

## Økotoxikologiske test med mediciner anvendt i fiskeopdræt

7-dages test med *Microcystis aeruginosa*  
og sulfadiazin

## Økotoksikologiske test med mediciner anvendt i fiskeopdræt

7-dages test med *Microcystis aeruginosa* og sulfadiazin

Agern Allé 5  
2970 Hørsholm

Tlf: 4516 9200  
Fax: 4516 9292  
E-mail: lsp@dhi.dk  
Web: www.dhigroup.com

Klient  Dansk Akvakultur		Klientens repræsentant  Brian Thomsen			
Projekt Økotoksikologiske test med mediciner anvendt i fiskeopdræt		Projekt nr.  53348			
Forfattere  Lise Samsøe-Petersen Trine Thorup Andersen Gitte Petersen Estelle Bjørnestad		Dato 2006.06.09			
		Godkendt af  Torben Madsen			
01	Supplerende rapport	LSP	TTA	TMA	2006.06.09
Revision	Beskrivelse	Udført	Kontrolleret	Godkendt	Dato
Nøgleord  <i>Microcystis aeruginosa</i> - væksthæmning Dambrug, toksicitet, medicin, sulfadiazin		Klassifikation  <input type="checkbox"/> Åben  <input type="checkbox"/> Intern  <input checked="" type="checkbox"/> Tilhører klienten			
Distribution  Dansk Akvakultur DHI: LSP/TTA/GIP/ESB/arkiv					Antal kopier  pdf 5



## **INDHOLDSFORTEGNELSE**

1	INDLEDNING.....	1
2	MATERIALER OG METODER .....	1
2.1	Teststoffet .....	1
2.2	Væksthæmningstest med blågrønalgen <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	1
3	RESULTATER .....	2
4	SAMLET DATASÆT FOR DE SEKS STOFFER.....	5
4.1	Samlede datasæt inkl. supplerende test.....	5
4.2	Vandkvalitetskriterier baseret på resultaterne af dette projekt.....	6
5	LITTERATUR.....	6

### BILAG

A	Primærdata fra væksthæmningstest med blågrønalgen <i>Microcystis aeruginosa</i>	
---	---	--



## 1 **INDLEDNING**

Denne rapport er et supplement til rapporten ” Økotoksikologiske test med mediciner anvendt i fiskeopdræt” af 23. maj d.å.

I hovedrapporten beskrives test med seks mediciner anvendt i fiskeopdræt med det formål at undersøge deres toksicitet over for vandlevende organismer. Testprogrammet var tilrettelagt med henblik på at supplere eksisterende data vedrørende stofferne, så der kan beregnes vandkvalitetskriterier på baggrund af et udvidet datagrundlag med en lav usikkerhedsfaktor (10).

Blandt de gennemførte test var en 4-dages væksthæmningstest med blågrønalgen *Microcystis aeruginosa* og sulfadiazin. Resultaterne tydede på, at sulfadiazin er flere dage om at trænge igennem den slimkappe, der omgiver blågrønalgerne. På den baggrund var det ikke muligt at bestemme de ønskede effektkoncentrationer (EC<sub>50</sub> og EC<sub>10</sub>) med den fornødne sikkerhed. På den baggrund er der udført en supplerende test med blågrønalgen og sulfadiazin med en varighed af 7 dage.

Resultatet af denne test rapporteres i herværende rapport. For fuldstændigheds skyld gengives det samlede sæt resultater fra projektet i afsnit 4.

## 2 **MATERIALER OG METODER**

### 2.1 **Teststoffet**

Ifølge oplysninger i litteraturen (Lützhøft et al. 1999 /1/, Lützhøft 2000 /2/ og Miljøstyrelsen 2005 /7) er stoffet sulfadiazin vandopløseligt (13-2000 mg/l v. 37°C) og har en lav oktanolvand-fordelingskoefficient (Log K<sub>ow</sub> =-0,1-1,12). Endvidere vurderes det ikke at være let bionedbrydeligt. Det antages derfor, at eksponeringskoncentrationen vil kunne holde sig konstant over en 7-dages forsøgsperiode. På den baggrund blev der ikke udtaget prøver til verificering af eksponeringskoncentrationerne ved kemisk analyse.

### 2.2 **Væksthæmningstest med blågrønalgen *Microcystis aeruginosa***

Der foreligger ingen international standardtest til blågrønalger, hvor krav til organismernes vækst og/eller reaktioner på referencestoffer er defineret<sup>1</sup>. For at have et sammenligningsgrundlag blev det valgt at anvende samme testorganisme som Lützhøft et al. /1/. De udførte deres test efter den tidligere beskrevne algetest (ISO standard nr. 8692 /4/), modificeret, så testmediet blev tilsat vitaminer og så varigheden af testen var 7 dage. Endvidere målte de klorofyl-indhold ved fluorescens til bestemmelse af væksthastigheden på den første og den sidste dag i testen, og ikke hver dag som foreskrevet i standarden.

<sup>1</sup> I den nye OECD Test Guideline Nr. 201 for algevæksthæmningstest nævnes to arter af blågrønalger, men der er ikke defineret validitetskriterier for dem.



I nærværende undersøgelse blev testen af stoffets akutte toksicitet over for blågrønalgen *Microcystis aeruginosa* ligeledes baseret på ISO 8692, men der blev anvendt et andet testmedium end Lützhøft et al. /1/, og der blev målt fluorescens ved testens start og efter 72, 96, 120 og 168 timer; dvs. hver 24. time som foreskrevet i ISO 8692. Endvidere blev der anvendt et andet vækstmedie, kaldet MA-medie. For detaljer vedrørende valg af medie henvises til hovedrapporten.

Kulturen af blågrønalger stammer fra Københavns Universitet, Biologisk Institut, Afdeling for Mikrobiologi, der generøst fremsendte en prøve af kulturen.

Ved teststart blev der tilsat blågrønalger, der gav et sikkert respons i fluorometret, svarende til 125.000- 140.000 celler per ml.

Testen blev udført ved  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  med en lysintensitet på  $3,5 - 7,0 \cdot 10^{15}$  quanta  $\text{cm}^{-2} \text{sec}^{-1}$  og pH  $8,6 \pm 0,2$ .

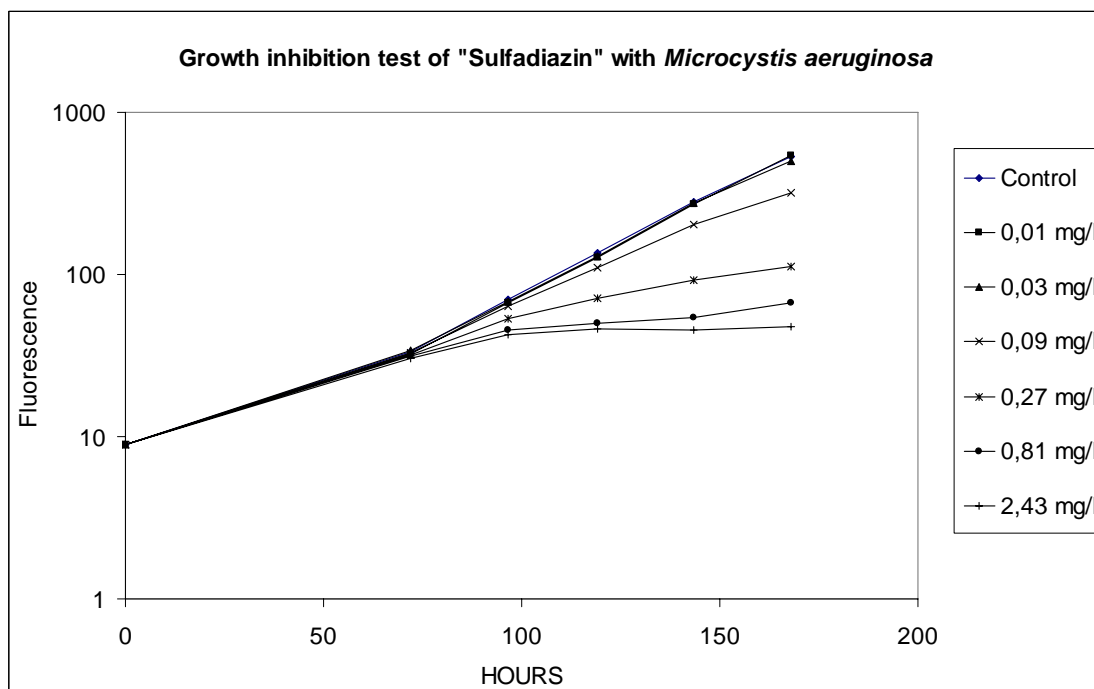
Algernes væksthastighed beregnes på grundlag af fluorescensregistreringerne og stoffets toksicitet angives som de koncentrationer, der i perioden 3-7 dage hæmmer væksthastigheden med henholdsvis 10 og 50 % i forhold til en kontrol uden stof ( $\text{EC}_{10}$  og  $\text{EC}_{50}$ ). Endvidere bestemmes NOEC og LOEC med Dunnett's test /5/. Beregningerne udføres med statistikprogrammet TOXEDO /6/.

Kaliumdikromat ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) blev anvendt som referencestof, da der er et relevant sammenligningsgrundlag for dette stof. Lützhøft et al. /1/ har anvendt det, og i EU risikovurderingsrapporten for krom er der citeret test med *M. aeruginosa*, der vurderes som værende af høj kvalitet /7/.

### **3 RESULTATER**

Resultaterne fra væksthæmningstesten med blågrønalgen *Microcystis aeruginosa* er samlet i bilag A, tabel 4.1 og nedenfor.

Figur 3.1 viser vækstkurverne for de 6 koncentrationer af sulfadiazin samt kontrol, der blev undersøgt i testen. Det fremgår, at effekten først begyndte at vise sig efter 3 dage. Derfor blev resultaterne fra dag 3 til 7 anvendt til beregning af vækstraten.



Figur 3.1 Vækstkurver fra 7-dages test med sulfadiazin og blågrønalgen *M. aeruginosa*. Enhed: mg/l

Ved vurdering af dosisresponskurvernes forløb blev det klart, at det bedste "fit" blev opnået, hvis den højeste af de testede koncentrationer ikke blev medtaget i datasættet. Resultaterne af testen er således baseret på målingerne fra dag 3 til 7 i 5 forskellige koncentrationer af sulfadiazin samt i kontrolglas uden stof.

Tabel 3.1 Resultater af 7-dages test med sulfadiazin og blågrønalgen *M. aeruginosa*. Enhed: mg/l

Testet interval	EC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub> 95%CL	EC <sub>10</sub>	EC <sub>10</sub> 95%CL	NOEC	LOEC
0,01-2,43	0,270	0,258-0,281	0,046	0,041-0,051	0,03	0,09

Der foreligger ikke en international standard for denne test, hvorfor der ikke er standardiserede krav til f.eks. vækstmedium, vækstrate og acceptkriterier for et referencestof. Resultaterne (EC<sub>10</sub> og EC<sub>50</sub>) af testene gennemført på DHI lå generelt højere end de resultater /1/, der ligger til grund for de nugældende vandkvalitetskriterier.

Som referencestof blev kaliumdikromat anvendt, idet Lützhöft et al. /1/ havde brugt dette, og der fandtes et kvalitetsvurderet resultat i litteraturen. Kaliumdikromat anvendes typisk som referencestof i væksttest med grønalg (ISO 8692) /4/.

Resultaterne af test med kaliumdikromat refereret i litteraturen samt test udført ved DHI er samlet i tabel 3.2.



Tabel 3.2 Resultater af test med kaliumdikromat og *M. aeruginosa* i forskellige vækstmedier. Lützhøft referer til /1/ og S&C til /7/. Enhed: mg/l

Reference	Vækst-medium	EC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub> 95%CL	EC <sub>10</sub>	EC <sub>10</sub> 95%CL	NOEC	LOEC	Testet interval
Lützhøft	ISO	0,211	0,029-1,506					0,044-0,400
DHI	MA	1,12	1,09-1,15	0,37	0,35-0,39	0,1	0,2	0,1-5,0
S&C	?					1		

ISO: ISO-medium med vitaminer, MA: MA-medium, ?: Opskriften for mediet i artiklen har ikke kunnet relateres umiddelbart til de øvrige.

Det fremgår af tabel 3.2, at de tre test synes at repræsentere en gradient af følsomhed, idet den af Lützhøft et al. /1/ fundne EC<sub>50</sub>-værdi er en faktor 5 lavere end den på DHI fundne, mens den på DHI fundne NOEC-værdi er en faktor 10 lavere end Sloof & Canton /7/. Det skal dog bemærkes, at det konfidensinterval, Lützhøft et al. /1/ rapporterer, er så bredt, at de på DHI fundne værdier for såvel EC<sub>50</sub> som EC<sub>10</sub> ligger inden for konfidensintervallet for EC<sub>50</sub> i /1/.

Oplysningerne om forsøgsbetingelserne i /7/ er begrænsede, så det er ikke muligt at give en fyldestgørende forklaring på årsager til forskellene, men Lützhøft et al. /1/ brugte 7 dage, mens såvel DHI som Sloof & Canton /7/ anvendte 4 dages eksponeringstid. Den forlængede varighed af testen kan have øget følsomheden. Denne problemstilling diskuteres også af Robinson et al. (2005) /8/, der selv anvendte *M. aeruginosa* i en serie test af 5 dages varighed med antibiotika. Robinson et al. /8/ undersøgte ikke nogen af de stoffer, der indgår i dette projekt, men et par andre stoffer, som Lützhøft et al. /1/ også har testet (ciprofloxacin og flumequine). For ciprofloxacin finder de to EC<sub>50</sub>-værdier af samme størrelsesorden (/1/:0,005 mg/l og /8/: 0,017 mg/l). For flumequine derimod er Lützhøft et al.s resultat en størrelsesorden lavere end Robinson et al.s, idet de får EC<sub>50</sub> til henholdsvis 0,159 mg/l og 1,96 mg/l, hvilket /8/ tilskriver forskellen i eksponeringstid.

En anden forskel mellem testene, der er udført af Lützhøft et al. og DHI, er hyppigheden af registreringer og beregning af væksthastigheden. Lützhøft et al. målte blågrønalgernes tæthed ved forsøgets start og ved afslutningen efter syv dage. Væksthastigheden blev derpå beregnet ud fra forskellen på disse to. Dette vanskeliggør sammenligninger mellem Lützhøft et al.s /1/ resultater og andre algetest. Ved forsøgene på DHI blev standarden fulgt, og algetætheden blev målt ved start samt daglig i de fire dage, forsøget varede (se bilag C). Væksthastigheden blev derefter beregnet ud fra den regressionslinie, der kunne lægges gennem samtlige observationer for hver koncentration.

Da resultaterne fra den først udførte test med sulfadiazin tydede på, at sulfadiazin har forsinket effekt på blågrønalgene, blev den her afrapporterede test gennemført med 7 dages varighed og registrering af fluorescens ved start samt dag 3 til 7..

Tabel 3.3 giver en oversigt over resultater fra Lützhøft et al. /1/ og DHI. Af hensyn til sammenligneligheden er alle koncentrationsangivelser i denne tabel baseret på nominelle koncentrationer.



Tabel 3.3 Resultater af test med *M. aeruginosa* rapporteret af Lützhøft et al. /1/ ("*Lützhøft*") og DHI. Lützhøft rapporterer kun EC<sub>50</sub>, hvorfor EC<sub>10</sub>/NOEC ikke er medtaget. Alle koncentrationer er nominelle. Enhed: mg/l

Stofnavn	Lützhøft <sup>1</sup> EC <sub>50</sub>	Lützhøft 95% CL	DHI <sup>2</sup> EC <sub>50</sub>	DHI EC <sub>50</sub> 95% CL
Amoxicillin	0,0037	Mangler	~1.0	Mangler
Oxolinsyre	0,18	Mangler	0,79	0,73-0,85
Oxytetracyklin	0,207	0,175-0,246	1,33	1,15-1,55
Sulfadiazin	0,135	0,082-0,223	0,270	0,258-0,281
Trimethoprim	112	100-126	> 100	Mangler
Florfenicol	Ikke testet	Ikke testet	0,21	0,19-0,24

1: Test varighed 7 dage

2: Test varighed 4 dage, dog 7 dage for sulfadiazin

I test med amoxicillin er følsomheden i Lützhøfts test næsten 300 gange højere end DHIs, mens den i test med oxolinsyre og oxytetracyklin er henholdsvis ca. 4 og 6 gange højere.

Det ses, at blågrønalgerne følsomhed over for stofferne generelt er højere i test rapporteret af Lützhøft et al. /1/ end i test gennemført ved DHI.

Variationsbredden (konfidensintervallets bredde som % af EC<sub>50</sub>-værdien) varierer mellem 9% og 30% (15, 30, 9, 24) i DHIs test, lavest i testen med sulfadiazin, mens den i Lützhøfts er mellem 23 og 104% (34, 104, 23), højest i testen med sulfadiazin.

## 4 SAMLET DATASÆT FOR DE SEKS STOFFER

### 4.1 Samlede datasæt inkl. supplerende test

Resultaterne af den her og de tidligere beskrevne test samt data fra litteraturen for de seks stoffer er samlet i tabel 4.1.

Tabel 4.1 Oversigt over datasæt for de seks stoffer. Resultater af test på DHI (vist i kursiv) er baseret på kemisk analyse af udvalgte stam- og testopløsninger. Laveste NOEC/EC<sub>10</sub> for hvert stof er markeret med **fed** skrift. Enhed: mg/l.

Stofnavn	Alger 72 t EC <sub>50</sub>	Alger 72 t EC <sub>10</sub>	Blågrønalg 4 / 7 dg EC <sub>50</sub>	Blågrønalg 4 dg EC <sub>10</sub>	Krebsdyr 48 t EC <sub>50</sub>	Krebsdyr 21 dg NOEC	Fisk 96 t LC <sub>50</sub>
Amoxicillin litt.	3100	250	0,0037 <sup>2</sup>	<b>0,00078<sup>2</sup></b>			> 100 Q
Amoxicillin DHI			0,16	<b>0,011</b>	> 158	≥ 158	
Florfenicol	2,66	1,04	0,21	<b>0,03<sup>1</sup></b>	> 100	5,0	> 100
Oxolinsyre	10-16	-	0,79	<b>0,15</b>	4,27	0,38	> 10
Oxytetracyklin	1,6-4,5	-	0,24	<b>0,10</b>	61-136 (reje)	7,4	75- >116
Sulfadiazin	8 – 403	-	0,270 <sup>2</sup>	<b>0,046<sup>2</sup></b>	221	8,8	> 100 Q
Trimethoprim	16-130	-	> 100	41,5	123	<b>10</b>	> 100

-: Mangler

Q = Beregnet ved hjælp af Miljøstyrelsens QSAR-program

1: Ekstrapoleret. Laveste testede koncentration var 0,1 mg/l

2: Blågrønalgetest af 7 dages varighed





Der foreligger endvidere resultater af en 7-dages test med tyk andemad (*Lemna gibba*), hvor trimethoprim og amoxicillin i koncentrationer op til 1 mg/l ikke gav effekter på vægt, antal blade, carotenoider, chlorophyl a eller b /9/.

Datagrundlaget for fastsættelse af vandkvalitetskriterier for de seks stoffer er udvidet, så det nu omfatter resultater af korttidstest med ”standardorganismerne”, alger, krebsdyr, fisk og derudover resultater i form af NOEC-værdier eller EC<sub>10</sub>-værdier fra længerevarende test med organismer fra tre grupper: Alger, dafnier og den forventeligt meget følsomme gruppe, blågrønalger.

## 4.2 Vandkvalitetskriterier baseret på resultaterne af dette projekt

Der er således skabt et datagrundlag, der skulle muliggøre anvendelse af en usikkerhedsfaktor på 10 ved beregning af vandkvalitetskriterier.

Under forudsætning af, at de i tabel 4.1 viste data lægges til grund for beregning af vandkvalitetskriterierne, og under forudsætning af, at der anvendes en usikkerhedsfaktor på 10, vil vandkvalitetskriterierne blive som vist i tabel 4.2.

Tabel 4.2 omfatter desuden de nugældende vandkvalitetskriterier.

Tabel 4.2 Vandkvalitetskriterier (VKK): gældende og beregnede ud fra data i tabel 4.1 med en usikkerhedsfaktor 10. Enhed: µg/l.

Stofnavn	Gældende VKK	VKK baseret på tabel 4.1
Amoxicillin (litteraturværdi)	0,04	0,08
Amoxicillin (DHI-resultat)		1,1
Florfenicol	1,2	3
Oxolinsyre	0,36	15
Oxytetracyklin	2,0	10
Sulfadiazin	1,3	4,6
Trimethoprim	16	1000

## 5 LITTERATUR

- /1/ Lützhøft, H.C. H., B. Halling-Sørensen og S.E. Jørgensen (1999): Algal Toxicity and Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 36: 1-6
- /2/ Lützhøft, H.-C. H. (2000): Environmental Risk Assessment of Antimicrobials. Ph.D rapport fra Farmaceutisk Højskole i København.
- /3/ Miljøstyrelsen (2005): Datablade med vandkvalitetskriterier for en række dambrugstoffer. Udsendt til amterne 31. marts 2005.
- /4/ ISO 8692 (2004): Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae.



- /5/ US-EPA (1989). Dunnett's Procedure in the Analysis of data from short-term toxicity tests with aquatic organisms. US-EPA, Cincinnati version 1.1.
- /6/ VKI (1992): TOXEDO Ver. 1.2. Program for statistical estimation of EC-values, based on experimental data from ecotoxicological assays.
- /7/ Slooff W and Canton JH (1983). Comparison of the susceptibility of 11 freshwater species to 8 chemical compounds. II. (semi)chronic toxicity tests. *Aquat. Toxicol.* **4**, 271-281.
- /8/ Robinson, AA, JB Belden & MJ Lydy (2005): Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 423-430.
- /9/ Brian, RA, DJ Johnsson, SM Richards, H Sanderson, PK Sibley & KR Solomon (2004): Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, 371-382.



## **B I L A G A**

### ***Primærdata fra væksthæmningstest med blågrønalgen *Microcystis aeruginosa****



## Inhibition of the growth of *Microcystis aeruginosa* with “Sulfadiazin”

Statistical parameters calculated from continuous responses based on continuous mean.

Testtype: Growth inhibition test. Growth rate

### Control values

Concentration in mg/l	Growth per hour	Inhibition in per cent
Control 1	0.0276	-
Control 2	0.0276	-
Control 3	0.0309	-
Control 4	0.0289	-
Control 5	0.0297	-
Control 6	0.0287	-
Control mean	0.0289	0

### Experimental Data

Concentration in mg/l	Growth per hour	Inhibition in per cent
0.01	0.0293	0
0.01	0.0301	0
0.01	0.0288	0
0.03	0.0293	0
0.03	0.0277	4
0.03	0.0281	3
0.09	0.0240	17
0.09	0.0236	18
0.09	0.0239	17
0.27	0.0125	57
0.27	0.0125	57
0.27	0.0136	53
0.81	0.0074	74
0.81	0.0069	76
0.81	0.0071	75
2.43 *	0.0038	87
2.43 *	0.0046	84
2.43 *	0.0038	87

\* This result was not included in the statistical calculation

Dunnetts procedure:

NOEC: 0.03 mg/l

LOEC: 0.09 mg/l

EC values and limits of the 95% confidence interval

Y(EC)	LCL	EC(yo)	UCL
10	0.041	0.046	0.051
50	0.258	0.270	0.281
90	1.44	1.58	1.75

