, Teiser B, Andersen HR (2007).
92 Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: an
93 option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemo-
94 sphere*. **66**(5): 894–904.
- 95 70 Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A,
96 Kobayashi H et al. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines
97 for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol.
98 Mutagen*. **35**(3): 206–21.
- 99 71 Tomankova K, Kejlava K, Binder S, Daskova A, Zapletalova J, Ben-
100 dova H et al. (2011). In vitro cytotoxicity and phototoxicity study
101 of cosmetics colorants. *Toxicology in Vitro*. **25**(6): 1242–50.
- 102 72 Váilitalo P, Kruglova A, Mikola A, Vahala R (2017). Toxicological
103 impacts of antibiotics on aquatic micro-organisms: A mini-
104 review. *International Journal of Hygiene and Environmental
105 Health*. **220**(3): 558–569.
- 106 73 Váňa M, Wanner F, Matoušová L, Fuksa J. K (2010). Možnosti
107 odstraňování vybraných specifických polutantů v ČOV.
108 Vodo hospodářské technologicko-ekonomické informace **52**:
109 1–16.
- 110 74 Vasconcelos EC, Dalke CR, de Oliveira CMR (2017). Influence of
111 Select Antibiotics on *Vibrio fischeri* and *Desmodesmus subspici-*
112 *catus* at µg L⁻¹ Concentrations. *Environ Manage*. **60**: 157–164.
- 113 75 Vasquez MI, Fata-Kassinou D (2013). Is the evaluation of tradi-
114 tional physicochemical parameters sufficient to explain the
115 potential toxicity of the treated wastewater at sewage treatment
116 plants? *Environ Sci Pollut Res*. **20**: 3516 – 3528.
- 117 76 Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E (2012). Occurrence of phar-
118 maceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass
119 load and environmental risk after a secondary treatment—A
120 review. *Science of The Total Environment*. **429**: 123–155.
- 121 77 Vlkova A, Wittlingerova Z, Zimova M, Jirová G, Kejlová K,
122 Janoušek S (2016). Genotoxicity of wastewater from health care
123 facilities. *Neurocrinology Letters*. **37**: 25–32.
- 124 78 WHO (2013). In: Chartier Y, et al. editors. World Health Organisa-
125 tion. Safe Management of Wastes from Health-care Activities,
126 2nd ed.
- 127 79 White PA, Rasmussen JB, Blaise C (1996). Comparing the pres-
128 ence, potency, and potential hazard of genotoxins extracted
129 from a broad range of industrial effluents. *Environ Mol Mutagen*.
130 **27**(2): 116–39.
- 131 80 Wiest L, Chonova T, Bergé A, Baudot R, Bessueille-Barbier F,
132 Ayouni-Derouiche L et al. (2017). Two-year survey of specific
133 hospital wastewater treatment and its impact on pharmaceuti-
134 cal discharges. *Environ Sci Pollut Res*. **25**: 9207–9218.
- 135 81 Zgórska A, Arendarczyk A, Grabinska-Sota E (2011). Toxicity
136 assessment of hospital wastewater by the use of a biotest bat-
137 tery. *Archives of Environmental Protection*. **37**(3): 55–61.
- 138 82 Zhang Y, Geissen SU, Gal C (2008). Carbamazepine and diclofenac:
139 removal in wastewater treatment plants and occurrence in
140 water bodies. *Chemosphere*. **73**(8): 1151–61.

Studie IV

Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos to Hospital Effluent Compared to *Daphnia magna* and *Allivibrio fischeri*.

Physiological Research

69(4): S681-S691.

Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos to Hospital Effluent Compared to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*

Martina WITTLEROVÁ¹, Gabriela JÍROVÁ^{1,2}, Alena VLKOVÁ^{1,2}, Kristina KEJLOVÁ¹, Marek MALÝ¹, Tuula HEINONEN³, Zdeňka WITTLINGEROVÁ², Magdaléna ZIMO VÁ^{1,2}

¹National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic, ²Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic, ³Faculty 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, Väilitalo *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 ≤ 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	Cl_2
H2	University	1006	Mechanical-Biological	50	NaClO
H3	University	2199	Mechanical-Biological	50-100	NaClO
H4	General	500	Mechanical-Biological	30-50	Cl_2
H5	General	423	Mechanical-Biological	40	Do not chlorinate
H6	General	1447	Mechanical-Biological	360	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 %, EC_{50} or 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 [%] 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 [%] EC_{50} [%]
<i>FET test</i> (FET 48 h)	<i>Danio rerio</i> embryo	OECD TG 236	48 hpf	Mortality [%] LC_{50} [%]
<i>FET test</i> (FET 96 h)	<i>Danio rerio</i> embryo	OECD TG 236	96 hpf	Mortality [%] LC_{50} [%]
<i>FET test</i> (FET 96 h+sub)	<i>Danio rerio</i> embryo	OECD TG 236 modified	96 hpf	Mortality + sublethal effects [%] 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⁻¹ CaCO₃. 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⁻¹ CaCl₂ × 2H₂O, 123.3 mg·l⁻¹ MgSO₄ × 7H₂O, 63.0 mg·l⁻¹ NaHCO₃, 5.5 mg·l⁻¹ 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 LC₅₀.

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 EC₅₀.

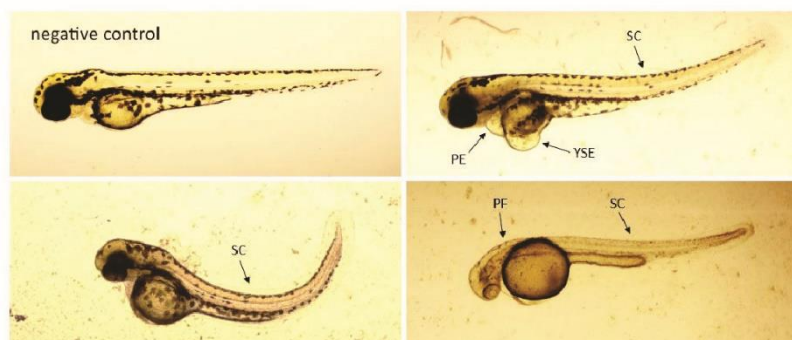


Fig. 1. Representative sublethal abnormalities of zebrafish embryos after 96 hpf (hours post fertilization) exposure to the hospital wastewater samples. PE=pericardial edema, YSE=yolk sac edema, SP=spinal curvature, PF=pigmentation failure.

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 ± 2 °C, 16:8 light:dark cycle, oxygen concentration ≥ 2 mg·l⁻¹, no feeding. For the experiment validity, the inhibition of mobility in the negative controls had to be ≤ 10 %. The sensitivity of test organisms was monitored by regular tests with K₂Cr₂O₇ used as positive control.

The results were expressed as percentage of *Daphnia* immobilization (toxic effect), or as EC₅₀ 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⁻¹, pH 6.0 to 8.5 and oxygen concentration >3 mg·l⁻¹. 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 ± 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 (ZnSO₄ × 7H₂O).

The results were presented as percentage of inhibition of the bacteria light emission (toxic effect) with respect to the negative control, or as EC₅₀.

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 EC50, LC50 values

In the following study, if the values of toxic effect exceeded 50 % (H1, H3-H6), EC₅₀ or LC₅₀ 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 EC₅₀ 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 LC₅₀ 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.

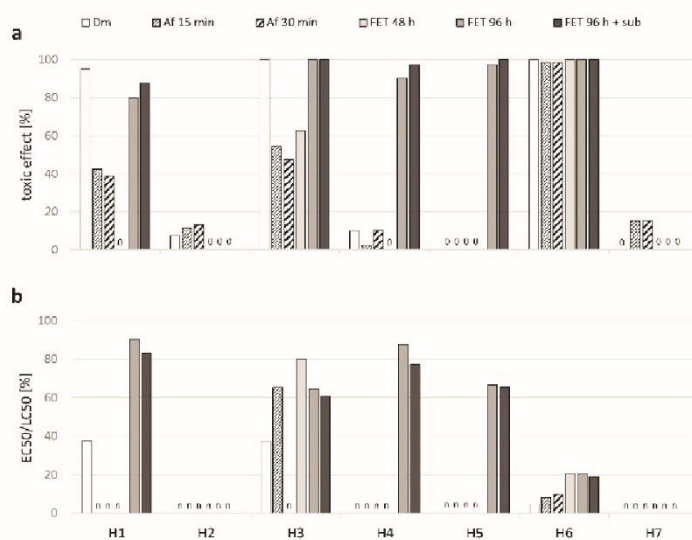


Fig. 2. Ecotoxicity of wastewater samples from different hospitals (H1-H7) expressed as: (a) toxic effect [%] of undiluted samples and (b) EC₅₀, LC₅₀ values [%]. Comparison between *Daphnia magna* (Dm), *Allivibrio fischeri* (Af) and *Danio rerio* embryos. FET=Fish Embryo Acute Toxicity Test.

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	48 hpf/96 hpf						
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
<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, Jirová *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 EC₅₀=2.01 %) and lower acute toxicity for *D. rerio* (48 h LC₅₀=29.25 %). In our study, the sample that can be considered as the most toxic (H6) because of its low EC₅₀ and LC₅₀ 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. LC₅₀ 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 LC₅₀ value 6.1 %. EC₅₀ 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 LC₅₀ 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 (LC₅₀=56.5 %) compared to FET 96 h (LC₅₀=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 ÂC, 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 LÜTZHØFT 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
- 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, CIESZYŃSKA-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, DOMENJOU 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>

ODBORNÝ ŽIVOTOPIS

Osobní informace:

Jméno: Ing. Gabriela Jírová

VŠ, fakulta: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta životního prostředí

Pracoviště: Katedra aplikované ekologie

Forma studia: Ph.D. student prezenční forma

Studijní obor: Aplikovaná a krajinná ekologie

Odborné zaměření: Ekotoxikologické hodnocení nemocničních odpadních vod

Vzdělání:

2016 – současnost Doktorské studium: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta životního prostředí, Katedra aplikované ekologie, obor Aplikovaná a krajinná ekologie; téma DSP: Indikátory rizik ekotoxicity odpadních vod

2013 – 2015 Magisterské studium: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, obor Udržitelný rozvoj biosféry; Program Péče o biosféru; téma DP: Ekohydrologické hodnocení Únětického potoka a jeho povodí, udělen titul Ing.

2009 – 2013 Bakalářské studium: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, obor Udržitelné využívání přírodních zdrojů; Program Udržitelné využívání přírodních zdrojů; téma BP: Ekohydrologické hodnocení drobného vodního toku v okolí Prahy, udělen titul Bc.

Vzdělávací kurzy zakončené certifikátem a osvědčením

2016: Konference TOXCON 2016, 22-24. 06. 2016 – Vysoké Tatry - Stará Lesná – Slovenská republika.

2017: Kurz AKK Odborné zdravotnické laboratorní metody – získání odborné způsobilosti k výkonu povolání odborného pracovníka v laboratorních metodách a v přípravě léčivých přípravků.

2017: VII. pracovní konference nelékařských zdravotnických pracovníků SZÚ.

2017: 22. konference Zdraví a životní prostředí, SZÚ. Milovy.

2018: Konference Vodárenská biologie 2018 v hotelu DAP v Praze.

2018: Školící kurz: Optimalizace obrazu v mikroskopii pro biologické aplikace. Olympus Czech Group, Evropská 176, Praha.

2018: 23. konference Zdraví a životní prostředí, SZÚ, Praha.

2019: Konference TOXCON 2019 - 24th Interdisciplinary Toxicology Conference, Vyhne.

2019: Seminář - VZORKOVÁNÍ PITNÝCH, PODZEMNÍCH A ODPADNÍCH VOD. Pořádaný v EA hotelu Populus v Praze.

2020: TOXCON 2020 - 25th Interdisciplinary Toxicology Conference. Praha.

Pracovní zkušenosti:

2016 až současnost: Státní zdravotní ústav, Praha. Centrum zdraví a životního prostředí, Laboratoř hygieny půdy a odpadů, pracovní pozice: Přírodovědný analytik-diagnostik.

Ostatní:

Řidičské oprávnění: B

Jazyky: Angličtina (B2)

Němčina (A2)

Práce na počítači: MS Office, EcoTox, ARGIS

Účast na projektech:

2015 – 2018: Ekotoxicita odpadních vod ze zdravotnických zařízení. Institucionální podpora výzkumné organizace. Státní zdravotní ústav, Praha.

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.

PUBLIKAČNÍ PŘEHLED

Příspěvky v časopise s IF

Jírová G., Wittlingerová Z., Zimová M., Vlková A., Wittlerová M., Dvořáková M., Jírová D., 2016: Bioindicators of wastewater ecotoxicity. *Neuroendocrinology Letters* 37(1): 17-24.

Vlková A., Wittlingerová Z., Zimová M., Jírová G., Kejlová K., Janoušek S., Jírová D., 2016. Genotoxicity of wastewater from health care facilities. *Neuroendocrinology Letters* 37(1): 101-108.

Chrz J., Vlková A., Jírová G., Wittlerová M., Wittlingerová Z., Zimová M., Kolarová H., 2017: Wastewater from health care facilities - Toxicity for human health and the environment. *Toxicology Letters* 280S: S202–S213.

Jírová G., Vlková A., Wittlerová M., Dvořáková M., Kašparová L., Chrz J., Kejlová K., Wittlingerová Z., Zimová M., Hošíková B., Jiravová J., Kolářová H., 2018: Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays. *Neuroendocrinology Letters* 39: 101–113.

Wittlerová M., Jírová G., Vlková A., Kejlová K., Malý M., Heinonen T., Wittlingerová Z., Zimová M., 2020: Sensitivity of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos to Hospital Effluent Compared to *Daphnia magna* and *Allivibrio fischeri*. *Physiological Research* 69(4): S681-S691.

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. *Physiological Research* 69(4): S661-S679.

Janoušek S., Vlková A., Jírová G., Kejlová K., Krsek D., Jírová D., Kandarova H., Wittlingerová 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. Alternatives to Laboratory Animals.
<https://doi.org/10.1177/02611929211004956>.