

Miljørisikovurdering af antibiotika

Formålet med denne artikel er at skabe debat om de miljømæssige konsekvenser vedrørende brugen og dermed udledningen af lægemiddelstoffer i miljøet - primært antibiotika i produktionen af fisk i danske dambrug. Desuden udføres en miljørisikovurdering, der belyser mulige risici ved brug af antibiotika til fiskeopdræt i dambrug

Af Hans-Christian Holten Lützhøft, Afdeling for Miljøkemi, Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi, DFH, hchl@dfh.dk

Miljørisikovurdering af lægemiddelstoffer er først kommet i søgelyset i slutningen af 1990'erne. Den 1. januar 1998 blev en EU-guideline implementeret [1], hvilket betyder, at alle nye veterinære lægemiddelstoffer skal underkastes en miljørisikovurdering, inden de sendes på markedet. Veterinære lægemiddelstoffer udgøres primært af antibiotika, der anvendes i landbrug og dambrug til bekæmpelse af bakterielle infektioner. Et udkast til en tilsvarende guideline for humant anvendte lægemiddelstoffer er under udarbejdning, og dens endelige implementering ventes snarest [2].

Motivationen, for at lægemiddelstoffer underkastes en miljørisikovurdering, ligger ikke alene i, at det er et myndighedskrav for nye veterinære lægemiddelstoffer. Verden over har forskellige forskningsgrupper fundet rester af både semi-syntetiske og syntetiske antibiotika i sediment fra omgivelserne omkring dambrug og havbrug [3-8]. Der er risiko for, at forbruget af antibiotika i produktionen af fisk resulterer i forekomsten af antibiotika i miljøet samt en eventuel påvirkning af det lokale økosystem.

Antibiotikaforbruget i Danmark

I modsætning til forbruget af humant anvendte lægemiddelstoffer eksisterer der endnu ikke et nationalt indberetningssystem, hvor oplysninger om det veterinære forbrug kan indhentes. Tabel 1 viser minimumforbruget af antibiotika i danske dambrug i perioden 1994-1997.

Gennem de seneste år har det totale antibiotikaforbrug, humant såvel som veterinært (forebyggende og terapeutisk), i Danmark været ca. 200 tons [11]. De 2-3 tons, der anvendes i dambrug, udgør en lille mængde. Det skal dog tages i betragtning, at mængden anvendes på et relativt begrænset område, samt at det er biologisk aktive kemikalier, der udledes direkte til miljøet.

Miljørisikovurdering

Miljørisikovurdering er et redskab, der anvendes til at vurdere et givent kemikalies potentielle effekt på et givent økosystem [12]. Der opereres med begrebet risikokvotient (Risk Quotient:

RQ), der defineres af en estimeret miljøkoncentration (Predicted Environmental Concentration: PEC), og en koncentration der anses for ikke at have effekt på det givne miljø (Predicted No Effect Concentration: PNEC) som angivet i (1).

$$RQ = PEC/PNEC \quad (1)$$

Resultatet af (1) evalueres for værdien 1, idet 1 angiver, at miljøkoncentrationen er den samme som den koncentration, der ikke anses for at have effekt. Således vil en $RQ > 1$ indikere en mulig risiko for det givne økosystem. Det kan ikke angives, i hvor høj grad effekten vil ses, men jo højere RQ er, des større er risikoen. Endvidere vil $RQ > 1$ give anledning til flere undersøgelser. En $RQ < 1$ indikerer tilsvarende at der, under de evaluerede omstændigheder, ikke anses at være nogen effekt på det pågældende økosystem.

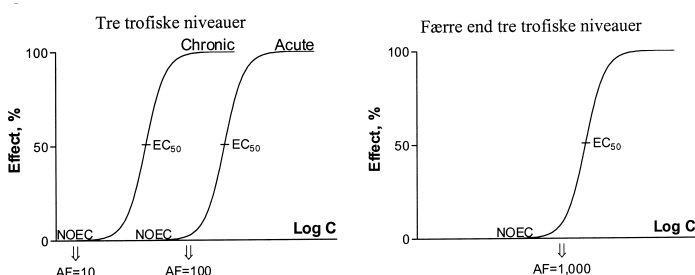
Jævnfør EU-guidelinen [1] kan PEC beregnes som det totale forbrug af antibiotika divideret med det tilhørende vandforbrug. Beregningen kan tilsvarende udføres for et enkelt dambrug.

PNEC bestemmes ud fra testresultater fra økotoxikologiske tests [1,13,14]. Ideelt set testes alle organismer, men eftersom det er en umulig opgave, forsøges det akvatiske økosystem efterlignet ved test på tre trofiske niveauer: alger, krebsdyr og fisk. Eksempelvis testes et stofs væksthæmmende effekt over for alger, på krebsdyrs reproduktionsevne og fisks overlevelse eller død. Til beregningen af PNEC, se (2), anvendes den mest følsomme organismes testresultat divideret med en sikkerhedsfaktor (Assessment Factor: AF). Undertiden eksisterer data på alle tre niveauer ikke, hvorfor værdien af AF må ændres tilsvarende.

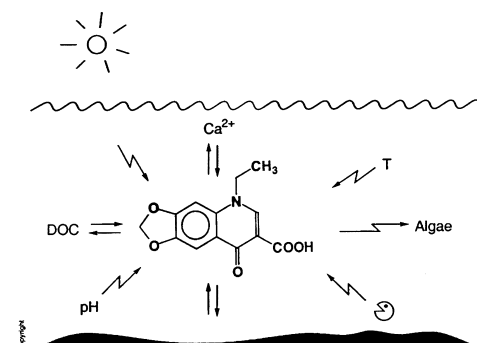
$$PNEC = EC/AF \quad (2)$$

EC angiver en af nedenstående effektkoncentrationer, og AF har bl.a. til formål at ekstrapolere fra laboratoriet til miljøet.

Afhængig af om der eksisterer test på alle tre trofiske niveauer, om testresultatet repræsenterer den koncentration, hvor der ikke blev observeret effekt (No Observed Effect Concentration: NOEC) eller koncentrationen der på et vist



Figur 1. Skematisk fremstilling af udvælgelsen af sikkerhedsfaktorer.



Figur 2. Proces for et kemikalies udsættelse for ved udledning til miljøet.

OXA er vist som eksempel. "Sol": fotolyse, Ca^{2+} : kompleksering med ioner, T: temperatur, $\circ$: bionedbrydning, og DOC: opløst organisk kulstof (dissolved organic carbon).

Tabel 1 – Antibiotikaforbruget i danske dambrug i 1994-1997, kg.

OXA ^a	SDZ ^a	TMP ^a	AMX ^b	OTC ^b	Andre ^b
700	1.000	200	6	94	132
906	1.241	248	78	67	242
511	845	169	141	27	177
587	1.677	335	132	16	181

^a: (9), ^b: Data fra 3 amter (10), Andre: dimetridazole, florfenicol, metronidazole, sulfamerazine med flere.

niveau gav effekt, sædvanligvis 50%-niveau (Effect Concentration to 50% of the population: EC₅₀), samt om testen var af akut eller kronisk karakter anvendes AF⁷ere af forskellig størrelsesorden. I henhold til EU-guidelinen anvendes følgende system: AF=10 hvis alle tre niveauer er testede med kroniske tests, der frembragte NOEC-værdier, AF=1.000 hvis der er testet færre end 3 trofiske niveauer og ellers anvendes en AF på 100, se figur 1, side 13.

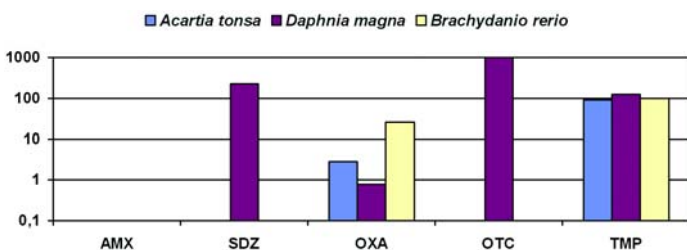
Ud over at vurdere stoffernes udledning til miljøet og deres økotoksikologiske effekter, skal stoffernes fysisk/kemiske egenskaber så vidt muligt tages i betragtning. Der skal frembringes viden om stoffernes bionedbrydelighedspotentiale og om stoffernes kemiske stabilitet i form af eksempelvis fotolyse og hydrolyse. Endvidere skal forsøg, der viser om stofferne kan forventes at fordele sig til sediment, udføres.

Antibiotikaanvendelsen i danske dambrug

Det er interessant at undersøge, hvorvidt antibiotika, der på nuværende tidspunkt anvendes i almen praksis i danske dambrug, ville blive godkendt, hvis de gennemgik en miljørisikovurdering i henhold til EU-guidelinen.

Tre produkter er kommercielt tilgængelige på det danske marked og forhandles i form af medicinerede foderpellets. Disse foderpellets indeholder henholdsvis oxolinsyre (OXA), kombinationspræparatet sulfadiazin/trimethoprim (SDZ/TMP) eller florfenicol. Florfenicol vil ikke blive videre berørt i denne artikel. Derudover kan en dyrlæge udstede recept på amoxicillin (AMX) eller oxytetracyclin (OTC) på baggrund af en godkendelse fra Fødevaredirektoratet. AMX og OTC er ikke kommercielt tilgængelige i form af foderpellets og skal håndteres ude hos dambrugeren. Ved brug af disse to antibiotika, er dambruget udsat for en større eksponering. OXA og SDZ/TMP bruges kun til behandling af voksne fisk, hvorimod AMX og OTC primært bruges til behandling af yngel.

De nævnte antibiotikas kemiske strukturer og basale fysisk/kemiske egenskaber er vist i tabel 2. Som det fremgår af tabel 2, er der tale om vandopløselige kemikalier, hvis speciering er afhængig af miljøets pH-værdi. Netop stoffernes egenskaber giver anledning til nye udfordringer i forbindelse med den kemiske kvantificering, idet sædvanlige opkoncentreringsmetoder som fast-fase-ekstraktion på C₁₈-kolonner og gaschromatografiske analyser ikke altid er anvendelige.



Figur 3. Akutte effektkoncentrationer for de undersøgte antibiotika, LC₅₀ (NOEC), mg/L^a.

Forekomster i miljøet

Som tidligere nævnt, har forskellige forskningsgrupper rapporteret forekomster af antibiotika i miljøet, se tabel 3. Det drejer sig primært om stofferne OXA og OTC primært indsamlet i marint sediment ved Norges og Finlands kyster. Enkelte undersøgelser er foretaget i Danmark.

Skæbne i miljøet

Som kemikalier i almindelighed udsættes antibiotika for forskellige nedbrydningsprocesser, når de udledes til miljøet, se figur 2. I hvilken grad afhænger af stoffets fysisk/kemiske egenskaber. Derudover kan stoffet have indflydelse på flora og fauna, i figur 2, side 13 vist som alger (algae). Der kan opdeles i fordelings- og nedbrydningsprocesser. Fordelingsprocesserne fører til en midlertidig fjernelse af det pågældende stof og fungerer dermed som et slags depot i miljøet. Nedbrydningsprocesserne bidrager derimod til fjernelsen af stoffet, hvad enten det mineraliseres, som den yderste konsekvens af bionedbrydning, eller nedbrydes til mere eller mindre stabile nedbrydningsprodukter i forbindelse med eksempelvis hydrolyse og fotolyse. Nedbrydningsprodukterne vil undertiden beholde moderstoffets biologiske aktivitet. Af tabel 4 fremgår det, at de undersøgte antibiotika ophobes i sediment [5,29], hvilket indirekte fremgår af, at stofferne kan findes i sedimentprøver, jf. tabel 3. For SDZ og AMX er værdierne antaget på baggrund af samme fysisk/kemiske og strukturmæssige egenskaber som de andre antibiotika. Derudover ses, at stofferne generelt er stabile [30,31], hvilket primært gælder for OXA, SDZ og TMP, der repræsenterer tre forskellige stofgrupper. Derimod er OTC let fotonedbrydeligt, og der rapporteres forskellige halveringstider for bionedbrydeligheden; 4-429 dage [29,32].

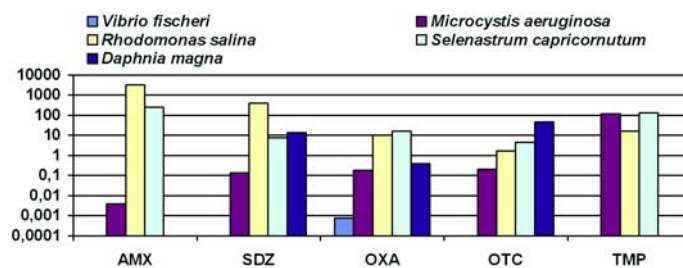
Effekter på miljøet

En gennemgang af litteraturen viser et sparsomt antal økotoksikologiske test udført med de nævnte antibiotika. Som det fremgår af figur 3 og figur 4, er kun OXA og TMP testet på de tre anbefalede trofiske niveauer.

De akutte effektkoncentrationer [33-37] ligger i området 1-100 mg/L, og de kroniske effektkoncentrationer [36,38,39] ligger i området 0,001-1.000 mg/L. Det fremgår, at de mest følsomme organismer er bakterier (*Vibrio fischeri*) og cyanobakterier (*Microcystis aeruginosa*) – hvilket ikke er overraskende, idet antibiotika er designet til at hæmme eller forhindre bakterievækst. Sidstnævnte organisme er i realiteten en alge, men har strukturel lighed med bakterier, hvilket kan forklare, at der observeres en forskel på 1-6 størrelsesordner mellem *M. aeruginosa* og algerne, *Rhodomonas salina* og *Selenastrum capricornutum*.

Miljørisikovurdering

PEC for antibiotika anvendt i dambrug kan jf. EU-guidelinen [1] beregnes af udløbskoncentrationen fra dambruget divideret med en passende fortyndingsfaktor. Udløbskoncentrationen kan beregnes som det enkelte antibiotikaforbrug divideret med det totale vandforbrug. I årene 1994-1997 var det totale årlige



Figur 4. Kroniske effektkoncentrationer for de undersøgte antibiotika, EC₅₀ (NOEC), mg/L^a.

vandforbrug ca. $4 \cdot 10^{12}$ L, og eftersom man ikke tilsigter at anvende mere end halvdelen af medianvandføringen anvendes en fortyndingsfaktor på 2, som den maksimale fortynding [40].

For at kunne beregne risikokvotienten, skal PEC, ifølge (1), sammenholdes med PNEC. Effektkoncentrationen aflæses af figur 3 og figur 4, mens sikkerhedsfaktoren aflæses af figur 1. RQ evalueres ved værdien 1. Ved værdier under 1 anses stoffet for ikke at have negative miljømæssige konsekvenser ved de givne forudsætninger, mens værdier over 1 medfører, at stoffet skal underkastes yderligere undersøgelser. I det netop gennemgåede eksempel skal både SDZ, AMX og OXA derfor yderligere undersøges, mens OTC og specielt TMP ikke anses for at have negative miljømæssige konsekvenser.

OXA og SDZ/TMP anvendes kun til voksne fisk, mens AMX og OTC primært anvendes til yngel. Ser man bort fra eventuelle specielle farmakologiske krav, fremgår det, at man bør undgå at anvende OXA og AMX til behandling af voksne fisk og yngel. Derimod bør SDZ/TMP og OTC foretrækkes.

Scenariet er meget enkelt, og både eksponeringen for OXA og eksponering og effekter for AMX bør undersøges nærmere.

De ovenfor refererede økotoxikologiske tests er udviklet til at bestemme industrikemikaliers potentielle effekter i miljøet. Industrikemikalier har ofte en uspecifik/narkotisk virkning, hvorfor det er muligt, at nogle lægemiddelstoffers effekter overses pga. deres specifikke virkning.

Tabel 2 – Kemiske strukturer og udvalgte fysisk/kemiske værdier for de undersøgte antibiotika.

	OXA	SDZ	TMP	AMX	OTC
Struktur					
CAS #	14698-29-4	68-35-9	738-70-5	26787-78-0	79-57-2
M, g/mol	261,23	250,28	290,32	365,41	460,44
S, mg/L	4,1 ^a	74 ^b	400 ^c	4.000 ^c	241 ^d
pK _a	6,9 ^e	2,0 & 6,5 ^f	7,1 ^g	2,7; 7,2 & 9,6 ^h	3,3; 7,3 & 9,1 ⁱ
Log K _{OW}	0,7 ^j	-0,1 ^k	0,8 ^l	-1,2 ^m	-0,9 ⁿ

^a: (15), ^b: (16), ^c: (17), ^d: (18), ^e: (19), ^f: (20), ^g: (21), ^h: (22), ⁱ: (23), ^j: (24), ^k: (25), ^l: (26), ^m: (27), ⁿ: (28), S: Vandig opløselighed ved pH 7, Log K_{OW}: Octanol/vand-fordelingskoefficienten ved pH hvor stoffet er mest neutralt.

Tabel 3 – Miljøforekomster af antibiotika.

Antibiotika	Sted	Koncentration, µg/g	Dage efter behandling	Afstand fra fiskebrug
OXA ^a	Vilde fisk ^{NO}	4,4 1,8 0,09 0,01	4 7 13 0	Op til 400 m
OXA ^b	Marint sediment ^{FI}	0,2 0	0 6	I nærheden
OXA ^c	Ferskvandssediment ^{DK}	1,6	21	300 m
OTC ^d	Vilde fisk ^{FI}	0,2-1,3 0,06 spor	0 1 7	I nærheden
OTC ^d	Marint sediment ^{FI}	1-3,8 16 1-4,4	1 8 308	Omkring net
OTC ^e	Marint sediment ^{NO}	281 15	75 560	Under bur
OTC ^f	Marint sediment ^{IR}	9,9 2,3 1,6	3 32 66	Under bur

^a: (3), ^b: (4), ^c: (5), ^d: (6), ^e: (7), ^f: (8), ^{NO}: Norge, ^{FI}: Finland, ^{DK}: Danmark, ^{IR}: Irland

Referencer

1. EMEA. 1998, Note for guidance: Environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-containing and immunological products. EMEA/CVMP/005/96-FINAL.
2. EMEA. 2001, Draft CPMP discussion paper on environmental risk assessment of non-genetically modified organism (non-GMO) containing medicinal products for human use. CPMP/SWP/4447/00.
3. Samuelsen OB, Lunestad BT, Husevåg B, Hølleland T, Ervik A. *Dis Aquat Org* 1992, 12, 111-119.
4. Bjørklund H, Råbergh CMI, Bylund G. *Aquaculture* 1991, 97, 85-96.
5. Holten Lützhøft HC. Environmental risk assessment of antimicrobials. Ph.D. thesis. Section of Environmental Chemistry, Department of Analytical and Pharmaceutical Chemistry, The Royal Danish School of Pharmacy, Universitetsparken 2, DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark, 2000.
6. Bjørklund H, Bondestam J, Bylund G. *Aquaculture* 1990, 86, 359-367.
7. Samuelsen OB, Torsvik VL, Ervik A. *Sci Total Environ* 1992, 114, 25-36.
8. Coyne R, Hiney M, O'Connor B, Kerry J, Cazabon D, Smith P. *Aquaculture* 1994, 123, 31-42.
9. Viuf BT. Personlig kommunikation, 1999.
10. Danske amter. Personlig kommunikation, 1999.
11. Jørgensen SE, Halling-Sørensen B. *Chemosphere* 2000, 40, 691-699.
12. Leeuwen CJv, Hermens JLM. Risk Assessment of Chemicals: An Introduction. Kluwer Academic Publishers, 1995.
13. Leeuwen CJv. Ecotoxicological effects. I: Leeuwen CJv, Hermens JLM. Risk Assessment of Chemicals: An Introduction. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp 175-237, 1995.
14. OECD. Report of the OECD workshop on the extrapolation of laboratory aquatic toxicity data to the real environment, Arlington, 10th-12th December 1990. OECD monographs no. 59. *OECD/GD(92)169*, 1-43, OECD, Paris, France, 1992.
15. Elema MO. Medicated feed pellets in aquaculture. Ph.D. Thesis. The Royal Danish School of Pharmacy, Copenhagen, Denmark, 1995.
16. Stober H, DeWitte W. Sulfadiazine. I: Florey K. Analytical Profiles of Drug Substances. Academic Press, New York, pp 523-551, 1982.
17. Mercks Index, 12th edition, 1996.
18. Martindale – The complete drug reference, 32nd edition, 1999.
19. Timmers K, Sternglanz R. *Bioinorg Chem* 1978, 9, 145-155.
20. Koizumi T, Arita T, Kakemi K. *Chem Pharm Bull* 1964, 12, 413-420.
21. Seiler P, Bischoff O, Wagner R. *Drug Res* 1982, 32, 711-714.
22. Tsuji A, Nakashima E, Hamano S, Yamana T. *J Pharm Sci* 1978, 67, 1059-1066.
23. Stephens CR, Murai K, Brunning KJ, Woodward RB. *J Am Chem Soc* 1956, 78, 4155-4158.
24. Takács-Novák K, Józán M, Hermecz I, Szász G. *Int J Pharm* 1992, 79, 89-96.

Tabel 4 – Antibiotikas miljømæssige skæbne.

Antibiotika	Log D _{SED}	Halvveringstid, d	
		Fotolyse i havvand ved 1 m dybde	Bionedbrydelighed i marint sediment ved 0-1 cm dybde
OXA	2,7 ^a	∞ ^d	151 ^e
SDZ	2,7 ^b	∞ ^d	50 ^e
TMP	2,3 ^a	∞ ^d	75 ^e
OTC	2,7 ^c	3 ^d	4-419 ^{c,e,f}
AMX	2,8 ^b	-	-

^a: (5), ^b: antaget grundet samme strukturelementer og tilsvarende fysisk/kemiske værdier som de andre antibiotika, ^c: (29), ^d: (30), ^e: (31), ^f: (32), ∞: ingen nedbrydning observeret i undersøgelsens 56 dage, -: ingen data fundet

25. Morishita T, Yamazaki M, Yata N, Kamada A. *Chem Pharm Bull* 1973, 21, 2309-2322.
26. Dietrich SW, Blaney JM, Reynolds MA, Jow PYC, Hansch C. *J Med Chem* 1980, 23, 1205-1212.
27. Smyth RD, Pfeffer M, Harken DRv, Cohen A, Hottendorf GH. *Antimicrob Agents Chemother* 1981, 19, 1004-1012.
28. Schumacher GE, Linn EE. *J Pharm Sci* 1978, 67, 1717-1720.
29. Lai H-T, Liu S-M, Chien Y-H. *J Environ Sci Health, A* 1995, 30, 1897-1923.
30. Lunestad BT, Samuelsen OB, Fjelde S, Ervik A. *Aquaculture* 1995, 134, 217-225.
31. Hektoen H, Berge JA, Hormazabal V, Yndestad M. *Aquaculture* 1995, 133, 175-184.
32. Samuelsen OB. *Aquaculture* 1989, 83, 7-16.
33. Migliore L, Civitareale C, Brambilla G, Dojmi Di Delupis G. *Water Res* 1997, 31, 1801-1806.
34. Halling-Sørensen B, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE. *Chemosphere* 1998, 36, 357-393.
35. Andersen HR. Personlig kommunikation, 2000.
36. Wollenberger L, Halling-Sørensen B, Kusk KO. *Chemosphere* 2000, 40, 723-730.
37. Halling-Sørensen B, Holten Lützhøft HC, Andersen HR, Ingerslev F. *J Antimicrob Chemother* 2000, 46, 53-58.
38. Backhaus T, Scholze M, Grimme LH. *Aquat Toxicol* 2000, 49, 49-61.
39. Holten Lützhøft HC, Halling-Sørensen B, Jørgensen SE. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999, 36, 1-6.
40. Michelsen K. Personlig kommunikation, 1999.