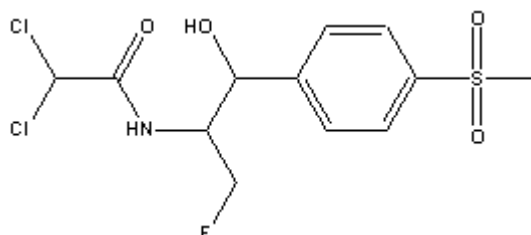


Florfenicol (CAS 76639-94-6).

Fastsættelse af kvalitetskriterier



$$\text{VKK}_{\text{ferskvand}} = 7 \mu\text{g/l}$$

$$\text{VKK}_{\text{saltvand}} = 2,1 \mu\text{g/l}$$

og

$$\text{KVKK}_{\text{ferskvand}} = 21 \mu\text{g/l}$$

$$\text{KVKK}_{\text{saltvand}} = 3,4 \mu\text{g/l}$$

Dette er en opdatering af databladet fra februar 2010. Ændringerne består bl.a. i anvendelse af artsfølsomhedsanalyse til beregning af VKK for saltvand, anvendelse af vækstrate EC_{50} for *Skeletonema* i stedet for biomasse EC_{50} , samt omklassificering af *Tetraselmis* fra ferskvandsform til saltvandsform.

English summary:

Florfenicol is an antibiotic veterinary drug used, among others, in fish farming.

The substance is not regarded as carcinogenic, mutagenic or reprotoxic (CMR properties), and it is not likely to bioaccumulate.

There is too little marine chronic data to separate marine data from freshwater data. However, there is a sufficient amount of freshwater data to perform a species sensitivity distribution analysis on NOEC or EC_{10} values for freshwater alone, and taxonomic groups, that are sensitive in the marine environment are also represented in the freshwater dataset. An HC_5 value of $28 \mu\text{g/l}$ was calculated. It is

highly likely that some of the most sensitive organisms (cyanobacteria) are represented. That the cyanobacteria are among the most sensitive organisms is further supported by MIC values for 14 species of pathogenic bacteria, so even though the requirements for the SSD analysis is only just fulfilled the assessment factor has been reduced to 4 resulting in an EQS for freshwater of 7 µg/l.

The lowest NOEC or EC₁₀ in the entire dataset is for the marine diatom *Skeletonema costatum* (4.2 µg/l). For derivation of the marine EQS the datasets for the marine and freshwater environments were pooled, and an HC₅ of 10.5 µg/l was calculated. As the HC₅ was greater than the lowest EC₁₀ or NOEC, and in the same order of magnitude of the values for the blue-green algae, the assessment factor (5) was not reduced. Thus the derived EQS_{saltwater} was 2.1 µg/l.

There are EC₅₀ values for 7 species of freshwater organisms representing 5 major taxonomic groups. As some of the most sensitive groups in all probability are included in the dataset an assessment factor of 10 is applied for calculation of the maximum acceptable concentration (MAC). This results in MAC_{freshwater} = 21 µg/l.

For derivation of MAC_{saltwater} the marine and freshwater data are pooled and an assessment factor of 10 is applied to the lowest EC₅₀. Thus the MAC_{saltwater} = 3.4 µg/l.

As the substance does not bioaccumulate, and doesn't possess CMR properties no biota or human health standards have been calculated.

The water solubility is around 1 g/l and log K_{ow} has been estimated at 2.4 and -0.04, and the K_{oc} has been estimated to be 1211 and 97 respectively, depending on what model is used. Florfenicol is thus unlikely to bind to sediments, and no sediment EQS has been calculated.

$$WQS_{\text{freshwater}} = 7 \mu\text{g/l}$$

$$WQS_{\text{saltwater}} = 2.1 \mu\text{g/l}$$

$$MAC_{\text{freshwater}} = 21 \mu\text{g/l}$$

$$MAC_{\text{saltwater}} = 3.4 \mu\text{g/l}$$

Stoffet er et antibiotikum.

Opløselighed i vand: 1,3 g/l (Sortkjær et al. 2000)

Giftighed:

Giftighed overfor pattedyr og fugle (NOEC, NOAEL, PNEC_{oral} (PNEC_{føde}), hormonforstyrrende effekter osv.): Ifølge EU's agentur for lægemidler, EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, <http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/florfenicol.pdf>) er den laveste NOEL for langtidsforsøg (flergenerations-) 1 mg/kg lgv/dag (rotter).

Giftighed overfor mennesker (ADI, TDI, hormonforstyrrende effekter, klassificering for kræft, reproduktionsskader og mutagenicitet): Ifølge EU's agentur for lægemidler, EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, <http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/florfenicol.pdf>) er den laveste NOEL for langtidsforsøg (flergenerations-) 1 mg/kg lgv/dag. Stoffet betragtes ikke som skadeligt for forplantningen eller som genotoksisk eller som kræftfremkaldende.

Giftighed over for vandorganismer:

Williams et al., 1992:

<i>Penaeus vannemei</i> (reje)	48 timer	LC50 = 95,2 mg/l
	48 timer	NOEC = 31,7 mg/l

Hobson 2005:

<i>Onchorhynchus mykiss</i>		LC50 > 780 mg/l
		NOEC = 780 mg/l
<i>Lepomis macrochirus</i>		LC50 > 830 mg/l
		NOEC = 830 mg/l
<i>Daphia magna</i>		EC50 > 330 mg/l
<i>Daphia magna</i>		NOEC < 100 mg/l
<i>Litopenaeus vennamei</i>		LC50 = 64 mg/l
		NOEC = 32,1 mg/l

Hoberg 1991:

<i>Selenastrum capricornutum</i> , vækstrate		NOEC = 2,9 mg/l
--	--	-----------------

Aufderheide 1999:

<i>Skeletonema costatum</i> , vækstrate		EC50 = 33,6 µg/l*
		NOEC = 4,2 µg/l*

Jenkins 2005 :

<i>Navicula pelliculosa</i>	72 t	ErC50 = 141 mg/l*
	72 t	ErC10 = 53,7 mg/l**

Samsøe-Petersen et al. 2006:

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	72 t	EC50 = 2,7 mg/l*
--	------	------------------

(=Selenastrum capricornutum)	72 t	EC10 =	1,0 mg/l**
Microcystis aeruginosa	96 t	EC50 =	210 µg/l*
	96 t	EC10 =	30 µg/l**
Daphnia magna	48 t	EC50 >	100 mg/l*
	21 d	NOEC =	5 mg/l*
Oncorhynchus mykiss	96 t	LC50 >	100 mg/l*
Ferreira et al. 2007:			
Tetraselmis chuii	72 t	EC50 =	11,3 mg/l*
Tetraselmis chuii	96 t	EC50 =	6,1 mg/l*
Tetraselmis chuii	72 t	NOEC =	3 mg/l*
Artemia parthenogenitica	48 t	LC50 =	889 mg/l*
Artemia parthenogenitica	48 t	NOEC =	637 mg/l
Bjørnstad 2008			
Skeletonema costatum	72 t	NOEC >	0,01 mg/l*
Gallagher et al. 2008			
Anabaena flos-aquae	96 t	NOEC =	0,051 mg/l**
Gallagher et al. 2008a			
Daphnia magna	21 d	NOEC =	1,5 mg/l**
Gallagher et al. 2008b			
Pimephales promelas	33	NOEC =	5,5 mg/l**
Softcheck 2009			
Lemna minor	7 d	NOEC _{vækstrate} =	0,57 mg/l**
Sayers 2009			
Brachionus calyciflorus	48 t	EC ₅₀	5.4 mg/l ^a
Brachionus calyciflorus	48 t	NOEC	0,76 mg/l**
Sayers 2008			
Nitrosomonas europaea	21 d	NOEC	0,63 mg/l**
Nitrobacter sp.	21 d	NOEC	4 mg/l**
Bradley 2009			
Chironomus riparius	28 d	NOEC	25 mg/l**

^a: Beregnet ud fra data i rapporten

*: Anvendt til beregning af kvalitetskriterier, men ikke brugt i SSD

** : Anvendt i SSD analysen

Effekter på sygdomsfremkaldende bakterier

Følgende er taget fra Schering-Ploughs hjemmeside vedrørende effektiviteten af Florfenicol overfor bakterier (http://www.avl.co.uk/aquaflor_efficacy.html). De opførte værdier er Minimum Inhibitory Concentration (MIC), som er den laveste koncentration ved hvilken, bakteriernes vækst er blevet hæmmet:

Organism	No. of isolates	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/l}$)	Median ($\mu\text{g/l}$)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	98	0.25-1.6	250-1600	925
<i>Pasteurella piscicida</i>	225	0.004-0.6	4-600	302
<i>Edwardsiella tarda</i>	52	0.4-1.6	400-1600	1000
<i>Vibrio anguillarum</i>	151	0.2-0.8	200-800	500
<i>Vibrio salmonicida</i>	10	0.8	800	800
<i>Vibrio spp.</i>	3	1.25	1250	1250
<i>Yersinia ruckeri</i>	5	0.6-10	600-10000	5300
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	48	0.001-16	1-16000	8000

Fra Hobson 2005 haves:

Aspergillus niger	MIC > 1000 mg/l
Trichoderme viride	MIC > 1000 mg/l
Nostoc sp.	MIC = 4 mg/l
Bacillus subtilis	MIC = 0,4 mg/l
Clostridium perfringens	MIC = 1 mg/l
Moraxella sp.	MIC = 0,5 mg/l
Serratia sp.	MIC = 16 mg/l
Escherichia coli	MIC = 8 mg/l
Aeromonas salmonicida	MIC = 0,3 – 2,5 mg/l
Vibrio sp.	MIC = 0,8 – 1,6 mg/l

Fra Bruun et al. 2000 og I. Dalsgaard 2004 haves følgende:

Flavobacterium psychrophilum	MIC = 125 $\mu\text{g/l}$ (Bruun et al. 2000)
Aeromonas salmonicida	MIC = 250 $\mu\text{g/l}$ (Dalsgaard 2004)

MIC værdierne bruges til at vurdere risikoen for opbygning af resistens hos sygdomsfremkaldende bakterier, og bruges også som supplerende oplysninger om giftigheden for vandorganismer (bidrager til helhedsbilledet). Hvis VKK er mere end 10 gange lavere end laveste MIC

betragtes det som usandsynligt, at der vil blive en opbygning af resistens hos sygdomsfremkaldende bakterier.

Nedbrydelighed:

Der er ikke fundet nogen oplysninger, bortset fra et sikkerhedsdatablad fra Schering-Plough (6/2-2004), der angiver at stoffet er ikke let nedbrydeligt. MITI nedbrydningsmodellerne i BIOWIN QSAR modelpakke forudsiger, at stoffet er ikke let nedbrydeligt. Stoffet antages at være ikke let nedbrydeligt.

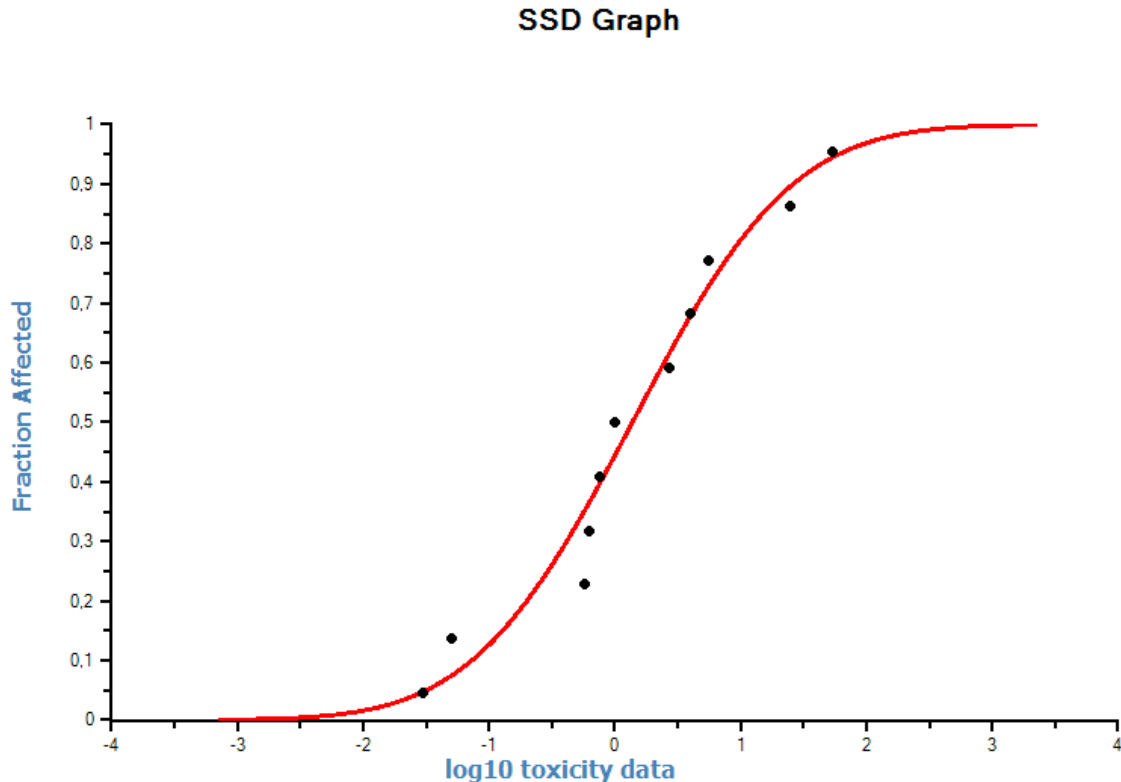
Bioakkumulering:

Et sikkerhedsdatablad fra Schering-Plough (6/2-2004) angiver $\log K_{ow} = 2,4$. EPIWIN-modellerne: $\log K_{ow} = -0,04$. Betragtes ikke som bioakkumulerende.

Vandkvalitetskriterie (VKK):

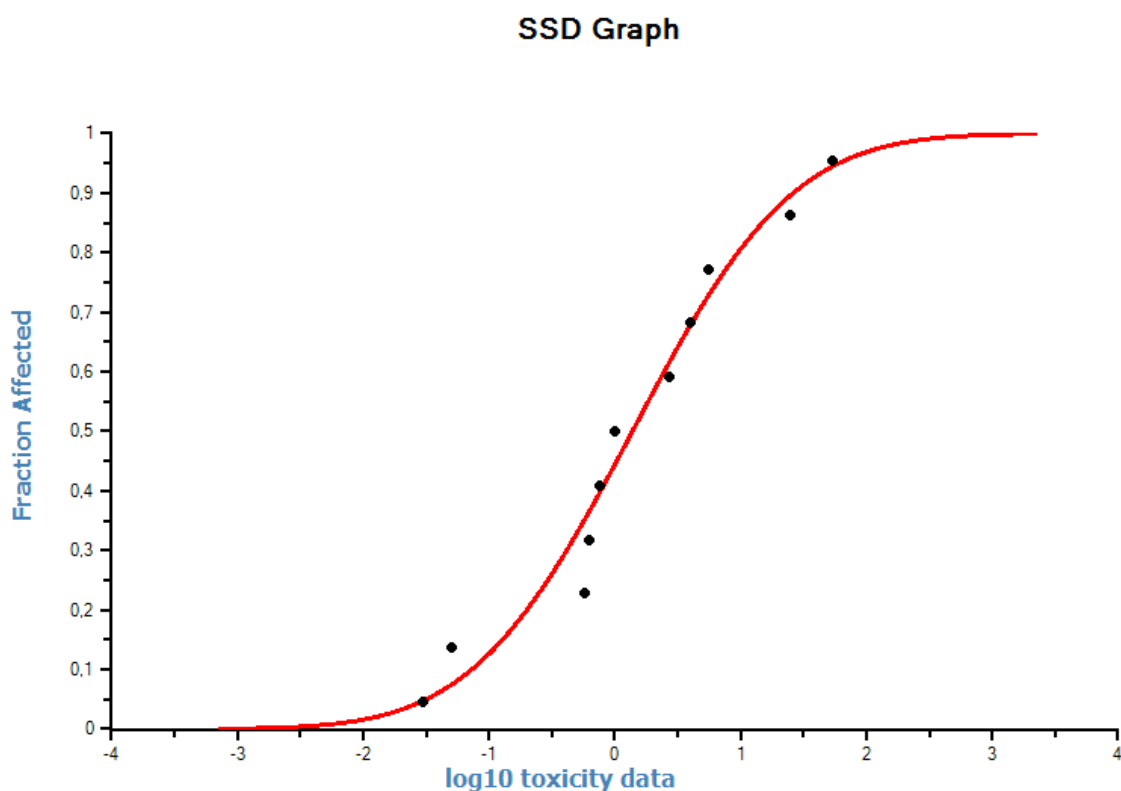
Vandkvalitetskriterierne er fastsat i overensstemmelse med Miljøstyrelsens vejledning (Miljøstyrelsen 2004) og EU's vejledning (EU 2011).

De mest følsomme organismer er kiselalger og blågrønalger, hvilket er forventeligt, da stoffet er et antibiotikum. Den laveste EC_{10} eller NOEC er for havkiselalgen *Skeletonema costatum* (4,2 $\mu\text{g/l}$).



Der er ikke tilstrækkeligt med data for marine organismer til at skille organismer fra havmiljøet og ferskvandsmiljøet ad. Der er dog tilstrækkeligt med data for ferskvandsarter, herunder for en ferskvandskiselalge, til at der kan fastsættes et VKK for ferskvand uden data for havlevende organismer. EC₁₀ for ferskvandskiselalgen er en faktor 10000 gange større end for havformen, og der er således intet, der tyder på at kiselalger i ferskvand er ligeså følsomme som *Skeletonema costatum*.

For ferskvand er der tilstrækkeligt med NOEC eller EC₁₀ data til at udføre en artsfølsomhedsanalyse (Species Sensitivity Distribution = SSD) (11 arter, 8 overordnede systematiske grupper). I denne analyse tages det geometriske gennemsnit af de to værdier for *Daphnia magna*. Da den ene af de to tests med *Pseudokirchneriella subcapitata* er udført over 14 dage bruges værdien ikke. Der bliver således 11 datapunkter. Ifølge RIVMs (Nederlandene) program ETX2.0 (RIVM 2004) kan det ikke afvises, at de logaritmisk transformerede data er normalfordelte efter afprøvning med tre forskellige statistiske metoder (Andersen-Darling, Kolmogorov-Smirnov, Cramer von Mise), og der er ikke noget, der tyder på to eller flere grupperinger selvom stoffet har en specifik virkningsmekanisme, se figuren.



HC_{5, 50%} = 28 µg/l, med nedre og øvre 90% grænser på henholdsvis 2,2 µg/l og 126 µg/l.

Kriterierne for at benytte SSD er lige overholdt. Som udgangspunkt anvendes en usikkerhedsfaktor på 5, men da det er overvejende sandsynligt at nogle af de mest følsomme arter (blågrønalger = cyanobakterier) er repræsenteret, og der er mange MIC værdier for patogene bakterier, som bekræfter, at blågrønalgerne er nogle af de mest følsomme organismer, anses det for usandsynligt at andre større systematiske grupper vil være mere følsomme, og det vælges at benytte en usikker-

hedsfaktor på 4. Dette vil give et $VKK_{\text{ferskvand}} = 28 \mu\text{g/l} : 4 = 7 \mu\text{g/l}$, som er mere end 4 gange lavere end laveste EC_{10} eller NOEC.

Undersøgelserne er velbeskrevne og i de fleste tilfælde følger de internationale retningslinjer (f.eks. OECD) eller retningslinjer givet af myndigheder i f.eks. USA. De anvendte NOEC værdier vurderes alle at være brugbare i SSD analysen.

For saltvand slås saltvandsdata og ferskvandsdata sammen, hvilket betyder datasættet omfatter 13 arter og de samme 8 overordnede systematiske grupper som i ferskvands datasættet. De statistiske tests for lognormalfordeling gav samme resultat som ovenfor, og en $HC_5 = 10,5 \mu\text{g/l}$ blev beregnet. Den nedre og øvre 90% grænse var henholdsvis $0,77 \mu\text{g/l}$ og $52,3 \mu\text{g/l}$.

Da HC_5 er større end NOEC for Skeletonema og af samme størrelsesorden som NOEC for de to blågrønalger reduceres usikkerhedsfaktoren ikke og en usikkerhedsfaktor på 5 anvendes. VKK for saltvand bliver således $10,5 \mu\text{g/l} : 5 = 2,1 \mu\text{g/l}$.

Der er EC_{50} data for 7 ferskvandsarter fra 5 større systematiske grupper, og for 4 saltvandsarter repræsenterende 2 overordnede systematiske grupper (som også er repræsenterede i datasættet for ferskvand). Normalt ville man slå disse datasæt sammen, hvis en statistisk sammenligning af de to datasæt ikke sandsynliggjorde en forskel i følsomhed mellem de to grupper. Dette også selvom der er data nok til at kunne uddrage et $KVKK$ for ferskvand kun på basis af ferskvandsdata.

Men da datasættet for ferskvand indeholder værdier for kiselalger (som er den mest følsomme gruppe i saltvandsdatasættet), nitrificerende bakterier og cyanobakterier (blågrønalger), som må forventes at være nogle af de mest følsomme organismegrupper, beregnes et $KVKK$ for ferskvand baseret alene på ferskvandsdata, og der anvendes en usikkerhedsfaktor på 10 på laveste EC_{50} ved beregning af korttidsvandkvalitetskriteriet ($KVKK$).

Til beregning af $KVKK$ for saltvand slås de to datasæt sammen og der anvendes en usikkerhedsfaktor på 10 på laveste EC_{50} .

Korttidskvalitetskriterierne bliver således: $KVKK_{\text{saltvand}} = 33,6 \mu\text{g/l} : 10 = 3,4 \mu\text{g/l}$ og $KVKK_{\text{ferskvand}} = 210 \mu\text{g/l} : 10 = 21 \mu\text{g/l}$.

Hobson 2003? Er en oversigtsrapport og Miljøstyrelsen har ikke de originale undersøgelser og data. Disse data bruges derfor kun som understøttende oplysninger og er ikke brugt direkte i beregningerne.

Testen med Microcystis (Samsøe-Petersen et al. 2006) er udført efter en modificeret ISO 8692 standard og er velbeskrevet, og der er opnået eksponentiel vækst. På grund af artens slimkappe, der kan hæmme optagelsen, havde en testvarighed på 7 dage måske været at foretrække, men i betragtning af stoffets høje vandopløselighed vurderes det, at dette næppe er et større problem.

Testen på Skeletonema (Aufderheide 1999) er velbeskrevet og følger en international standard (ISO 10253) og God Laboratorie Praksis. Testen betragtes som værende af høj kvalitet og NOEC værdien betragtes som brugbar til fastsættelse af VKK .

Vandkvalitetskriterierne bliver da:

$$VKK_{\text{ferskvand}} = 7 \mu\text{g/l}$$

$$VKK_{\text{saltvand}} = 2,1 \mu\text{g/l}$$

og

$$KVKK_{\text{ferskvand}} = 21 \mu\text{g/l}$$

$$KVKK_{\text{saltvand}} = 3,4 \mu\text{g/l}$$

MIC for sygdomsfremkaldende bakterier er mere end 10 gange højere end VKK og det antages derfor, at der ikke vil være problemer med opbygning af resistens.

Fødekædeeffekter og effekter på menneskers sundhed: Stoffet har en opløselighed i vand på omkr. 1 g/l og log K_{ow} omkring 2,4, så ophobning i biota er ikke sandsynlig. Stoffet betragtes ikke som kræftfremkaldende eller mutagent, og skader ikke frugtbarheden. Der udarbejdes derfor ikke kvalitetskriterium for biota eller sundhed.

Sediment: QSAR-programmet Kocwin giver med to forskellige modeller estimater for Koc på henholdsvis 1211 og 96,7. Sammenholdt med at vandopløseligheden er omkr. 1 g/l er det ikke særlig sandsynligt at stoffet vil ophobes i sediment. Der udarbejdes derfor ikke et kvalitetskriterium for sediment.

Referencer:

Aufderheide, J.A. 1999: Growth Inhibition Test of Florfenicol with the Marine Diatom, *Skeletonema costatum*. Rapport fra ABC Laboratories Europe nr. 70141 til Schering-Plough Health Corporation. Schering rapport nr. 30727, SCH 25298

Bjørnestad, E. 2008: Growth inhibition test of florfenicol with *Skeletonema costatum*. Undersøgelse nr. 91331/557 fra DHI til Schering-Plough Animal health, januar 2008.

Bradley MJ, 2009. Florfenicol - Toxicity Test with Sediment-Dwelling Midges (*Chironomus riparius*) Under Static Conditions, Following OECD Guideline 219. Intervet-Doc. No.: 08317

Bruun, M.S., A.S. Schmidt, L. Madsen & I. Dalsgaard 2000: Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture* 187: 201-212.

Dalsgaard, I 2004: Resultaterne fra upublicerede arbejdspapirer. Skal tages med forbehold. Personlig kommunikation

EU 2011: Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards. Guidance Document No. 27, Technical Report – 2011 – 055, European Commission.

Ferreira, C. S. G.; B.A. Nunes, J. Md. M. Henriques-Almeida & L. Guilhermina, 2007: Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotox Envir Safety* 67: 452-458.

Gallagher SP, Kendall TZ, Krueger HO, 2008. Florfenicol: A 96-hour Toxicity Test with the Freshwater Alga (*Anabaena flos-aquae*). Intervet-Doc. No.: 07119.

Gallagher SP, Kendall TZ, Krueger HO, 2008a Florfenicol: A Static-renewal Life-cycle Toxicity Test with the Cladoceran *Daphnia magna*. Intervet-Doc. No.: 07134.

Gallagher SP, Kendall TZ, Krueger HO, 2008b. Florfenicol: An Early Life-stage Toxicity Test with the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). Intervet-Doc. No.: 07133

Hoberg, J.R. 1991: Toxicity to the freshwater green alga, *Selenastrum capricornutum*. Research Report A-25387 to Schering-Plough (Schering Study No. 1513).

Hobson, J.F. (2005?): Expert report on the potential environmental impacts of florfenicol administered to fish. Rapport til Schering-Plough Animal Health Corporation.

Jenkins, C. A. 2005: Florfenicol. Algal Growth Inhibition Assay. *Navicula pelliculosa*. Rapport fra Huntingdon Life Sciences Ltd. til Schering-Plough Animal Health corporation. Rapport nr. 49230 SCH 25598

Samsøe-Petersen L., T.T.Andersen, Petersen & E. Bjørnstad 2006: Økotoksikologiske test med mediciner anvendt i fiskeopdræt. Rapport maj 2006 til Dansk Akvakultur

Sayers LE, 2008. Florfenicol – Determination of Microbial Growth Inhibition in nitrifying bacteria Following FDA Environmental Assessment Technical Assistance Handbook, Document 4.02. 2008. Intervet-Doc. No.: 07388

Sayers LE, 2009. Florfenicol - Chronic Toxicity to Rotifers (*Brachionus calyciflorus*) Under Static Conditions. Intervet-Doc. No.: 08316

Softcheck KA, 2009. Florfenicol - 7-Day Toxicity Test with Duckweed (*Lemna gibba*) following OECD Guideline 221. Intervet-Doc. No.: 08318

Williams, R.R.; Bell, T.A.; Lightner, D.V. 1992: Shrimp Antimicrobial Testing. II. Toxicity Testing and Safety Determination for Twelve Antimicrobials with Penaeid Shrimp Larvae. *Journal of Aquatic Animal Health* 4: 262-270.