

Mgr. Pavla Kovaláková, Ph.D.

# HODNOCENÍ STAVU VOD POMOCÍ EFFECT-BASED METOD

# Využití effect-based metod k hodnocení stavu povrchových vod v kontextu Rámcové směrnice o vodě

SS03010140 HOPEM

Prostředí pro život 3, podprogram 1

Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v. v. i.  
leden 2021 – listopad 2023

Web projektu: [heis.vuv.cz/projekty/hopem/](https://heis.vuv.cz/projekty/hopem/)

# Podstata projektu

Rámcová směrnice o vodě (WFD, 2000/60/ES) vyžaduje integrovaný přístup ke sledování a hodnocení kvality útvarů povrchových vod. V pokynech Společné Implementační strategie (CIS) je uvedeno, že je nutné představit další techniky pro hodnocení kvality vod jakmile budou k dispozici.

V ČR je **hodnocení stavu vod** zajišťováno dle rámcového programu monitoringu v souladu s požadavkem vyhlášky 98/2011 ve znění §21 vodního zákona a normami kvality životního prostředí (EQS) závaznými v celé EU

- **Ekologický stav** hodnotí účinky na úrovni populace a komunity dle konkrétních indexů a poměrů ekologické kvality
- **Chemický stav** se stanovuje dle vybraných regulovaných chemických látek (prioritních, prioritních nebezpečných a dalších znečišťujících látek)



účinky celkového množství chemických látek a jejich metabolitů  
přítomnost a působení emergentních polutantů (CECs)  
efekty směsí

NORMAN Network a CMEP WG Chemicals **doporučují začlenění effect-based metod** do současného systému monitoringu, viz Technical report on aquatic effect-based monitoring tools (EK, 2014) a EU Collaborative Project SOLUTIONS (2019)

# Effect-based monitoring

## Ekotoxikologické biotesty

- *In vivo* akutní a chronické testy na živých organismech
- *In vitro* AR/ER/GR/AhR CALUX, YES/YAS, Ames, ABC
- Biomarkery EROD, AChE, MTT, imposex

Reakce na široké spektrum chemických stresorů dle jejich mechanismu účinku  
Nelze je propojit s určitou prioritní látkou a použít samostatně v souladu s normami environmentální kvality (EQS).

## Využití

- Brzká detekce biologické nerovnováhy
- Propojení ekologické a chemické informace
- Propojení koncentrací s expozicí a efekty
- Včasné upozornění na změny kvality vody
- Detekce a hodnocení významných polutantů pro aktualizaci hodnocení rizik
- Detekce nepříznivých biologických efektů – prioritizace lokalit

Vhodnost metod hodnocena dle ceny a praktické proveditelnosti

- speciální lab. vybavení, citlivost metody, rychlost provedení, množství vzorku...

# Hlavní cíl projektu

## Metodika hodnocení stavu vod pomocí vybraných effect-based metod

- Hodnocení ekotoxikologického stavu povrchových vod, vč. efektů směsí
- Screeningový nástroj k identifikaci rizikových látek dle MoA
- Doplněk konvenčního monitoringu
- Systém včasného varování, prioritizace studia dalších efektů

## Effect-based metody

### Ekotoxicita pro destruenty

- Microtox test s luminiscenční bakterií *Aliivibrio fischeri* dle ČSN EN ISO 11348

### Ekotoxicita pro producenty

- Test inhibice růstu zelených řas dle ČSN EN ISO 8692
- Řasa *Raphidocelis subcapitata*

### Endokrinní disrupce

- Hodnocení estrogenní aktivity pomocí YES-testu dle ISO 19040-1
- kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

### Genotoxicita

- stanovení přímé mutagenity pomocí Amesova testu dle ISO 11350:2012
- bakterie *Salmonella typhimurium* (kmeny TA 98 a TA 100)

# Plán projektu

## Odběry vzorků vod na vybraných lokalitách

- 11 profilů na třech povodích
  - 9 dlouhodobě špatná jakost vod
  - 2 referenční
- Odběr prostých bodových vzorků
  - 3x ročně po dobu dvou let

## Zpracování vzorků vod

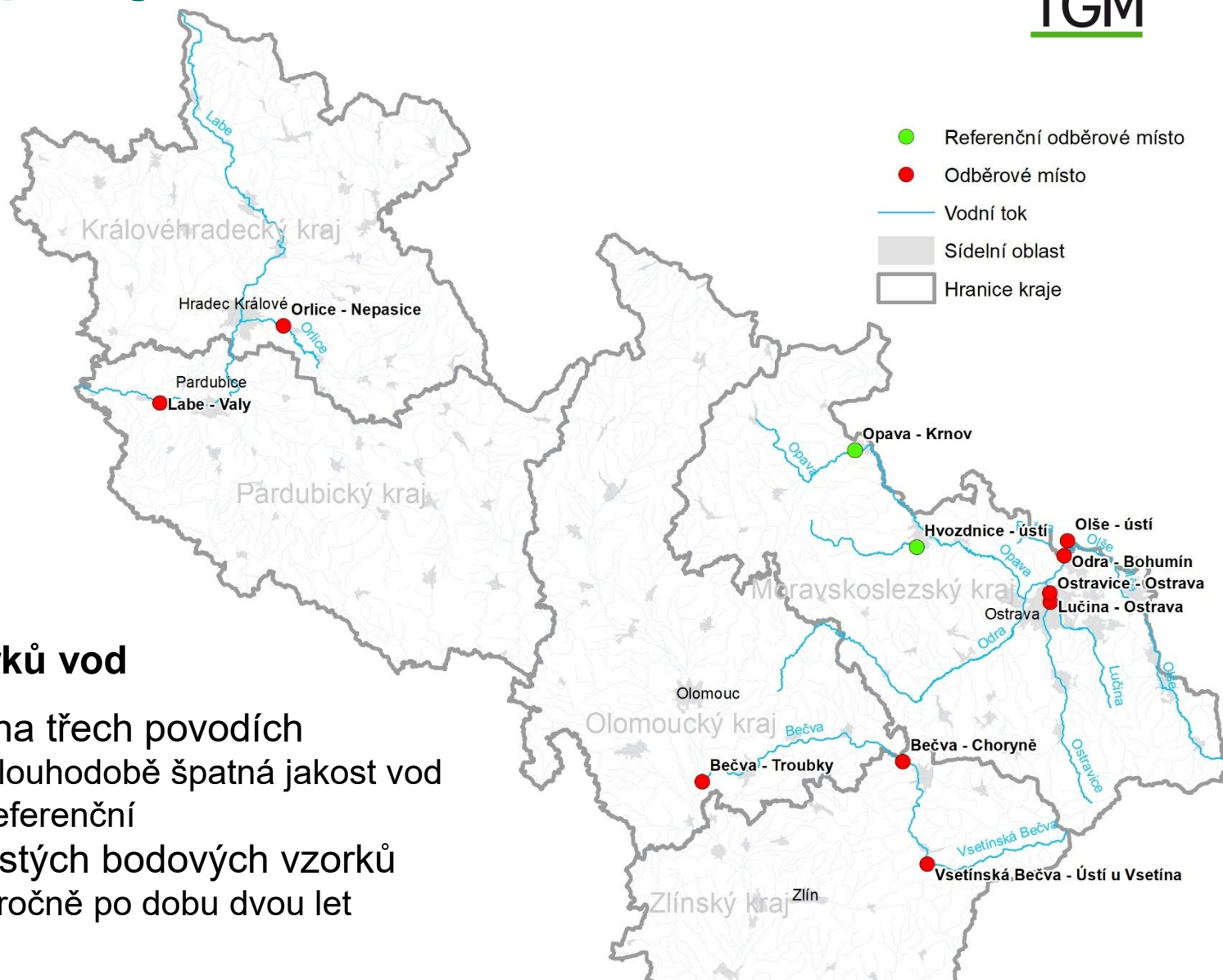
- Příprava 1000x zakoncentrovaného vzorku dle normy TNV 75 7231
  - Optimalizace postupu

## Testování zakoncentrovaných vzorků effect-based metodami

- Limitní zkoušky ekotoxicity, genotoxicity a endokrinní disrupce
  - U pozitivních vzorků test ředící řady pro stanovení relevantních endpointů (EC50, EC20, EEQ, # revertantů)

## Vyhodnocení dat a příprava metodiky

# Plán projektu



## Odběry vzorků vod

- 11 profilů na třech povodích
  - 9 dlouhodobě špatná jakost vod
  - 2 referenční
- Odběr prostých bodových vzorků
  - 3x ročně po dobu dvou let





# Plán projektu

## Odběry vzorků vod na vybraných lokalitách

- 11 profilů na třech povodích
  - 9 dlouhodobě špatná jakost vod
  - 2 referenční
- Odběr prostých bodových vzorků
  - 3x ročně po dobu dvou let

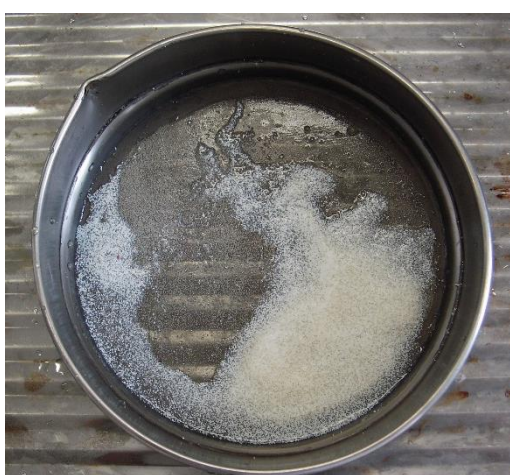
## Zpracování vzorků vod

- Příprava 1000x zakoncentrovaného vzorku dle normy TNV 75 7231
  - Optimalizace postupu

## Testování zakoncentrovaných vzorků effect-based metodami

- Limitní zkoušky ekotoxicity, genotoxicity a endokrinní disrupce
  - U pozitivních vzorků test ředící řady pro stanovení relevantních endpointů (EC50, EC20, EEQ, # revertantů)

## Vyhodnocení dat a příprava metodiky



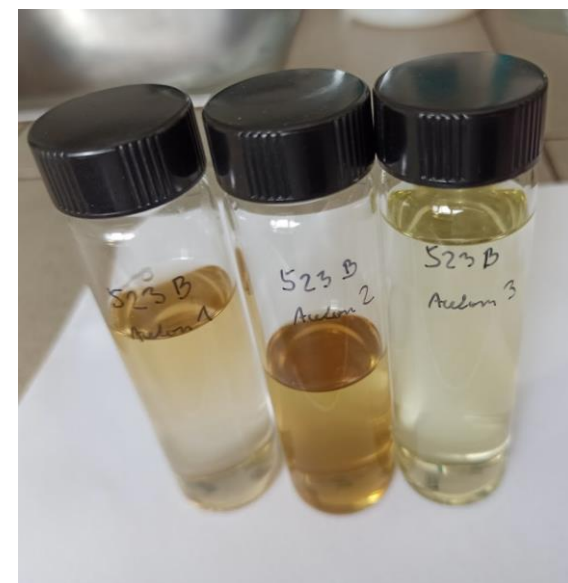
## Sorbent: Amberlite XAD polymeric resins

### XAD-4

- sorpce malých hydrofobních sloučenin, např. organochloridů a pesticidů
- surf. area 725 m<sup>2</sup>/g, pore diameter 50 Å

### XAD-16

- sorpce hydrofobních sloučenin až do 40,000 MW, velké organické molekuly a proteiny
- surf. area 900 m<sup>2</sup>/g, pore diameter 100 Å





## Zakoncentrování vzorků 1000x

- Extrakce do rozpouštědla (metanol, aceton)
- Zahuštění na vakuové odparce
- Doplnění do finálního objemu 20 mL demineralizovanou vodou



# Plán projektu

## Odběry vzorků vod na vybraných lokalitách

- 11 profilů na třech povodích
  - 9 dlouhodobě špatná jakost vod
  - 2 referenční
- Odběr prostých bodových vzorků
  - 3x ročně po dobu dvou let

## Zpracování vzorků vod

- Příprava 1000x zakoncentrovaného vzorku dle normy TNV 75 7231
  - Optimalizace postupu

## Testování zakoncentrovaných vzorků effect-based metodami

- Limitní zkoušky ekotoxicity, genotoxicity a endokrinní disrupce
  - U pozitivních vzorků test ředící řady pro stanovení relevantních endpointů (EC50, EC20, EEQ, # revertantů)

## Vyhodnocení dat a příprava metodiky

# Effect-based metody

## Ekotoxicita pro destruenty

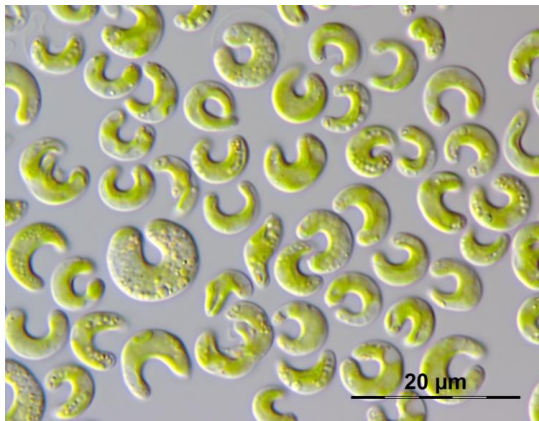
## Microtox assay

- *in vitro* test dle ČSN EN ISO 11348
- Bioluminiscenční bakterie *Aliivibrio fischeri*
- Test akutní toxicity
- Endpoint: inhibice luminiscence po 15 a 30 min



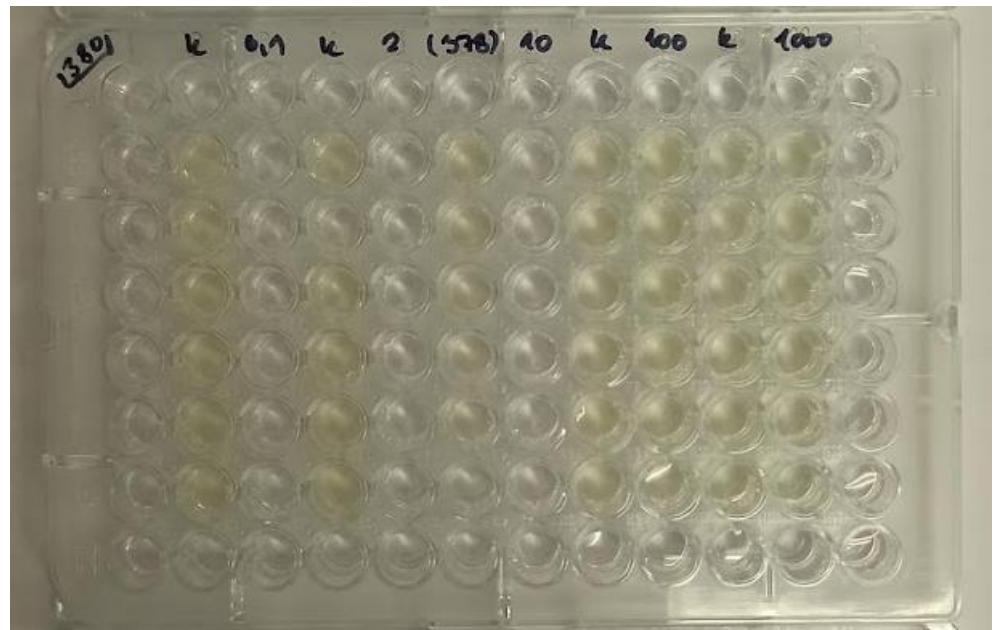
# Effect-based metody

## Ekotoxicita pro producenty



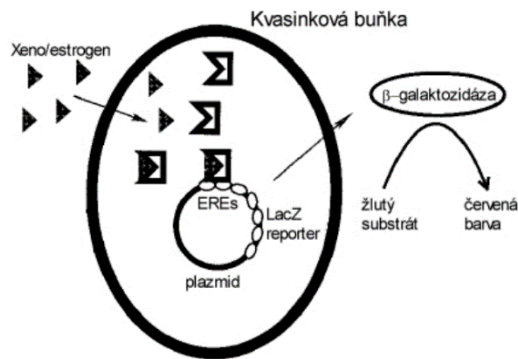
## Test inhibice růstu zelených řas

- Dle ČSN EN ISO 8692
- Sladkovodní řasa *Raphidocelis subcapitata*
- Test chronické toxicity
- Endpoint: Inhibice růstu po 72 h



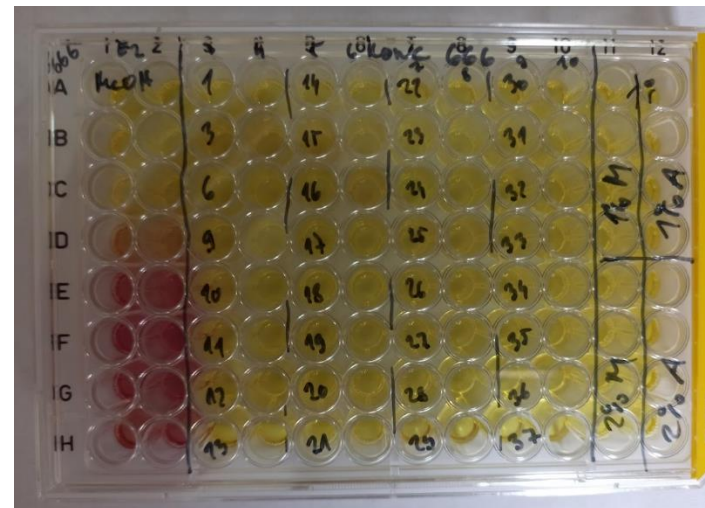
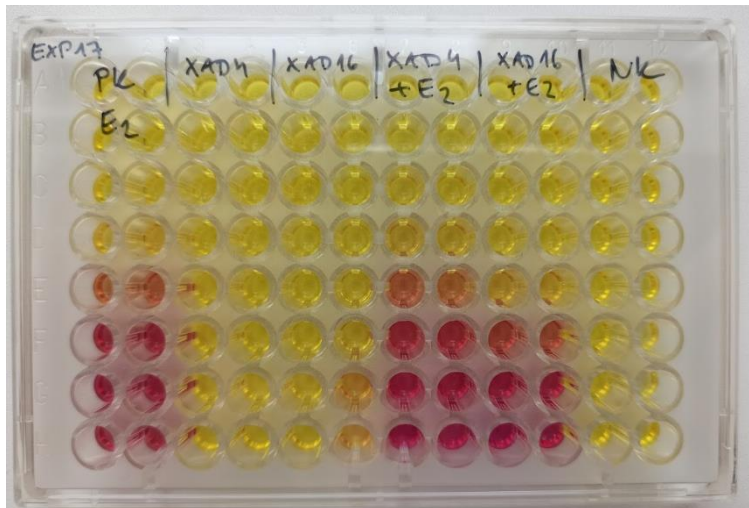
# Effect-based metody

## Endokrinní disrupce



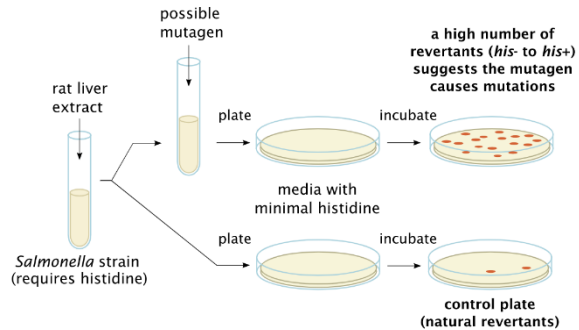
## Yeast Estrogen Screen (YES) test

- Hodnocení estrogenní aktivity dle ISO 19040-1
- *in vitro* test s GMO kvasinkami *S. cerevisiae*
- Endpoint: Estradiol Equivalent Concentration (EEQ)
- Pozitivní kontrola: 17-β estradiol



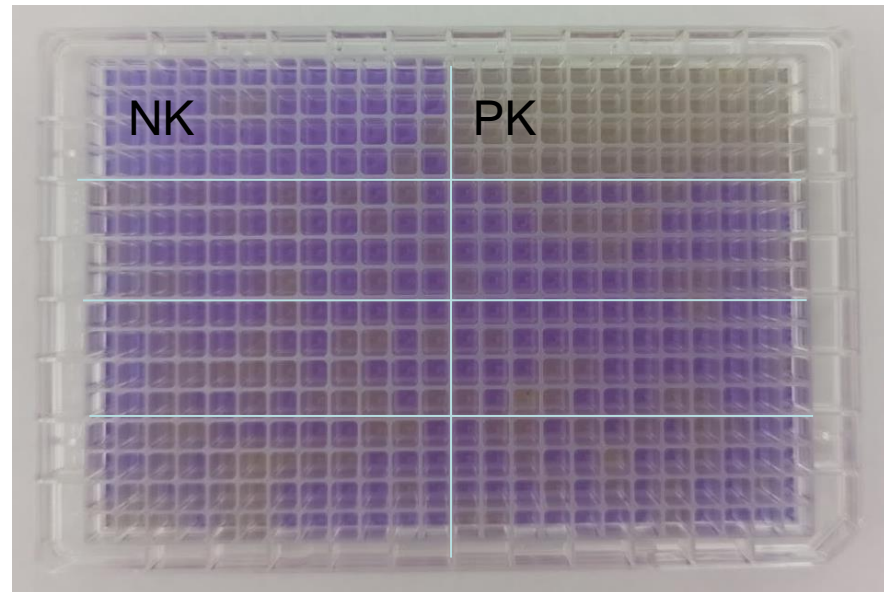
# Effect-based metody

## Genotoxicita



## Ames test

- Stanovení přímé mutagenity dle ISO 11350:2012
- Bakterie *Salmonella typhimurium* (kmeny TA98,TA100)
- Endpoint: zpětná mutace genu pro syntézu histidinu
- Pozitivní kontrola: TA98: 4-NOPD, TA100: nitrofurantoin





# Plán projektu

## Odběry vzorků vod na vybraných lokalitách

- 11 profilů na třech povodích
  - 9 dlouhodobě špatná jakost vod
  - 2 referenční
- Odběr prostých bodových vzorků
  - 3x ročně po dobu dvou let

## Zpracování vzorků vod

- Příprava 1000x zakoncentrovaného vzorku dle normy TNV 75 7231
  - Optimalizace postupu

## Testování zakoncentrovaných vzorků effect-based metodami

- Limitní zkoušky ekotoxicity, genotoxicity a endokrinní disrupce
  - U pozitivních vzorků test ředící řady pro stanovení relevantních endpointů (EC50, EC20, EEQ, # revertantů)

## Vyhodnocení dat a příprava metodiky

## **Vyhodnocení dat a příprava metodiky**

- Výsledky ekotoxikologických biotestů vyjádřeny jako bioanalytické ekvivalenty (BEQ)
- Interpretace dat – hodnocení toxikologického stavu vod a analýza rizik (Úroveň rizika dle ředění ve kterém se projeví pozitivní efekt měřeného endpointu)
- Porovnání s daty chemických ukazatelů jakosti vod poskytnutými s.p. Povodí Labe, Moravy a Odry
- Sledování případných trendů v časových řadách
- Vyhodnocení vhodnosti vybraných effect-based metod pro hodnocení stavu vod
- Příprava metodiky

## **TAP Action**

- Porovnání know-how s řešiteli z dalších evropských zemí / pracovních skupin

# TAP Action



- Thematic Annual Programming (TAP) Action je třetí výzva ERA-NET Cofundu AquaticPollutants. Jedná se o výzvu typu Alignment na podporu mobility a sdílení dobré praxe, materiálů, infrastruktur, dat a výsledků.
- Téma výzvy: *“Měření vstupů a přijímání opatření ke snížení emergentních polutantů (CECs), patogenů a bakterií rezistentních na antimikrobiální látky ve vodních ekosystémech“*
- Do této výzvy jsou zapojeni poskytovatelé z pěti evropských zemí:
  - Česká republika (TA ČR)
  - Francie (ANR)
  - Irsko (EPA)
  - Španělsko (AEI)
  - Švédsko (SRC)
- Rozpočet pro ČR je 4 050 000 Kč, max. výše podpory na projekt je 1 350 000 Kč
  - Způsobilé náklady: osobní náklady, ostatní přímé náklady, nepřímé náklady
  - Nezpůsobilé náklady: investice, subdodávky
- Trvání projektu: leden 2022 – prosinec 2023
- Celkem čtyři setkání TAP Clusteru (dvě v roce 2022, dvě v roce 2023)

Mgr. Pavla Kovaláková, Ph.D.

# HODNOCENÍ STAVU VOD POMOCÍ EFFECT-BASED METOD

[heis.vuv.cz/projekty/hopem/](https://heis.vuv.cz/projekty/hopem/)

[pavla.kovalakova@vuv.cz](mailto:pavla.kovalakova@vuv.cz)