

Aquatic effect-based monitoring tools

Luděk Sehnal

1. Úvod

Hydrologické problémy spojené s lidskou činností nebo přírodními změnami kvality vod jsou intenzivně diskutovány od konce 60. let minulého století. Do legislativy se první standardy pro hodnocení kvality vody dostali v roce 1975 a následně v roce 1980 byly nastaveny závazné cíle kvality pro pitnou vodu. V dnešní době je monitoring a hodnocení kvality vod v evropské unii (EU) řízen prostřednictvím rámcových směrnic. Z obecného hlediska lze veškerá vodní tělesa plně charakterizovat pomocí 3 hlavních složek: hydrologie, fyzikálně-chemických vlastností a biologie, a tak kompletní hodnocení kvality vody je založeno na vhodném monitoringu těchto 3 složek (Chapman et al., 1996).

Tato seminární práce je zaměřena na využití moderních a efektivních metod pro monitoring a hodnocení kvality povrchových vod, přičemž jsou tyto metody založeny na detekci specifických efektů. Pojednává také o tom, jaký je v současnosti legislativní rámec EU pro řízení monitoringu a hodnocení kvality vod a to jak vnitrozemských, tak mořských vod. V neposlední řadě, práce interpretuje několik případových studií, kde bylo využito kombinace chemických analýz a souboru biotestů, biomarkerů a ekologických indikátorů chemického znečištění pro monitoring a hodnocení kvality vod.

2. Potenciál využití biotestů k monitoringu

Jde o techniky, které nacházejí velké využití při výzkumu biologických efektů směsí látek, detekci efektů čistých látek a také pro screeningové testy vzorků z prostředí, a to zejména pro svou specifickou odpověď na působení chemických stressů. V kontextu WFD jsou biotesty zmíněny v dokumentech Společné implantační Strategie (CIS). V pokynech CIS je uvedeno, že je nutné představit další techniky pro hodnocení kvality a těžit z vývoje úsporných zdrojů, jakmile budou k dispozici. Lze tedy předpokládat, že by se tyto tzv. „effect based tools“, jakožto techniky vhodné pro hodnocení biologických efektů, mohli stát legislativní součástí WFD. Současně je však uvedeno, že jsou designovány k odpovědi na široké spektrum chemických stresorů, a tudíž nejsou jednoznačně propojitelné s určitou prioritní látkou. Z toho vyplývá, že ačkoliv jsou velmi užitečné, nemohou být použity jako

samostatné kontrolní jednotky v souladu s normami environmentální kvality (EQS). Nicméně, potenciál těchto detekčních metod je značný, o čemž svědčí jejich vhodné využití pro:

- Brzkou detekci biologické nerovnováhy
- Propojení ekologické a chemické informace
- Propojení koncentrací s expozicí a efekty
- Včasné upozornění na změny kvality vody
- Detekci a hodnocení významných polutantů pro aktualizaci hodnocení rizik
- Detekci nepříznivých biologických efektů pro zjištění, kde je vyžadován monitoring

Vhodnost jakékoliv konkrétní metody musí být hodnocena s ohledem na její cenu a praktickou proveditelnost. Metoda musí poskytnout užitečné informace, které následně mohou napomoci cílům monitorovacích programů.

Z kontextu WFD je možné identifikovat několik cílů tzv. „effect based tools“ a několik z nich je shrnuto zde:

- a. Aby plnili funkci screeningových metod, jako součást hodnocení vlivů a dopadů na vodní ekosystémy
- b. Aby plnili účel systému včasného varování, k prioritizaci studia dalších efektů
- c. Aby zohlednili efekty směsí polutantů nebo neanalyzovaných látek
- d. Aby dodatečně podpořili hodnocení kvality vod již zavedenými metodami

Dle typu monitorovacího přístupu lze tyto tzv. „effects based tools“ rozdělit do tří kategorií na biomarkery, *in vitro* a *in vivo* biotesty. V následujícím textu této práce se podíváme jaké výhody a nevýhody poskytují jednotlivé kategorie, z hlediska využitelnosti při monitoringu a hodnocení rizik.

2.1. Biotesty

Obecně jsou biotesty definovány jako testy, které měří toxicitu vzorků z prostředí při laboratorních podmínkách. Využívají přitom běžných postupů k měření toxikologických endpointů na úrovni organismu nebo nižší (Piva et al., 2011). Důležitou součástí jak pro *in vitro*, tak pro *in vivo* testy je správný odběr a zpracování vzorku, aby nedošlo ke změnám chemického složení vzorků. Z toho důvodu vydala mezinárodní organizace pro standartizaci (ISO) pokyny, jak správně provádět vzorkování vodních těles.

Většina vhodných přístupů je obecně založena na výběru adekvátní baterie testů a na výběru druhů, které by měli zohledňovat různé aspekty, jako jsou citlivost, specifická dostupnost organismu, variabilita metody, nákladnost, etičnost a standartizovatelnost ruku v ruce se vzájemnou kalibrací metod. S tím pak souvisí validita testů. Mezinárodně jsou nejdůležitějšími orgány pro vývoj, validizaci a standardizaci Organizace pro Spolupráci a Vývoj (OECD) a ISO, a to jak pro biotesty, tak analytické metody.

2.1.1. In vitro biotesty

In vitro biotesty jsou založeny především na testování vzorků z prostředí na laboratorních buněčných liniích s transfekovaným reportérovým genem. Test je založen na specifické odpovědi transfekovaných buněk, jejichž reportérový gen spouští expresi detekovatelného produktu (luciferáza nebo GTP) v případě, že látka či skupina látek, kterým je buněčná linie exponována spouští signalizační dráhu vazbou na specifický receptor. Typy běžně používaných linií jsou uvedeny v Tab 1. Nejběžnější linie CALUX je komerčně dostupnou linií.

| Název linie | Mechanismus působení |
|-------------|--|
| AR CALUX | Androgenní aktivita (AR) |
| DR CALUX | Vazba na aryl uhlovodíkový receptor (AH) |
| ER CALUX | Estrogení aktivita (ER) |
| GR CALUX | Glucokortikoidní aktivita (GR) |
| TRb CALUX | Tyroidní aktivita (TR) |
| YES | Estrogenní aktivita (ER) |
| Ames | Genotoxicita/mutagenita |
| ABC | Antibiotická aktivita |

Tabulka 1 Přehled transfekovaných buněčných linií navržených pro monitorovací účely.

Prostřednictvím in vitro biotestů lze sledovat nepřeberné množství efektů látek v environmentálních směsích. Výhody těchto testů (Tab. 2) jasně převažují nad nevýhodami, avšak bez doplňující informace pokročilých analytických metod je jejich vypovídající hodnota nedostačující. A tak pouze kombinace těchto metod představuje prospektivní řešení pro monitoring a hodnocení kvality vod, což je ukázáno v případové studii, viz příloha 1.

| Výhody | Nevýhody |
|---|--|
| není třeba řešit etické problémy | nelze stanovit strukturu látek |
| velmi specifická odpověď | nízká vypovídající hodnota o [↑] úrovních |
| lze testovat extrakty všech typu matric | |
| je třeba malé množství vzorku | |
| stačí krátký expoziční čas | |
| nízké náklady | |
| snadná identifikace toxických frakcí | |
| dobře dostupné | |

Tabulka 2 Přehled výhod a nevýhod využití *in vitro* biotestů pro monitoring a hodnocení rizik.

2.1.2. In vivo biotesty

In vivo biotesty slouží k hodnocení dopadů chemických látek a environmentálních směsí na živé organismy. Většinou jsou testy prováděny v laboratoři, v manipulovaných podmínkách. Výsledkem takových biotestů jsou tzv. endpointy. Jde o typy efektů, z nichž jsou některé sledovány již při expozici a některé až po skončení expozice. Jako příklady takových efektů lze uvést mortalitu, vliv na reprodukci, metabolismus, fyziologické funkce či chování. Je nutné testování na více trofických úrovních, protože druhová citlivost k různým látkám je velice variabilní (viz příloha 3).

Obecně je in vivo biotestů široké spektrum a můžeme je dle délky expozice rozdělit na akutní a chronické testy. U akutních testů nesmí přesáhnou doba expozice $\frac{1}{3}$ průměrného času od narození po sexuální zralost. Naopak, chronické efekty toxicity jsou měřeny až po uplynutí doby delší, než je 50% celková doba života organismu. Velkou výhodou těchto testů je možnost pozorování odpovědi živého organismu ke zvolené expozici. Avšak také velkou nevýhodou jejich pracnost, časová náročnost a u chronických testů i finanční náročnost. Monitoring environmentální toxicity v rozsahu chronických testů je tedy z praktického hlediska nemožný.

2.2. Biomarkery

Tyto metody nachází využití při studiu takových efektů, jako jsou biochemické, fyziologické či morfologické změny u exponovaných jedinců. Slouží ke studiu jedinců, kteří jsou vystavení terénní expozici, ne při laboratorních podmínkách. Některé z biomarkerů jsou

již zavedeny v monitorovacích programech, aby identifikovali dopad látek a směsí látek, které doposud nebyli prohlášeny jako nebezpečně a ke studiu trendů a včasné indikace o snížené environmentální kvalitě. Biomarkery jsou děleny do několika kategorií. Prvním přístupem je dělení na specifické a obecné biomarkery:

- Obecné – odpověď na několik skupin látek, často i na jiné stresory
- Specifické – odpověď na specifickou skupinu látek (příloha 2)

| Biomarker | Popis | Odpověď na typy látek |
|--|--|--|
| EROD | Biotransformační enzym indukovaný planárními uhlovodíky | PCBs, PAHs a látky dioxinového typu |
| AChE Acetylcholinesteráza | Enzym, který se účastní přenosu nervového vzruchu | Organofosfáty, karbamáty a podobné molekuly |
| VTG Vitellogenin | Prekurzor vaječného žloutku, normálně syntetizován u samic ryb | Estrogenní endokrinně disruptivní látky |
| MT Metallothionein | Vazba kovů zapojená v ochraně proti oxidativnímu stresu | Těžké kovy a induktory oxidativního stresu |
| DNA dukty | Změny DNA struktury, které mohou narušit funkci DNA | Genotoxické látky typů PAHs a jiné organické polutanty |
| Imposex | Změna mužský pohlavních znaků na ženské | TBT |
| Mikrojadérka | Poškození genetického materiálu organismu | Látky způsobující permanentní a dědičné DNA zlomy |

Tabulka 3 Příklady některých biomarkerů používaných při monitoringu a hodnocení kvality vod.

Druhý přístup je rozděluje na biomarkery expozice a efektu:

- Expozice – měří změny na molekulární a buněčné úrovni, zahrnující indukci či inhibici specifických enzymů
- Efektu – měří odpovědi, které jsou relevantní ke zdraví organismu a možnosti přežití a reprodukce, naznačující riziko na vyšší úrovni organizace

Při studiu efektů určitých typů látek je nutná kombinace několika odlišných typů biomarkerů, což může poskytnout velmi důležité informace, viz příloha 2. Broeg et al (2005) uvádí, že multi-biomarkerový přístup, založený na několika různých typech biomarkerů je

užitečným předpokladem pro hodnocení dopadů environmentální kontaminace na různých úrovních organizace.

Obecně lze říct, že biomarkery by měli být spolehlivým, relativně levným, snadno proveditelným, metodologicky standardizovaným hodnotícím kritériem. Navíc, použití neinvazivních a nedestruktivních metod by mohlo usnadnit určité typy aplikací. Využití biomarkerů se teda zdá jako vhodný a efektivní přístup pro monitoring a hodnocení kvality, který je již dobře vědecky popsán a současně již zahrnut při hodnocení kvality.

2.3. Ekologické indikátory chemického znečištění

V souvislosti s WFD jsou populace a celá společenstva vhodným biologickým stupněm organizace, na kterém by měli být efekty látek přítomných v prostředí hodnoceny. Tudíž jsou vyžadovány metody, které jsou využitelné pro přímý monitoring efektů stresu na úrovni celých společenstev a tudíž vhodné pro hodnocení ekologického stavu. Několik takových technik bude popsáno v následujícím textu.

Moderní metody pro hodnocení ekologického stavu se vztahují na strukturu (tedy druhové složení a hojnost) a funkčnost (tedy druhové znaky) společenstev. Tyto techniky využívají multimetrických indexů založených na bio-ekologických znacích.

2.3.1 SPEAR index

Jde o bioindikační systém, založený na biologických znacích, který je vysoce citlivý k určitým skupinám polutantů a relativně nezávislý na vedlejších faktorech (Beketov and Liess, 2008 and Liess et al., 2008). Index měří poměr mezi citlivými a méně citlivými druhy.

$$\text{SPEAR index} = (\text{citlivé/necitlivé}) * 100$$

Z indexu vyplývá, že čím vyšší je jeho hodnota, tím méně je oblast ovlivněna sledovaným stresem. V současnosti zahrnuje index dva typy indikátorů podle typů sledovaných kontaminantů, a to pesticidy a organické polutanty. Tento index byl již aplikován pro výzkumné účely nebo při hodnocení rizik, zatím však ne pro běžný monitoring. V EU však nachází široké uplatnění a lze předpokládat, že bude zahrnut i do monitoringu.

2.3.2 Tolerance společenstva indukovaná znečištěním (PICT)

Tato citlivá metoda sleduje změny ve funkčnosti komunity (tudíž současně indikuje i změny strukturní), které mohou být připisovány toxickým látkám. Není to index, ale spíše metoda pro vysvětlení, proč musí komunita změnit složení, když je vystavena určitému stresu. Přístup spoléhá na to, že citlivé složky společenstva budou přesunuty více tolerantnějšími zástupci, a tak povedou ke zvýšení citlivosti celého společenstva. Měří

funkční test, který detekuje následky selekčního tlaku. Například pomocí krátkého testu toxicity založeného na ekofyziologickém endpointu. Tento přístup je shrnut také v práci Blanck & Wängberg (1988), autorů kteří stojí za vznikem této metody.

PICT byl již dříve využíván k hodnocení vývoje tolerance některých modelových organismů, například bakterií. Byl také využit při hodnocení rizik jednotlivých kontaminantů na úrovni společenstva. PICT je stále vyvíjen a v kombinaci s novými metodami, by mohl být užitečný v kontextu WFD.

3. Rámcové směrnice pro vody – WFD & MSFD

V současné době se evropská vodní politika řídí dle rámcových směrnic. Rámcové směrnice jsou dvě, přičemž rámcová směrnice vod (WFD) je regulační orgán pro vody vnitrozemské (platnost od roku 2000) a rámcová strategická směrnice pro moře (MSFD) je regulační orgán pro vody mořské (platnost od roku 2008). Obecně rámcové směrnice vod představují operační nástroj a nastavení cílů pro ochranu vod s výhledem do budoucna. Směrnice vyžadují sjednocený přístup k monitoringu a hodnocení kvality vod. Při hodnocení ekologického stavu se zohledňují efekty na úrovni populace či celých společenstev, kdy základem je využití specifických indikátorů a ekologických poměrů kvality. Hodnocení chemického stavu vody je založeno na souladu s právně závaznými standardy kvality životního prostředí pro vybrané chemické polutanty v rámci celé EU.

4. Závěr

Neustálé zlepšování metod pro monitoring a hodnocení kvality vod je velmi důležité z hlediska ochrany životního prostředí. Přesné informace o ekologickém i chemickém stavu vod vedou k výraznému zlepšování kvality vod a díky metodám včasné detekce hrozícího nebezpečí, lze předcházet rozsáhlejšími problémům způsobených kvalitou vody. V EU je monitoring a hodnocení kvality řízen pomocí WFD a spolupracujících organizací, například OECD.

Hlavními zdroji pro tuto seminární práci byly Wernersson et al (2014) a Chapman et al (1996), které jsou spolu s ostatními zdroji uvedeny v seznamu literatury.

Seznam literary:

Beketov, M. A., & Liess, M. (2008). An indicator for effects of organic toxicants on lotic invertebrate communities: independence of confounding environmental factors over an extensive river continuum. *Environmental Pollution*, 156(3), 980-987.

Blanck, H., & Wängberg, S. Å. (1988). Induced community tolerance in marine periphyton established under arsenate stress. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45(10), 1816-1819.

Broeg, K., Westernhagen, H. V., Zander, S., Körting, W., & Köhler, A. (2005). The “bioeffect assessment index”(BAI): A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 50(5), 495-503.

Chapman, D. V. (Ed.). (1996). Water quality assessments: a guide to the use of biota, sediments and water in environmental monitoring.

Liess, M., Schäfer, R. B., & Schriever, C. A. (2008). The footprint of pesticide stress in communities—species traits reveal community effects of toxicants. *Science of the total environment*, 406(3), 484-490.

Piva, F., Ciaprini, F., Onorati, F., Benedetti, M., Fattorini, D., Ausili, A., & Regoli, F. (2011). Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: a practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere*, 83(4), 475-485.

Wernersson, A. S., Maggi, C., & Carere, M. (2014). Technical report on aquatic effect-based monitoring tools. *European Commission*.

| |
|--|
| Case Study 1 |
| Title Laxsjön – investigating sediment contamination, using chemical and <i>in vitro</i> bioassay approach |
| Bibliography and link to objectives/national use |
| Illustrating the following use described in this report: Primarily prioritisation of areas for further studies (to support conclusions made in the analysis of pressures and impacts). Also supportive in the selection of future parameters to monitor as well as identification of control measures |
| Reporting Institution : County Administrative Board Västra Götaland, Sweden |
| Web-Link http://www.lansstyrelsen.se/vastragotaland/Sv/publikationer/2012/Pages/2012-47.aspx |
| Main sources for further information; literature: Gunnarsson F, Wernersson A-S. 2012. Sediment i Laxsjön. Halter av miljöfarliga ämnen. Länsstyrelsen i Västra Götaland. Report 2012:47 (In Swedish) |
| Background, purpose, , approach, results and conclusions |
| Background The lake Laxsjön was suspected to be exposed to emissions from primarily point sources, including both on-going and historic activities (such as a sewage treatment plant, paper mill, previous saw mill and area for timber treatment) but also diffuse emissions from an urbanised area and a channel that is frequently used by pleasure craft boats. The lake is of interest to sport fishing and other recreational activities. Some fish samples had previously been taken but exclusively analysed metals and dioxins and was performed on fish caught in the lower (presumably less exposed) part of the lake, not showing elevated concentrations. Also some previous sediment investigations close to the historic saw mill activities (LX4 below) had been performed. The results indicated that the PAHs analysed were present both at exposed and reference locations at more or less equal levels, suggesting that there is either an impact from local sources on the whole lake, or the results reflect the PAH situation in a larger geographical perspective ¹ . |
| Purpose The Laxsjön water body was identified to be at risk of not achieving good status in the analysis of pressures and impacts assessment, involving a potentially large number of substances. The main purpose was therefore to make an initial investigation of whether hazardous substances were elevated in the upper sediments, to confirm or reject the conclusions made in the analysis of pressures and impacts assessment. If confirmed, the investigation should also provide information about what parts of the lake were most impacted and from what type of substances. Such information would also act as decision support to identify potential needs for remediation and/or other control measures. |
| Why effect based tools were included (why not an entirely chemical approach?) To cover a large number of substances within a limited budget, the chemical analyses were primarily focused on relevant priority substances that can be suspected to be found in sediment. This approach was combined with a battery of <i>in vitro</i> bioassays, to also cover substances that could be considered to be specific pollutants in this water body, but perhaps not individually identified and for which assessment criteria are not yet established. Furthermore, to investigate whether dioxins and dioxin-like compounds could be screened using <i>in vitro</i> bioassays instead of chemical analyses, both were performed in parallel on the same samples. Such an approach could save costs in future investigations of this area. |

¹However, only few limnic sediment data on PAHs to be used for comparison are available from this geographical region, and it was therefore not clear whether the PAHs found were elevated compared to the ambient background situation.

Approach

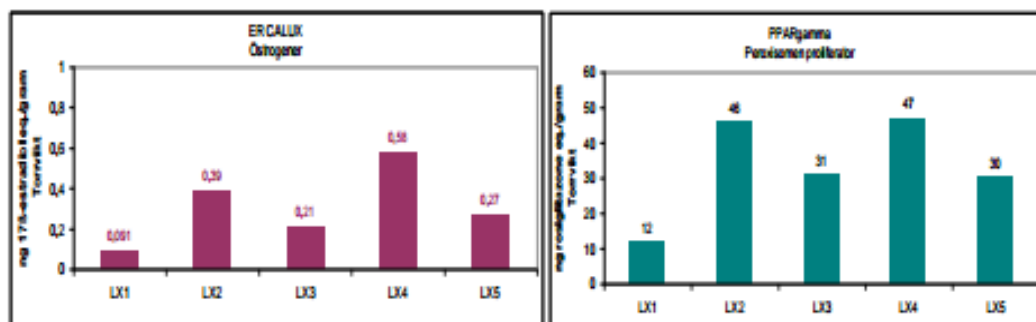
The substances primarily suspected to be present at elevated concentrations are known to accumulate in sediments and/or biota. Some are probably found in sediment or lower trophic level biota rather than fish (or water), because of their hydrophobicity and high metabolism potential in fish. Because of limited experience in biota monitoring of other species than fish in limnic environments, and due to the potential impact from historic² activities (sediments could act as sources), these initial studies were performed on surface sediments. Samples from five locations in the lake were taken. The chemical analyses included DEHP and other phthalates, 16 PAH, octylphenols, organic tin compounds, metals, PCDD/Fs and dioxin-like PCBs and a battery of *in vitro* assays based on different types of receptor binding (DR-, PAH-, ER α -, anti-AR- and PPAR γ -CALUX). In this way, dioxin-like, benzo(a)pyrene-like, estrogenic, anti-androgenic and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma binding compounds³ present in the surface sediment were covered.

Results and conclusions

Primarily two of the locations were found to be contaminated, based on both chemical and *in vitro* analyses. ER CALUX primarily responded at one of the locations (LX4) (first graph below), which is not surprising due to the proximity to a sewage treatment plant. Nonylphenol and octylphenol were analysed chemically but not detected, although unfortunately the detection limits were not sufficiently low to allow any conclusions about status to be made. PPAR γ -CALUX results suggest that primarily LX2 and LX4 are the most impacted locations (second graph below).

Some of the priority substances found in elevated levels, such as the very high concentrations of DEHP in LX2, could be responsible for the peak observed in the *in vitro* bioassay to detect anti-androgenic compounds (third graph below). However, it is also likely that the signals observed *in vitro* are due to several other compounds that were not included or detected in the chemical analysis.

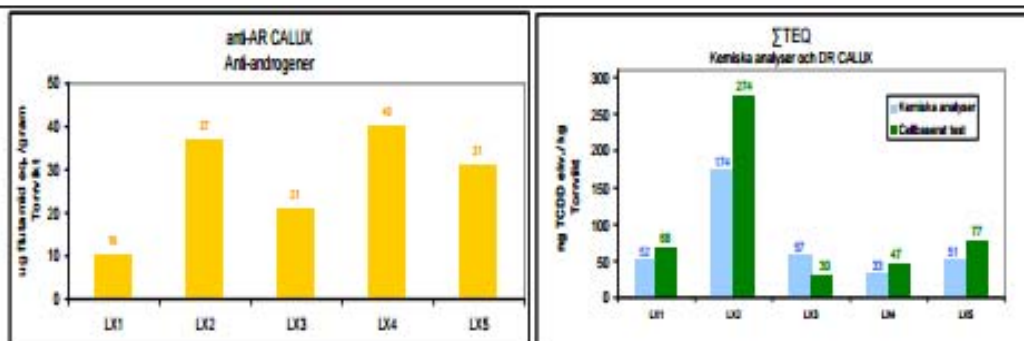
The DR CALUX assay more or less confirmed results from chemical analyses, suggesting that the major dioxin-like contamination was to be found at LX2. This suggests a potential to reduce the costs in future follow-up studies of dioxin and dioxin like PCB load in the lake (fourth graph below⁴). A proposed Swedish assessment criteria for dioxins and dioxin-like PCBs in sediment based on WHO-TEQ is 0.9 ng TEQfish/kg (Naturvårdsverket 2008). This value is clearly exceeded at all sites, but sediment exceedences to some extent are anticipated to occur at many locations, suggesting dioxins and dioxin-like compounds to be considered ubiquitous in sediment. To check status biota data should rather be used. However, the exceedance at LX2 is more than 300 times if based on *in vitro* results (and almost 200 times based on chemical analysis), suggesting that the sediment quality is not good.



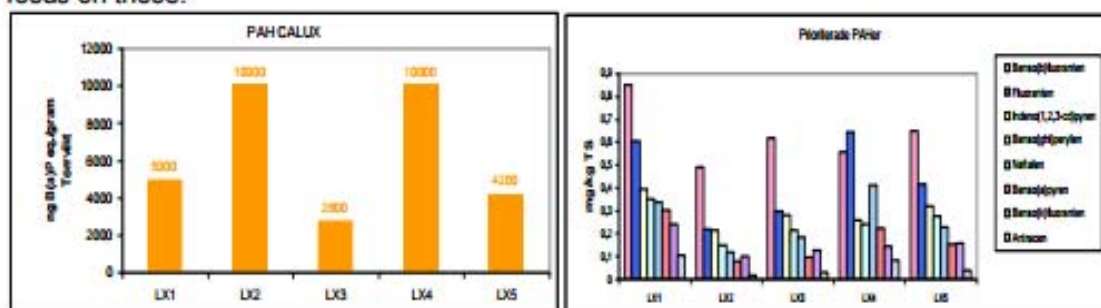
²It was e.g. known that phthalates had previously been used in large amounts in the paper mill processes

³ Binding to the gamma receptor (found in adipose tissue) involved in peroxisome proliferation is analysed, thus responding to compounds that influence glucose and lipid metabolism. Examples of compounds that activate PPAR γ are TBT, phthalates and perfluorinated compounds

⁴Light blue bars are based on chemical analysis, whereas green bars are based on *in vitro* assay. The *in vitro* assays possibly even further indicate that LX2 is the most contaminated site from this type of compounds.



Interestingly, the PAH CALUX assay primarily responded to the two most exposed locations (LX2 and LX4). The chemical analysis of individual priority PAHs on the other hand would rather confirm previous conclusions (see graphs below), suggesting that PAHs in general has an impact on the whole lake at about equal levels. If analysing each individual PAH though, there is some variability between sites⁵, although at least LX2 is not suggested to be of particular concern by any individual compound. Taking *in vitro* data into account, it could instead be concluded that both LX2 and LX4 are the main areas of concern and that future studies should focus on those.



The responses observed in the *in vitro* assays were, except for DR CALUX, not interpreted in absolute terms but rather on a relative scale between the different sites of the same lake, to identify the most contaminated locations. If additional data becomes available on *in vitro* results from sediment testing using this battery, the opportunities to also compare the results with the situation in other areas would increase. Nevertheless, if comparing PAH CALUX results (expressed as BaP equivalents) with the QSbent for BaP, the results indicate a clear exceedence at LX2 and LX4, a slight exceedence at LX1 and LX5 and below at LX3. The PAH CALUX results (using BaP equivalents compared to BaP criteria) indicate that the cumulative response to PAHs other than BaP is an issue that would have been overlooked with a purely chemical approach. ER, PPAR and anti-AR CALUX are hard to evaluate at the moment because even if the results are expressed on a chemical equivalent basis, /sediment/ assessment criteria for these reference compounds are not available.

To conclude, *in vitro* assays were found to be useful as a complement to the chemical analyses, to make conclusions about which parts of the lake are the most contaminated and what type of compounds (and therefore sources), other than those analysed chemically, that are probably of major concern. It was also concluded that the DR CALUX assay is an acceptable, cost effective alternative (about 1/5th of the price compared to the chemical approach) to track sources of dioxins and dioxin-like stable compounds in follow up studies of the same area. The PAH CALUX data indicate that PAHs other than those that are regularly monitored are of concern.

For further information about the conclusions related to chemical analyses, please refer to the full

⁵If compared to effect based QSbent for fluoranthene, concentrations are elevated at all locations, but more so at LX1 and LX4 than at the other locations. If compared to marine sediment data, the PAH concentrations were to be considered moderate to very high, depending on the substance. Benzo(a)pyrene was primarily found at LX1, and at higher concentration than was so far reported to a national screening database, but still below a calculated QSbent using local TOC concentrations. Taken together, the chemical analysis of PAHs suggest that primarily fluoranthene is of a concern, but at all locations and primarily at LX1 and LX4 but not particularly at LX2.

report.

Costs involved: Approximately half of the budget of this project was related to the sampling of sediments, including one day spent on finding the most suitable locations by using side scan sonar mapping. Total costs for the *in vitro* battery analysed on the five samples were about 2500 Euro; total costs of project about 25 000 Euro.

Outlook - Next steps

Further studies are on-going.

PŘÍLOHA 2

| |
|--|
| Case study 2 |
| Title Deployment of a multi-biomarker approach to identify the origin of wild fish abnormalities reported in a French stream receiving urban and industrial effluents. |
| Bibliography and link to objectives/national use Illustrating the following use described in this report: Primarily illustrating the use of a multibiomarker approach to provide robust data, useful for environmental managers to understand mechanisms of environmental degradation in a crisis context. Also illustrates how to identify suitable measures, and should be a trigger for studies of population level effects |
| Reporting Institution : National Institute for Industrial Environment and Risks (INERIS), France |
| Web-Link http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722962 |
| Main sources for further information; literature: Sanchez, W. (2010). Rivière Dore: resultants de l'étude suite aux prélèvements réalisés en 2009 et 2010. DRC-10-109441-13986A, 37p. Sanchez, W., W. Sremski, B. Piccini, O. Palluel, E. Maillot-Maréchal, S. Betoulle, A. Jaffal, S. I. Ait-Aïssa, F. Brion, E. Thybaud, N. Hinfray and J.-M. Porcher (2011). Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. <u>Environment International</u> 37(8): 1342-1348. |
| Background, purpose, , approach, results and conclusions |
| Background In 2008, anglers reported the presence of gudgeons (<i>Gobio gobio</i>) exhibiting abdominal swelling associated to gonad hypertrophy in a river receiving effluents from waste water treatment plants and from a pharmaceutical industry involved in steroid production. According to the precautionary principle, local authorities have forbidden consumption of wild fish from this river. |
| Purpose An investigative study was initiated to identify the origin of the observed fish abnormalities. |
| Why effect based tools were included (why not an entirely chemical approach?) The study was initiated by visible effects in wild fish inhabiting a good status water body. First investigations based on chemical analysis did not reveal presence of chemical contaminants. Due to the adverse effects (abdominal swelling and gonadal hypertrophy) the investigations included effect based tools (biomarker battery) with focus on endocrine disruption parameters. |
| Approach A set of biomarkers including vitellogenin (VTG) as endocrine disruption end-point, biotransformation enzymes (7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), cytochrome P450 3A (CYP3A) and glutathione-S-transferase (GST) activities, together with acetylcholinesterase (AChE) and lysozyme activities respectively as neurotoxicity and immunotoxicity biomarkers was measured. To complete, histological analysis of gonads were performed for sex verification, identifying stage of development, documenting presence of intersex and other pathologies. Fish assemblage was also characterized to identify potential disturbance of fish populations complementarily to assessment of individual effects. |

In this work, adult gudgeons out of reproductive period were electrofished on 3 sites located upstream and downstream from industrial effluent.

Conclusions:

Responses of biotransformation enzymes, neurotoxicity and endocrine disruption biomarkers revealed contamination of the investigated stream by a mixture of pollutants. Fish from sampled sites downstream the industrial discharge exhibited also strong signs of endocrine disruption, including vitellogenin induction, intersex and a male-biased sex-ratio. The observed response profile appears as more complex with antagonist signals such as VTG induction and male-biased sex ratio.

No cause-effect relationship can be firmly established between fish exposure to Active Pharmaceutical Ingredients (APIs) and individual and population disturbances. However, pharmaceuticals discharged in the investigated stream could be involved in adverse effects observed on fish and their assemblage, and a set of evidence supports the hypothesis that these compounds induced the observed adverse effects and indicated that resident fish populations from both downstream sites could disappear.

Costs involved :

65 000 EUR including travel fees, consumables and permanent personal fees for 4 sites investigated 2-fold

Outlook - Next steps

The study was completed by an EDA approach to identify i) chemicals involved in water contamination and supporting observed adverse effects and ii) pollution source. A set of APIs discharged by a pharmaceutical manufacturer was identified. Local authorities requested specific measures to reduce environmental impact and establishment of an effect-based monitoring programme (the first in France). Now, a complementary study is performed to assess resilience of the water body.

PŘÍLOHA 3

| |
|---|
| Case study 7 |
| Title Monitoring concentrated surface water with in vivo bioassays in the Netherlands |
| Bibliography and link to objectives/national use |
| Illustrating the following use described in this report: Use on national level, status and trend monitoring programme |
| Reporting Institution : National Institute for Public Health and the Environment and Centre of Water, Traffic and Human Environment (previously Centre of Water management) (Both the Netherlands) |
| Web-Link http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=rivmp:16209&type=org&disposition=inline |
| Main sources for further information; literature: Durand A M, Rotteveel S, Collombon M T, Van der Grinten E, Maas J L, Verweij W, 2009. Toxicity measurements in concentrated water samples; evaluation and validation. RIVM report 607013010/2009; Centre of Water Management report 2009.003 (in English) Struijs, J., van der Grinten E., Aldenberg T., 2010. Toxic pressure in the Dutch delta measured with bioassays. Trends over the years 2000-2009. RIVM report 607013013/2010 (in English) |
| Background, purpose, , approach, results and conclusions |
| Background Since the early 1990s, water quality in the Netherlands has been regularly assessed by chemical and biological effects monitoring (RWS, 1999; Maas and Van den Heuvel-Greve, 2005). As a consequence of the improvement in water quality, toxicity tests like the Microtox® assay barely show any acute effects at the present level of contamination. However, also the risk of chronic effects need to be taken into account. Monitoring of environmental toxicity using chronic bioassays is very laborious though, and therefore expensive. |
| Purpose The National Institute for Public Health and the Environment, together with the Centre of Water Management ⁸ , developed a method for measuring toxic pressure (risk of effects) in a cost-effective way. |
| Why effect based tools were included (why not an entirely chemical approach?) Primarily to cover large number of substances that are not included in the chemical analysis, but can contribute to the toxic pressure. The results were used both to identify locations with elevated risks of long term effects but also to monitor trends in toxic pressure. |
| Approach The biological effects method consists of a concentration procedure, toxicity testing and (statistical) interpretation of results. First, the organic toxicants in the water sample are adsorbed to a synthetic resin, eluted with an organic solvent and concentrated into a water extract. Then, the toxicity of the extract is measured using a set of standardized acute tests. The results are interpreted in a single species approach or in a risk-based manner. <i>Preconcentration step</i> Physical-chemical techniques are used to isolate and concentrate many of the organic toxicants from the water sample. This concentration step is necessary, so that acute toxicity tests can be used to identify samples with elevated toxic pressure. The concentration step also separates toxicological stress |

⁸ formerly called Institute for Inland Water Management and Waste Water Treatment

from other stress factors like minerals and nutrients.

The method aims at comprehensive adsorption to adsorbents with a high affinity for the biologically available fraction of toxic substances. A combination of synthetic resins (called XAD-4 and XAD-8) are therefore used as the adsorbent. Nevertheless, only the organic fraction of the contaminants is tested in this way, since metals do not adsorb to the XAD.

After adsorption, the substances are removed from the XAD using acetone, found to be the most suitable organic solvent. Before using the eluates for toxicity tests the acetone is removed and the substances are transferred to a water extract. The recovery of substances has been found to be about 80 % for narcotic substances like 3-chloro-nitrobenzene but is very low for e.g. organotin substances.

Bioassays

Because of the concentration step, the amount of material available is small in relation to the original sample. One factor in the choice of bioassay is therefore that it must be possible to measure the toxicity in very small volumes. The set of organisms was also tuned to obtain optimal ecological relevance, by including primary producers (algae), primary consumers (crustaceans) and decomposing organisms (bacteria). The tests are well described in protocols and mostly derived from international ISO-standard tests and endpoints include mortality, growth inhibition and photosynthetic activity. The toxicity tests vary in duration from a few hours to several days.

Data interpretation

The bioassay results are compared to developed criteria, either in a single species approach (criteria based on risk of long term effects) or in a risk-based manner (based on a species sensitivity distribution concept). Reproducibility of the tests is good and within acceptable limits, both in intra- and in inter-laboratory experiments. The reproducibility of the entire method is good and comparable to the reproducibility of the individual tests. Validating the entire method in the same way as is done for chemical methods is complex however. Other technical specifications, such as LOD, LOQ, linearity and precision are difficult to establish because the chemical composition of surface water is not known (can only be established for a single substance or a mixture of known substances). For that reason, no detection limit, linearity and 'bias' are specified. There was, however, a pragmatic solution chosen for LOQ-determination.

Results and conclusions

The concentration procedure (sample pretreatment) was evaluated thoroughly. The method appears to be suitable for many substances, although there are differences in recovery. More specifically:

- The method is especially suitable for hydrophobic substances with a narcotic mechanism of action. Recovery was typically between 88 and 100%.
- The effects of herbicides and organochloro-pesticides (insecticides) can be well demonstrated. Recovery is usually somewhat lower (60 to 75 %).
- Hydrophilic substances (like medicines) do not adsorb very well onto the applied resins (XAD 4/8). Perhaps other types of resins would lead to better results.
- Volatile substances will disappear largely during the concentration procedure.
- Metals are not extracted from the water phase.
- The extraction procedure can be applied well to surface water. Natural organic matter does not appear to influence extraction efficiency of toxic substances.
- The procedure is well described in protocols. Disturbing factors are well known and included in the protocols.
- Reproducibility of the method is good and within acceptable limits.

For more details, please refer to the specified report.

During the years 2000-2009, the effects of toxic substances in Dutch inland waters were measured. The results offer an excellent opportunity to evaluate the trend in toxic pressure in Dutch freshwater water bodies, without analysing all the individual substances involved. Trends became apparent when the results of five bioassays in several water bodies collected over ten years were combined (Van der Grinten et al. in prep).

Costs involved:

Although not all substances and types of effects (mode of actions) are covered in this way, the approach has been found to offer a cost effective alternative to an approach based on chemical analysis only, if trying to cover an almost unlimited list of substances that could potentially be present in the studied waters.

Outlook - Next steps

The approach has been suggested to be used for different purposes, such as identification of locations where toxic substances may have a negative impact and for that reason it was also proposed as an additional method within WFD-monitoring (Maas, 2005).

PŘÍLOHA 4