

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA STANIČ
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA STANIČ

**VPLIV VETERINARSKIH PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN IN NJIHOVIH
PREOSTANKOV NA ORGANIZME V ZEMLJI**

**EFFECTS OF VETERINARY ANTIMICROBIALS AND THEIR RESIDUALS TO
SOIL ORGANISMS**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Marka Slana, iz podjetja Krka d.d. Novo mesto.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorju dr. Marku Slana, za strokovno usmerjanje, nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Marka Slana.

Anja Stanič

VSEBINA

Kazalo vsebine

VSEBINA.....	i
Kazalo vsebine	i
Kazalo preglednic	iv
Kazalo slik.....	vii
Kazalo prilog	viii
POVZETEK	ix
ABSTRACT	x
SEZNAM OKRAJŠAV.....	xii
1 UVOD	1
1.1 Veterinarske učinkovine in njihov vpliv na okolje	1
1.2 Registracija veterinarskih učinkovin v EU in ocena njihovega vpliva na okolje.....	2
1.3 Veterinarske protimikrobne učinkovine in tveganja njihove uporabe	3
1.3.1 Namen uporabe protimikrobnih učinkovin pri živalih	4
1.3.2 Presnova učinkovin v živalih	4
1.3.3 Širjenje preostankov učinkovin in njihovih presnovkov v okolje	6
1.3.4 Protimikrobne učinkovine v okolju	7
1.3.5 Razgradnja učinkovin v okolju.....	8
1.3.6 Prispevek protimikrobnih učinkovin k pojavu rezistence	10
1.4 Ravnanje z iztrebki živali izpostavljenih protimikrobnim učinkovinam in prenos iztrebkov v okolje	11
1.5 Najpogosteje uporabljene protimikrobne učinkovine v veterini	13
1.5.1 FLORFENIKOL.....	13
1.5.2 SULFADIAZIN.....	14
1.5.3 TILOZIN	14
2 NAMEN	16

3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 Materiali	18
3.2 Metode	18
3.2.1 Zbiranje podatkov	18
3.2.2 Izračun parametrov za oceno potencialnega vpliva učinkovin na okolje	19
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	22
4.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI UČINKOVIN IN NJIHOVE ZNAČILNOSTI	23
4.1.1 Fizikalno-kemijske lastnosti najpogosteje uporabljenih protimikrobnih učinkovin v veterini	23
4.2 ZNAČILNOSTI UČINKOVIN V KOPENSKEM OKOLJU	27
4.2.1 Presnova in izločanje učinkovin iz zdravljenih živali	27
4.2.2 Obstočnost in razgradnja preostankov učinkovin v gnoju	31
4.2.3 Adsorpcija preostankov učinkovin v zemlji	36
4.2.4 Vpliv sestavin gnoja na adsorpcijo v zemlji	38
4.2.5 Obstočnost in razgradnja preostankov učinkovin v zemlji	39
4.2.6 Pronicanje v globlje plasti prsti in vodno okolje	43
4.3 ZNAČILNOSTI UČINKOVIN V VODNEM OKOLJU	44
4.4 EKOTOKSIKOLOŠKE LASTNOSTI PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN	46
4.4.1 Ekotoksičnost florfenikola	47
4.4.2 Ekotoksičnost sulfadiazina	49
4.4.3 Ekotoksičnost tilozina	53
4.4.4 Odmerki veterinarskih učinkovin in tarčne živali	55
4.5 VPLIV PREOSTANKOV PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN IN NJIHOVIH PRESNOVKOV	56
4.5.1 Izračuni predvidenih koncentracij v okolju	56
4.5.2 Določanje vpliva učinkovin na okolje	58
4.5.2.1 Preračunani $PEC_{\text{soil-refined}}$ za florfenikol	59

4.5.2.2 Preračunani $PEC_{\text{soil-refined}}$ za sulfadiazin	60
4.5.2.3 Preračunani $PEC_{\text{soil-refined}}$ za tilozin	62
4.5.3 Ocena vpliva učinkovin na okolje	64
4.5.3.1 Povzetek lastnosti učinkovin in ocenjene toksičnosti za okolje.....	64
4.5.3.2 Primerjava lastnosti učinkovin in njihovih značilnosti v okolju	66
4.5.3.3 Vpliv presnove in razgradnje na toksičnost preostankov učinkovin	66
5 SKLEP	68
6 VIRI IN LITERATURA.....	69
7 PRILOGE	76

Kazalo preglednic

Preglednica I: Pregled fizikalno-kemijskih lastnosti predstavljenih učinkovin.....	24
Preglednica II: Koncentracije učinkovin, ki potencialno prehajajo v vodno okolje.....	58
Preglednica III: Deleži presnovkov florfenikola v piščančjih in prašičjih izločkih.	59
Preglednica IV: Deleži presnovkov sulfadiazina v prašičjih izločkih.	61
Preglednica V: Deleži presnovkov tilozina v piščančjih in prašičjih izločkih.....	62
Preglednica VI: Razlaga parametrov, ki nastopajo v enačbi 1 iz CVMP navodil (33) z enotami in standardnimi vrednostmi.	76
Preglednica VII: Razlaga parametrov, ki nastopajo v enačbi 2 iz CVMP navodil (33) z enotami in standardnimi vrednostmi.	77
Preglednica VIII: Standardne vrednosti za deleže črede zdravljene z učinkovino za različne skupine veterinarskih zdravilnih učinkovin, ki se uporabljajo pri izračunih PEC.	78
Preglednica IX: Standardne vrednosti parametrov, ki se uporabljajo pri izračunih PEC _{soil} za intenzivno rejene živali.....	79
Preglednica X: Standardne vrednosti parametrov, ki se uporabljajo pri izračunih PEC _{soil} za pašno rejene živali.	79
Preglednica XI: Izračuni PEC _{soil} za intenzivno rejene piščance in prašiče zdravljene s florfenikolom v zdravilu Floron 40 mg/g - peroralni prašek.....	80
Preglednica XII: Izračuni PEC _{soil} za intenzivno rejene piščance in prašiče zdravljene s sulfadiazinom v zdravilu Sulfaprex Premix 250/50 mg/g - predmešanica za pripravo zdravilne krme.	81
Preglednica XIII: Izračuni PEC _{soil} za intenzivno rejene piščance in prašiče zdravljene s tilozinom v zdravilu Pharmasin 100 % w/w - granule za pripravo peroralne raztopine.	81
Preglednica XIV: Razlaga parametrov v enačbah 32 – 40 z enotami in standardnimi vrednostmi.	83
Preglednica XV: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za florfenikol.	84
Preglednica XVI: Parametri v enačbah izračunani za florfenikol.	84
Preglednica XVII: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za sulfadiazin.	85
Preglednica XVIII: Parametri v enačbah izračunani za sulfadiazin.....	85
Preglednica XIX: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za tilozin.....	86
Preglednica XX: Parametri v enačbah izračunani za tilozin.....	86

Preglednica XXI: Izračun kvocienta tveganja (RQ) za florfenikol.	87
Preglednica XXII: Izračun kvocienta tveganja (RQ) za sulfadiazin.	88
Preglednica XXIII: Izračun kvocienta tveganja (RQ) za tilozin.	89
Preglednica XXIV: Koncentracije učinkovin, ki potencialno prehajajo v vodno okolje, če se upošteva presnova učinkovine v tarčni živali.	90
Preglednica XXV: Florfenikol - izračun kvocienta tveganja (RQ) za $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem presnove v živalih, višji od 100 $\mu\text{g/kg}$, za organizme, kjer je bil RQ pri začetnem PEC_{soil} večji od 1.	90
Preglednica XXVI: Sulfadiazin:- izračun kvocienta tveganja (RQ) za $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem presnove v živalih, višji od 100 $\mu\text{g/kg}$, za organizme, kjer je bil RQ pri začetnem PEC_{soil} večji od 1.	91
Preglednica XXVII: Tilozin - izračun kvocienta tveganja (RQ) za $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem presnove v živalih, višji od 100 $\mu\text{g/kg}$, za organizme, kjer je bil RQ pri začetnem PEC_{soil} večji od 1.	92
Preglednica XXVIII: Razlaga parametrov v enačbah 9 - 11.	93
Preglednica XXIX: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za florfenikol.	94
Preglednica XXX: Za florfenikol izračunane vrednosti parametrov v enačbah za izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja..	94
Preglednica XXXI: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za sulfadiazin.	95
Preglednica XXXII: Za sulfadiazin izračunane vrednosti parametrov v enačbah za izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja..	95
Preglednica XXXIII: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za tilozin.	96
Preglednica XXXIV: Za tilozin izračunane vrednosti parametrov v enačbah za izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja (brez upoštevanje presnove v tarčni živali).	96
Preglednica XXXV: Za tilozin izračunane vrednosti parametrov v enačbah za izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja (z upoštevanje presnove v tarčni živali).	96

Preglednica XXXVI: Koncentracija tilozina, ki potencialno prehaja v vodno okolje, če se upošteva razgradnja učinkovine med hranjenjem iztrebkov (brez in z upoštevanjem predhodne presnove v tarčni živali).	97
Preglednica XXXVII: Tilozin - izračun kvocienta tveganja (RQ) za $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem razgradnje učinkovine v gnoju, za organizme, kjer je bil RQ pri $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem presnove učinkovine v živali večji od 1.	97
Preglednica XXXVIII: Razlaga parametrov v enačbah 12 – 15.	98
Preglednica XXXIX: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za tilozin.	99
Preglednica XL: Za tilozin izračunane vrednosti parametrov v enačbah za izračun $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem razgradnje v zemlji.....	99
Preglednica XLI: Koncentracije tilozina, ki potencialno prehajajo v vodno okolje, če se upošteva razgradnja učinkovine v zemlji	100
Preglednica XLII: Tilozin - izračun kvocienta tveganja (RQ) za $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem razgradnje učinkovine v zemlji za organizme, kjer je bil RQ pri začetnem PEC_{soil} večji od 1.	100

Kazalo slik

Slika 1: Glavne poti delovanja protimikrobnih učinkovin. (Povzeto po 7)	3
Slika 2: Potek presnove učinkovin. (Povzeto po 8)	5
Slika 3: Poti protimikrobnih učinkovin po izločanju iz živali. (Povzeto po 3).....	6
Slika 4: Poti in procesi preostankov oz. presnovkov učinkovin v zemlji. (Povzeto po 11)....	8
Slika 5: Fizikalno-kemijske lastnosti in vpliv na področja v okolju. (Povzeto po 35)	23
Slika 6: Strukturna formula florfenikola.. (Povzeto po 77)	25
Slika 7: Strukturna formula sulfadiazina. (Povzeto po 78).....	25
Slika 8: Strukturna formula Tiloizina. (Povzeto po 79).....	26
Slika 9: Presnovki florfenikola in predvidena pot presnove pri piščancih. (Povzeto po 73)	27
Slika 10: Presnovki Sulfadiazina in predvidena pot presnove. (Povzeto po 47)	28
Slika 11: Strukturna faktorjev tilozina. (Povzeto po 48 in 49)	30

Kazalo prilog

PRILOGA I - Preglednice s standardnimi vrednostmi parametrov, ki se uporabljajo pri izračunih PEC_{soil} povzete po CVMP navodilih.....	76
PRILOGA II - Izračuni začetne PEC_{soil} za predstavljene učinkovine na primeru intenzivno rejenih piščancev in prašičev	80
PRILOGA III - Izračun predvidenih koncentracij učinkovin, ki prehajajo v površinske in podzemne vode	82
PRILOGA IV - Na osnovi začetne PEC_{soil} izračune koncentracije učinkovin, ki potencialno prehajajo v vodno okolje.....	84
PRILOGA V - Izračuni kvocienta tveganja (RQ) za predstavljene učinkovine na osnovi izračunanih začetnih PEC_{soil} vrednosti in podatkov za akutno toksičnost, zbranih iz objavljenih študij (Ocena tveganja- Stopnja A).	87
PRILOGA VI - Izračuni kvocienta tveganja (RQ) za predstavljene učinkovine na osnovi vrednosti $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjo presnove v tarčni živali in podatkov za akutno toksičnost, zbranih iz objavljenih študij (Ocena tveganja - Stopnja A).	90
PRILOGA VII - Enačbe za izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja (Povzete po CVMP navodilih (12))......	93
PRILOGA VIII - Izračuni $PEC_{soil-refined}$ za predstavljene učinkovine z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem iztrebkov	94
PRILOGA IX - Izračuni kvocienta tveganja (RQ) za tilozin na osnovi $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem iztrebkov in podatkov za akutno toksičnost zbranih iz objavljenih študij (Ocena tveganja - Stopnja A).	97
PRILOGA X – Enačbe za izračun $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem razgradnje v zemlji (Povzete po CVMP navodilih (12))......	98
PRILOGA XI – Izračun $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem razgradnje v zemlji za tilozin.....	99
PRILOGA XII – Izračuni kvocienta tveganja (RQ) za tilozin na osnovi $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem razgradnje učinkovine v zemlji in podatkov za akutno toksičnost zbranih iz objavljenih študij (Ocena tveganja – Stopnja A).....	100

POVZETEK

Veterinarska zdravila so pomembna skupina farmacevtskih izdelkov, ki zajemajo različne razrede učinkovin, med katerimi prevladujejo protimikrobne učinkovine. Florfenikol, sulfadiazin in tilozin so predstavniki najpogosteje uporabljenih protimikrobnih učinkovin v veterini, namenjenih predvsem zdravljenju respiratornih obolenj živali za prehrano ljudi. Aplicirane učinkovine se iz telesa živali izločajo v obliki starševskih molekul ali v obliki presnovkov z oz. brez biološke aktivnosti. Ker se izločki, ki nastajajo pri živinoreji uporabljajo za gnojenje kmetijskih površin, so ti glavni vir protimikrobnih učinkovin za okolje. Koncentracija učinkovine, ki vstopi v okolje, je odvisna od odmerka, načina aplikacije in dolžine terapije; obstojnost učinkovine ter ekotoksikološki vplivi na okolje pa so odvisni od njenih fizikalno-kemijskih, razgradnih ter toksikoloških lastnosti. Tako predstavljajo učinkovine potencialno nevarnost za okolje, zato je potrebno poznavanje oz. ocena njihovih lastnosti in možnih tveganj.

V magistrski nalogi smo pregledali v literaturi objavljene rezultate dosedanjih študij o lastnostih predstavljenih učinkovin in njihovih značilnostih v okolju ter toksičnosti za kopenske in vodne organizme. Z zbranimi podatki smo izračunali predvidene koncentracije učinkovin, ki prehajajo v okolje in na osnovi tega določili tveganje za okolje. Oceno tveganja za okolje in izračune smo naredili v skladu z navodili Odbora za zdravila za uporabo v veterinarski medicini, ki se zahteva v vlogi za pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom oz. registraciji zdravila.

Z izračuni smo dokazali, da se s procesi presnove in razgradnje v iztrebkih in zemlji, skozi katere gre učinkovina v svojem celotnem življenjskem ciklu, njena koncentracija v okolju lahko pomembno zniža do te mere, da ne predstavlja tveganja za prisotne organizme. Za predstavljene učinkovine, florfenikol, sulfadiazin in tilozin smo pokazali, da v splošnem nimajo toksičnega vpliva na kopensko in vodno okolje, v kolikor se zdravilo uporablja v skladu z navodili za uporabo. Z rezultati smo tudi potrdili hipotezo, da se lahko z intenzivno razgradnjo preostankov učinkovin v iztrebkih in zemlji ali ireverzibilno vezavo na anorganske oz. organske snovi zmanjša toksičnost preostankov učinkovin za okolje.

Ključne besede: veterinarske protimikrobne učinkovine, florfenikol, sulfadiazin, tilozin, presnova v živalih, razgradnja, ekotoksičnost, ocena tveganja za okolje

ABSTRACT

Veterinary medicines are important group of pharmaceuticals that includes various classes of active ingredients, among which antimicrobials predominate. Florfenicol, sulfadiazine and tylosin are representatives of the most commonly used antimicrobials in veterinary medicine, intended primarily to treat respiratory diseases of animals for human consumption. Applied active ingredients are excreted from the body of animal in the form of parental molecules or in the form of metabolites with or without biological activity. Since excrements from livestock farming are used to fertilize agricultural land, they are the main source of antimicrobials for the environment. The concentration of active substance, which enters in the environment, depends on the dosage, the application form and the length of the therapy. The persistence of compound in the environment and its ecological impacts are mainly dependent on the physico-chemical, degradable and toxicological properties. Thus, the residuals of active substances are a potential threat to the environment, therefore knowledge and assessment of their properties and its possible risks are essential.

In the presented master's work we made a review of the results of previous studies on the characteristics of the presented active substances and their behavior in the environment, as well as their toxicity for terrestrial and aquatic organisms published in the literature. With the collected data, we have calculated the predicted environmental concentrations of active ingredients that are potentially transmitted to soil or water and based on these concentrations we determined the risk for the environment. The environmental risk assessment and performed calculations are made in accordance with the instructions of the Committee for Veterinary Medicinal Products mandatory for use at preparation of environmental risk assessment, requested at submission for marketing authorization of medicinal product.

We have demonstrated that the processes of metabolism and degradation in faeces and soil, which represents a part of the active substance within the entire life cycle importantly reduce its environmental concentrations. The reduction can be significant to the extent that the active compound does not present a risk for the organisms in the environment. For active substances florfenicol, sulfadiazine and tylosin, presented in our work, we have shown that they generally do not have toxic effects for the terrestrial and aquatic environment, when the drug is used in accordance with the instruction in the summary of product characteristics. The results have also confirmed our hypothesis that with intensive decomposition of active

substance`s residuals in excrements and soil or their irreversible binding to minerals and organic matter, reduces the toxicity of residual active substances to the environment.

Key words: veterinary antibiotics, florfenicol, sulfadiazine, tylosin, animal metabolism, degradation, ecotoxicity, environmental risk assessment

SEZNAM OKRAJŠAV

a.R.	aplicirana radioaktivnost
AF	»Assessment Factor« = varnostni faktor
ARG	»Antibiotic Resistance Gene« = geni za rezistenco na protimikrobne učinkovine
CVMP	»Committee for Medicinal Products for Veterinary Use« = Odbor za zdravila za uporabo v veterinarski medicini
CYP / CYP450	»Cytochrome / Cytochrome P450« = Citokrom / Citokrom P450
DNA	»Deoxyribonucleic acid« = Deoksiribonukleinska kislina
DT ₅₀	»Degradation Time« (50 %) = čas, v katerem se razgradi 50 % učinkovine
DT ₉₀	»Degradation Time« (90 %) = čas, v katerem se razgradi 90 % učinkovine
EC ₅₀	»Effect concentration« (50 %) = koncentracija, pri kateri je viden vpliv na 50 % testiranih organizmov
EDQM	»European Directorate for Quality of Medicinal Products« = Evropski direktorat za kakovost zdravil
EMA/EMEA	»European Medicines Agency« = Evropska agencija za zdravila
ERA	»Environmental Risk Assessment« = ocena tveganja za okolje
EU	Evropska unija
FDA	»Food and Drug Administration« = Agencija za hrano in zdravila v Združenih državah Amerike
GL	»Guideline« = smernica
IUPAC	»International Union of Pure and Applied Chemistry« = Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo
K _d	koeficient adsorpcije v zemlji
K _{oc}	koeficient adsorpcije v zemlji preračunan na vsebnost organskega ogljika
K _{onc.}	koncentracija
K _{ow}	porazdelitveni koeficient oktanol-voda

LC ₅₀	»Letal concentration« (50 %) = koncentracija, ki povzroči smrt pri 50 % testiranih organizmov
LOEC	»Lowest observed effect concentration« = najnižja koncentracija z opaznimi učinki
MIC	»Minimal Inhibitory Concentration« = minimalna inhibitorna koncentracija
NOEC	»No observed effective cocentration« = koncentracija brez opaznih učinkov
OECD	»Organisation for Economic Co-operation and Development« = organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj
PEC	»Predicted Environmental Concentration« = napovedana koncentracija v okolju
PEC _{groundwater}	napovedana koncentracija spojine v podzemnih vodah
PEC _{soil-initial}	začetna napovedana koncentracija spojine v zemlji (z upoštevanjem popolnega zaostanka)
PEC _{soil-refined}	napovedana koncentracija spojine v zemlji, zmanjšana na račun upoštevanja razgradnje
PEC _{surfacewater}	napovedana koncentracija spojine v površinskih vodah
pKa	konstanta disociacije oz. ionizacijska konstanta
PNEC	»Predicted No-Effet Concentration« = napovedano koncentracijo, ki nima vpliva na organizme
RNA	»Ribonucleic acid« = ribonukleinska kislina
RQ	»Risk Quotient«= kvocient tveganja
VICH	Mednarodna organizacija za usklajevanje tehničnih zahtev za pridobitev registracijskega dovoljenja veterinarskih preparatov (»International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products«)
ZDA	Združene države Amerike

1 UVOD

1.1 Veterinarske učinkovine in njihov vpliv na okolje

Veterinarska zdravila so pomembna skupina farmacevtskih izdelkov, ki se uporabljajo za zdravljenje obolelih živali oz. za zaščito njihovega zdravja. Zajemajo različne razrede učinkovin, kot so: antiparazitiki, protimikrobne učinkovine, hormoni, protivnetna zdravila, anestetiki, sedativi, bronhodilatatorji, antacidi, diuretiki in druge. Razen zdravil za zdravljenje in zaščito pred boleznimi so živali lahko izpostavljene še raznim prehranskim dodatkom za spodbujanje rasti (rastnim promotorjem), ki se dodajajo predvsem v prehrano živali namenjenih prehranski industriji. Med in po zdravljenju živali učinkovine vstopajo v okolje direktno z izpusti ali z iztrebki zdravljenih pašnih živali oz. posredno prek vnosa kontaminiranega gnoja ali gnojevke na kmetijske površine. Z razvojem točnejših analiznih metod z nizkimi mejami detekcije jih lažje identificiramo in natančneje določimo njihove koncentracije; znano je, da so nekatere prisotne v zemlji, površinskih in podzemnih vodah (1, 2, 3).

Učinkovine se iz telesa izločajo v različnih oblikah: v obliki starševskih molekul, kot bioaktivni presnovki z morebitnimi terapevtskimi in neželenimi učinki ali v obliki neaktivnih presnovkov. Izločene količine so odvisne od lastnosti učinkovine, načina aplikacije, vrste zdravljene živali in časa po odmerku. Pri nekaterih protimikrobnih učinkovinah (tetraciklini, sulfonamidi) se npr. izloči od 40 % do 90 % odmerka v nespremenjeni obliki (3).

Obstojnost učinkovin v okolju je različna, od nekaj dni do nekaj mesecev, in je lahko odvisna od pogojev katerim so učinkovine izpostavljene. Konstantno prisotne nizke koncentracije lahko kljub siceršnji netoksičnosti, zaradi dolgoročnega vpliva, predstavljajo nevarnost za okolje in ljudi. Preostanki teh spojin v vodi in zemlji lahko vplivajo na tam živeče organizme. Toksični učinki se kažejo na nivoju celic, organov, organizmov, populacij ali ekosistema; protimikrobne učinkovine (antibiotiki) npr. spodbujajo razvoj rezistence in selekcijo odpornejših, bolj škodljivih bakterij. Spremembe so lahko dolgoročne, ireverzibilne in možne že pri zelo nizkih koncentracijah. Pri rastlinah se učinki kažejo na biokemijskem in fiziološkem nivoju ter s spremembami signalnih poti. Lahko se pojavijo tudi spremembe na nivoju izražanja genov, regulacije in prenašanja signalov (1, 4).

Ljudje so učinkovinam v okolju lahko izpostavljeni na različne načine:

- z uživanjem poljščin, ki so med rastjo akumulirale toksične spojine iz prsti,
- s hrano živalskega izvora, saj lahko živali nenadzorovano akumulirajo veterinarske učinkovine prek prehranjevalne verige,
- z ribami, ki so bile izpostavljene preostankom učinkovin v vodnem okolju,
- prek onesnaženih površinskih in podzemnih voda.

Tako predstavljajo učinkovine, po tem ko pridejo v okolje, potencialno nevarnost za cel ekosistem, zato je potrebno poznavanje oz. ocena njihovih lastnosti in možnih tveganj. Podatki o toksičnosti najpogosteje uporabljenih veterinarskih učinkovin za različne vodne in kopenske organizme morajo biti dostopni. Predstavniki vodnih organizmov v študijah so običajno morske bakterije, fitoplankton, alge, ribe, raki ali vodne rastline, za oceno učinkov na zemeljski ekosistem pa se preučuje mikroorganizme, insekte, zemeljske črve in gliste ter kopenske rastline. Za določene veterinarske učinkovine je znano tveganje za okolje, vendar v splošnem njihova usoda, delovanje, učinki ter potencialni vplivi na okolje niso povsem raziskani.

1.2 Registracija veterinarskih učinkovin v EU in ocena njihovega vpliva na okolje

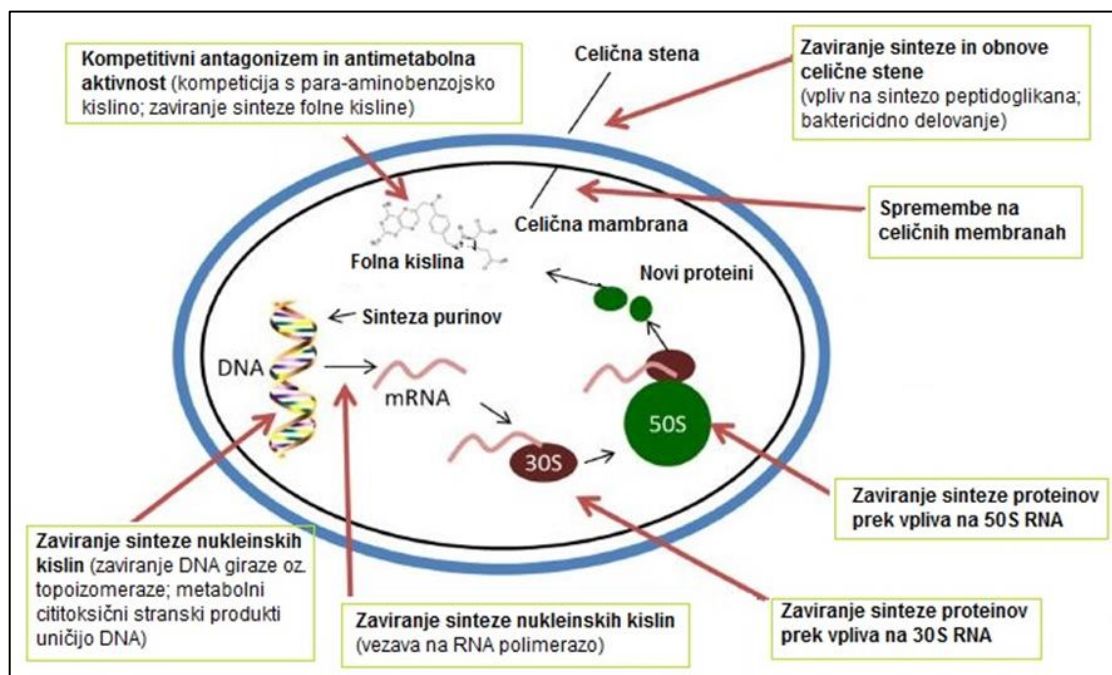
Vloga za pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom v EU je sestavljena iz: splošnega dela, farmacevtsko-kemijskega in biološkega dela, nekliničnega farmakološko-toksikološkega ter kliničnega dela. V dokumentaciji s farmakološko-toksikološko vsebino je za veterinarske učinkovine zahtevana ocena potencialnega tveganja za okolje (»Environmental Risk Assessment« - ERA), narejena po aktualnih navodilih Odbora za zdravila za uporabo v veterinarski medicini (»Committee for Veterinary Medicinal Products« - CVMP): »Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38«. To so harmonizirane smernice za določitev vpliva veterinarskih zdravil na okolje, ki veljajo v Evropski Uniji (EU), Združenih državah Amerike (ZDA), na Japonskem (JP) ter v Avstraliji oz. Novi Zelandiji in upoštevajo regionalne razlike v podnebjju, vrsti vode in prsti ter načinu živinoreje (5, 6).

1.3 Veterinarske protimikrobne učinkovine in tveganja njihove uporabe

Protimikrobne učinkovine ubijajo mikroorganizme (bakterije, arheje, virusi, protozoo, mikroalge, glive), zavirajo njihovo rast ali presnovo; tiste s specifičnim delovanjem na bakterije oz. glive v človeških ali živalskih gostiteljih imenujemo antibiotiki. So naravnega, sinteznega ali polsinteznega izvora. Naravne antibiotike proizvajajo bakterije ali glive (npr. benzilpenicilin, gentamicin) za zaviranje oz. uničenje konkurenčnih mikroorganizmov v okolju; polsintezni pa so pridobljeni s kemijsko obdelavo molekul naravnega izvora, da se jim poveča učinkovitost (npr. boljša stabilnost) (7).

Molekule protimikrobnih učinkovin so kompleksne; na osnovno kemijsko strukturo so vezane različne funkcionalne skupine, ki določajo njihov učinek. Razvrščamo jih na različne načine; kemijsko glede na osnovno strukturo molekule, znotraj te delitve pa po mehanizmu delovanja. Glavni načini delovanja protimikrobnih učinkovin so (Slika 1):

- Zaviranje sinteze oz. obnove celične stene pri bakterijah
- Spremembe na celičnih membranah bakterijskih celic
- Zaviranje sinteze bakterijskih proteinov (delovanje na 30S ali 50S RNA)
- Zaviranje sinteze nukleinskih kislin (zaviranje DNA-giraze ali polimeraze; vezava na RNA polimerazo)
- Kompetitivni antagonizem in antimetabolna aktivnost (7)



Slika 1: Glavne poti delovanja protimikrobnih učinkovin. (Povzeto po 7)

1.3.1 Namen uporabe protimikrobnih učinkovin pri živalih

V veterini se protimikrobne učinkovine uporabljajo za:

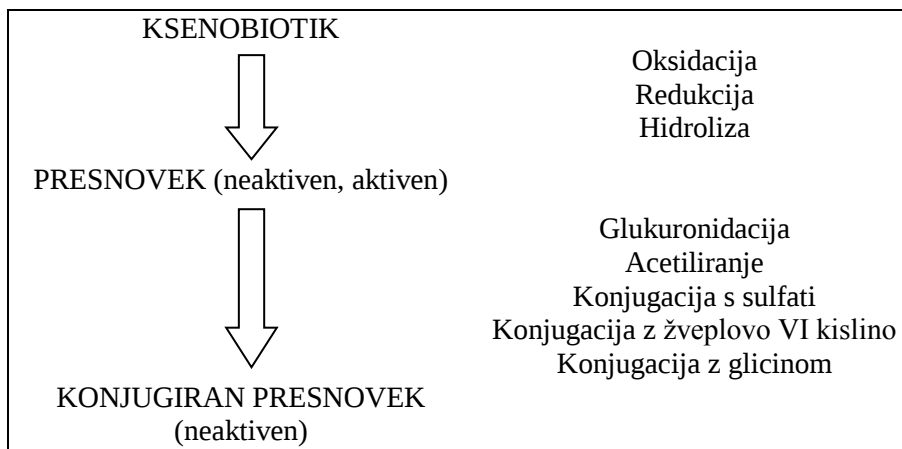
- Terapijo: to je zdravljenje klinično bolnih živali
- Nadzor bolezni: aplikacija skupini živali, pri katerih je v določenem času povečana umrljivost
- Preprečevanje bolezni: aplikacija živalim s tveganjem za razvoj bolezni že pred pojavom prvih znakov
- Pospeševanje rasti oz. povečanje telesne mase: protimikrobna učinkovina ugodno vpliva na absorpcijo hranil (dajejo se nizki odmerki, med 5 in 40 ppm, ki spremenijo presnovo mikrobnih populacij v črevesni flori živali) (3).

Odmerki učinkovin so odvisni od vrste in velikosti živali. Po aplikaciji se večji delež odmerka v organizmu ne absorbira in presnovi; študije ocenjujejo, da se 75 – 90 % učinkovine iz odmerka izloči nespremenjene; količina je sicer odvisna od narave molekul, živalske vrste, načina aplikacije in trajanja zdravljenja. Lahko pa se delno presnovi (reakcije oksidacije, redukcije: demetiliranje, hidroksiliranje, dehalogeniranje) in konjugira s polarnimi molekulami (glukuronska kislina, očetna kislina, žveplove VI kislina, glutation, glicin) ter nato hitro izloči iz telesa z urinom oz. fecesom. Nekateri konjugati se v okolju pretvorijo ponovno v starševske spojine. Tak primer so acetilirane molekule, ki so neaktivne in težko določljive v analizah. V gnoju se med skladiščenjem acetilna skupina lahko odcepi in sprosti se biološko aktivna starševska molekula. V fazi skladiščenja gnoja se pogosto konjugirane oz. nekonjugirane učinkovine razgrajujejo do manj aktivnih in manj toksičnih produktov, oziroma se ireverzibilno vežejo na delce gnoja in so tako biološko nerazpoložljive. Upoštevati je potrebno tudi, da nekateri presnovki ohranijo biološko aktivnost in s tem terapevtske oz. neželene učinke na organizme v okolju (2, 8).

1.3.2 Presnova učinkovin v živalih

Presnova ali biotransformacija je sklop encimskih reakcij, v katerih se ksenobiotik preoblikuje in s tem lažje izloči iz telesa. Zmanjša se lipofilnost in poveča polarnost molekul, tako so presnovki bolje topni v vodi kot starševske molekule. Presnova se začne takoj po absorpciji in poteka vzporedno z nadaljnjimi procesi absorpcije, porazdelitve ter izločanja; potek je odvisen od strukturne formule, fizikalnih in kemijskih lastnosti ter reaktivnosti aktivne spojine. Določene učinkovine so polarne in dovolj hidrofilne, da se

lahko izločijo nespremenjene (npr. penicilini in aminoglikozidi se izločijo z urinom v aktivni obliki) (8).



Slika 2: Potek presnove učinkovin. (Povzeto po 8)

Pri presnovi sta običajno prisotni dve fazi; prva je priprava molekul za reakcije konjugacije v drugi fazi (Slika 2). Tu potekajo oksidativni procesi (oksidacije oz. redukcije), dealkiliranje oz. hidroksiliranje. Presnova večine učinkovin poteka z encimi citokrom P450 (CYP450), ki se nahajajo v gladkem endoplazmatskem retikulumu celic. Ti se delijo na družine in poddružine in so vključeni v 70 - 80 % reakcij presnove. Pri različnih živalskih vrstah so prisotne oz. bolj izražene različne družine encimov, poleg tega so med vrstami tudi razlike v aktivnosti encimov iz določene družine. Na aktivnost encimov CYP450 vpliva vrednost porazdelitvenega koeficienta oktanol-voda (K_{ow}) učinkovin; pri bolj lipofilnih spojinah ($\log K_{ow} > 0$) je encimski sistem CYP bolj aktiven kot pri manj lipofilnih ($\log K_{ow} < 0$) zato, da se poveča njihova vodotopnost in s tem izločanje iz telesa. Med prvo fazo presnove se večina učinkovin deaktivira, nekatere pa se šele pretvorijo v aktivno obliko (predzdravila); določene protimikrobne učinkovine se presnovijo v drugo aktivno obliko (npr. pri psih in piščancih se enrofloksacin pretvori v ciprofloksacin) (8, 9).

V drugi fazi presnove poteka konjugacija molekul ksenobiotikov s polarnimi spojinami. V glavnem z glukuronsko kislino (glukuronidacija), ocatno kislino (acetiliranje), manj pogosto z žveplovo VI kislino, glutationom ali glicinom. Nastanejo vodotopne, večinoma neaktivne molekule, ki se lahko izločijo (8).

Pomemben parameter za primerjavo izločanja učinkovin med vrstami je razpolovni čas eliminacije, ki pove čas, v katerem se količina učinkovine v krvni plazmi zniža na polovico začetne vrednosti. Običajno je neodvisen od odmerka, saj eliminacija v glavnem poteka po kinetiki prvega reda, po kateri se določen del učinkovine izloči iz telesa v določenem času.

Pri zelo visokih odmerkih, kjer pride do zasičenja procesov eliminacije, je prisotna kinetika ničelnega reda z daljšimi razpolovnimi časi. Na osnovi razpolovnega časa se določa odmerek in interval odmerkov, predvidijo se toksični učinki za žival (8).

Veterinarske učinkovine, ki se v večji meri (ekstenzivno) presnavljajo, po smernicah Evropske komisije za zdravila (»European Medicines Agency« - EMA) ne predstavljajo tveganja za okolje, zato se lahko zanje ERA zaključi v prvi fazi. Ko predstavljajo presnovki med 5 in 10 % apliciranega odmerka, se lahko koncentracija presnovka odšteje od celotnega odmerka učinkovine, ki se ga aplicira živali (9).

1.3.3 Širjenje preostankov učinkovin in njihovih presnovkov v okolje

Glavni vir protimikrobnih učinkovin za okolje so iztrebki, ki nastajajo pri živinoreji. (Slika 3). Prisotne so tudi v odpadnih vodah in blatu iz humanih naselij, saj se v čistilnih napravah ne odstranijo oz. razgradijo popolnoma. Manjši vir učinkovin so še izpusti iz proizvodnih procesov, ki v EU in ZDA sicer ne predstavljajo večje nevarnosti zaradi dokaj strogih regulatornih nadzorov (1).

Po vstopu v ekosistem se preostanki učinkovin lahko s spiranjem z deževnico ali ob namakanju kmetijskih površin širijo na kopenskem površju, prehajajo v globlje plasti zemlje ali vstopijo v vodni ekosistem (površinske in podzemne vode); vir protimikrobnih učinkovin za vodno okolje je tudi gojenje vodnih rastlin ali živali (3).



Slika 3: Poti protimikrobnih učinkovin po izločanju iz živali. (Povzeto po 3)

1.3.4 Protimikrobne učinkovine v okolju

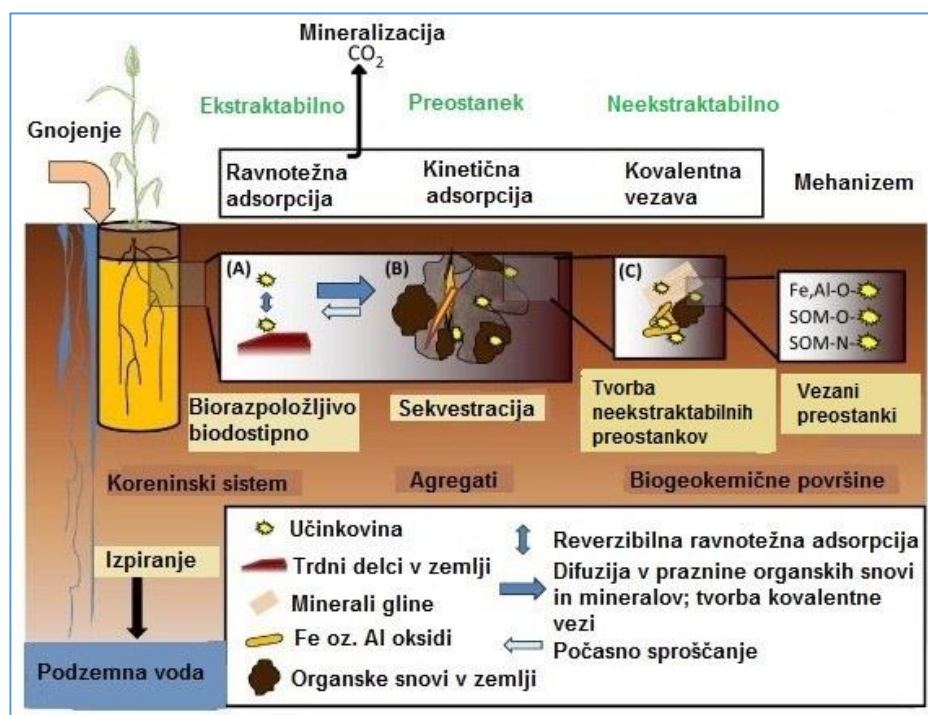
Koncentracije protimikrobnih učinkovin prisotnih v okolju (prsti ali vodi) so različne, od nekaj pg do 100 µg na L oz. kg prsti. Visoke koncentracije niso vedno posledica velikega ali konstantnega vnosa učinkovin v okolje, ampak tudi dobre obstojnosti nekaterih spojin, ki je sicer med molekulami zelo različna. Penicilini npr. imajo slabo obstojnost zaradi hitre hidrolize β-laktamskega obroča v strukturi; fluorokinoloni (ciprofloksacin), makrolidi (tilozin) in tetraciklini, ki so obstojnejši, se lahko ob pretirani rabi s časom nalagajo v okolju in lahko dosežejo koncentracije, pri katerih se pojavijo učinki na okolje oz. prisotne organizme. Če protimikrobna učinkovina deluje v sinergiji z drugimi soprisotnimi ksenobiotiki, se te koncentracije še prej dosežejo (7).

Struktura molekule določa njene kemijske in fizikalne značilnosti. Molekula je lahko ionizirana, amfifilna ali amfoterna, kar vpliva na stopnjo adsorpcije na delce v okolju, ki je sicer določena tudi z molekulsko strukturo, velikostjo, obliko, topnostjo in hidrofobnostjo. Proces adsorpcije v prvi vrsti določajo lastnosti zemlje (pH, velikost delcev, prisotne organske snovi in minerali), v drugi vrsti pa lastnosti molekule (K_{ow} , vodna topnost, pKa, funkcionalne skupine). Adsorpcija na delce prsti vpliva na razgradnjo, transport in bioakumulacijo preostankov učinkovin ter s tem toksičnost v okolju. Ocena adsorpcijskega potenciala učinkovin je izražena s porazdelitvenim koeficientom zemlja-voda (K_d) (t.j. razmerje med konc. učinkovine v zemlji in njeno konc. v vodi) oz. s K_{oc} , ki upošteva še vsebnost organskega ogljika v zemlji, kar omogoča boljšo primerljivost med vrstami prsti (4, 10).

V osnovi je to reverzibilni ravnotežni proces difuzije molekul učinkovine med delce organskih snovi in mineralov ter tvorbe kovalentne vezi. Proces desorpcije je nasprotujoč in omogoča postopno sproščanje molekul s teh površin. Biološka dostopnost in razpoložljivost učinkovine se s časom zmanjšuje, saj sekundarni adsorpcijski procesi in difuzija učinkovine v mikro- in nanopore začasno zmanjšajo dostopnost molekul za encime in mikroorganizme. To je proces sekvestracije, s katerim se zmanjša toksičnost, a podaljša čas zadrževanja substance v prsti, saj je zmanjšana njena dostopnost za procese razgradnje oz. odstranjevanja. Vzporedno z reverzibilnimi ravnotežnimi procesi adsorpcije in sekvestracije del molekul tvori neekstraktibilne preostanke. Ti lahko nastanejo z encimsko katalizirano tvorbo kovalentnih vezi ali z difuzijo učinkovine v prostore znotraj togih struktur trdnih delcev organskih snovi (npr. nanopore v oksidih) in notranjih plasteh mineralov (11).

Zgoraj opisani procesi so prikazani na spodnji sliki (Slika 4), kjer črke označujejo:

- A) Biorazpoložljivo oz. biodostopno frakcijo = tj. raztopljeno in reverzibilno vezano učinkovino, ki se enostavno ekstrahira z blagimi ekstrakcijskimi sredstvi (razredčene raztopine soli).
- B) Sekvestracijo = tj. kinetično sorpcijo in difuzijo v praznine organskih snovi, mineralov in mikro agregatov v prsti; Ti preostanki se le delno ekstrahirajo pod ostrimi ekstrakcijskimi pogoji (visoka T in tlak).
- C) Neekstraktibilne preostanke = tj. učinkovine ireverzibilno vezane v nanopore s kovalentnimi vezmi



Slika 4: Poti in procesi preostankov oz. presnovkov učinkovin v zemlji. (Povzeto po 11)

1.3.5 Razgradnja učinkovin v okolju

Razgradnjo ksenobiotikov v zemlji večinoma vodijo mikrobní procesi in encimske reakcije, kot sta oksidativna dekarboksilacija, oksidacija in hidroksilacija. Pred vstopom v okolje se učinkovine v živalih presnovijo. Presnovki, ki pri tem nastanejo, se po prehodu v okolje lahko pretvorijo nazaj v starševske spojine ali nadalje razgrajujejo v iztrebkih, gnoju oz. zemlji. V zemlji z dodanim živinskim gnojem je biorazgradnja učinkovin pospešena zaradi večjega števila mikroorganizmov. Na splošno je zemlja obsežen rezervoar mikroorganizmov, ki so pomembni tudi za kroženje snovi. Protimikrobne učinkovine

vplivajo na sestavo in funkcijo teh mikrobnih združb ali pa spodbudijo prilagoditev in razvoj odpornosti bakterij v okolju. Dokazali so, da pride v zemlji ob ponovni aplikaciji iste ali podobnih protimikrobnih učinkovin do prilagoditve organizmov, ki sodelujejo v procesih razgradnje, pri čemer se čas razgradnje opazno skrajša (12, 7).

Razgradnja je praviloma hitrejša in popolnejša pri aerobnih pogojih. V anaerobnem okolju je proces zmanjšan oz. upočasnen (npr. pri tilozinu, sulfadiazinu, oksitetraciklinu) ali ne poteka (npr. pri ciprofloksacinu). Potek razgradnje je odvisen od strukture molekul učinkovine (npr. makrolidi in penicilini se v zemlji hitro razgradijo). Z vezavo na površine oz. v pore trdnih delcev prsti se biorazpoložljivost učinkovine zmanjša pod mejno koncentracijo, ki je potrebna za začetek biološke razgradnje; tako lahko ostanejo učinkovine (npr. tetraciklini) v zemlji tudi več mesecev. Produkti biorazgradnje protimikrobnih učinkovin (npr. mnogi presnovki fluorokinolonov) lahko ohranijo protimikrobno delovanje, zato znižanje koncentracije učinkovine ne pomeni vedno znižanja toksičnosti za mikroorganizme. Tilozin A se na primer v kislem mediju pretvori v še vedno aktiven tilozin B, v nevtralnem in alkalnem mediju pa nastaja aldol-tilozin A in več polarnih razgradnih produktov z manjšo biološko aktivnostjo (12).

Na razgradnjo v okolju poleg intrinzičnih lastnosti spojin vplivajo različni dejavniki okolja; v kopenskem ekosistemu so to temperatura, vrsta prsti, delež gnoja v zemlji oz. prisotnost živalskih izločkov, pH in količina UV žarkov. Učinkovine so običajno obstojnejše pri nižjih temperaturah in manj svetlobe, kar pomeni, da ostanejo dlje v nižjih plasteh prsti in globlje v vodah. Tip oz. sestava prsti določa adsorpcijo, saj imajo različni delci različne adsorpcijske lastnosti. Gnoj in živalski izločki spremenijo količino organski snovi ter pH prsti, kar vpliva na adsorpcijo in druge procese (10).

Poleg biorazgradnje poteka v okolju abiotska razgradnja s procesi hidrolize in fotolize. Večina učinkovin je načrtovanih za peroralno aplikacijo, zato so odpornejše na hidrolizo. Tako se predvideva, da je glavni mehanizem abiotske transformacije v površinskih vodah direktna ali indirektna fotoliza. V kopenskem okolju, razen na površini, fotorazgradnja ni pomembna, saj svetloba težje prodira v nižje plasti. Direktna fotoliza je posledica direktne absorpcije svetlobe, pri indirektni pa sodelujejo fotoaktivatorji, kot so nitrati in huminske kisline, ki fotolizo pospešijo. V študiji fotorazgradnje šestih protimikrobnih učinkovin so ugotovili, da je v vodnih raztopinah z nitratnimi ioni (s koncentracijo 5 - 15 mg/L) pri vseh učinkovinah zmanjšanj razpolovni čas. Vpliv huminskih kislin je različen. Glede na

rezultate študij ioni, kot so nitrati in kloridi ter organske snovi, kot so huminske kisline, spodbujajo fotorazgradnjo protimikrobnih učinkovin prisotnih v naravi (10).

1.3.6 Prispevek protimikrobnih učinkovin k pojavu rezistence

Stalna prisotnost protimikrobnih učinkovin v okolju pomeni za organizme kronično izpostavljenost z možnim toksičnim vplivom in posrednimi učinki na mikroorganizme, na katere sicer nimajo direktnega vpliva. Najbolj zaskrbljujoče je tveganje za razvoj in širjenje rezistence, to lahko predstavlja resno nevarnost za zdravje ljudi in živali. Nevarne so nizke koncentracije (tj. nanogrami na liter ali kilogram prsti), nižje od minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), za katere je dokazano, da spodbujajo horizontalni prenos genov za rezistenco (11).

Za najpogostejše uporabljane protimikrobne učinkovine so določili vrednosti koncentracij brez vpliva na organizme («Predicted No-Effect Concentration» - PNEC) med 0,008 in 64 µg/L, predvidene najnižje minimalne inhibitorne koncentracije pa med 0,69 – 32,000 µg/L. Posledice prisotnosti takšnih nizkih koncentracij so:

- Selekcija rezistentnih organizmov (obogatitev predhodnih bakterij ali selekcija rezistentnih vrst)
- Spodbujanje genetskih in fenotipskih sprememb (večja prilagodljivost)
- Funkcija signalnih molekul (sodelovanje v fizioloških procesih kot so virulenca, gradnja biofilmov, izražanje genov) (7)

Rezistenca za protimikrobne učinkovine je lahko naravna, normalno prisotna pri bakterijah v različnih naravnih okoljih, ali pridobljena na osnovi onesnaževanja človeškega izvora. Naravna rezistenca je rezultat evolucijske prilagoditve (homeostaza) mikroorganizmov na prisotnost naravnih snovi, ki zavirajo njihovo rast in omogoča tem organizmom, da preživijo in se razmnožujejo kljub prisotnosti molekul, ki zavirajo njihovo rast. Da so se mikroorganizmi lažje prilagodili okolju, so razvili različne mehanizme:

- tvorijo encime, ki deaktivirajo antibiotike (npr. β-laktamaze),
- spremenjena prepustnost bakterijskih celičnih sten (mutacije porinov), kar preprečuje vstop antibiotika v celice,
- spremenjena tarčna mesta antibiotikov znotraj bakterijskih celic,
- aktivni transportni sistemi v celičnih stenah, ki preprečujejo kopičenje molekul antibiotikov v celicah,
- alternativne poti presnove (7).

Zaradi zavedanja nevarnosti rezistence v določenih državah izvajajo aktivnosti za zmanjšanje onesnaženja okolja s protimikrobnimi učinkovinami in geni za rezistenco. V EU je od leta 2006 prepovedana uporaba teh učinkovin kot rastnih promotorjev, saj nizki odmerki (minimalne inhibitorne koncentracije), ki se uporabljajo s tem namenom spodbujajo nastanek in širjenje rezistence. V ostalih državah po svetu (npr. Amerika, Kanada, Azija) še vedno uporabljajo protimikrobne učinkovine tudi za spodbujanje rasti. Nekateri raziskovalci so dokazali, da se z zmanjšanjem vnosa protimikrobnih učinkovin v okolje zmanjša tudi količina genov za rezistenco (»Antibiotic Resistance Gene« - ARG) in njihov prenos na človeške patogene, drugi pa menijo, da je takšno zmanjševanje rezistence počasno ter da so rezistentne populacije dolgo obstojne v okolju. Glede na to, da se nekateri geni za rezistenco najdejo tudi v okolju, ki ni bilo onesnaženo s protimikrobnimi učinkovinami, menijo, da se ARG lahko ohranjajo tudi brez selekcijskega pritiska teh učinkovin (7).

1.4 Ravnanje z iztrebki živali, izpostavljenih protimikrobnim učinkovinam in prenos iztrebkov v okolje

Področja kopenskega okolja najbolj izpostavljena onesnaženju z veterinarskimi učinkovinami, so kmetijski ekosistemi, kot so njive in polja, saj se vanje konstantno vnašajo večje količine živinskega gnoja oz. organskih odpadkov. Vir učinkovin je predvsem onesnažen živinski gnoj, biološki odpadki, odplake in sedimenti, drugi viri onesnaženja so odpadne vode iz čistilnih naprav, neprečiščene odpadne vode ter površinske oz. podzemne vode, ki pogosto vsebujejo preostanke protimikrobnih učinkovin. Poleg živalskih izločkov so lahko vir učinkovin za okolje tudi prašni delci, ki nastajajo na živalskih farmah (5,14).

V EU se z živinorejo pridela okrog 1400 milijonov ton gnoja letno. Živinska gnojila so hlevski gnoj, gnojevka, gnojnica in izločki živali na paši. Hlevski gnoj so iztrebki rejenih živali (blato, urin) pomešani s steljo (slama, žagovina, suho listje), ki služi za adsorpcijo izločkov v hlevu; gnojevka je brez ali z le malo stelje in ima dodano vodo; gnojnica pa je mešanica živalskega seča, vode in snovi, ki nastanejo ob naravni presnovi seča ter odcednih voda iz gnojišč (14).

Gnoj je pomemben za ohranjanje oz. obnavljanje rodovitnosti prsti, problem velikih količin gnoja pa je onesnaženje vode in evtrofikacija, kar pomeni povečanje količine biomase v vodi zaradi povečane koncentracije anorganskih hranil v ekosistemu. Poleg pronicanja

nitratov/fosfatov in amonijevih snovi iz prsti v vodo k pojavu prispevata še onesnaženje zraka s toplogrednimi plini ter izpusti amonijaka. Zaradi naraščanja deleža nitratov v vodah na določenih območjih držav članic Evropske unije, je bila sprejeta Nitratna direktiva (Direktiva Sveta 91/676EEC o varstvu voda pred onesnaženjem z nitrati iz kmetijskih virov, sprejeta 12. decembra 1991), ki od držav članic EU zahteva zmanjšanje onesnaženja voda z nitrati iz kmetijstva. Proizvodnja gnoja je tako nadzirana, določene so mejne vrednosti vnosa nevarnih snovi in gnojil v tla, po katerih obremenitev zemlje z dušikom iz živinskih gnojil ne sme preseči 170 kg na hektar prsti na leto (15, 16).

Pred vnosom na kmetijske površine se živinska gnojila običajno najprej nekaj časa ustrezno skladiščijo z namenom zmanjšanja nevarnosti za onesnaženje voda. Procesi, ki pri tem potekajo, so ugodni tudi za razgradnjo veterinarskih učinkovin. Skladiščenje običajno traja 1 – 4 mesece (odvisno od klimatskih razmer in značilnosti posameznega področja) v ustreznih zbiralnikih, ki so izdelani tako, da ne pride do izlivanja, izpiranja oz. odtekanja v okolje. Tekoče oblike gnoja (gnojevka, gnojnica) se večinoma pri prašičjih iztrebkih skladiščijo v kovinskih cisternah (tj. vodotesnih zbiralnikih) pri anaerobnih pogojih, trdni iztrebki, predvsem perutninski, goveji, ovčji in kozji se običajno kompostirajo. Prevladuje odprto kompostiranje, kjer je gnoj skladiščen v kopah na utrjenih, za tekočine nepropustnih tleh ali v zaprtih reaktorjih s kontroliranimi pogoji. Kope gnoja imajo na površini aerobne, v notranjosti pa anaerobne pogoje in so izpostavljene sončni svetlobi, padavinam in drugim dejavnikom okolja. Manj značilna oblika skladiščenja prašičje gnojevke so lagune, kjer prevladujejo anaerobni pogoji ob prisotnosti svetlobe (aeroben je samo površinski sloj); mikrobna aktivnost je tu v primerjavi z gnojevko v cisterni bolj intenzivna (14, 15, 18).

S kompostiranjem in anaerobno fermentacijo se lahko zaradi razgradnje koncentracija učinkovin v živalskem gnoju precej zmanjša. Stopnja razgradnje je odvisna od vrste učinkovine, tipa gnoja in pogojev pri skladiščenju gnoja. Aplicirane učinkovine se najprej presnavljajo v zdravljeni živali, po izločanju pa se razgradnja nadaljuje v izločkih in zemlji. Če se nastali presnovki in preostanki učinkovine počasi razgrajujejo. So lahko te spojine toksične za okolje. V nekaterih študijah so določili, da presnovki v gnoju negativno vplivajo na sisteme obdelave gnoja, kot so procesi anaerobne razgradnje in nitrifikacijski sistemi (14).

Gnojijo se polja in travniki. Polja običajno gnojijo dvakrat letno, spomladi in jeseni. Tu se gnoj vmeša v zgornjo plast zemlje približno do 0,20 m globoko. Travniki se gnojijo do

štirikrat letno. Pri tem se uporabljajo predvsem tekoče oblike gnoja (gnojevka ali gnojnica), ki se brizgajo oz. razpršujejo po površini tal in pronikajo nekje do 0,05m v tla (9).

1.5 Najpogosteje uporabljene protimikrobne učinkovine v veterini

1.5.1 FLORFENIKOL

Florfenikol je sintezna protimikrobna učinkovina s širokim spektrom delovanja proti večini Gram negativnim in Gram pozitivnim organizmom, namenjen uporabi le v veterini. Kot ostali fenikoli zavira sintezo bakterijskih proteinov na nivoju ribosomov in ima bakteriostatični učinek. Z difuzijo vstopi v bakterijsko celico ter z vezavo na 50S in 70S podenoti ribosomov zavira sintezo proteinov. Spada v isto skupino učinkovin kot kloramfenikol in tiamfenikol, vendar je manj toksičen in ne povzroča od odmerka odvisne supresije kostnega mozga oz. ireverzibilne aplastične anemije pri ljudeh, kot kloramfenikol, ki je zaradi tega prepovedan za uporabo pri živalih gojenih za namen prehrane. Tiamfenikol in florfenikol nimata para-nitro skupine, ki je odgovorna za povzročanje aplastične anemije v primeru kloramfenikola. Florfenikol ima poleg tega na tretjem ogljiku alkoholne verige atom fluora namesto hidroksilne skupine, zato ni občutljiv na delovanje encima kloramfenikol acetil-transferaze, ki bakterijam omogoča razvoj rezistence (20). Tako je učinkovit tudi proti kloramfenikol rezistentnim sevom, kot so: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella Typhimurium* in *Staphylococcus aureus*. Pri sesalcih se florfenikol uporablja predvsem za zdravljenje respiratornih bolezni, ki jih pri govedu povzročajo *Pasteurella hemolytica*, *Pasturella multocida* in *Haemophilus somnus*; pri prašičih pa *Actinobacillus Pleuropneumonia* in *Pasturalla multocida*. Pri govedu se lahko kljub nekoliko manjši učinkovitosti uporablja tudi za zdravljenje mastitisa (21,22).

Florfenikol se zaradi relativno dobre topnosti v lipidih dobro porazdeljuje v telesna tkiva, v mnogih dosega visoke koncentracije. V tkivih je prisotna starševska molekula učinkovine in njeni presnovki: florfenikol-amin, florfenikol-alkohol, folrfenikol oksamska kislina, monoklorid florfenikol. Povprečni čas eliminacije je 64 do 80 ur. Pri prašičih in govedu se primarno izloča v urinu (63 - 71 %) večinoma v osnovni obliki, sekundarno pa z blatom, v osnovni obliki ali v obliki presnovkov (florfenikol-amin, oksamska kislina) (19).

1.5.2 SULFADIAZIN

Sulfadiazin je protimikrobna učinkovina iz skupine sulfonamidov. Sulfonamidi so kompetitivni inhibitorji encima dihidropteroat sintetaze, ki katalizira pretvorbo p-aminobenzojske kisline v dihidropteroat, predstopnjo folata oz. folne kisline. Z oviranjem nastajanja tetrahidrofolne kisline je zavrt biosinteza purinskih in pirimidinskih baz, ni sinteze DNA in RNA ter s tem proteinov, zato je onemogočeno podvajanje celic, kar pomeni bakteriostatični učinek. Pri sesalcih ne poteka celotna sinteza tetrahidrofolne kisline, dihidrofolno kislino dobijo s hrano; to omogoča selektivno toksičnost sulfonamidov za bakterijske celice. V terapiji se pogosto uporabljajo skupaj z diaminopirimidini (npr. s trimetoprimom), ki so kompetitivni antagonisti dihidrofolat reduktaze, encima za pretvorbo dihidrofolne v tetrahidrofolno kislino. Takšno sinergistično delovanje pomeni zaviranje iste kaskade reakcij na dveh različnih tarčah in s tem učinkovitejšo terapijo kot v primeru samo sulfonamidov (23, 25).

Sulfadiazin deluje bakteriostatično za določene Gram pozitivne in Gram negativne bakterije in se uporablja za zdravljenje sistemskih infekcij, pri različnih živalih. Zanj občutljivi organizmi so: *Actinobacilli*, *Actinomycae*, *Bordetella* spp, *Brucella*, *Corynebacteria*, *Escherichia coli*, *Haemophilus* spp, *Klebsiella* spp, *Pasteurella* spp, *Pneumococci*, *Proteus*, *Salmonella* spp, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Vibrio* (23, 24).

Po peroralni aplikaciji se pri monogastričnih živalih (psi, konji, prašiči) hitro absorbira in porazdeli v tkiva. V jetrih se presnovi v pretežno acetilirane in delno v hidroksilirane derivate; stopnja presnove je 80 – 100 %, odvisno od živalske vrste; razpolovni čas je pri konjih 4 ure, 2 uri pri prašičih, 1 uro pri govedu. Izloča se predvsem prek ledvic z glomerulno filtracijo in aktivnim tubulnim izločanjem, pri čemer je v 24 urnem urinu 50 % odmerka; razpolovni čas eliminacije je pri prašičih 2,9 h (23).

1.5.3 TILOZIN

Tilozin je naravni antibiotik iz skupine makrolidov. Pridobiva se s fermentacijo, pri čemer sodeluje sev *Streptomyces fradiae*. Nastane mešanica štirih farmakološko aktivnih produktov (tilozina A, ki predstavlja več kot 80 %, tilozina B (oz. dezmikozina), tilozina C (oz. makrocina) in tilozina D (oz. relomicina)), z različno reaktivnostjo. V terapevtskih koncentracijah ima predvsem bakteriostatično delovanje s časovno odvisnim učinkom.

Mehanizem njegove protimikrobne aktivnosti je podoben kot pri ostalih makrolidih; z reverzibilno vezavo na 50S podenoto ribosomov zavira sintezo proteinov (26).

Deluje proti določenim Gram pozitivnim in Gram negativnim bakterijam (npr.: Gram pozitivnim kokom (*Staphylococci*, *Streptococci*), Gram pozitivnim bacilom (*Arcanobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Erysipelothrix*, *Actinomyces*), nekaterim Gram negativnim bacilom (*Haemophilus* spp., *Pasteurella* spp., *Mannheimia* spp.)) ter različnim vrstam mikoplazm. Na anaeroobe običajno nima učinka, prav tako ne vpliva na enterobakterije (*Sanmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia Coli*). Tilozin in njegove fosfatne oz. tartratne soli so registrirane samo za uporabo v veterini, primarno za zdravljenje respiratornih bolezni pri govedu, griže pri prašičih, kroničnih respiratornih bolezni pri piščancih in infekcijskega sinusitisa pri puranih. Aplicira se s krmo, pitno vodo ali intramuskularno injekcijo, odvisno od vrste živali (26, 27).

Tilozin je šibka organska baza in s kislinami hitro tvori estre ali soli. Po absorpciji se šibko do zmerno veže na plazemske proteine, ker je dobro topen v lipidih, se dobro porazdeljuje v telesnih tkivih in telesnih tekočinah, porazdelitveni volumni so pri različnih živalih različni, večinoma višji od 1,1 L/kg (tudi do 14,6 L/kg pri prašičih). Med vrstami živali so razlike tudi v eliminaciji. Pri podganah in prašičih se večinoma izloča z žolčem v blato (94 – 99 %) in malo (1 – 6 %) z urinom. Kot lipofilna šibka baza tilozin dobro prehaja iz krvne plazme v mleko, ki ima nižji pH; višje koncentracije tilozina so pri kravah našli tudi v genitalnih izločkih (28).

2 NAMEN

Protimikrobne učinkovine se uporabljajo v obsežnih količinah tako v humani medicini kot v veterini. V veterini predstavljajo več kot 70 % vseh uporabljenih učinkovin. Uporabljajo se predvsem pri gojenju prašičev in perutnine. Poraba sledi trendu porasta živinoreje za namen proizvodnje hrane, saj se z zaščito zdravja živali preprečujejo ekonomske izgube in zagotavljajo zaloge živil. V državah Evropske unije je bilo v letu 2014 prodanih 9.065 ton veterinarskih protimikrobnih učinkovin (približno 0,8 % za zdravljenje hišnih ljubljencev, ostalih 99,2 % v živinoreji in konjereji); od tega se je v Sloveniji prodalo okrog 6 ton. Za Združene države Amerike je Agencija za hrano in zdravila («Food and drug Administration» - FDA) za leto 2014 ocenila 15.358 ton prodanih veterinarskih protimikrobnih učinkovin. Največja je poraba tetraciklinov, penicilinov, sulfonamidov in makrolidov (29).

Lastnosti veterinarskih protimikrobnih učinkovin in njihov vpliv na okolje še niso prav dobro poznani in povsem raziskani. Nekatere učinkovine v okolju ohranjajo protimikrobno aktivnost ali so toksične za prisotne organizme, pri nekaterih nastanejo toksični produkti s presnovo v živali ali z razgradnjo v okolju. V literaturi objavljeni rezultati dosedanjih študij so variabilni zaradi različnih načinov testiranja, potrebno je kritično vrednotenje razpoložljivih informacij.

V magistrski nalogi želimo oceniti vpliv veterinarskih protimikrobnih učinkovin na okolje. Najprej bomo predstavili veterinarske učinkovine in tveganja njihove uporabe za okolje na splošno ter nekaj besed namenili registraciji tovrstnih zdravil in zahtevam, s katerimi se nadzoruje njihov vpliv na okolje. Nato se bomo osredotočili na tri izmed najpogostejše uporabljenih učinkovin: florfenikol, sulfadiazin in tilozin. Zanje bomo naredili pregled podatkov o fizikalno-kemijskih lastnostih, značilnostih v kopenskem in vodnem okolju ter vplivu na organizme v okolju, zbranih iz literature in dostopnih podatkovnih baz. S pomočjo teh podatkov bomo v skladu z navodili Odbora za zdravila za uporabo v veterinarski medicini (CVMP), naredili izračun tveganja za okolje za posamezno učinkovino, kot je zahtevano ob registraciji zdravil. Skušali bomo ugotoviti morebitno povezavo med fizikalno-kemijskimi lastnostmi učinkovin, presnovo v tarčnih živalih, razgradnjo v okolju in ekotoksičnostjo.

Z raziskovalnim delom želimo preveriti hipotezo o tem, da se toksičnost učinkovin za okolje lahko zmanjša z njihovo intenzivno razgradnjo v iztrebkih in zemlji ali z njihovo ireverzibilno vezavo na anorganske oz. organske snovi.

3 MATERIALI IN METODE

Raziskovalno delo je zajemalo:

- zbiranje dostopnih, trenutno razpoložljivih informacij o fizikalno-kemijskih lastnostih veterinarskih protimikrobnih učinkovin (florfenikol, sulfadiazin, tilozin) in podatkov o njihovi toksičnosti za okolje ter prisotne organizme,
- izračun parametrov za oceno potencialnega vpliva učinkovin na okolje v skladu s smernicami VICH GL6 in GL38 (33), po katerih se ocenjuje tveganje učinkovine za okolje ob registraciji zdravilnih učinkovin,
- primerjavo zbranih informacij o posameznih učinkovinah med sabo in s parametri pridobljenimi z izračuni.

3.1 Materiali

V magistrski nalogi smo se osredotočili na tri izmed najpogosteje uporabljanih protimikrobnih učinkovin, za katere smo s pregledom literature uspeli zbrati največ informacij. To so:

- **Florfenikol** - IUPAC ime (30): 2,2-dikloro-N-((1R,2S)-3-floro-1-hidroksi-1-[4-(metansulfonil)fenil]propan-2-il}acetamid
- **Sulfadiazin** – IUPAC ime (31): 4-amino-N-(pirimidin-2-il)benzen-1-sulfonamid
- **Tilozin** – IUPAC ime (32): [(2R,4E,6E,9R,11R,12S,13S,14R)-12-{[3,6-dideoksi-4-O-(2,6-dideoksi-3-C-metil-alfa-L-ribo-heksopiranozil)-3-(dimetilamino)-beta-D-glukopiranozil]oksi}-2-etil-14-hidroksi-5,9,13-trimetil-8,16-diokso-11-(2-oksoetil)-1-oksacikloheksadeka-4,6-dien-3-il]metil 6-deoks-2,3-di-O-metil-beta-D-alopiranozid

3.2 Metode

3.2.1 Zbiranje podatkov

Podatki o izbrani temi so bili pridobljeni z raziskavo in kritičnim vrednotenjem internetnih virov ter preglednih in raziskovalnih znanstvenih člankov. Osredotočili smo se na novejša publikacije, od leta 2000 dalje, ki se navezujejo na področje veterinarskih učinkovin v splošnem in veterinarskih protimikrobnih učinkovin (predvsem florfenikola, sulfadiazina

in tilozna), njihove fizikalno-kemijske lastnosti, obnašanje v okolju ter vpliv na prisotne organizme in procese v okolju.

3.2.2 Izračun parametrov za oceno potencialnega vpliva učinkovin na okolje

Parametre za oceno potencialnega vpliva učinkovin na okolje smo izračunali po navodilih in enačbah predpisanih v CVMP smernicah za ERA poročilo. To je sestavljeno iz dveh faz; navodila za prvo fazo so zapisana v VICH GL6, za drugo pa v VICH GL38 (33). Kratek povzetek dela teh navodil z enačbami, ki smo jih uporabili v izračunih je predstavljen v spodnjih odstavkih ter v *Prilogah I, III in VII*.

V prvi fazi ERA poročila se na osnovi izračunane koncentracije učinkovine, ki prehaja v okolje z iztrebki izpostavljenih živali ($PEC_{soil-initial}$) oceni stopnja izpostavljenosti okolja. Pri tem se uporablja pristop popolnega zaostanka, ki predvideva 100 % izločanje nespremenjene učinkovine, brez upoštevanja presnove oz. ekskrecije v tarčni živali.

Če je začetna izračunana koncentracija PEC_{soil} višja od 100 $\mu\text{g/kg}$, je potrebna druga faza poročila. Poročilo se zaključi v fazi 1 pri učinkovinah, ki hitro in popolnoma mineralizirajo v tarčni živali, tako da izločeni presnovki predstavljajo manj kot 5 % apliciranega odmerka oz. presnovki strukturno niso podobni izhodni spojini, oziroma pri učinkovinah, ki se popolnoma razgradijo v gnoju v 30 dneh (to je povprečno najdaljši čas hranjenja gnoja) in produkti mineralizacije oz. razgradnje predstavljajo 5 % apliciranega odmerka ali manj.

Izračun začetne PEC vrednosti v zemlji ($PEC_{soil-initial}$) upošteva tarčno živalsko vrsto in predviden način uporabe zdravila, značilnosti sestavin zdravila ter način aplikacije. Tako sta v uporabi dve enačbi, ena za intenzivno rejene živali v hlevu, druga za pašno živinorejo. Za izračun je potrebno poznati le velikost in število odmerkov veterinarske učinkovine v času zdravljenja, ostali parametri so podani v preglednicah v navodilih CVMP. V nalogi smo se osredotočili na uporabo predstavljenih učinkovin pri piščancih in prašičih, ki glede na CVMP navodila spadajo med intenzivno rejene živali, zato smo izračune $PEC_{soil initial}$ naredili po *enačbi 1*, ki je predpisana za primere intenzivne živinoreje. *Enačba 2*, ki se uporablja v primeru ocene tveganja pri zdravljenju pašnih živali, je tu samo predstavljena (9, 33).

Intenzivna živinoreja je način reje, kjer so živali ves čas gojenja v hlevu; pri zdravljenju teh živali se preostanki aktivne učinkovine izločajo z živalskimi izločki v hlevu in so tako prisotni v gnoju teh živali. Pri izračunu $PEC_{soil initial}$ je v tem primeru pomembna količina gnoja onesnaženega z učinkovino, ki se vnese v zemljo; glede na statistične podatke je v

večini EU držav povprečni najvišji vnos dušika 170 kg N / ha. Predpisana enačba iz CVMP navodil je predstavljena spodaj (*Enačba 1*), nastopajoči parametri pa v *Prilogi I*, v *Preglednici VI*.

Enačba 1: *Izračun $PEC_{soil\ initial}$ pri intenzivni živinoreji*

$$PEC_{soil\ initial} = \left(\frac{D \times Ad \times BW \times P \times 170 \times Fh}{1500 \times 10\ 000 \times 0,05 \times N_y \times H} \right) \times 1000$$

Pašna živinoreja je način reje, kjer so živali v času gojenja na pašniku, pri zdravljenju teh živali preostanki učinkovine z iztrebkih prehajajo direktno v zemljo. Za izračun $PEC_{soil\ initial}$ je pomembno število živali na določeni površini zemlje (to je gostota živine). Predpisana enačba iz CVMP navodil (*Enačba 2*) je predstavljena spodaj, nastopajoči parametri so razloženi v *Prilogi I*, *Preglednica VII*.

Enačba 2: *Izračun $PEC_{soil-initial}$ pri pašni živinoreji*

$$PEC_{soil\ initial} = \left(\frac{D \times Ad \times BW \times SD \times Fh}{1500 \times 10\ 000 \times 0,05} \right) \times 1000$$

V drugi fazi ERA poročila se vrednoti vpliv in učinek preostankov učinkovine v zemlji. Predpisan je dvostopenjski proces ocene tveganja za okolje (stopnja A, stopnja B). Prva stopnja, stopnja A zajema preproste študije za oceno tveganja na osnovi izpostavljenosti in učinkov na ogroženem območju. Predstavljeni so podatki študij o fizikalno-kemijskih lastnostih učinkovine (porazdelitveni koeficient oktanol-voda), podatki študij o vplivu na okolje (adsorpcija, fotoliza, razgradnja), podatki študij o učinkih na vodno oz kopensko okolje in ocena tveganja na osnovi začetne vrednosti PEC ($PEC_{soil-initial}$).

Druga faza tako temelji na izračunu kvocienta tveganja (»Risk Quotient« - RQ) po *enačbi 3*, ki je razmerje med napovedano koncentracijo učinkovine ali metabolita v okolju (PEC_{soil}) določeno v fazi 1, s pristopom popolnega zaostanka in napovedano koncentracijo, ki nima vpliva na netarčne organizme oz. dopustno koncentracijo snovi v okolju (PNEC). Ta se izračuna po *enačbi 4* iz koncentracij pri katerih je bil v ekotoksikoloških študijah opažen učinek na netarčnih organizmih (LC_{50} ali EC_{50} ali NOEC). Z varnostnim faktorjem (AF – assessment factor) enačba upošteva variabilnost med in znotraj vrste ter negotovost pri prenosu eksperimentalnih podatkov v naravne sisteme.

Enačba 3: Izračunu kvocienta tveganja

$$RQ = PEC/PNEC$$

Enačba 4: Izračun dopustne koncentracije snovi v okolju oz. koncentracije brez vpliva na netarčne organizme

$$PNEC = (LC_{50} \text{ ali } EC_{50} \text{ ali } NOEC) / AF$$

Če je izračunani $RQ < 1$, nadaljnje testiranje ni potrebno in ERA se lahko zaključi s stopnjo A druge faze poročila. Za $RQ \geq 1$ se začetni PEC_{soil} preračuna še z upoštevanjem podatkov o presnovi v tarčnih živalih, deležu preostankov učinkovin v izločkih, razgradnji v gnoju in zemlji. Predvideva se namreč, da ti procesi lahko pomembno zmanjšajo deleže bioaktivnih preostankov učinkovin. Vrednosti za PEC_{soil} se tako predvidoma znižajo in s tem se zniža tudi RQ . Če se doseže $RQ < 1$, se ERA še vedno zaključi s stopnjo A, v nasprotnem primeru sledi stopnja B, ki jo sestavljajo kompleksnejše in bolj specifične študije.

Izračuni PEC_{soil} z upoštevanjem presnove, deleža preostankov učinkovin v izločkih, razgradnje v gnoju in zemlji so bili potrebni tudi za učinkovine predstavljene v nalogi (florfenikol, sulfadiazin in tilozin).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Z oceno tveganja za okolje (ERA poročilo), ki temelji na podatkih ekotoksikoloških študij, se predvidi usoda določene učinkovine v okolju, izpostavljenost okolja in učinki na ekosistem. Takšna ocena je zahtevana v dokumentaciji za registracijo vseh veterinarskih učinkovin. Veterinarske učinkovine in njihovi presnovki namreč večinoma direktno prehajajo v okolje z izločki (urin in blato) zdravljenih živali pri pašni živinoreji oz. se v okolje vnašajo z onesnaženim gnojem ob gnojenju kmetijskih površin. Ker običajno niso podvržene ciljni razgradnji v čistilnih napravah, kot se to predvideva za učinkovine v humanih zdravilih in se uporabljajo v večjih odmerkih ter količinah, predstavljajo veterinarske učinkovine v primerjavi s humanimi učinkovinami večje potencialno tveganje za okolje.

Osnova ocene tveganja učinkovin za okolje je količnik tveganja (RQ), razmerje med predvideno koncentracijo v okolju (PEC) in predvideno koncentracijo brez učinka na organizme (PNEC). Za izračun predvidene koncentracije učinkovine v okolju so potrebni podatki o:

- načinu uporabe zdravila (odmerek, odmerni interval, zdravljena živalska vrsta),
- fizikalno-kemijskih lastnostih učinkovine,
- presnovi v zdravljeni živali,
- razgradnji v gnoju, gnojevki, zemlji in vodi,
- porazdelitvenih lastnostih v zemlji in sedimentih,
- značilnostih okolja v katerem se učinkovina predvidoma uporablja.

Predvidene koncentracije brez učinka na organizme pa se izračunajo s farmakološko-toksikološkimi podatki (33).

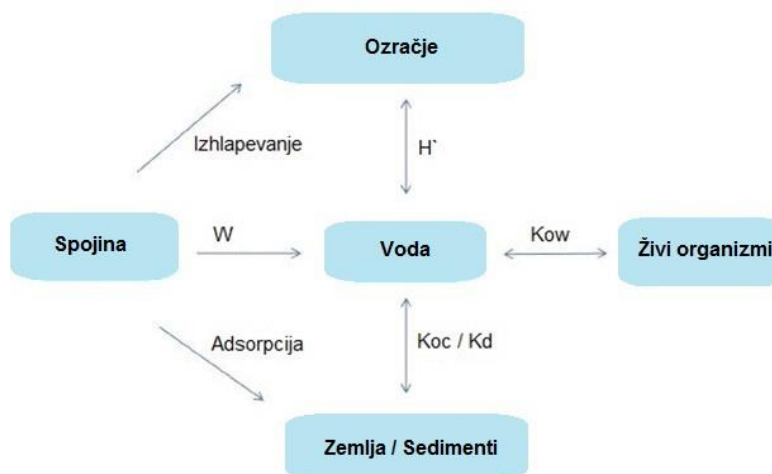
Vpliv učinkovine na okolje je koncentracijsko odvisen, zato se ocena tveganja za okolje začne z izračunom predvidene koncentracije, ki ob predpisanem načinu uporabe zdravila prehaja v okolje. To je osnovni izračun in ne upošteva vseh procesov v življenjskem ciklu učinkovine. Običajno so rezultat teh izračunov visoke koncentracije, ki ne predstavljajo realne situacije. Zato sledijo nadaljnji izračuni, v katerih se upoštevajo še podatki o fizikalno-kemijskih lastnostih, presnovi v tarčni živali in razgradnji v iztrebkih ter zemlji oz. vodi. S tem se izračunane predvidene koncentracije lahko precej znižajo. In zniža se tudi kvocient tveganja (33).

V opravljeni raziskavi smo s pregledom člankov zbrali zgoraj naštete podatke za tri izmed najpogostejše uporabljenih veterinarskih protimikrobnih učinkovin: florfenikol, sulfadiazin in tilozin. Zbrani podatki so predstavljeni in obrazloženi v naslednjih poglavjih in na njih temeljijo izračuni tveganja za okolje za posamezno učinkovino. Izračune smo naredili v skladu z navodili Odbora za zdravila za uporabo v veterinarski medicini (CVMP), kakor je opisano v poglavju 3 *Materiali in metode*.

4.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI UČINKOVIN IN NJIHOVE ZNAČILNOSTI

4.1.1 Fizikalno-kemijske lastnosti najpogostejše uporabljenih protimikrobnih učinkovin v veterini

Na osnovi fizikalno-kemijskih lastnostih protimikrobnih učinkovin lahko napovemo njihovo obnašanje in porazdelitev v okolju (*Slika 5*). Osnovni parametri, ki se pri tem uporabljajo, so: koeficient adsorpcije v zemlji (K_d oz. K_{oc}), porazdelitveni koeficient oktanol-voda (K_{ow}), topnost v vodi (W) in Henry-jeva konstanta (H') (35).



Slika 5: Fizikalno-kemijske lastnosti in vpliv na področja v okolju. (Povzeto po 35)

Pri oceni tveganja za okolje so v prvi stopnji (Stopnja A), najprej predstavljene fizikalno-kemijske lastnosti ocenjevane učinkovine in parametri določeni v študijah vpliva na okolje (narejenih v skladu z OECD navodili), ki opisujejo obnašanje spojine v določenem okolju. V spodnji preglednici (*Preglednica 1*), so predstavljene fizikalno-kemijske lastnosti florfenikola, sulfadiazina in tilozina, ki smo jih zbrali s pregledom dostopnih virov ter jih

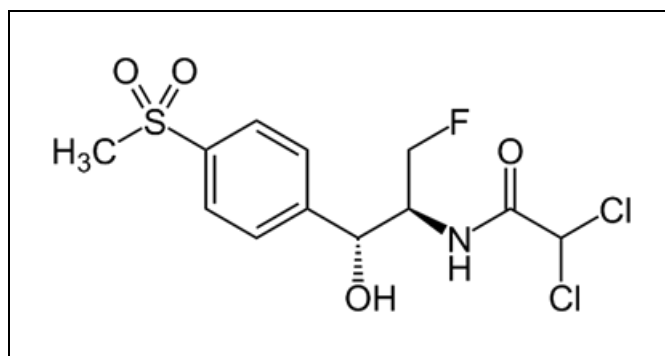
nato uporabili pri izračunu kvocienta tveganja (RQ) in pri oceni tveganja predstavljenih veterinarskih učinkovin ter njihovih preostankov na okolje.

Preglednica I: Pregled fizikalno-kemijskih lastnosti predstavljenih učinkovin

Fizikalno-kemijske lastnosti	Učinkovina		
	FLORFENIKOL	SULFADIAZIN	TILOZIN
Molekulska formula	$C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	$C_{46}H_{77}NO_{17}$
Molska masa [g/mol]	358,21	250,28	916,1
pK_{a1} / pK_{a2}	9,0	2-3 / 5-8	7,73
K_{ow} (Log K_{ow})	2,36 (0.37)	0,81 (-0.09)	42,66 (1.63)
Topnost v vodi pri 20°C in pH 7 [mg/L]	1320	130	5000
Porazdelitveni koeficient v zemlji (K_d) [L/kg]	0,07-0,59	0,6 – 4,9	12,4-129,5
Adsorpcijski koeficient v zemlji (K_{oc}) [L/kg]	10-27 (visoka mobilnost)	37-125 (zmerna mobilnost)	553-7988 (nizka mobilnost)
Temperatura tališča [°C]	153-154	252 – 256	128 - 132
Parni tlak pri 25°C [mPa]	4,83x10-04 (ni hlapen)	9,32x10-05 (ni hlapen)	3,87x10 ⁻⁰⁵ (ni hlapen)
Henry-jeva konstanta pri 25°C [$Pa\ m^3\ mol^{-1}$]	5,25x10 ⁻⁰⁶	7,4x10 ⁻⁰⁶	7,86x10 ⁻¹¹
UV-Vis adsorpcijski spekter	UV _{max.} 224 nm	UV _{max.} 265 nm	UV _{max} = 282 nm
Viri:	19, 36, 44, 74, 80	25, 39, 65, 75	41, 42, 44, 48, 50, 76

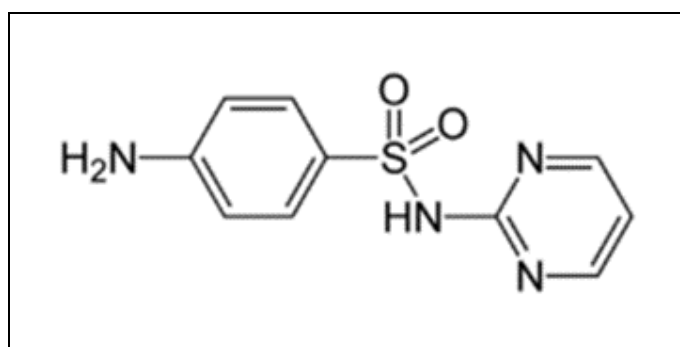
Molekule florfenikola (Slika 6) v pH območju med 2 in 12 so neionizirane. Spojina namreč vsebuje več polarnih funkcionalnih skupin (diklorometilamidno, alkilhidroksilno, fluorometilno in metilsulfonsko), ki v tem pH območju ne ionizirajo. Florfenikol je topen v polarnih topilih in dobro topen v vodi (1320 mg/L), kar se kaže tudi z nizkim porazdelitvenim koeficientom oktanol-voda (K_{ow} : 2,36). Glede na nizke adsorpcijske koeficiente (K_{oc} : 10-27 L/kg) določene v različnih vrstah prsti ima visoko mobilnost. Florfenikol in njegovi presnovki oz. produkti razgradnje (florfenikol-amin, florfenikol-

alkohol, folrfenikol oksamska kislina) imajo glede na fizikalno-kemijske lastnosti nizek potencial za bioakumulacijo v okolju. Presnovki so bolj topni (topnost v vodi pri 20 °C in pH 7 je pri teh od 49,7 do >500 g/L) in manj lipofilni (zanje so določene nižje vrednosti za K_{ow} kot pri florfenikolu), zato imajo višji potencial za prehajanje v vodno okolje (36, 37, 38).



Slika 6: Strukturna formula florfenikola.. (Povzeto po 77)

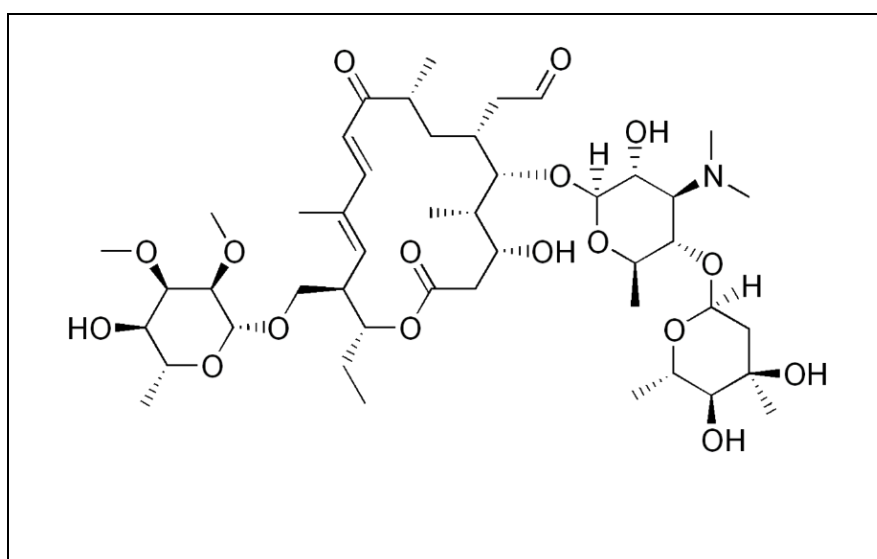
Naboj molekul sulfadiazina in njegovih presnovkov določata disociacijska konstanta (pK_a) in pH okolja. Molekula sulfadiazina (Slika 7) ima dve ionizirajoči skupini, to sta amino in sulfonamidna skupina. Protonacijo amino skupine opiše pK_{a1} (2-3), pK_{a2} (5-8) pa deprotonacijo sulfonamidne skupine. Tako pH okolja določa obliko molekule in s tem adsorpcijo, mobilnost ter procese razgradnje oz. presnove. Kot večina sulfonamidov je tudi sulfadiazin slabo topen v vodi (130 mg/L) in glede na nizek koeficient adsorpcije (K_{oc} : 37-125 L/kg) zmerno mobilni kar pomeni, da ni zelo močno vezan na trdne delce in lahko prehaja v okolju. Glavni produkti presnove so: 4-hidroksi-sulfadiazin, N-acetil-sulfadiazin in 2-amino-pirimidin. Presnovki imajo nižjo molekulsko maso in so bolj polarni od starševske molekule (25, 39, 40).



Slika 7: Strukturna formula sulfadiazina. (Povzeto po 78)

Med proučevanimi spojinami ima tilozin najvišjo molekulsko maso, a ima kljub temu najboljšo topnost v vodi (5000 mg/L). Tilozin je šibko bazična spojina z eno ionizirajočo

skupino (to je dimetilaminska skupina). Pri nevtralnem do kislem pH-ju značilnem za naravno okolje je pretežno v protonirani obliki. Glede na vrednost za K_{ow} in topnost v vodi je to precej hidrofilna molekula. Določen adsorpcijski koeficient v zemlji je visok (K_{oc} : 553 - 7988 L/kg) in kaže na nizko stopnjo mobilnosti ter povečano akumulacijo v okolju. Tilozin ni samo ena molekula, tvorijo ga različne vrste molekul oz. tako imenovani faktorji, od katerih prevladuje tilozin A predstavljen na spodnji sliki (*Slika 8*). Ostali faktorji so še tilozin B oz. desmikoizin, ki je brez mikaroznega sladkorja; tilozin C oz. makrozin z demetiliranim micinoznim sladkorjem in tilozin D oz. relomicin, pri katerem je aldehyd na makrolidnem obroču reduciran. Ti faktorji nastajajo tudi z razgradnjo tilozina A in se še nadalje razgrajujejo ter končno mineralizirajo (41, 42, 43).



Slika 8: Strukturna formula Tilozina. (Povzeto po 79)

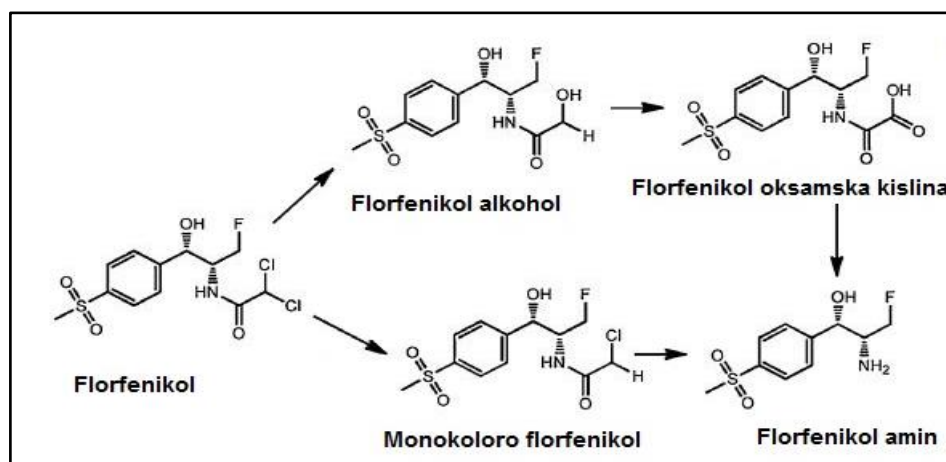
4.2 ZNAČILNOSTI UČINKOVIN V KOPENSKEM OKOLJU

4.2.1 Presnova in izločanje učinkovin iz zdravljenih živali

Po aplikaciji se učinkovine v živalih presnovijo v bolj polarne produkte z višjo topnostjo v vodi. Ti potem z živalskimi izločki in iztrebki prehajajo v okolje, kjer se lahko nadalje razgrajujejo v biotskih ali abiotskih procesih. Veliko veterinarskih protimikrobnih učinkovin se kljub temu vsaj deloma izloča v biološko aktivni obliki v iztrebkih in urinu, zato imajo selektiven vpliv na mikroorganizme v zemlji in vodi (38, 44).

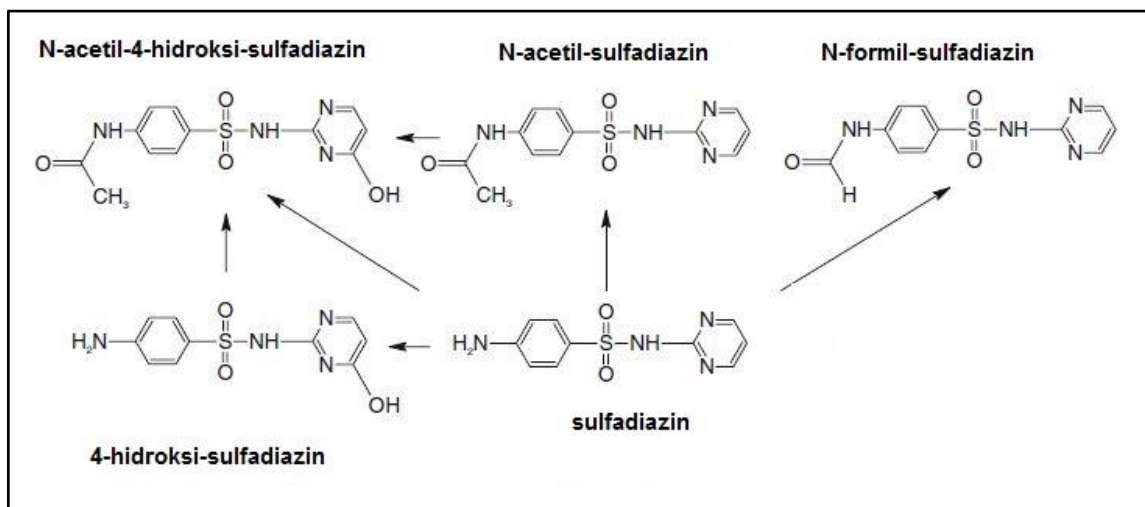
Pri piščancih so spremljali izločanje ^{14}C označenega florfenikola, ki je bil apliciran dvakrat dnevno (na 12 ur), peroralno v odmerku 20 mg/kg telesne mase 3 zaporedne dni. Prvi dan po zadnjem odmerku so v iztrebkih izmerili 93,7 % aplicirane radioaktivnosti (a.R.), 7. dan pa 98,2 % a.R. V izločkih so določili 42 % starševske spojine (florfenikol), 25 % je bilo amino presnovka, 5 % oksamske kisline, 10 % alkoholnega presnovka, preostali delež izmerjene radioaktivnosti so pripisali trem nedoločenim presnovkom (Slika 9). Monokloro florfenikola, ki je tudi eden od presnovkov florfenikola niso določili (45).

Pri peroralni aplikaciji ^{14}C označenega florfenikola prašičem, enkrat dnevno v odmerku 20 mg/kg telesne mase 5 dni zaporedoma, je bilo na tretji dan po prvi aplikaciji v iztrebkih izmerjene 80 % aplicirane radioaktivnosti, na 19. dan pa 91,45 % a.R. Pri tem se je večina izločila z urinom (76 % a.R.) in manj z blatom (24 % a.R.). Z analizo urina so določili naslednji profil izločanja: 45 – 60 % florfenikol, 11,2 – 17 % amin presnovek, < 10 % oksamska kislina, 1,1 % alkoholni presnovek, 1,9 % monokloro florfenikol, preostanek radioaktivnosti trije nedoločeni presnovki (19).



Slika 9: Presnovki florfenikola in predvidena pot presnove pri piščancih. (Povzeto po 73)

Večji del apliciranega odmerka se pri sulfonamidih iz organizma izloči nespremenjenega (pri sulfadiazinu približno 50 %). Na stopnjo presnove sicer vplivajo lastnosti posamezne spojine in značilnosti organizma. Pri biotransformaciji sulfonamidov potekajo: oksidacija, acetiliranje oz. hidroksiliranje N-atoma amino skupine ali glukuronidacija na amidnem oz.aminskem dušiku. Glavna produkta presnove sulfadiazina v živalih (prašičih) sta N⁴-aceti-sulfadiazin in 4-hidroksi-sulfadiazin, nastaja pa tudi N-acetil-4-hidroksi sulfadiazin in N-formil slfadiazin (*Slika 10*). Acetiliranje pomeni de-aktivacijo sulfadiazina, saj se acetilna skupina veže na amino skupino, ki je nosilec protimikrobnega učinka. Po prehodu v okolje oz. ob staranju gnoja lahko pride do odcepa acetilne skupine in sprosti se aktivna učinkovina. Ta lahko deluje in izraža toksične učinke v okolju oz. se hidroksilira v 4-hidroksi-sulfadiazin, ki je manj toksičen. V zemlji z bio-razgradnjo sulfadiazina nastajajo: N⁴-aceti-sulfadiazin, 4-hidroksi-sulfadiazin (glavni presnovek) in 2-amino-pirimidin. Reakcija nastanka N⁴-aceti-sulfadiazina je reverzibilna in poteka le ob prisotnosti gnoja; nastali produkt se lahko pretvori v 4-hidroksi-sulfadiazin. Najhitreje (v nekaj urah) nastaja 2-amino-pirimidin, ki lahko tvori vezane preostanke v zemlji oz. gnoju (25, 40, 46).

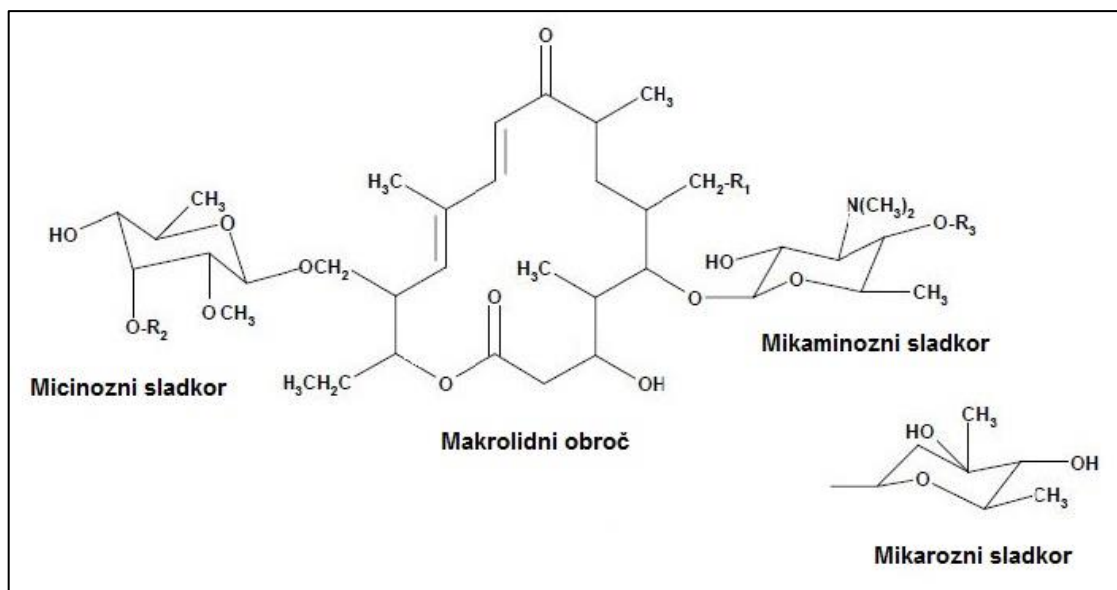


Slika 10: Presnovki Sulfadiazina in predvidena pot presnove. (Povzeto po 47)

Proces presnove in izločanja sulfadiazina opisuje študija narejena s prašiči, ki jim je bil štiri dni zaporedoma apliciran ¹⁴C-sulfadiazin v obliki peroralnih kapsul. Dnevni odmerek je bil 30 mg/kg telesne mase živali. Dnevno so analizirali vzorce blata in urina 10 dni, od prvega odmerka dalje. V tem času se je iz živali izločilo 96 % aplicirane radioaktivnosti, 4 % a.R. je ostalo v telesu. Največji delež izločenih preostankov učinkovine in presnovkov je bil izmerjen 6. in 7. dan po prvem odmerku. V izločkih so določili 44 % sulfadiazina, 26 % 4-

hidroksi-sulfadiazina, 21 % acetil-sulfadiazina, 3 % neidentificiranih presnovkov, 1,8 % N-acetil-4-hidroksi-sulfadiazina, 0,1 % N-formil-sulfadiazina (47).

Tilozin je mešanica različnih zvrsti molekul oz. faktorjev (A, B, C in D), od katerih prevladuje tilozin A (več kot 80 %). Ostali faktorji, ki nastajajo sočasno z obliko A oz. tudi ob njeni razgradnji, se s tilozinom A razlikujejo glede na substituentne vezane na jedro molekule (makrolidni obroč) (*Slika 11*). Za farmakološko aktivnost tilozina so zaradi vezave na tarčno mesto v mikrobih pomembne hidrofobne interakcije, ki jih tvori makrolidni oboč in vodikove vezi, ki jih tvorijo substituenti. Sladkorni substituenti v molekuli tilozina A so mikarozni, mikaminozni in micinozni sladkor. Mikarozni in micinozni sladkor nista zelo pomembna za vezavo, zato spremembe na teh dveh substituentih nimajo bistvenega vpliva na protimikrobno aktivnost spojine. Tako imata tilozin B (oz. desmikoziin), kjer ni mikaroznega sladkorja in tilozin C (oz. makrocin) z demetiliranim micinozni sladkorjem protimikrobno aktivnosti primerljivo tilozinu A. Manjšo aktivnost pa imata tilozin D (oz. relomicin), z reduciranim aldehidnim substituentom na makrolidnem obroču in dihidrodesmikoziin, ki je brez mikaroznega sladkorja in ima reducirani aldehidni substituent na makrolidnem obroču. Za faktor D so določili 25 % protimikrobne aktivnosti faktorja A, za dihidromikoziin pa 50 %. Takšna, dokaj visoka biološka aktivnost razgradnih produktov je lahko problematična za okolje, zato je pri tilozinu še posebej pomembno tudi poznavanje lastnosti njegovih presnovkov in upoštevanje njihove aktivnosti pri oceni tveganja za okolje (48).



Spojina	R1	R2	R3	Relativna bioaktivnost
Tilozin A	-CHO	-CH ₃	Mikarozni sladkor	100 %
Tilozin B	-CHO	-CH ₃	-H	100 %
Tilozin C	-CHO	-H	Mikarozni sladkor	100 %
Tilozin D	-CH ₂ OH	-CH ₃	Mikarozni sladkor	25 %
Dihidrodessmikoizin	-CH ₂ OH	-CH ₃	-H	50 %

Slika 11: Struktura molekul oz. faktorjev tilozina. (Povzeto po 48 in 49)

Pri peroralni aplikaciji ¹⁴C-tilozina piščancem (528 mg/L) tri dni zaporedoma so v izločkih sedem dni po zadnjem odmerku izmerili 69 % aplicirane radioaktivnosti. Preučevali so izločke zbrane v dnevu pred zadnjim odmerkom, pri čemer so za določitev spojin v izločkih uporabili metodo večstopenjske ekstrakcije s topili (kloroform, ogljikov tetraklorid, voda, klorovodikova kislina, aceton). Pri ekstrakciji je večina preostankov učinkovine prešla v kloroform (67,3 %), nekaj v vodno frakcijo (24 %) in ostalo v druga topila (7,8 %). Frakcijo kloroforma so nadalje analizirali in določili prisotnost naslednjih presnovkov: tilozin A (31,6 %), tilozin D (12,6 %), tilozin B (5 %), dihidrodessmikoizin (4,3 %), drugo so bili neidentificirani polarni presnovki (6,9 %). Pri oceni protimikrobne aktivnosti preostankov tilozina v piščančjih izločkih so predpostavili, da je v vodi in ostalih topilih prisoten le tilozin A (100 % bioaktivnost), za identificirane presnovke v kloroformu pa so njihov prispevek k protimikrobni aktivnosti v izločkih preračunali na osnovi njihovega deleža in poznano relativno aktivnostjo glede na faktor A. Tako so preračunali, da se s piščančjimi

izločki v okolje povprečno izloči do 75 % odmerka kot preostanek z bioaktivnostjo ekvivalentno tilozinu A (48).

V študiji s prašiči, ki so dva tedna prejemali ^{14}C -tilozin v odmerku 110 mg/kg telesne mase s peroralno aplikacijo, so po koncu zdravljenja živali v zbranih vzorcih blata določili 94 % aplicirane radioaktivnosti, v vzorcih urina pa 6 % a.R. Od tega je bilo 43 % Tilozina D in 44 % dihidrodesmikozina. Prisotna je bila tudi sečna kislina tilozina D, ki je verjetno nastala s hidrolizo njegovega laktonskega obroča (50).

4.2.2 Obstojnost in razgradnja preostankov učinkovin v gnoju

Koncentracije preostankov protimikrobnih učinkovin v gnoju so med 1 in 10 mg/kg ali mg/L, v nekaterih raziskavah so določili celo ≥ 200 mg/kg oz. mg/L. V splošnem koncentracija preostankov učinkovin v gnoju korelira s pH, temperaturo, vsebnostjo dušika, razmerjem ogljik-dušik, celotnim organskim ogljikom, fosforjem, prisotnim natrijem, kromom, bakrom, cinkom, železom, kadmijem. Lastnosti oz. sestava gnoja določajo aktivnost mikrobov v njem. Ti kot vir energije izkoriščajo ogljik in dušik, beljakovine pa za rast in razmnoževanje. Neugodne spremembe v količini hranil, kisika, pH in temperaturi gnoja lahko povzročijo smrt prisotnih aerobnih mikrobov ali jih deaktivirajo, kar zmanjša oz. upočasni razgradnjo morebitnih preostankov protimikrobnih učinkovin. Poleg tega razlike v sestavi gnoja vplivajo tudi na učinkovitost ekstrakcije in kvantifikacije preostankov učinkovin v študijah (51, 52).

Pred vnosom v okolje se običajno živalski iztrebki namenjeni gnojenju prsti določen čas skladiščijo. Mnoge protimikrobne učinkovine ostajajo stabilne med hranjenjem gnoja, saj v njem tvorijo komplekse z raztopljenimi organskimi snovmi, lahko pa se razgrajujejo. Pri tem je delež razgradnje različen, odvisen od načina hranjenja gnoja, koncentracije in vrste učinkovine, pogojev v rezervoarju oz. bioreaktorju, vrste prisotnih bakterij in hranilnih snovi zanje. Različni biološki procesi namreč različno vplivajo na obstojnost protimikrobnih učinkovin. Razpolovni čas primarne razgradnje tilozina v mešanici gnoja in prsti pri aerobnih pogojih je npr. 3,3 do 8,1 dni, tetraciklini in kinoloni, ki so med najobstojnejšimi protimikrobnimi učinkovinami pa imajo povprečne razpolovne čase okrog 100 dni. Med staranjem laboratorijskih količin gnoja pri običajnih temperaturah okolja so v študijah večinoma ugotovili opazno zmanjšanje koncentracije testiranih učinkovin (51, 52).

Aerobno razgradnjo florfenikola v govejem gnoju so opazovali v 92 dnevni študiji, kjer so čistemu gnoju brez protimikrobnih učinkovin dodali ^{14}C -florfenikol, ter na osnovi izmerjene radioaktivnosti določali količino neekstraktibilnih oz. vezanih preostankov v gnoju. V kontrolnem vzorcu je bil uporabljen sterilni gnoj (36).

Količina vezanih preostankov je v testnih vzorcih s časom naraščala. Po 7 dneh so ti predstavljali 51,6 %, ob koncu študije pa 69,7 % aplicirane radioaktivnosti. Koncentracija prostega florfenikola se je pri tem zmanjševala z 88 % izmerjene radioaktivnosti ob začetku študije na 41,9 % po treh dneh, 5,5 % po sedmih dneh in ob koncu študije (po 92 dneh) okrog 1,5 % aplicirane radioaktivnosti. Hitrejše in izrazitejše znižanje koncentracije florfenikola v primerjavi s tvorbo vezanih preostankov kaže na biorazgradnjo učinkovine v testnih vzorcih (36).

V kontrolnem vzorcu se količina neekstraktibilnih preostankov ni bistveno spreminjala, prav tako je bila količina florfenikola v glavnem konstantna, okrog 94 % aplicirane radioaktivnosti. Glede na rezultate študije v sterilnem okolju ne nastajajo vezani preostanki in ni abiotske razgradnje učinkovine. Biorazgradnja v sterilnem okolju ne poteka.

Razgradnja florfenikola je potekla predvsem z mikroorganizmi prisotnimi v gnoju. Določena sta bila DT_{50} 2,4 dni in DT_{90} 8,0 dni, ki kažeta na to, da se razgradnja florfenikola začne hitro potem, ko ta vstopi v aerobni sistem. Poleg florfenikola je bil v vzorcih prisoten monokloro-florfenikol (glavni presnovek florfenikola), za katerega je bila določena podobna kinetika razgradnje, z DT_{50} 3,0 dni in DT_{90} 10,0 dni. Florfenikol je v gnoju v precejšnjem deležu tvoril vezane, neekstraktibilne preostanke, ki niso biorazpoložljivi (36).

Pri anaerobnih pogojih v brozgi prašičjih iztrebkov in urina je tudi bila določena hitra razgradnja florfenikola s podobnim profilom nastajanja presnovkov, kot v govejem gnoju in monoklorofenikolom kot primarnim presnovkom. Florfenikol se je hitro porazdelil med vodno in trdno fazo v sistemu ter se v obeh hitro razgradil, tako da po 90 dneh ni bil več prisoten. Za florfenikol sta bila določena DT_{50} 1,0 dni in DT_{90} 3,4 dni, za monoklorofenikol pa DT_{50} 2,4 dni in DT_{90} 8,1 dni. Vezani, neekstraktibilni preostanek florfenikola je v testnih vzorcih po 90 dneh predstavljal 27,1 % aplicirane radioaktivnosti. Tudi v sterilnem sistemu se je delež aplicirane radioaktivnosti v času študije znižal z 90 % na 5,0 %, vezani preostanek je predstavljal 23,2 % aplicirane radioaktivnosti in porazdelitev med vodno in trdno fazo je bila podobna kot v nesterilnem sistemu. Rezultati študije so pokazali, da pri anaerobnih pogojih poteka abiotska razgradnja florfenikola in njegovih presnovkov.

Rezultat razgradnje je bil v sterilnih in biološko aktivnih sistemih podoben, vendar je bila hitrost procesov v sterilnem okolju precej počasnejša (36).

V raziskavi vpliva govejega in prašičjega gnoja na transformacijo oz. presnovo florfenikola, kjer so na osnovi porazdelitve radioaktivno označenega ogljika (^{14}C) spremljali nastajanje ekstraktabilnih in neekstraktabilnih preostankov ter mineralizacijo (na osnovi nastalega CO_2 in CH_4) florfenikola, so dokazali hitro izginjanje te učinkovine iz živalskih iztrebkov. Vzorce gnoja s ^{14}C označenim florfenikolom so inkubirali pri temperaturi $20\text{ }^\circ\text{C}$, pri aerobnih pogojih, zaščitene pred svetlobo. Meritve so bile narejene po 27 in 53 dneh v primeru prašičjega gnoja in po 45 in 90 dneh v primeru govejega gnoja. Čas 90 dni za goveji in 53 dni za prašičji gnoj je najdaljši dovoljeni čas staranja gnoja pred uporabo.

V govejem gnoju se je delež florfenikola zmanjšal iz 97,8 % aplicirane radioaktivnosti določene ob začetku na 78,6 % po 24 urah in 1,2 % a.R. po 90 dneh. Delež ekstraktabilnih preostankov se je zmanjšal iz 106,2 % a.R. ob začetku na 39,8 % a.R. po 90 dneh, delež neekstraktabilnih preostankov pa se je zvišal iz 7,7 % a.R. na 69,6 % a.R. po 45 dneh in nato ostal približno enak do konca študije (90 dni). Mineralizacija je bila zmerna, po 90 dneh sta $^{14}\text{CO}_2$ in $^{14}\text{CH}_4$, ki sta pri tem nastala predstavljala 1,9 % aplicirane radioaktivnosti. Hitro izginjanje florfenikola je bilo določeno tudi v prašičjem gnoju, kjer se je delež florfenikola zmanjšal iz 92,5 % a.R. izmerjene po aplikaciji učinkovine v vzorce gnoja na 85,1 % po 24 urah in 1,5 % a.R. po 53 dneh. Delež ekstraktabilnih preostankov se je najprej zmanjšal iz 100,8 % a.R. ob začetku na 63,8 % a.R. po 26 dneh, nato pa nekoliko narasel na 69,6 % a.R. po 53 dneh. Delež neekstraktabilnih preostankov je porasel iz začetnih 1,6 % a.R. na končno 38,1 % a.R.. Po 53 dneh je bili določen delež mineralizacije 0,2 % a.R. V obeh vrstah gnoja se je delež ekstraktabilnih preostankov s časom zmanjševal, delež neekstraktabilnih pa naraščal. Sprememba deležev ekstraktabilnih in neekstraktabilnih preostankov je bila najbolj izrazita v prvi polovici časa študije (tj. 45 dni pri govejem in 26 dni pri prašičjem gnoju), nato je bili njihov delež približno konstanten. Stopnja mineralizacije je bila v obeh tipih gnoja nizka in približno ves čas opazovanja enaka (53).

Pri sulfadiazinu so na laboratorijskih testnih sistemih določili hitro izginjanje proste učinkovine in visok delež neekstraktabilnih preostankov v tekočem govejem gnoju in gnojeni zemlji tipa mulj-ilovica. V tekočem govejem gnoju se je po 102 dneh delež ekstraktabilnega preostanka ^{14}C -sulfadiazina zmanjšal s 70 % na 5 % apliciranega odmerka. Določena sta bila DT_{50} 17 dni in DT_{90} 56 dni. Stopnja mineralizacije je bila nizka ($\sim 1\%$), delež neekstraktabilnih preostankov pa okrog 82 %. Ekstraktabilni preostanek učinkovine

se je hitro zmanjšal zaradi tvorbe neekstraktabilne frakcije, kar pomeni, da je v tekočem govejem gnoju nizka biorazpoložljivost preostankov sulfadiazina. Zaradi visokega neekstraktabilnega deleža se učinkovina v gnoju dolgo zadržuje (54).

V primeru testne brozge, ki je bila mešanica zemlje in govejega gnoja, so neekstraktabilni preostanki nastajali še hitreje kot v samem gnoju. Po 102 dneh sta bila količina ekstraktabilne frakcije in delež mineralizacije nepomembna. Afniteta ^{14}C -sulfadiazina za trdne delce določena v študiji je bila najvišja v primeru gnojene prsti (višja kot v samem gnoju oz. sami zemlji). Sklepali so, da je to posledica vpliva višje mikrobne aktivnosti v gnojeni zemlji. Mikrobi naj bi prispevali k hitrejšemu nastajanju neekstraktabilne frakcije sulfadiazina (54).

Študija, kjer so 40 dni opazovali spreminjanje koncentracije protimikrobnih učinkovin (med njimi sulfadiazin in tilozin) v perutninskem gnoju s časom (staranje gnoja), je pokazala postopno znižanje koncentracije vseh učinkovin in končno več kot 99 % očistek. Pri aerobnih pogojih in temperaturi 28 – 33 °C se je v 24 dneh odstranilo 99,99 % apliciranega odmerka sulfadiazina. Zaznali so hitro znižanje koncentracije s 30,63 mg/kg na 0,003 mg/kg v 13 dneh, nato počasnejše zmanjševanje koncentracije še 24 dni do koncentracij pod mejo detekcije. Glavna produkta razgradnje sta bila acetil-sulfadiazin in hidroksi-sulfadiazin. Za razpolovni čas sulfadiazina v perutninskem gnoju so določili DT_{50} 1,4 dni. Rezultat je primerljiv z rezultatom študije, kjer so za koncentracijo 10 mg/kg sulfadiazina v prašičjem gnoju poročali o popolni odstranitvi v 3 dneh kompostiranja gnoja. visok delež očistka so določili tudi v primeru tilozina. Njegova koncentracija v perutninskem gnoju se je v 9 dneh znižala iz 62,56 mg/kg na 0,35 mg/kg in v času 30 dni dosegla 0,01 mg/kg, kar pomeni 99,98 % očistek tilozina med kompostiranjem. Staranje gnoja je torej pomembno za zmanjšanje vnosa preostankov učinkovin v okolje. Po prehodu v zemljo se razgradnja teh preostankov nadaljuje in je v nekaterih primerih celo pospešena v kombinaciji gnoja in prsti (51, 55).

Študije razgradnje tilozina v perutninskih iztrebkih dokazujejo, da se vsi faktorji tilozina začnejo razgrajevati že v hlevu, razgradnja se nato nadaljuje pri vseh oblikah shranjevanja gnoja. V 30 dnevni študiji razgradnje tilozina v piščančjih iztrebkih v aerobnem okolju pri 20°C so kot glavna presnovka ob začetku inkubacije določili tiozin A in tilozin D. Po 30 dneh ni bilo več merljive količine tilozina A, niti ostalih faktorjev. Če so ti nastajali med razgradnjo tilozina A, so se do konca opazovanja razgradili. Za tilozin A v piščančjih

iztrebkih so tako določili kinetiko razgradnje prvega reda, z razpolovnim časom $< 7,5$ dni. Tudi v uležanem gnoju niso zaznali prisotnosti nobenega od faktorjev A, B, C ali D. V raziskavah s puranjimi iztrebki so poročali o razpolovnem času tilozina od 16 do 23 dni (48).

V raziskavi razgradnje tilozina v prašičjem gnoju pri koncentraciji 25 mg/L je bil določen razpolovni čas za tilozin A manj kot 2 dni pri anaerobnih pogojih in temperaturi 20 °C. Hitrost izginja tilozina A je naraščala z naraščajočo koncentracijo prisotnih trdnih delcev v vzorcih. Takojšnje adsorpcije tilozina na delce gnoja niso opazili. Možnih vzrokov za hitro znižanje biorazpoložljive koncentracije učinkovine je več: bakterijska oz. abiotska razgradnja ali adsorpcija na delce gnoja, česar pa v študiji niso točno določili.

Za tilozin je značilna hitra razgradnja v okolju, po 45 dneh v gnoju ni več določljiv. Prav tako ni sledov učinkovine v zemlji oz. vodi v okolici. V procesu visokostopenjske anaerobne digestije gnoja je razpolovni čas tilozina A še krajši (2,5 h) kot v zemlji (2-8 dni) oz. v pasivno skladiščenem gnoju. Tu poteka mikrobiološki razkroj brez prisotnosti kisika. Vključenih je veliko mikroorganizmov in nastajata dva glavna končna produkta, presnovljene snovi in bioplin. Določili so, da se v anaerobnem blatu v 5 dneh anaerobne digestije adsorbira ali abiotsko oz. biotsko razgradi 90 % tilozina A. Točen mehanizem odstranjevanja tilozina v tem procesu ni bil določen. V anaerobnih pogojih naj bi bila razgradnja protimikrobnih učinkovin, ki se ekstrahirajo predvsem v vodno fazo, pomembnejša od adsorpcije, saj so takšne učinkovine bolj razpoložljive za razgradnjo z mikroorganizmi. Tilozin je ena takšnih spojin, v vodno fazo se ekstrahira 85 % celotne ekstraktabilne koncentracije (52).

Tilozin se dobro razgrajuje že v prebavilih zdravljenih živali. Večinoma gre za presnovo iz tilozina A v tilozin B oz. iz tilozina A v tilozin D in nato dihidrodesmikozin. Študija razgradnje tilozina v govejih, piščančjih in prašičjih iztrebkih pri aerobnih pogojih v temi na temperaturi 20 °C je pokazala dobro in hitro razgradnjo učinkovine tudi v živalskih izločkih. Koncentracije tilozina so določali ob začetku inkubacije vzorcev in nato po 30 dneh. Pri govejem in prašičjem gnoju, kjer so iztrebkom pred inkubacijo dodali s ^{14}C označen tilozin, je bila v govejem gnoju začetna koncentracija tilozina 119,52 $\mu\text{g/g}$ in 62,82 $\mu\text{g/g}$ v prašičjem gnoju. Po 30 dneh so v govejem gnoju določili 4,16 $\mu\text{g/g}$ tilozina, v prašičjem gnoju pa 4,11 $\mu\text{g/g}$. Piščančje iztrebke s preostanki tilozina so pridobili od piščancev, katerim je bil apliciran ^{14}C -tilozin. Tu je bila začetna koncentracija tilozina v

iztrebkih 35,01 $\mu\text{g/g}$, po 30 dneh pa $< 2,23 \mu\text{g/g}$. V vseh tipih gnoja je tako po 30 dneh ostalo manj kot 6,5 % začetne količine učinkovine (49).

V vzorcih so opazovali tudi spreminjanje deležev ekstraktabilnih in neekstraktabilnih preostankov. Delež ekstraktabilnih preostankov se je v 30 dneh zmanjšal v govejem gnoju iz 79,05 % na 63,12 % aplicirane radioaktivnosti, v prašičjem iz 75,55 % a.R. na 71,18 % a.R.. V piščančjih iztrebkih je bil delež ekstraktabilnih preostankov določen le ob koncu inkubacije in je predstavljal 93,88 % a.R. Deleži neekstraktabilnih preostankov v trdnih delcih gnoja so s časom naraščali. Predvidevali so, da zaradi vgradnje razgradnih produktov tilozina v podlago oz. zaradi slabše učinkovitosti ekstrakcije po adsorpciji. Rezultati študije se ujemajo z rezultati drugih raziskav razgradnje tilozina (49).

4.2.3 Adsorpcija preostankov učinkovin v zemlji

Pomemben proces, od katerega so odvisni razgradnja, transport, bioakumulacija in ekotoksičnost preostankov učinkovin v okolju, je adsorpcija v zemlji, saj se tako zmanjšuje mobilnost, reaktivnost in biorazpoložljivost teh preostankov za mikrobovno razgradnjo. Z njo se protimikrobni potencial precej zmanjša, a ni nujno, da se popolnoma odstrani. V študijah s tetraciklinom in tilozinom, vezanim na delce prsti, so namreč ugotovili, da tudi molekule močno adsorbirane na delce ilovice, ostanejo aktivne in njihovi protimikrobni učinki lahko vplivajo na selekcijo rezistentnih bakterij. (3) Adsorbirane spojine tako predstavljajo rezervoar onesnažil, saj se lahko ob ustreznih pogojih ponovno sprostijo v okolje, širijo prek prsti z vodnim tokom, z deževnico pronikajo v podzemne vode ali ob eroziji prsti prehajajo v površinske vode (3, 4, 46).

Za florfenikol so značilni nizki deleži adsorpcije v zemlji. V študijah adsorpcije in desorpcije v različnih tipih prsti se je adsorbiralo manj kot 25 % apliciranega odmerka. Vezavne lastnosti florfenikola so določali na osnovi ocenjenih koeficientov adsorpcije, določenih v treh vrstah prsti z različno teksturo in vsebnostjo organskih snovi. Vrednosti za K_d so bile med 0,16 in 0,95, za K_{oc} pa med 24 in 52, kar kaže na šibko vezavo v zemljo in precejšnjo mobilnost. Presnovki so bili manj mobilni (38).

Pri sulfadiazinu na adsorpcijo vplivata predvsem pH okolice in vrsta prsti (glede na vsebnost organskih snovi). V kislem okolju ($\text{pH} < 2$) prevladuje kationska oblika molekule z dobro adsorpcijo, v bazičnem okolju ($\text{pH} > 6,5$) pa anionska. Pri $\text{pH} 2 - 6,5$ je večina molekul sulfadiazina v obliki iona dvojčka, ki se močneje adsorbira na delce prsti kot anion. V

nevtralnem okolju je za sulfonamide značilna vezava na organske snovi prek hidrofobnih interakcij (40).

Kljub nizkemu porazdelitvenemu koeficientu zemlja–voda (K_d), ki kaže na visoko mobilnost, pride pri sulfonamidih do hitre začetne adsorpcije v zemlji. Nizka vrednost K_d pomeni, da je spojina v manjšem deležu vezana na delce prsti, zato je mobilna in lahko prehaja v okolju. V študijah poteka vezave preostankov sulfadiazina v prsti so ugotovili hitro in močno adsorpcijo na delce prsti že v nekaj minutah po vnosu učinkovine v zemljo ter s tem takojšnje zmanjšanje ekstraktabilnosti. Poleg tega naj bi v prvih 24 urah stika s prstjo potekalo še kinetično vodeno nadaljnje zmanjševanje ekstraktabilnosti. Tako se pri sulfadiazinu s časom povečuje delež vezanih preostankov, predvsem neekstraktabile frakcije. V 24 urah so določili 40 – 50 % lahko ekstraktabilnih, 30 – 35 % težje ekstraktabilnih in 15 – 25 % neekstraktabilnih preostankov. Ob koncu študije, po 218 dneh, pa <5 % lahko ekstraktabilne, 45 – 50 % težje ekstraktabilne in okrog 50 % neekstraktabile frakcije. Upad ekstraktabilnosti je bil hitrejši ob prisotnosti gnoj, kar kaže na pomen mikrobioloških procesov pri nastajanju neekstraktabilnih preostankov (57).

S časom se adsorbirani reverzibilno vezani delež lahko deloma počasi sprosti v dostopne oblike, tako se dlje časa ohranja biološka aktivnost sulfadiazina v zemlji. Sočasno v zemlji poteka sekvestracija molekul sulfadiazina na podlago. Najprej nastajajo reverzibilno, nekovalentno vezani preostanki, nato pa se količina ekstraktabilne frakcije postopno zmanjšuje, saj nastajajo neekstraktabilni, kovalentno vezani preostanki. Zaradi počasnega nastajanja neekstraktabilnih preostankov, ostaja sulfadiazin dlje časa razpoložljiv za okolje, saj lahko medtem poteka desorpcija reverzibilno vezane frakcije. Za ireverzibilno adsorpcijo je najverjetneje odgovorna aromatska amino skupina, ki tvori kovalentne vezi s huminskimi snovmi v zemlji. Pri acetiliranem presnovku sulfadiazina je na tem mestu vezana acetilna skupina, zato ne tvori te kovalentne vezi in ima šibkejšo vezavo kot starševska molekula in presnovek hidroksi-sulfadiazin. Amino skupina je tudi nosilec protimikrobnega delovanja sulfonamidov, zato adsorpcija prispeva k zmanjšanju njihove biološke aktivnosti (39, 46, 58).

Adsorpcija tilozina je močno odvisna od pH okolja, narave vezavnih površin, deleža ilovice v zemlji in kationske izmenjevalne kapacitete prsti; penetracija v mikro pore prsti je zaradi velikosti molekule ovirana. Molekula tilozina ima veliko število –OH in –C=O skupin, ki pri adsorpciji tvorijo elektrostatske interakcije in vodikove vezi s polarnimi deli huminskih kislin. V splošnem se makrolidi dobro adsorbirajo v prsteh z visoko vsebnostjo mineralov

kot so Fe, Al in Mn, kjer imajo zaradi tega nizko težnjo za migracijo. Pri tilozinu je adsorpcija v pozitivni korelaciji z vsebnostjo ilovice v prsti; v študijah je bil v peščeni zemlji določen K_d 8-11 L/kg, v ilovnati pa 62-128 L/kg. Vpliv organskih snovi na adsorpcijo je v primeru tilozina koncentracijsko odvisen; pri nižjih koncentracijah učinkovine je adsorpcija v zemlji višja, ko je učinkovine več pa nižja (4, 42).

Z nižanjem pH se zvišuje K_d tilozina, saj pri nižjem pH-ju v molekuli prevladuje pozitivni naboj, kar omogoča več elektrostatskih povezav z negativno nabitimi površinami v zemlji oz. gnoju ali z molekulami, kot so aminokisline, proteini in druge elektronegativne zvrsti ter pri tem tvorijo močne ionske vezi. Pri višji ionski moči naj bi bila adsorpcija tilozina manjša, zaradi kompeticije med kationi elektrolitov in pozitivno nabitimi molekulami tilozina za negativno nabite adsorbente v okolju. Kationi elektrolitov v raztopini so lahko tudi hidratirani in delujejo kot donorji protonov ter protonirajo terciarni amin v molekuli tilozina ali pa vezani na negativnih delcih prsti tvorijo H-vezi z OH skupinami tilozina. Ti mehanizmi spodbudijo njegovo adsorpcijo pri višjih ionskih močeh. Sicer so pri adsorpciji tilozina pomembne predvsem hidrofozne in ne ionske vezi z alifatskim aminom v molekuli. Vzrok je verjetno v stereokemiji molekule, saj je tilozin A velika molekula in je vezava med alifatskim aminom in delci v podlagi sterično ovirana (34, 42).

Različne oblike tilozina oz. njegovi presnovki imajo zaradi razlik v strukturi tudi drugačne lastnosti v okolju. Med tilozinom A in tilozinom B, ki nastane z njegovo hidrolizo, so večje razlike v adsorpciji, saj pride pri hidrolizi do odcepa mikaroznega sladkorja. Zato ima tilozin B večjo hidrofilnost in s tem manjši potencial za tvorbo hidrofnih interakcij ter s tem potencialno višjo mobilnost v okolju (34).

4.2.4 Vpliv sestavin gnoja na adsorpcijo v zemlji

Učinkovine največkrat vstopijo v zemljo z živalskim gnojem, ki tudi lahko vpliva na procese adsorpcije in obnašanje učinkovin v okolju. Sestava različnih tipov gnoja (npr. goveji, prašičji, perutninski) je zelo heterogena in kompleksna. Prašičji gnoj npr. vsebuje različne kovinske ione (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Na^+), amonijeve in acetatne ione, bikarbonat, maščobne kisline ter fenole, ki nastajajo pri bakterijski razgradnji beljakovin v črevesju prašičev. Poleg tega so lahko prisotne še žolčne kisline, aminokisline in nerazgrajene vlaknine in beljakovine. Običajno je adsorpcija protimikrobnih učinkovin v gnoju, bogatem z organskimi snovmi močna, prevladujejo ionske interakcije in vodikove vezi. Gnoj vpliva na adsorpcijo učinkovin predvsem prek sprememb pH prsti in deleža

organskih snovi v njej, lahko pa vpliva tudi na sestavo mikrobnih združb v zemlji ter s tem na delovanje teh mikrobov. Večinoma vsebuje gnoj veliko amonijaka in ima visok pH, zato se z gnojenjem zviša pH prsti. S tem se spremenijo naboji na površinah delcev in kationska izmenjevalna kapaciteta prsti. Sprememba pH vpliva tudi na celotni neto naboj molekul prisotnih disociirajočih spojin, zaradi česar se spremenijo njihove porazdelitvene lastnosti, vezava v zemlji in potencial za pronicanje skozi prst. Večja količina raztopljenih organskih snovi lahko poveča mobilnost težkih kovin, pesticidov in farmacevtskih učinkovin prisotnih v zemlji in podzemnih vodah. Mobilni koloidi organskih snovi namreč delujejo kot nosilci za druge toplice in delce ter tako spodbujajo njihovo mobilnost (40, 42, 46, 59).

Pri sulfonamidih je adsorpcija v gnoju močnejša kot v zemlji zaradi številnih karboksilnih in fenolnih komponent, ki predstavljajo vezavna mesta zanje. V gnojeno zemlji pa je adsorpcija šibkejša kot v zemlji pred gnojenjem, saj se poveča mobilnost molekul učinkovine. Z dvigom pH ob gnojenju se namreč poveča delež anionske oblike molekul, ki ima od vseh molekulskih zvrsti najšibkejšo vezavo. Dodatno imajo enak vpliv še raztopljene organske snovi, ki povečajo koncentracijo sulfadiazina v vodni fazi prsti. Poleg tega gnoj vsebuje N-heterociklične ogljikovodike, ki z N-heterocikličnimi sulfonamidi tekmujejo za adsorpcijska mesta na delcih prsti (40, 46).

Za tilozin je značilna močna adsorpcija in majhna mobilnost v zemlji, ob prisotnosti gnoja pa se to lahko spremeni, predvsem zaradi povečane količine organskih snovi. V študijah so ugotovili, da je adsorpcija tilozina na koloidne (< 1,2 μm) in trdne (< 2 μm) delce organskih snovi primerljiva; tako se z vezavo molekul tilozina na koloide poveča njihova mobilnost, saj te, vezane na koloidnih delcih, potujejo s površinskimi oz. podzemnimi tokovi. Glede na določene vrednosti za K_d in primerjavo teh s K_d drugih protimikrobnih učinkovin se tilozin močno adsorbira na delce gnoja in je bolj mobil kot npr. tetraciklini, a manj kot sulfonamidi (42, 60).

4.2.5 Obstočnost in razgradnja preostankov učinkovin v zemlji

Preostanki protimikrobnih učinkovin so heterogeno porazdeljeni v okolju v različnih koncentracijah, ki so za večino teh učinkovin (makrolidi, sulfonamidi, trimetoprim, fluorokinoloni, tetraciklini) nižje od predvidenih biološko aktivnih koncentracij (0,1 ppm oz. 100 $\mu\text{g/kg}$). Z biološkega vidika se mnoge učinkovine ob stiku z zemljo učinkovito

nevtralizirajo, predvsem z adsorpcijo na delce prsti. Dinamika procesov razgradnje se med vrstami prsti nekoliko razlikuje. Za β -laktame in florfenikol so ugotovili, da v različnih tipih prsti ohranjajo biološko aktivnost ter s tem lahko vplivajo na razvoj rezistence za antibiotike (44).

S proučevanjem razgradnje radioaktivno označenega florfenikola (92 dni) v treh tipih gnojene prsti pri temperaturi 22 °C je bila ugotovljena dolgotrajna postopna mineralizacija, z razpolovnimi časi med 86 in 270 dni oz. v povprečju 158 dni, kar je približno 5 mesecev. Pri tem se je 24 – 50 % začetne aplicirane radioaktivnosti sprostilo v obliki ogljikovega dioksida (CO₂). Po 14 dneh je bilo v prsti manj kot 40 % ekstraktabilnega deleža starševske spojine. Nastajali so polarni presnovki, ki pa se v zemlji niso akumulirali, zato so zanje predvidevali, da se razgrajujejo enako hitro ali hitreje kot starševska spojina. Ob koncu te, 92 dnevne študije se je v vseh treh vrstah prsti razgradilo 94 – 100 % apliciranega florfenikola. Primarna biorazgradnja učinkovine je bila dokaj hitra z razpolovnimi časi 4 – 27 dni oz. povprečno 13 dni. Glede na določene razpolovne čase za primarno razgradnjo in celotno mineralizacijo je bil za razgradnjo florfenikola določen razpolovni čas 27 dni (36).

V študiji, kjer so proučevali ohranjanje aktivnosti protimikrobnih učinkovin (ampicilin, cefalotin, cefoksitin, ceftiofur, florfenikol, tetraciklin, ciprofloksacin, sulfadiazin, sulfadimetoksin) v treh različnih brozgah iz vode in 20 % prsti vrste mulj-ilovica, pesek-ilovica oz. peščeni prsti, so opazovali rast (optična gostota) bakteriji vrste *Escherichia coli* K-12 ob prisotnosti supernatanta, pridobljenega iz testnih brozg z različnimi učinkovinami. Kjer je po inkubaciji prišlo do znižanja koncentracije učinkovine v vzorcu pod MIC za to protimikrobno učinkovino, so bakterije rastle kljub prisotnosti učinkovine. Florfenikol je v testu ohranil sposobnost popolnega zaviranja rasti *E. coli* K-12. Protimikrobna aktivnost se je ohranila tudi pri sulfadiazinu, vendar ni bilo popolnega zaviranja bakterij. Ugotovili so, da je bil vzrok zmanjšanja protimikrobne aktivnosti v testiranih vzorcih predvsem adsorpcija v delce prsti, s čimer se je nevtralizirala večina protimikrobne aktivnosti oz. abiotska razgradnja, kot je hidroliza. Biotske razgradnje v študiji niso določali. Koncentracije preostankov protimikrobnih učinkovin v zemlji so bile različne, odvisne od vrste prsti v testni brozgi. Najnižje so bile v brozgi s prstjo mulj-ilovica, nato v primeru peščeno-ilovnate prsti in najvišje v peščeni zemlji. Skladno s temi rezultati je bila v bioloških testih v vzorcih z višjimi koncentracijami protimikrobnih učinkovin omejena oz. zavirana rast bakterij. Hkrati so določili tudi stopnjo hidrolize proučevanih učinkovin v 24

urah, v pufrih različni pH vednosti med 4 in 8 ter ugotovili, da florfenikol ni podvržen hidrolizi. V primeru sulfadiazina analize niso mogli izvesti zaradi slabe topnosti te učinkovine (44).

Študija je pokazala, da adsorbirane učinkovine niso biološko aktivne, so pa lahko še vedno razpoložljive za okolje. Vrste prsti uporabljene v testih so bile glede fizikalno-kemijskih lastnosti precej različne. V prsteh z večjim deležem gline in večjo vsebnostjo organskih snovi je bilo odstranjevanje protimikrobnih učinkovin učinkovitejše, kot v pretežno peščeni prsti. Poleg tega predvidevajo, da je razgradnja oz. nevtralizacija učinkovin, ocenjena v študiji precej manjša, kot v naravnem okolju, saj tu ni bila upoštevana fotoliza in razgradnja z biološkimi procesi v naravnem okolju (44).

Pri sulfadiazinu so ugotovili, da je kljub manjši adsorpciji v globljih delih prsti njegov potencial za razgradnjo manjši. Verjetno zaradi zmanjševanja mikrobne aktivnosti z globino, kar kaže na večji pomen biorazgradnje. Ker procesi v glavnem potekajo v stiku s trdno fazo, je pri nižjih začetnih koncentracijah, razgradnja hitrejša zaradi manjše zasedenosti površine. Poleg tega nižje koncentracije učinkovine manj vplivajo (zavirajo rast) na mikrobo. Zaradi nelinearne kinetike adsorpcije je količina adsorbirane učinkovine relativno visoka, kar lahko povzroči ali hitrejšo ali počasnejšo razgradnjo, odvisno od vrste udeleženih mikrobov (61).

V raziskavi, kjer so opazovali stabilnost sulfadiazina v govejem gnoju ter razgradnjo in mobilnost v zemlji, se je v zemlji tipa mulj-glina v 102 dneh ekstraktabilni preostanek zmanjšal iz 86 % na 3 % aplicirane radioaktivnosti, določena sta bila $DT_{50} = 3$ dni in $DT_{90} = 29$ dni. Hitro je bilo tudi nastajanje neekstraktabilnih preostankov, ki so v 7 dneh predstavljali >75 % in končno 96 % aplicirane radioaktivnosti. Mineralizacija je bila le 2 %. Ugotovili so, da je razgradnja sulfadiazina v zemlji hitrejša kot v gnoju, prav tako je bilo hitrejšo nastajanje neekstraktabilnih preostankov. Hitro nastajanje neekstraktabilnih preostankov, kaže na visoko afiniteto sulfadiazina do delcev prsti (54).

O hitrem nastajanju neekstraktabilnih preostankov v zemlji poroča tudi 57 dnevna študija, kjer so opazovali zmanjšanje ekstraktabilnosti preostankov sulfadiazina (sulfadiazin, acetyl-sulfadiazin, 4-OH-sulfadiazin) v zemlji gnojeni s svežim gnojem in v zemlji gnojeni z gnojem, ki je bil 6 mesecev kompostiran pri temperaturi 20 °C. V samem svežem gnoju so takoj po dodatku sulfadiazina določili: 85,1 mg/kg sulfadiazina, 55,1 mg/kg acetyl-sulfadiazina in 37,5 mg/kg 4-OH-sulfadiazina. V kompostiranem gnoju s sulfadiazinom je bila določena višja koncentracija sulfadiazina 125,1 mg/g (predpostavili so, da zaradi

pretvorbe presnovka acetil-sulfadiazin nazaj v sulfadiazin med kompostiranjem), 17,5 mg/kg acetil-sulfadiazin in 37,5 mg/g 4-OH-sulfadiazina. V samem gnoju je bila tako več kot 96 % ekstraktabilnost. Ob vnosu gnoja v ilovnato-peščeno prst so opazili hiter upad ekstraktabilnosti. V zemlji, gnojeni s svežem gnojem, je bila po 1 dnevu $\leq 10,8$ %, po 29 dneh pa $\leq 0,3$ % ekstraktabilnost preostankov sulfadiazina, v zemlji s kompostiranim gnojem pa po 1 dnevu $\leq 6,8$ % in po 29 dneh $\leq 3,2$ % ekstraktabilnost (62).

V študiji aerobne razgradnje in fotolize tilozina v zemlji in vodi so predlagali naslednjo pot razgradnje v okolju. Z odcepom mikaroznega sladkorja iz molekule tilozina A, naj bi nastal tilozin B. Reakcija naj bi potekala predvsem v kislem okolju oz. v vodi pod vplivom svetlobe. Z abiotsko transformacijo naj bi v zemlji nastajal tilozin C. Tilozin D so določili v sistemih s prisotnim gnojem, zato so sklepali, da so v njegov nastanek vključene bakterije oz. mikroorganizmi. Tilozin D je bil določen tudi kot glavni produkt presnove pri podganah in prašičih izpostavljenih tilozinu. V nevtralnem in alkalnem okolju so določili še prisotnost aldol tilozina in nekaj nedefiniranih polarnih razgradnih produktov. Nastali produkti se lahko nadalje razgrajujejo in končno mineralizirajo. V isti študiji so ugotovili še, da je izginjanje tilozina iz proučevanih vzorcev s časom večinoma posledica adsorpcije na trdne delce in abiotske transformacije, vključno z izomerizacijo in razgradnjo. Takšno razgradnjo dokazuje še več drugih študij v različnih tipih prsti in pri različnih pogojih (28, 63).

V raziskavi razgradnje tilozina A pod aerobnimi pogoji pri 20 °C so 120 dni spremljali vzorce štirih prsti z različnimi pH in teksturami ter začetno koncentracijo radioaktivno označene učinkovine 1 mg/kg. Tilozin A se je primarno razgradil in pretvoril v tilozin B, C in D ter nekaj drugih presnovkov. S časom se je koncentracija vseh faktorjev tilozina zmanjšala, od začetnega deleža 85 - 88 % na 58 - 70 % ob koncu študije. Končna popolna mineralizacija do CO₂ je bil ocenjena na 1,6 – 9,3 % začetnega odmerka učinkovine. Določeni razpolovni časi tilozina A so bili med 50,3 in 105 dnevi, odvisno od vrste prsti. Količina vezanih preostankov učinkovine je s časom naraščala v območju od 12,6 – 23,8 %, iz česar so sklepali na postopno razgradnjo tilozina do preostankov, ki se vgrajujejo v podlago. S študijo je bila torej dokazana razgradnja tilozina A in ostalih faktorjev v zemlji ter nato postopna razgradnja do CO₂. Podobne so bile tudi ugotovitve drugih raziskav. Pri opazovanju razgradnje tilozina v zemlji gnojeni s piščančjimi iztrebki onesnaženimi z učinkovino, kjer so bili vzorci inkubirani pri različnih temperaturah (4, 20 in 30 °C) in aerobnih pogojih 30 dni, so ugotovili upad protimikrobne aktivnosti učinkovine. Pri temperaturi 4 °C se je ohranilo 40 % učinka, pri ostalih dveh temperaturah pa aktivnosti

niso več zaznali že po 5. dnevu. V raziskavi s spreminjanjem koncentracij vseh faktorjev tilozina (A, B, C, D) na poljih gnojenih s prašičjim gnojem živali izpostavljenih tilozinu, so določili razpolovni čas tilozina A 49 in 67 dni, tilozina B in D pa med 84 in 140 dni. Najnižja začetna koncentracija je bila določena za tilozin C in se v času opazovanja ni znižala, vendar je bila ves čas pod določeno mejo kvantifikacije ter nekje tudi pod mejo detekcije, zato niso mogli določiti značilnosti njegove razgradnje (48).

S študijo, kjer so določali profil izginjanja tilozina v sterilni in nesterilni zemlji, so v obeh primerih za tilozin A določili razpolovni čas 7 dni, za tilozin D pa 8 dni, ter počasno naraščanje koncentracije tilozina C v času študije, kar kaže na abiotsko razgradnjo tilozina A v zemlji. Tilozina B v zemlji niso zaznali, predvidoma zaradi prisotnosti drugih snovi v zemlji. Faktor B je bil namreč določen v študijah razgradnje v vodnem okolju. Glede na to, da med hitrostjo razgradnje tilozina v sterilni in nesterilni prsti ni bilo statistično značilne razlike v izginjanju tilozina pri koncentraciji 50 µg/g spremljani v študiji, so sklepali, da v razgradnji učinkovine niso bili pomembni mikroorganizmi. Vzrok za njihovo neaktivnost je bilo verjetno protimikrobno delovanje tilozina, saj so v drugih študijah z nižjimi koncentracijami učinkovine poročali tudi o biorazgradnji (63).

4.2.6 Pronicanje v globlje plasti prsti in vodno okolje

Preostanki protimikrobnih učinkovin v kopenskem okolju so vir teh spojin za vodno okolje. Ob padavinah oz. namakanju kmetijskih površin se spira zemeljsko površje in profil tal, tok tekočine pri tem odnaša raztopljene snovi po okoliških površinah in v vodovje na površju ter v globlje dele prsti in podzemne vode. Če se po gnojenju prsti gnoj v kratkem ne zaorje v zemljo, naravne padavine ali namakanje spirajo gnoj ter s sabo odnašajo morebitne preostanke učinkovin. Tako so hidrološke poti lahko pomembna transportna pot preostankov veterinarskih protimikrobnih učinkovin apliciranih v zemljo z gnojem. (64)

Značilnosti in prehajanje učinkovin v okolju je odvisno od fizikalno-kemijskih lastnosti, ki določajo njihovo mobilnost in potencial za prehod v vodno okolje. Ni nujno, da imajo učinkovine iz istega razreda tudi enake značilnosti v okolju. Adsorpcija na organske snovi in izmenjevalna mesta mineralov so pogosto vezana na prenose nabojev in ionske interakcije, ne samo na hidrofobno porazdeljevanje (52).

Z opazovanjem prehajanja različnih veterinarskih protimikrobnih učinkovin v vodno okolje so ugotovili, da imajo lahko spojine kljub visokemu koeficientu adsorpcije solidno

mobilitnost v okolju in se koncentracije v vodnem okolju lahko približajo tistim z dobro mobilnostjo (64).

V študijah adsorpcije in desorpcije florfenikola v treh različnih prsteh so ugotovili, da je za učinkovino značilna šibka vezava na trdne delce prsti. Glede na določene nizke vrednosti K_d (0,16 – 0,95) in K_{oc} (24 – 52), so florfenikol uvrstili med dokaj mobilne spojine, ki potencialno prehajajo tudi v vodno okolje. V nadaljnjih raziskavah so spremljali koncentracije florfenikola in njegove toksične učinke v vodnem okolju. Izmerjene koncentracije učinkovine so bile tudi v primeru najslabšega scenarija, ko gnojenju sledi obilno namakanje, pod najnižjo koncentracijo brez opaznih učinkov za testirane organizme. To pomeni, da florfenikol ne predstavlja tveganja za vodno okolje (38).

Pri proučevanju prehajanja sulfadiazina v nižje sloje prsti kljub njegovi dobri mobilnosti v zemlji, v vzorcih iz globljih slojev prsti niso našli preostankov spojine. V poskusih so simulirali močne padavine v naravnem okolju in preverjali vzorce prsti z globine 15 cm in 30 cm takoj po namakanju ter z globine 90 cm vzorčenih kasneje. Z laboratorijskim lizimetričnim testom (to je metoda za merjenje evapotranspiracije in količine ter kakovosti vode, ki pronica skozi talni profil proti podtalnici) so nato testirali prenosljivost laboratorijskih rezultatov na pogoje naravnega okolja ter zaključili, da se 64 % učinkovine zadrži v zgornjem sloju prsti (tj. v pasu 0 – 5 cm globoko), z globino pa se kontaminacija zmanjšuje. Visoka afiniteta sulfadiazina za delce prsti nasprotuje toku vode in zmanjšuje izpiranje oz. pronicanje globlje v tla. Tveganje bi bilo večje le, če bi takoj po nanosu učinkovine na zemljo sledilo obilno namakanje (presežek vode) (54).

V raziskavi onesnaženosti površinskih voda s tilozinom, kjer so bili odvzeti 104 vzorci voda, ki bi lahko bile onesnažene s tilozinom, je bil tilozin prisoten le v 13,5 % vzorcev. Poleg tega so bile koncentracije tilozina v pozitivnih vzorcih nizke, v območju 0,04 – 0,28 $\mu\text{g/L}$. Tudi druge študije kažejo na visoko tendenco tilozina za adsorpcijo (K_{oc} 553 – 7988 L/kg), kar pomeni, da v zemlji ni mobilen. Še posebej v tisti z velikim deležem ilovice (13, 49).

4.3 ZNAČILNOSTI UČINKOVIN V VODNEM OKOLJU

Mnoge študije so dokazale prisotnost protimikrobnih učinkovin in njihovih presnovkov v različno visokih koncentracijah v rekah in drugih vodnih okoljih na različnih krajih sveta. V vodi lahko učinkovine vplivajo na prisotne organizme, lahko se razgrajujejo s procesi

fotolize ali hidrolize. Za fotorazgradnjo oz. fotolizo preostankov učinkovin je potrebna svetloba ali UV sevanje, hidroliza pa poteka v odsotnosti svetlobe. Fotoliza je direktna ali indirektna. Pri direktni fotolizi gre za direktno interakcijo učinkovine s svetlobo, pri indirektni pa svetloba reagira s spojinami prisotnimi v vodi, ki potem lahko spodbujajo razgradnjo učinkovin (38, 65).

V 28-dnevni študiji so aerobno biorazgradnjo florfenikola in presnovkov v vodi določali z merjenjem ^{14}C -ogljikovega dioksida (CO_2) in ^{14}C -hlapnih produktov, ki so nastajali ob mikrobni razgradnji učinkovine. Celotni izmerjeni $^{14}\text{CO}_2$ in ^{14}C -hlapni produkti so predstavljali manj kot 1,0 % začetnega odmerka učinkovine. Ob koncu študije je izmerjeni preostanek florfenikola v testni raztopini predstavljal 81 % začetne aplikacije, 19 % učinkovine se je razgradilo. Pri pogojih študije je bil določen razpolovni čas florfenikola daljši od 28 dni. Med presnovki florfenikola je bila najintenzivnejša razgradnja amino presnovka, katerega je bilo po 28 dneh 25,4 % začetne vrednosti, oksamske kisline in alkoholnega presnovka pa je bilo še 98,6 % in 70,7 %. Predvidevali so, da je bila majhna razgradljivost proučevanih spojin, ki so jo določili v študiji, lahko posledica zaviranja potencialne mikrobne aktivnosti, zaradi visokih začetnih koncentracij učinkovine in njenih presnovkov, vendar tega v študiji niso preverili (36).

S proučevanjem direktne in indirektna fotolize florfenikola v 30-dnevni študiji so ugotovili, da nobena ne predstavlja pomembne razgradne poti za učinkovino. Razpolovni čas fotolize so ocenili na več kot 150 dni. Na osnovi kontrolnih vzorcev, hranjenih v temi, so določili še razpolovni čas florfenikola za hidrolizo, ki bi bil v čisti vodi s pH 7 okrog 350 dni, zato tudi hidroliza pri razgradnji florfenikola ni pomembna.

Podobne rezultate minimalne razgradnje podajajo še druge študije fotolize in hidrolize florfenikola in njegovih presnovkov. V eni od raziskav so opazili razliko med čisto vodo in naravno svežo vodo. V čisti vodi ni bilo fotolize ne pri obsevanju in ne ob sončni svetlobi oz. simulirani sončni svetlobi, medtem ko je v naravni sveži vodi ob vplivu sončne svetlobe potekla fotoliza. Kljub temu glede na rezultate večine raziskav procesa za razgradnjo florfenikola nista pomembna v nobeni vrsti vode (deionizirani, sveži ali morski vodi) (36, 38).

V raziskavi fotokatalitične razgradnje štirih sulfonamidov v vodnih raztopinah ob prisotnosti TiO_2 in obsevanju z UV žarki (λ_{max} 366 nm) so opazovali vpliv starševskih molekul in spojin nastalih s fotorazgradnjo na rast zelene alge *Chlorella vulgaris*. Glede občutljivosti

sulfonamidov na biorazgradnjo so različna mnenja, ene študije kažejo visoko odpornost, druge ne. V splošnem imajo sulfonamidi v okolju dolgo življenjsko dobo in se lahko nalagajo v različnih organizmih v prehranjevalni verigi. Vsi sulfonamidi v raziskavi so bili v začetnih raztopinah odporni na biorazgradnjo in toksični za zeleno algo *Chlorella vulgaris* (Toksičnost glede na EC₅₀: sulfacetamid > sulfatiazol > sulfametoksazol > sulfadiazin) vendar občutljivi na fotorazgradnjo. To sprožijo HO• radikali, ki nastanejo v vodnih raztopinah izpostavljenih UV žarkom ob prisotnosti TiO₂, Fe(III) oz. H₂O₂. Med procesom fotokatalitične razgradnje nastanejo vmesni organski produkti (sulfanilamid, sulfanilna kislina, anilin, hidrokinon, kinon, karboksilna kislina, dikarboksilna kislina), ki se nadalje lahko razgradijo s procesi biorazgradnje (z mikroorganizmi) ali se, če so odporni na biorazgradnjo, z nadaljevanjem fotorazgradnje popolnoma mineralizirajo do anorganskih snovi, za kar pa so potrebni daljši časi obsevanja kot samo za proces razgradnje. V običajnih razmerah se fotorazgradnja konča na stopnji vmesnih organskih produktov, ki se naprej lahko razgradijo z biološkimi procesi. Razgradni produkti sulfadiazina, ki so nastali po različnih časih obsevanja so imeli inhibitorni učinek na testno kulturo. Zaviranje rasti je bilo manjše v vzorcih z raztopino obsevano z UV žarki, kot v vzorcih, kjer so bile starševske molekule, kar pomeni, da je bila toksičnost razgradnih produktov manjša (66).

V študijah ekotoksičnosti tilozina za vodne organizme z vodnimi raki in mavrično postrvjo so opazili, da ostajajo koncentracije tilozina v vodi večinoma konstantne v času 48 oz. 96 urnega opazovanja. Nasprotno je bilo v 72 urnih poskusih z obsevanimi algami v posodi brez alg opaženo zmanjševanje koncentracije tilozina. Iz tega so predpostavili, da tilozin v vodi ne hidrolizira, ampak ima potencial za fotolizo (48).

4.4 EKOTOKSIKOLOŠKE LASTNOSTI PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN

Za oceno akutnih in kroničnih učinkov določene učinkovine ter njenih presnovkov na mikroorganizme, ribe, vodne, morske in kopenske nevretenčarje, vodne in kopenske rastline, CVMP smernice zahtevajo uporabo podatkov pridobljenih v laboratorijskih študijah, izvedenih v skladu s smernicami agencije za zdravila in hrano v ZDA (FDA) ali smernicami Organizacije za gospodarsko sodelovanje in razvoj (»Organisation for Economic Co-operation and Development« - OECD), ob upoštevanju dobre laboratorijske

prakse. (33) V drugi fazi ERA poročila je vrednotenje tveganja v stopnji A narejeno s podatki o vplivu določenem za kratkotrajno izpostavljenost oz. akutne učinke, v stopnji B pa s podatki o dolgotrajni izpostavljenosti oz. kroničnih učinkih. (33) Pri izračunu kvocienta tveganja smo uporabili podatke o vplivu učinkovin na organizme, ki smo jih zbrali v pregledani dostopni literaturi.

4.4.1 Ekotoksičnost florfenikola

Za florfenikol smo večino podatkov o ekotoksičnosti povzeli iz ocene tveganja za okolje narejene za zdravilo *Aquaflor* (67), saj so bili ti že zbrani iz ustrezno izvedenih študij. Predstavljeni so v *Prilogi V*, v *Preglednici XIX*, kjer so prikazani tudi rezultati izračuna kvocienta tveganja za učinkovino.

Florfenikol je učinkovit proti širokemu spektru protimikrobnih učinkovin. Določene minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) so v razponu od 0,25 mg/L za bakterijo *Pasturella multocida* do >1000 mg/L za organizma *Trichoderme virid* in *Aspergillus niger*. Za zaviranje rasti nitrifikacijskih bakterij *Nitrobacter* sp. in *Nitrosomonas europaeae* pa je bila določena MIC 65 in 2,5 mg/L (67).

Mikrobi v zemlji so pomembni za delovanje ekosistema, saj so vključeni v kroženje dušika. Prokarioti sodelujejo v procesih nitrifikacije (tj. oksidacija amonijaka do nitrata prek nitrita) in denitrifikacije (tj. redukcija nitrata do molekularnega dušika prek nitrita, dušikovega oksida in didušikovega oksida). Učinkovine, ki vplivajo na mikroorganizme v zemlji, s tem verjetno posredno vplivajo tudi na te procese (58).

V raziskavi vpliva na mikrobno pretvorbo dušika, izvedeni v skladu z OECD 216, je imel florfenikol pri koncentracijah 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg in 2,5 mg/kg le začasen vpliv na zemeljske mikroorganizme. Koncentracije nitrata so bile ves čas študije podobne kot v kontrolnem vzorcu brez učinkovine, nivo amonijaka pa se je v izpostavljenih vzorcih najprej zvišal in nato po 28 dneh vrnil na začetno vrednost. Odstopanje koncentracij nastalega nitrata in amonijaka je bilo ob koncu 28-dnevne študije manj kot 25 % glede na kontrolni vzorec. To pomeni, da ni dolgoročnega vpliva na te mikroorganizme (67).

V testu vpliva na procese kroženja ogljika (OECD 217) je florfenikol pri vseh testiranih koncentracijah zaviral procese kroženja ogljika. Aktivnost mikroorganizmov se je pri nižjih koncentracijah učinkovine obnovila v 28 dneh, pri koncentraciji 2,5 mg/kg pa po 56 dneh. Vpliv na procese kroženja ogljika je bil manj kot 25 %, torej tudi na kroženje ogljika florfenikol nima dolgoročnih učinkov.

Kot je bilo določeno v testih, se je mikrobná aktivnost pri pogojih testiranja s časom obnovila. Florfenikol ni ubil mikroorganizmov, ampak jih le deloma zavrl, zato se procesi v zemlji po razgradnji učinkovine lahko obnovil. Ugotovili so tudi, da so presnovki učinkovine od 5- do več kot 1000-krat manj toksični kot starševska spojina, zato je pri oceni tveganja za mikroorganizme potrebno upoštevati predvsem vpliv starševske molekule (67).

V študiji vpliva florfenikola na reprodukcijo zemeljskih črvov po OECD 222, s testnim organizmom *Eisenia foetida* (zemeljski črv) so za smrt odraslih osebkov določili $LC_{50} > 50$ mg/kg, za razmnoževanje EC_{50} 8,61 mg/kg, za razvoj mladih črvov pa $LOEC$ 3,13 mg/kg in $NOEC$ 1,56 mg/kg (67).

Rezultati testov toksičnosti za kopenske rastline narejeni v skladu z navodili OECD 208, kažejo, da florfenikol nima vpliva na kalitev, vpliva pa na rast rastlin. Na osnovi mase vzklilih sadik kreše, gorčice in pšenice so bile ocenjene vrednosti EC_{50} za te rastline 0,5 mg/kg, 1,7 mg/kg in 6,7 mg/kg. V različnih študijah na rastlinah so bile najnižje vrednosti $NOEC$ določene za krešo 0,16 mg/kg, za gorčico in zelje pa 0,123 mg/kg (67).

V raziskavi vpliva florfenikola na kalitev in rast z več rastlinami (čebula, pšenica, oves, paradižnik, oljna ogrščica, gorčica, kumarica, črna detelja, navadni fižol) po OECD 208 so ugotovili, da je v večini vpliv učinkovine na rastline odvisen od koncentracije. Edini vidni učinek na rastlinah je bilo delno razbarvanje listov, opažen pri gorčici, paradižniku in oljni ogrščici. Najnižje določene koncentracije z vplivom na kalitev so bile EC_{10} 0,01 mg/kg za oljno ogrščico (*Brassica napus*), EC_{50} 1,46 mg/kg za gorčico (*Sinapis alba*) in $NOEC$ <0,06 mg/kg za paradižnik (*Solanum lycopersicum*). Preživetje poganjka ob prisotnosti florfenikola je bilo najbolj občutljivo pri gorčici (*Sinapis alba*), določili so: EC_{10} 0,24 mg/kg, EC_{50} 0,60 mg/kg in $NOEC$ 0,56 mg/kg. Najobčutljivejši parameter v testu je bila biomasa oljne ogrščice (*Brassica napus*), z EC_{10} 0,05 mg/kg, EC_{50} 0,25 mg/kg in $NOEC$ <0,06 mg/kg (53).

Testiranja toksičnosti za vodne rastline so narejena večinoma na algah. Za algo *Pseudokirchneriella subcapitata* (oz. *Selenastrum capricornutum*) je bila za florfenikol določena MIC za biomaso 1 mg/L, za hitrost rasti pa >2,9 mg/L. Iz podatkov pridobljenih v 14 dnevni študiji so za biomaso preračunali EC_{50} za 96 urno izpostavljenost 1 mg/L in $NOEC$ 0,75 mg/L. Za to algo so bili presnovki florfenikola manj toksični od starševske spojine, z izjemo alkoholnega presnovka. Ta pa v okolju ni obstojen, zato njegove koncentracije ne morejo doseči toksičnih vrednosti. Ugotovili so, da ima florfenikol

algistatičen učinek in ne algicidnega, saj so bile določene MIC za celično gostoto (oz. biomaso) manjše kot MIC za hitrost rasti.

Za kremenasto algo (*Navicula pelliculosa*), cianobakterijo oz. modro zeleno algo (*Anabaena flos-aquae*) in vodno lečo (*Lemna gibba*) so razpoložljivi rezultati OECD testov določitev toksičnosti florfenikola. Najnižje določene EC_{50} in na osnovi teh predvidene EC_{10} oz. NOEC vrednosti so bile za vpliv na biomaso pri kremenasti algi (*Navicula pelliculosa*) ($EC_{50} = 61$ mg/L, $EC_{10} = 18,7$ mg/L; iz rezultatov testa 72-urne izpostavljenosti) in pri cianobakteriji oz. modro zeleni algi (*Anabaena flos-aquae*) ($EC_{50} = 0,23$ mg/L, NOEC = 0,11 mg/L; iz rezultatov testa 96-urne izpostavljenosti) ter za vpliv na porast biomase pri vodni leči (*Lemna gibba*) ($EC_{50} = 0,82$ mg/L, $EC_{10} = 0,28$ mg/L; iz rezultatov testa 7 dnevne izpostavljenosti) (67).

Predstavnik vodnih nevretenčarjev v OECD akutnih in kroničnih testih je *Daphnia magna*. Za akutno toksičnost florfenikola na ta organizem je bil določen $EC_{50} > 330$ mg/L in NOEC < 100 mg/L. Toksičnost presnovkov je bila podobna ali nižja kot v primeru starševske spojine. V kroničnih študijah, kjer so spremljali vpliv na preživetje, rast in razmnoževanje, za preučevane koncentracije v območju 0 – 3,0 mg/L niso opazili pomembnega vpliva na preživetje in rast. Najobčutljivejši parameter je bilo razmnoževanje, ki je bilo pri najvišji testirani koncentraciji upočasnjeno. Na osnovi tega je bil določen NOEC 1,5 mg/L (67).

Florfenikol ni izkazal akutne toksičnosti za predstavnika sladkovodnih rib *Oncorhynchus mykiss* in *Lepomis macrochirus*. Za *Oncorhynchus mykiss* sta bila določena $LC_{50} > 780$ mg/kg in NOEC 780 mg/L, za *Lepomis macrochirus* $LC_{50} > 830$ mg/L in NOEC 830 mg/L. Tudi prisotnost presnovkov učinkovine ni vplivala na umrljivost organizmov. V 33-dnevni kronični študiji na ribi *Pimephales promelas* v glavnem niso zaznali vpliva na razmnoževanje, preživetje ali rast pri testnih koncentracijah v območju 0 – 11 mg/L. Opažena je bila samo krajša končne dolžine organizma pri najvišji testirani koncentraciji, iz česar je bil določen NOEC 5,5 mg/L (67).

4.4.2 Ekotoksičnost sulfadiazina

Glede na rezultate opravljenih študij po EU direktivi 93/67/EEC, ki ocenjuje tveganje za okolje, so sulfonamidi ocenjeni za netoksične oz. neškodljive, saj nimajo mutagenih, karcinogenih in teratogenih učinkov. Poročilo »Environmentally Classified Pharmaceuticals 2009« (82), ki poleg tveganja za okolje upošteva še obstojnost in bioakumulacijo v okolju pa jih uvršča med visoko škodljive učinkovine. Sulfonamidi se

namreč lahko akumulirajo v različnih organizmih vključenih v prehranjevalno verigo in s kopičenjem v okolju se njihova toksičnost poveča oz. lahko delujejo v sinergiji z drugimi onesnažili v okolju. (25) Podatki o toksičnosti sulfadiazina za organizme v okolju predstavljeni pod tem naslovom so zbrani v *Preglednici XX*, v *Prilogi V*, kjer so prikazani tudi rezultati izračuna kvocienta tveganja za učinkovino.

V raziskavi, kjer so opazovali učinek gnoja z dodanim sulfadiazinom v koncentracijah 10 mg/kg in 100 mg/kg na strukturo in raznolikost mikrobnih združb v zemlji, so ugotovili upad biomase mikrobov, zmanjšanje razmerja bakterije-glive in spremembe v populaciji bakterij. V obeh primerih je po mesecu dni koncentracija učinkovine precej znižala, predvidevali so, da zaradi razgradnje ali vezave na organske oz. mineralne snovi v zemlji. Prisotnost sulfadiazina je najprej zavrla mikrobovno aktivnost, ki pa se je po znižanju koncentracije učinkovine popolnoma obnovila. Zaviralni učinek nižje in višje koncentracije učinkovine je bil primerljiv. Tudi nizke koncentracije sulfadiazina so bile visoko učinkovite pri zaviranju mikrobov, razlika je bila le v tem, da so višji odmerki delovali dlje. Sulfadiazin je deloval selektivno na bakterije, na arheje in glive ni imel pomembnega vpliva, zato so lahko ti organizmi nadomestili bakterijsko aktivnost, kar je bilo vidno z znižanjem razmerja bakterije-glive. V prvi stopnji nitrifikacije sodelujejo amonijak oksidirajoče bakterije (AOB) in arheje (AOA), ki so naravno prisotne v različnih deležih z razmerjem v prid arhej. Ob prisotnosti sulfadiazina se je to razmerje še povečalo, saj je učinkovina zavirala predvsem delovanje bakterij. Pri višjih koncentracijah je bil negativen učinek opazen tudi pri arhejah. Za AOB je bil ocenjen EC_{50} 8 mg/kg in za AOA 30 mg/kg. Pri denitrifikacijskih bakterijah bil je vpliv sulfadiazina različen, za nekatere skupine spodbuden, za druge zaviralen. V splošnem pa je bil za mikrobov v zemlji določen negativen vpliv prisotnega sulfadiazina (58).

V eni od študij so opazovali nalaganje in učinke sulfadiazina pri višjih rastlinah, *Salix fragilis* L. (vrba) in *Zea mays* L. (koruza), v prsteh s sulfadiazinom v koncentracijah 10 mg/kg (visoka koncentracija še pričakovana v prsti) in 200 mg/kg (neobičajno visoka koncentracija s potencialnim vplivom na rastline). Po 40 dneh so analizirali vplive učinkovine na rast, fiziološke parametre in koncentracijo starševske molekule in njenih glavnih presnovkov v rastlinskih tkivih ter različnih plasteh prsti. Ugotovili so, da ima sulfadiazin neželene učinke na rastline že pri kratkoročni izpostavljenosti tudi pri koncentraciji 10 mg/kg potencialno prisotni v naravnem okolju. Opazili so spremembe v zgradbi korenin, ki so bile verjetno posledica motene regulacije rasti zaradi vpliva

sulfadiazina. Sulfonamidi namreč zavirajo nastajanje folne kisline, ki je predhodna stopnja v sintezi fitohormonov, s tem prihaja do nenormalnih delitev in napak v diferenciaciji celic (65).

Rezultati raziskave toksičnosti sulfadiazina za rastline, kjer so spremljali kalitev semen, rast korenin in rast poganjkov so pokazali, da ima učinkovina značilen vpliv le na rast rastlin, ne pa na kalitev (zaviranje kalitve je bilo največ 18 %). Določili so linearno razmerje med koncentracijo sulfadiazina in rastjo proučevanih rastlin. Med opazovanimi rastlinami: pšenica (*Triticum aestivum*), kitajsko zelje (*Chinese cabbage*) in paradižnikom (*Cyphomandra betacea*) je bila na prisotnost sulfadiazina najbolj občutljiva pšenica, za katero je bila za rast poganjkov in korenin določena IC_{50} 28 mg/kg; pri zelju in paradižniku je bila IC_{50} 31 mg/kg oz. IC_{50} 92 mg/kg. (68) Pri rastlini beli volčji bob (*Lupinus albus*), je bilo ob enodnevnosti izpostavljenosti sulfadiazinu opaženo 13 % zmanjšanje dolžine korenin, iz tega je bil določen EC_{50} 100 mg/kg. (43) Glede na te podatke lahko vidimo, da je občutljivost rastlin na protimikrobne učinkovine v okolju različna.

Zaradi zmerne mobilnosti so sulfonamidi lahko prisotni tudi v vodnem okolju. Običajno so te koncentracije nizke, na nivoju ng/L in nimajo farmakološkega učinka pri ljudeh, lahko pa so potencialna mikro onesnažila za organizme, ki živijo v teh vodnih ekosistemih (npr.: ribe, vodni nevretenčarji, enocelične alge). Različne skupine organizmov iz različnih nivojev prehranjevalne verige so različno občutljive na protimikrobne učinkovine v okolju. Nekateri toksični učinki na primarnih avtotrofih (npr. zelene alge) potencialno vplivajo na celotno prehranjevalno verigo, saj ti organizmi predstavljajo pomemben delež celotne biomase ekosistema in so vir ogljika za celotno vodno biosfero. Dokazano je bilo, da so mikro alge bolj občutljive na protimikrobne učinkovine kot raki in ribe (39).

V vodnem okolju je lahko hkrati prisotnih več različnih protimikrobnih učinkovin oz. druge podobne spojine. V študijah, kjer so primerjali učinke posameznih protimikrobnih učinkovin, mešanic različnih tovrstnih učinkovin oz. drugih spojin v koncentracijah 0,001 – 10 μ g/L, so se sulfonamidi izkazali za najmanj toksične. Določena inhibitorna koncentracija (IC_{50}) je bila precej višja od koncentraciji pričakovanih v površinskih oz. odpadnih vodah. Za sulfadiazin so ugotovili, da pri modro zelenih algah povzroči zmanjšanje vsebnosti klorofila. Glede na ta vpliv je bil za *Mycrocistis aeruginosa* določen EC_{50} 135 mg/L (na osnovi rezultatov 7 dnevne študije), za *Selenastrum capricornutum* pa 7,8 mg/L (72 urni test). Rastopina sulfadiazina je bila toksična tudi za algo *Chlorella vulgaris*, njegovi fotorazgradni produkti pa so imeli manjši vpliv (39).

Nekoliko drugačeno vrednost EC_{50} za *Selenastrum capricornutum* podaja raziskava vpliva veterinarskih protimikrobnih učinkovin na rast sladkovodnih alg narejena v skladu z OECD smernicami. Za sulfadiazin so določili EC_{50} 2,19 mg/L in NOEC <1,00 mg/L. Na podlagi rezultatov so zaključili, da sulfonamidi ob povečani uporabi lahko predstavljajo tveganje za zelene alge. To je manjše, če se sulfonamid v tarčni živali presnovi v acetiliran derivat, ki ima precej manjši zaviralni učinek na rast alg kot starševska spojina (69).

Študija z 12 različnimi sulfonamidi, med katerimi je bil tudi sulfadiazin, usmerjena na različne bakterije in netarčne organizme (alge in rastline) z različnih trofičnih nivojev vodnega in kopenskega okolja je pokazala, da so sulfonamidi toksični za zelene alge (vrednosti EC_{50} določene za alge: 1,54 – 32,25 mg/L), še bolj pa za rastlino vodno lečo (zanjo določene vrednosti EC_{50} : 0,02 – 4,89 mg/L).

Testiranja so bila narejena na encimu acetilholin-esteraza (EC_{50} za vpliv sulfadiazina: >250 mg/L), ki sodeluje v prenosu živčnih signalov in encimu glutation-reduktaza, ki vzdržuje celično redoks stanje. Encima se uporabljata v hitrih testih za oceno potencialnih subceličnih učinkov. Kot predstavnika mikrobov sta bili uporabljeni morska alga (*Vibrio fisheri*) (EC_{50} za vpliv sulfadiazina: >25 mg/L) in zemeljska bakterija (*Aerthrobacter globiformis*) (EC_{50} za vpliv sulfadiazina: >125 mg/L), kot predstavnika netarčnih organizmov pa zelena alga (*Scendesmus vacuolatus*) (EC_{50} za vpliv sulfadiazina: 2,2 mg/L) in rastlina vodna leča (*Lemna minor*) (EC_{50} za vpliv sulfadiazina: 0,07 mg/L).

Preučevani sulfonamidi pri testiranih koncentracijah niso zavirali testnih encimov. Nobena učinkovina tudi ni imela večje akutne toksičnosti za morsko algo *V. fisheri*; določene vrednosti za EC_{50} so bile v vseh primerih >25 mg/L; običajne koncentracije teh učinkovin v okolju pa so v razponu od nekaj ng/L do nekaj 100 µg/L. Toksični učinki se niso izrazili niti pri zemeljski bakteriji *A. globiformis*. Negativen vpliv (zaviranje rasti zaradi zaviranja sinteze folata) je bil opazen samo pri zeleni algi (*S. vacuolatus*), za katero so bili toksični vsi testirani sulfonamidi že pri nizkih koncentracijah. Med najbolj toksičnimi je bil tudi sulfadiazin. Ker so zelene alge fotoavtotrofni organizmi pomembni za vodne ekosisteme, je to nevarno, saj lahko tako sulfonamidi prek vpliva na prehranjevalno verigo, negativno delujejo na celoten ekosistem.

Najbolj občutljiv organizem v študiji je bila vodna leča (*L. minor*). Močna toksičnost sulfonamidov za višje rastline je verjetno posledica načina njihovega delovanja. Kot strukturni analogi p-aminobenzojske kisline zavirajo encim dihidropteroat sintetazo v rastlinah na enak način kot v bakterijah (70).

Poleg alg je v študijah toksičnosti učinkovin za vodne organizme značilen predstavnik zooplankton *Daphnia magna*. Zanj so za akutno toksičnost sulfadiazina določili EC₅₀ 221 mg/L, za kronično toksičnost pa EC₅₀ 13,7 mg/L (56).

4.4.3 Ekotoksičnost tilozina

Podatke o toksičnosti tilozina za organizme v okolju smo povzeli iz ocene tveganje za okolje, narejene za zdravilo Tylan® Soluble (48), saj so pridobljeni s študijami v skladu z OECD smernicami. Prikazani so v Prilogi V, v Preglednici XXI, kjer so tudi rezultati izračuna kvocienta tveganja za učinkovino.

Vpliv zemeljsko mikrofloro so opazovali na vzorcih prsti, onesnažene s tilozinom v koncentracijah 1 mg/kg in 5 mg/kg. Študija je potekala pri aerobnih pogojih 28 dni v temi in pri 20 °C. Ocenjevali so vpliv na dihanje tal oz. kroženje ogljika, prek nastajanja CO₂ in vpliv na kroženje dušika, z merjenjem koncentracij amonijaka, nitrita in nitrata. V času študije je tilozin zaviral procese kroženja ogljika, nitrifikacijo pa le prvih 14 dni, nato se je mikrobna aktivnost obnovila. Zaključili so, da tilozin nima pomembnega vpliva na proučevane procese, saj so bila odstopanja merjenih parametrov v primerjavi s kontrolnimi vzorci brez učinkovine manjša od 25 % (48).

Drugi kopenski organizmi, na katerih se določa toksičnost, so še zemeljski črvi in rastline. V 14 dnevni študiji toksičnosti za zemeljske črve vrste *Lumbricus terrestris*, kjer so v vzorcih prsti s koncentracijo tilozina 102,6 mg/kg spremljali maso organizmov, niso ugotovili fizičnih znakov toksičnosti ali povečane umrljivosti zaradi prisotnosti učinkovine, prav tako ni bilo sprememb v hitrosti rasti. Določena vrednost za NOEC je bila zato enaka oz. večja od koncentracije učinkovine v testu, torej $\geq 102,6$ mg/kg (48).

Značilen predstavnik zemeljskih črvov v ekotoksikoloških testiranjih je tudi *Eisenia fetida*. Vpliv tilozina na razmnoževanje in rast te vrste so opazovali v vzorcih umetne prsti, onesnažene z različnimi koncentracijami učinkovine do 250 mg/kg pri pogojih naravnega okolja. Odrasle osebke so po 4 tednih inkubacije odstranili iz prsti ter ocenili njihovo zdravje in maso. Z inkubacijo testnih posod so nadaljevali še 4 tedne, nato so glede na število razvitih potomcev ocenili vpliv tilozina na razmnoževanje. Po 28 dneh inkubacije odraslih osebkov niso opazili zaviranja rasti ali smrti zaradi vpliva tilozina. V nadaljnjih 28 dneh, namenjenih razvoju ličink niso zaznali manjšega števila potomcev niti pri najvišjih testiranih koncentracijah. Določen je bil NOEC 62,5 mg/kg (48).

V testu OECD 208 za vpliv tilozina na rastline so opazili delno razbarvanje listov pri vseh rastlinah. Za vpliv na kalitev so določili naslednje vrednosti NOEC: $\leq 83,3$ mg/kg za črno deteljo (*Trifolium pratense*), 144 mg/kg za oljno ogrščico (*Brassica napus*) in paradižnik (*Solanum lycopersicum*), 250 mg/kg za čebulo (*Allium cepa*), 800 mg/kg za oves (*Avena sativa*) in navadni fižol (*Phaseolus vulgaris*). Najbolj občutljiv parameter v testu je bila sveža masa korenin pri črni detelji (*T. pratense*), kjer so določili EC_{50} 23,5 mg/kg, EC_{10} 7,7 mg/kg in NOEC 16,0 mg/kg (53).

Študija na paradižniku, ovsu in soji, gojenih v peščeno-ilovnati prsti ni pokazala pomembnega vpliva na kalitev niti pri najvišjih koncentracijah. Pri vseh rastlinah pa so opazili spremembe v rasti. Za maso korenin paradižnika so določili EC_{50} 43 mg/kg in NOEC 16 mg/kg, pri ovsu in soji je bil NOEC 3,9 mg/kg (48).

V raziskavi vpliva šestih učinkovin (med njimi tilozin) na rast rastlin in kvaliteto prsti, so spremljali kalitev semen, rast rastlin v onesnaženi zemlji ter dihanje prsti in aktivnost encima fosfataze, ki sta indikatorja mikrobne aktivnosti. Rastline v testih so bile: riž (*Oryza sativa* L.), kumarica (*Cucumis sativus* L.) in radič (*Cichorium endivia*).

Med proučevanimi učinkovinami je imel tilozin najmanjši vpliv na kalitev semen. Določena ekotoksičnost za oves je bila EC_{50} 141 mg/kg in EC_{10} 19 mg/kg, za riž je bil EC_{50} in EC_{10} >500 mg/kg, pri kumaricah pa EC_{50} >500 mg/kg in EC_{10} 217 mg/kg.

V testu vpliva na rast so med vsemi učinkovinami imeli pomemben vpliv na rast riža samo sulfonamidi. Predvidevali so, da zaradi dobre biorazpoložljivosti, saj imajo sulfonamidi nizek koeficient adsorpcije v zemlji. Vpliv tilozina na rast rastlin je bil najbolj izražen pri kumaricah. Najbolj občutljiv parameter v testu je bila višina poganjka, kjer so določili EC_{50} 343 mg/kg in EC_{10} 90 mg/kg.

Tilozin je v študiji izkazal le majhno vpliv na aktivnost mikrobov in še to le pri višjih koncentracijah učinkovine. To so vrednotili kot ne relevantno. Sklepali so, da dobra oz. močna adsorpcija tilozina v zemlji in relativno kratka obstojnost, pomembno zmanjšata njegovo biorazpoložljivost. Študije kažejo na hitro izginjanje tilozina iz prst, z DT_{50} približno 7 dni, kar pomeni, da v zemlji ni obstojen, se ne akumulira in zato predstavlja minimalno tveganje za mikrobne procese dihanja tal (71).

Toksičnost za vodne organizme je bila določena na predstavnikih alg, vodnih bolh in rib. V testu s sladkovodno zeleno algo *Pseudokirchneriella subcapitata* so 72 ur pri 24 °C spremljali spremembe biomase in hitrost rasti celic, izpostavljenih različnim začetnim

koncentracijam tilozina v razponu od 0,04 do 0,64 mg/L. Med študijo so se koncentracije tilozina v vzorcih znižale za 75 % ali več, predvidoma zaradi njegove fotolize. Glede na povprečno koncentracijo so določili EC_{50} za biomaso 0,22 mg/L in EC_{50} 0,31 mg/L za hitrost rasti. NOEC za oba parametra je bil 0,099 mg/L. V drugi študiji, kjer so primerjali toksičnost tilozina za različne vrste alg, so za zeleno algo *Pseudokirchineriella subcapitata* določili EC_{50} 1,38 mg/L, za cianobakterijo *Microcystis aeruginosa* pa 0,034 mg/L, kar je skladno s tem, da so prokariotske cianobakterije običajno precej bolj občutljive na protimikrobne učinkovine kot zelene alge (48).

V raziskavi vpliva veterinarskih protimikrobnih učinkovin na rast sladkovodnih zelenih alg izvedeni po OECD smernicah je bil za vpliv tilozina na algo *Selenastrum capricornutum* določen EC_{50} 0,411 mg/L in NOEC 0,206 mg/L (69).

Akutna toksičnost za vodno bolho *Daphnia magna* je bila določena v 48 urnem testu, kjer je bil organizem izpostavljen povprečni koncentraciji tilozina 87 mg/L. Neželenih vplivov na *D. magna* pri tej koncentraciji niso opazili. Določili so $EC_{50} > 87$ mg/L in $NOEC \geq 87$ mg/L (48).

Za ribo mavrična postrv (*Oncorhynchus mykiss*) je bila akutna toksičnost na podlagi rezultatov testa 96 urne izpostavljenosti tilozinu v povprečni koncentraciji 96 mg/L, kjer so dnevno opazovali spremembe v vedenju in umrljivosti organizmov. V času testa ni prišlo do smrti oz. neželenih učinkov, zato je bil določen $LC_{50} > 96$ mg/L in $NOEC \geq 96$ mg/L (48).

4.4.4 Odmerki veterinarskih učinkovin in tarčne živali

Potencialni vpliv veterinarskih protimikrobnih učinkovin na okolje je odvisen od načina in trajanja zdravljenja, ki se razlikujeta glede na zdravilno učinkovino, živalsko vrsto in indikacije. Ocena vpliva učinkovin (florfenikol, sulfadiazin, tilozin) je narejena na primeru najslabšega scenarija uporabe zdravil, to je peroralna aplikacija živalim (piščanci pitanci oz. brojlerji in prašiči pitanci), katerim se aplicira največ učinkovine in imajo največ rejnih ciklov na leto. Predstavljeni PEC_{soil} izračuni so narejeni na osnovi odmerkov predpisanih za naslednja registrirana veterinarska zdravila:

- Florenikol: Floron 40 mg/g, peroralni prašek namenjen individualnemu zdravljenju bolezni dihal pri prašičih, ki jih povzroča *Pasteurella multocida*. Največji dnevni odmerek je 10 mg na kg telesne teže živali, zdravljenje traja 5 dni (22).

- Sulfadiazin: Sulfaprex Premix 250/50 mg/g predmešanica za pripravo zdravilne krmne mešanice: za zdravljenje respiratornih bolezni pri prašičih in ovcah, ki jih povzročajo *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, *Streptococcus suis*. Največji dnevni odmerek je 30 mg učinkovin na kg telesne teže živali. Od tega je 25 mg sulfadiazina, saj je v zdravilu kombinacija sulfadiazina in trimetoprima. Zdravljenje traja 5 dni (72).
- Tilozin: Pharmasin 100 % w/w granule za pripravo peroralne raztopine, ki se uporablja pri teletih za zdravljenje in preprečevanje respiratornih bolezni, ki jih povzroča *Mycoplasma* spp; pri prašičih za zdravljenje in preprečevanje enzootske pljučnice povzročene z *M. hyopneumoniae* ali *M. hyorhinis* ter črevesnih obolenj povezanih z *Lawsonia intracellularis*; pri piščancih v primeru kronične respiratorne bolezni, zaradi *Mycoplasma* spp. ter nekrotičnega enteritisa povzročene s *Clostridium perfringens*; pri puranih za zdravljenje in preprečevanje infekcijskega sinusitisa povezanega z *Mycoplasma* spp. Za prašiče je največji dnevni odmerek 100 mg na kg telesne teže in trajanje zdravljenja 5 dni, za piščance pa je največji dnevni odmerek 20 mg na kg telesne teže ter trajanje terapije 10 dni (27).

4.5 VPLIV PREOSTANKOV PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN IN NJIHOVIH PRESNOVKOV

4.5.1 Izračuni predvidenih koncentracij v okolju

Florfenikol, sulfadiazin in tilozin se uporabljajo predvsem za zdravljenje prašičev in piščancev, ki glede na CVMP navodila (33) spadajo v med intenzivno rejene živali. V *Prilogi II* so v *Preglednicah XI, XII, XIII* predstavljeni izračuni predvidenih koncentracij v kopenskem okolju (začetni PEC_{soil} , brez upoštevanja presnove v živalih ali razgradnje v gnoju in zemlji) za intenzivno rejene piščance in prašiče, narejeni po *enačbi 1*, opisani v poglavju 3 *Materiali in metode*. V izračunih so uporabljene vrednosti za dnevni odmerek in trajanje terapije, ki so predpisane za veterinarska zdravila predstavljena v poglavju 4.4.4 *Odmerki veterinarskih učinkovin in tarčne živali*.

Izračunane vrednosti začetne PEC_{soil} z upoštevanjem popolnega zaostanka so za peroralno aplikacijo obravnavanih učinkovin, apliciranih intenzivno rejenim piščancem oz. prašičem v večini nad mejo 100 µg/kg, predpisano v CVMP navodilih. To pomeni, da se ocena

njihovega tveganja za okolje nadaljuje z drugo fazo ERA poročila, kjer se najprej (Stopnja A) primerja predvidena koncentracija v kopenskem okolju (začetni PEC_{soil} , brez upoštevanja presnove v tarčnih živalih in razgradnje učinkovine v iztrebkih) z dopustno koncentracijo v okolju (PNEC) za predstavnike vodnih in kopenskih netarčnih organizmov. S tem se izračuna kvocient tveganja (RQ), od katerega je odvisen nadaljnji potek ocenjevanja.

Za izračun kvocienta tveganja smo za vsako posamezno učinkovino izbrali najvišjo in najnižjo izračunano vrednost začetne PEC_{soil} (iz *Preglednic XI, XII, XIII v Prilogi II*), višjo od 100 $\mu\text{g/kg}$. Izračuni RQ so predstavljeni za vsako spojino posebej v *Prilogi V (Preglednice XXI, XXII, XXIII)*.

V prvi stopnji druge faze ERA je za vrednosti začetne $PEC_{soil} > 100 \mu\text{g/kg}$ predpisan še izračun predvidene koncentracije učinkovine, ki prehaja v podzemne oz. površinske vode ($PEC_{groundwater}$, $PEC_{surfacewater}$) in kvocienta tveganja za vodno okolje, saj preostanki učinkovin lahko predstavljajo tveganje tako za zemeljske kot za vodne organizme.

Prek iztrebkov zdravljenih živali učinkovine najprej vstopijo v zemljo in potencialno vplivajo na netarčne organizme v njej. Ker pa je zaradi padavin možno spiranje preostankov učinkovin v površinske vode in podtalnico, je možen tudi vpliv na netarčne organizme v vodi. Prehajanje učinkovine v površinske vode določajo: fizikalno-kemijske lastnosti učinkovin, količina padavin in delež vode, ki odteka s površja in hidrologija prsti. Pronicanje v podzemne vode pa je še pod vplivom količine organskih snovi v zemlji in globine vodonosnika oz. podzemne vodne shrambe. Koeficient tveganja se zato izračuna za organizme v zemlji in vodi (33).

Predvideno koncentracijo posamezne učinkovine, ki prehaja v površinske in podzemne vode ($PEC_{groundwater}$, $PEC_{surfacewater}$) smo izračunali po enačbah 31 – 36 iz CVMP navodil. Enačbe so predstavljene v *Prilogi III*, izračuni v *Prilogi IV*. Izračuni temeljijo na fizikalno-kemijskih lastnostih spojin, za vrednosti zahtevanih parametrov sem uporabila podatke predstavljene v *Preglednici I*, pod naslovom *4.1.2 Fizikalno-kemijske lastnosti učinkovin in njihove značilnosti v okolju*. Izračunane koncentracije učinkovin, ki predvidoma prehajajo v vodno okolje so prikazane v *Preglednici II*. Obravnavali smo najvišje in najnižje izračunane vrednosti začetne PEC_{soil} , višje od 100 $\mu\text{g/kg}$ (*V Prilogi II Preglednice XI, XII, XIII*).

Preglednica II: Koncentracije učinkovin, ki potencialno prehajajo v vodno okolje.

	Florfenikol	Sulfadiazin	Tilozin
PEC_{soil-initial} [µg/kg]	443,48 104,60	1108,70 129,52	4344,40 111,70
PEC_{groundwater} [µg/L]	249,64 58,88	179,16 20,93	14,39 0,37
PEC_{surfacewater} [µg/L]	83,21 19,63	59,72 6,98	4,80 0,12

4.5.2 Določanje vpliva učinkovin na okolje

Za najvišjo in najnižjo izračunano vrednost začetno PEC_{soil} višjo od 100 µg/kg smo za posamezno učinkovino izračunali kvocient tveganja (RQ) po enačbi 3, predstavljeni v poglavju 3 *Materiali in metode*. Rezultati izračunov so prikazani v Prilogi V, v Preglednicah XXI, XXII, XXIII.

Dopustne koncentracije v okolju (PNEC) so izračunane po enačbi 4, s podatki za koncentracije, pri katerih je bil opažen toksični učinek na netarčnih organizmih (EC₅₀/LC₅₀/NOEC), zbranih iz literature in predstavljenih pod naslovom 4.4 *Ekotoksikološke lastnosti protimikrobnih učinkovin*.

Dopustna koncentracija v okolju je količnik izmerjenega toksikološkega vpliva na določen netarčni organizem in varnostnega faktorja (AF). Vrednost AF, ki se uporabi v izračunu, je odvisna od vrste študije, s katero so bili pridobljeni podatki za EC₅₀/LC₅₀/NOEC. Možne so vrednosti med 1000 in 10, pri čemer se AF 1000 uporablja, ko so dostopni le akutni podatki, AF 10 pa, ko so na voljo kronični toksikološki podatki. Varnostne faktorje, ki smo jih uporabili v izračunih, smo izbrali v skladu s CVMP navodili (33).

Izračuni kvocienta tveganja za peroralno aplikacijo florfenikola, sulfadiazina in tilozina piščancem in prašičem pitancem kažejo, da predstavljajo pri takšni aplikaciji vse tri učinkovine potencialno tveganje za organizme v zemlji in vodi.

Tveganje se po CVMP navodilih najprej ocenjuje na osnovi PEC_{soil} brez upoštevanja presnove v zdravljenih živalih in razgradnje preostankov učinkovine v iztrebkih. Če je dobljeni RQ ≥ 1, predstavlja učinkovina visoko tveganje za okolje in je zahtevana druga

faza poročila za oceno tveganja. Tu se začetni PEC_{soil} preračuna tako, da se upošteva presnovo v tarčni živali oz. deleže izločenih preostankov učinkovine in biorazgradnjo v iztrebkih, zemlji ali vodnih sistemih. Izjema so učinkovine z ekstenzivno presnovo, kjer presnovki predstavljajo manj kot 5 % apliciranega odmerka, saj se predvideva, da spojine v tako nizkem deležu nimajo pomembnega vpliva na okolje. Če je presnovkov več kot 10 % apliciranega odmerka, je potrebno upoštevati njihovo prisotnost, zato se pri izračunu PEC_{soil} z upoštevanjo presnovo prištejejo k deležu izločene učinkovine.

4.5.2.1 Preračunani $PEC_{soil-refined}$ za florfenikol

Pri florfenikolu se po podatkih zbranih v literaturi večina apliciranega odmerka izloči v obliki starševske spojine. Deleži posameznih presnovkov so večinoma manjši od 10 %, zato jih pri izračunu PEC_{soil} z upoštevanjo presnovo ni potrebno upoštevati. Večji delež predstavlja le amino presnovek. V izračunih smo uporabili podatke, ki so predstavljeni pod naslovom 4.2.1 *Presnova in izločanje učinkovin iz zdravljenih živali* in zbrani v *Preglednici III*. Kjer so podani deleži v intervalih, je upoštevana vrednost za zgornjo mejo intervala, saj je po smernicah VICH GL 6 in GL 38 potrebno upoštevati in oceniti najslabšo varianto (33).

Izračun smo naredili za najvišjo in najnižjo začetno $PEC_{soil} > 100 \mu\text{g/kg}$, izračunani za primer zdravljenih prašičev, saj smo v literaturi našli največ podatkov o presnovi florfenikola pri prašičih in razgradnji v prašičjem gnoju.

Preglednica III: Deleži presnovkov florfenikola v piščančjih in prašičjih izločkih.

Vrsta presnovka	Delež v prašičjih izločkih [%] (Vir: 19)
Florfenikol	45 – 60
Amino prsnovek	11,2 – 17
Oksamska kislina	< 10
Alkoholni presnovek	1,1
Monokloroflorfenikol	1,9
Neidentificirani presnovki	1,45 -22,25

$PEC_{soil-refined}$ za florfenikol z upoštevanjo presnovo:

$$PEC_{soil-refined}(\text{prašiči}) = 434,44 \times (0,60 + 0,17) = 334,52 \mu\text{g/kg}$$

$$PEC_{soil-refined}(\text{prašiči}) = 104,60 \times (0,60 + 0,17) = 80,39 \mu\text{g/kg}$$

Preračunana vrednost $PEC_{\text{soil-refined}}$ na osnovi najvišje začetne PEC_{soil} je še vedno višja od $100 \mu\text{g/kg}$, zato je potrebna primerjava preračunane $PEC_{\text{soil-refined}}$ s PNEC za mikroorganizme v okolju, za katere je bil RQ pri začetnem PEC_{soil} večji od 1. Izračuni so prikazani v *Prilogi VI*, v *Preglednicah XXV, XXVI, XXVII*.

Dobljene vrednosti RQ so kljub upoštevanju presnove v živali še vedno za kopenske organizme > 1 . Zato se po CVMP navodilih naredi dodatne izračune z upoštevanjem razgradnje učinkovine v času hranjenja gnoja pred vnosom v okolje. (33) Nadaljnja razgradnja v gnoju namreč lahko pomeni pomembno zmanjšanje količine aktivnih presnovkov in s tem zmanjšanje tveganja za okolje.

Po podatkih, ki smo jih našli v literaturi in so predstavljeni pod naslovom *4.5.2 Obstočnost in razgradnja preostankov učinkovin v gnoju* so razpolovni časi florfenikola in njegovih presnovkov v gnoju relativno kratki. To lahko pomeni pomembno zmanjšanje tveganja za okolje, zato smo nadalje zračunali še $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem razgradnje v gnoju. Enačbe iz CVMP navodil, po katerih smo računali, so predstavljene v *Prilogi VII*, izračuni za florfenikol pa v *Prilogi VIII (Preglednici XXIX in XXX)*.

V izračunih smo upoštevali razpolovni čas (DT_{50}) presnovka florfenikola v brozgi prašičjih iztrebkov in urina, hranjenih pri anaerobnih pogojih, ki je po podatkih v literaturi 1 dan (35). Ob upoštevanju razgradnje v gnoju se je PEC_{soil} precej zmanjšal, izračunali smo $PEC_{\text{soil-refined}} 4,5233 \times 10^{-06} \mu\text{g/kg}$, kar pomeni, da florfenikol ob ustreznem hranjenju gnoja pred vnosom v okolje ne predstavlja tveganja za okolje, saj je PEC_{soil} precej nižja od meje $100 \mu\text{g/kg}$ predpisane v CVMP navodilih.

4.5.2.2 Preračunani $PEC_{\text{soil-refined}}$ za sulfadiazin

Sulfadiazin se glede na rezultate študij večinoma izloči iz telesa zdravljenih živali. Pri tem večji delež izločenega odmerka predstavlja starševska spojina, pomembna pa sta tudi presnovka 4-hidroksi-sulfadiazin in N^4 -acetil-sulfadiazin, zato je v izračunih njun delež prištet k deležu starševske spojine. Ostali presnovki so prisotni v manjših deležih, od katerih noben ne presega 10 %. Izračun $PEC_{\text{soil-refined}}$ sulfadiazina z upoštevanjem presnove smo naredili za najvišjo in najnižjo začetno $PEC_{\text{soil}} > 100 \mu\text{g/kg}$ za primer zdravljenih prašičev. V literaturi smo namreč našli največ podatkov o presnovi sulfadiazina pri prašičih. Zbrani podatki so predstavljeni v poglavju *4.2.1 Presnova in izločanje učinkovin iz*

zdravljenih živali. Podatki uporabljeni pri preračunu $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjo presnove v zdravljenih živalih so zbrani v *Preglednici IV*.

Preglednica IV: Deleži presnovkov sulfadiazina v prašičjih izločkih.

Vrsta presnovka	Delež v prašičjih izločkih [%] (Vir: 47)
Sulfadiazin	44
4-hidroksi-sulfadiazin	26
acetil-sulfadiazin	21
neidentificirani presnovki	3
N-acetil-4-hidroksi-sulfadiazin	1,8
N-formil-sulfadiazin	0,1

$PEC_{\text{soil-refined}}$ za sulfadiazin z upoštevanjo presnove:

$$PEC_{\text{soil-refined}} (\text{prašiči}) = 1086,11 \times (0,44 + 0,26 + 0,21) = 988,36 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

$$PEC_{\text{soil-refined}} (\text{prašiči}) = 261,5 \times (0,44 + 0,26 + 0,21) = 237,97 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

Preračunana $PEC_{\text{soil-refined}}$ je kljub upoštevanju presnove za najvišjo in tudi za najnižjo vrednost začetno PEC_{soil} višja od 100 $\mu\text{g/kg}$, zato smo preračunane $PEC_{\text{soil-refined}}$ primerjali s PNEC za mikroorganizme v okolju, za katere je bil RQ pri začetnem PEC_{soil} večji od 1. Izračuni so prikazani v *Prilogi VIII*, v *Preglednicah XXXI in XXXII*.

Vrednosti RQ so tudi za preračunane $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjo presnove za večino organizmov večje od 1, zato smo $PEC_{\text{soil-refined}}$ preračunali še z upoštevanjem razgradnje učinkovine v času hranjenja gnoja pred vnosom v okolje. Podatkov o razgradnji sulfadiazina v gnoju je malo in za razgradnjo v prašičjem gnoju nismo našli DT_{50} . V eni od raziskav poročajo o tem, da je bil sulfadiazin s koncentracijo 10 mg/kg v prašičjem gnoju popolnoma odstranjen v 3 dneh. V literaturi smo dobili DT_{50} 1,4 dni za razgradnjo v perutninskem gnoju, za goveji gnoj pa DT_{50} 17 dni. Za izračun $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem razgradnje v gnoju smo uporabili DT_{50} 1,4 dni, kot je bilo določeno za perutninski gnoj, saj se ta določitev dobro ujema s podatkom o popolnem očistku sulfadiazina iz prašičjega gnoja v času 3 dni. V tem primeru izračun ni povsem v skladu s CVMP navodili, saj bi morali biti vsi podatki le za izbrano živalsko vrsto (v našem primeru za prašiče). Preračunani $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem razgradnje v gnoju je $2,151 \times 10^{-03} \text{ } \mu\text{g/kg}$, kar kaže na precejšnje zmanjšanje koncentracije preostankov sulfadiazina ob ustreznem hranjenju gnoja pred vnosom v okolje. Sulfadiazin tako ne predstavlja tveganja za okolje.

4.5.2.3 Preračunani $PEC_{\text{soil-refined}}$ za tilozin

Razgradni produkti in faktorji tilozina imajo visoko biološko aktivnost, kar je potrebno upoštevati pri oceni tveganja za okolje. Delež bioaktivnosti posameznega presnovka je določen glede na delež presnovka v iztrebkih in njegovo relativno bioaktivnost glede na Tilozin A. Za piščančje iztrebke smo v izračunu upoštevali, da se v okolje izloči 75 % odmerka z bioaktivnostjo ekvivalentno Tilozinu A, kot so določili v študiji na osnovi peroralne aplikacije ^{14}C -tilozina piščancem (48), ki je predstavljena pod naslovom 4.2.1 *Presnova in izločanje učinkovin iz zdravljenih živali*. Za prašičje iztrebke smo našli le podatke o deležu izločenih presnovkov, ne pa točnega deleža bioaktivnosti zanje, zato smo v izračunu $PEC_{\text{soil-refined}}$ za prašičje iztrebke upoštevali, kot da imajo vsi izločeni presnovki (Tilozin D, dihidrodesmikozin) bioaktivnost ekvivalentno Tilozinu A (največje tveganje), kar je skupno 87 % apliciranega odmerka (50).

Preglednica V: Deleži presnovkov tilozina v piščančjih in prašičjih izločkih.

Vrsta presnovka	Delež v piščančjih iztrebkih [%] (Vir: 48)	Delež v prašičjih iztrebkih [%] (Vir: 50)
Tilozin A	31,6	-
Tilozin D	12,6	43
Tilozin B	5	-
Dihidrodesmikozin	4,3	44
Polarni presnovki	6,9	-
Sečna kislina Tilozina D	-	-

$PEC_{\text{soil-refined}}$ za tilozin z upoštevanom presnovo:

$$PEC_{\text{soil-refined}} (\text{piščanci}) = 111,70 \times 0,75 = 83,78 \mu\text{g/kg}$$

$$PEC_{\text{soil-refined}} (\text{prašiči}) = 4344,40 \times 0,87 = 3779,63 \mu\text{g/kg}$$

Tudi preračunana vrednost $PEC_{\text{soil-refined}}$ je v primeru prašičjih iztrebkov nad predpisano mejo 100 $\mu\text{g/kg}$, zato smo $PEC_{\text{soil-refined}}$ primerjali s PNEC za mikroorganizme v zemlji, za katere je bil RQ pri začetnem PEC_{soil} večji od 1. Izračuni so predstavljeni v *Prilogi VIII*, v *Preglednicah XXXIII* in *XXXIV*.

Dobljene vrednosti RQ so še vedno za večino organizmov > 1 , kar kaže, da ima tilozin, ki prehaja z izločki direktno v okolje, potencialno tveganje za prisotne mikroorganizme, zato so sledili izračuni za primer, ko se izločki oz. gnoj pred vnosom v okolje določen čas hranijo oz. starajo v predpisanih pogojih. Razgradnja preostankov učinkovine namreč poteka tudi

med hranjenjem gnoja. Pri tilozinu študije poročajo o dobri razgradnji, okrog 93,5 % v 30 dneh pri aerobnih pogojih v prašičjih in piščančjih iztrebkih, z razpolovnim časom (DT_{50}) $\leq 7,6$ dni.

Z upoštevanjem razgradnje tilozina med hranjenjem gnoja se PEC_{soil} precej zmanjša v primerjavi z začetno PEC_{soil} in tudi v primerjavi s $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjo presnove v živali. A preračunani $PEC_{soil-refined}$ je 382,92 $\mu\text{g/kg}$, kar je več kot 100 $\mu\text{g/kg}$. Ker izračun $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja ne upošteva, da pred tem že poteka presnova učinkovine v živali, s katero se zmanjša delež izločene starševske spojine, smo izračunali še $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja, kjer je upoštevana presnova učinkovine v živali, s katero se zmanjša delež izločene aktivne učinkovine. Na podlagi podatkov o presnovi v prašičjih iztrebkih, po katerih se iz živali izloči skupno 87 % apliciranega odmerka, smo izračunali $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja 333,14 $\mu\text{g/kg}$, kar je nekoliko manj kot $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja brez upoštevanja presnove a še vedno nad predpisano vrednostjo 100 $\mu\text{g/kg}$. $PEC_{soil-refined}$ smo tako tudi tu primerjali s PNEC za mikroorganizme in določili kvocient tveganja. Rezultati so prikazani v *Prilogi IX* in kažejo na zmanjšanje tveganja, vendar je še vedno $RQ > 1$ za najbolj občutljivo kopensko rastlino (črno deteljo) in vodno algo (*Mycrocystis aeruginosa*).

Pri tilozinu tako tudi z upoštevanjem presnove učinkovine v tarčni živali in razgradnje med hranjenjem iztrebkov pred vnosom v zemljo nismo dosegli ustreznega zmanjšana RQ. Po podatkih v literaturi se tilozin po prehodu v okolje razgrajuje tudi v zemlji, zato lahko izračune za zmanjšanje predvidenega tveganja nadaljujemo še z upoštevanjem razgradnje v zemlji. $PEC_{soil-refined}$ za razgradnjo v zemlji smo izračunali na osnovi razpolovnega časa (DT_{50}) 105 dni, ki je bil za Tilozin A določen v študiji razgradnje tilozina v zemlji. Študija je predstavljena v poglavju 4.2.5 *Obstojnost in razgradnja preostankov učinkovin v zemlji*. V izračunu smo predpostavili, da se iztrebki v povprečju aplicirajo trikrat letno (dvakrat letno na poljih, do štirikrat letno na travnikih).

Enačbe za izračun $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem razgradnje v zemlji iz CVMP navodil po katerih smo računali, so zbrane v *Prilogi X*. Za razgradnjo tilozina v zemlji smo določili $PEC_{soil-refined}$ 130,10 $\mu\text{g/kg}$, izračun je prikazan v *Prilogi XI*. Kljub precejšnjemu znižanju PEC_{soil} ob upoštevanju predvidenih procesov razgradnje v okolju je bil ta več kot 100 $\mu\text{g/kg}$, zato smo nadalje izračunali kvocient tveganja za organizme, pri katerih še nismo dosegli

ustreznega RQ (*Priloga XII*). Z upoštevanjem vseh pristopov zmanjšanja tveganja v izračunih PEC_{soil} , ki jih v Stopnja A ERA poročila dopuščajo CVMP smernice, smo tudi pri tilozinu postopoma dosegli $RQ < 1$ za vse obravnavane predstavnike kopenskih in vodnih organizmov in s tem pokazali, da učinkovin na predstavlja tveganja za kopensko in vodno okolje.

4.5.3 Ocena vpliva učinkovin na okolje

4.5.3.1 Povzetek lastnosti učinkovin in ocenjene toksičnosti za okolje

A) FLORFENIKOL

Glede na zbrane podatke o fizikalno-kemijskih lastnostih je florfenikol polarna molekula brez ionizirajočih funkcionalnih skupin pri pH-ju okolja in z dobro topnostjo v vodi, ki jo napoveduje nizka K_{ow} vrednost. Iz živali se izloča predvsem z urinom, v katerem prevladuje starševska spojina in amino presnovek. Glede na nizek porazdelitveni koeficient oktanol-voda se predvideva nizek potencial florfenikola za bioakumulacijo, kar potrjujejo podatki v študijah, po katerih je biorazgradnja učinkovine v gnoju hitrejša od nastajanja vezanih preostankov. Za zmanjšanje deleža proste učinkovine in ekstraktabilno vezanih preostankov je pomembno staranje oz. hranjenje gnoja pred vnosom v okolje. V tem času pa poteka tudi nadaljnja razgradnja učinkovine v gnoju in nastajajo neekstraktabilni preostanki, brez biološke aktivnosti.

Študije adsorpcije florfenikola v zemlji potrjujejo visoko mobilnost učinkovine, ki jo napoveduje nizka vrednost parametra K_{oc} . V eni od raziskav so določili, da se manj kot 25 % apliciranega odmerka adsorbira v zemlji. Ugotovljena je bila dobra razgradnja florfenikola v zemlji z razpolovnim časom 13 dni za primarno biorazgradnjo, z upoštevanjem še mineralizacije pa 27 dni.

Z izračuni ocene tveganja za okolje po CVMP navodilih smo za florfenikol ob upoštevanju razgradnje učinkovine med hranjenjem gnoja dosegli ustrezno znižanje predvidene koncentracije v zemlji in s tem pokazali, da florfenikol nima vpliva na okolje.

B) SULFADIAZIN

Sulfadiazin vsebuje dve ionizirajoči funkcionalni skupini, amsko in sulfonamidno, zato je oblika molekule odvisna od pH okolja, ki posredno pomembno vpliva na adsorpcijo, mobilnost, presnovo in razgradnjo učinkovine. V vodi je slabo topen, kar se lahko

predvideva iz zelo nizke vrednosti porazdelitvenega koeficienta oktanol-voda. Nizek K_{ow} napoveduje tudi nizek potencial za bioakumulacijo. Po podatkih raziskav se iz zdravljenih živali izloči okrog 96 % apliciranega odmerka. V izločkih je največji delež starševske spojine ter presnovkov 4-hidroksi-sulfadiazina in acetil-sulfadiazina. Obstočnost preostankov učinkovine v gnoju je različna, odvisna od lastnosti gnoja. Študije kažejo na hitro zmanjšanje ekstraktabilne frakcije, zaradi vezave na delce gnoja in nastajanja neekstraktabilne frakcije. To pomeni, da se bioaktivnost sulfadiazina v gnoju hitro zmanjša, vendar je zaradi vezave na delce učinkovina dlje časa prisotna v gnoju.

Dokaj nizka vrednost K_{oc} kaže na zmerno mobilnost spojine v zemlji. Po podatkih raziskav je za sulfadiazin značilna hitra začetna adsorpcija, nato pa postopno naraščanje deleža vezane, predvsem neekstraktabilne frakcije s časom. Nastajanje neekstraktabilnih preostankov je v zemlji hitrejše kot v gnoju. Za adsorpcijo je namreč pomemben pH okolja in vsebnost organskih snovi v zemlji. V gnoju je običajno višji pH in zato slabša adsorpcija (večji delež ekstraktabilnih preostankov), po vnosu gnoja v zemljo z gnojenjem pa delež ekstraktabilnih preostankov hitro upade.

Glede na izračunane predvidene koncentracije sulfadiazina v okolju, se te z upoštevanjem presnove v živali in razgradnje v iztrebkih pred vnosom v okolje precej znižajo, zato učinkovina ne predstavlja tveganja za okolje.

C) TILOZIN

Tilozin je kljub velikemu nepolarnemu jedru polarna molekula, saj ima več hidroksilnih in karbonilnih funkcionalnih skupin. Poleg tega ima eno ionizirajočo, dimetilaminsko skupino. V vodi je zelo dobro topen, kar se kaže tudi z visokim K_{ow} , ki hkrati napoveduje visok potencial za bioakumulacijo. Po peroralni aplikaciji se iz zdravljene živali izloči približno 70 % odmerka, od tega večji delež v blatu in nekaj v urinu. Raziskave obstojnosti in razgradnje v gnoju kažejo na hitro razgradnjo tilozina. Razgradnja se po gnojenju nadaljuje v zemlji, vendar je počasnejša kot v gnoju.

Kot napoveduje visok K_{oc} , je za to učinkovino značilna nizka mobilnost in povečana akumulacija v zemlji, ki pa je močno odvisna od pH okolja, narave vezavnih površin, deleža ilovice in kationske izmenjevalne kapacitete prsti. Adsorpcija je najboljša v prsteh z visoko vsebnostjo mineralov (Al, Fe, Mn) in pri nizkem pH. Zaradi visoke tendence za adsorpcijo in nizke mobilnosti je redko prisoten v vodnem okolju in če že, le v nizkih koncentracijah.

Izračunana začetna predvidena koncentracija tilozina v zemlji je precej visoka. Z upoštevanjem procesov presnove, razgradnje med hranjenjem iztrebkov in razgradnje v zemlji v izračunih predvidenih koncentracij v okolju, se te pomembno znižajo do stopnje, na osnovi katere lahko zaključimo, da tilozin nima toksičnega vpliva na okolje.

4.5.3.2 Primerjava lastnosti učinkovin in njihovih značilnosti v okolju

S primerjavo podatkov o fizikalno-kemijskih lastnostih predstavljenih učinkovin in rezultatov študij, v katerih so ugotavljali njihove značilnosti v okolju, lahko vidimo, da parametri, kot so npr.: K_{oc} , K_{ow} , topnost dobro napovejo obnašanje učinkovin v okolju. Florfenikol, polarna molekula z dobro topnostjo v vodi, visoko mobilnostjo v zemlji in nizkim potencialom za bioakumulacijo se dobro presnavlja v živalih, med predstavljenimi spojinami se v gnoju in zemlji najhitreje razgrajuje ter ima najnižjo adsorpcijo v okolju. Zaradi hitre razgradnje tudi ne predstavlja tveganja za vodno okolje.

Sulfadiazin ima najslabšo topnost, zmerno mobilnost v zemlji in glede na K_{ow} najnižji potencial za bioakumulacijo. Koncentracija v zemlji in tudi v gnoju se hitro zmanjša predvsem zaradi nastajanja neekstraktibilnih preostankov. Kljub dobri mobilnosti v zemlji, hitra adsorpcija na delce prsti omejuje prehajanje učinkovine v globlje plasti zemlje in v vodno okolje. Od predstavljenih spojin je pri sulfadiazinu najbolj izrazit vpliv pH okolja za njegovo adsorpcijo, mobilnost, presnovo in razgradnjo.

Najboljšo topnost v vodi ima tilozin, ki ima tudi najvišji K_{ow} in potencial za bioakumulacijo, kar je verjetno posledica velikega števila funkcionalnih skupin v molekuli. Tilozin ima med obravnavanimi učinkovinami najmanjšo mobilnost v zemlji in je zaradi visokega potenciala za adsorpcijo le redko prisoten v vodnem okolju. Na adsorpcijo sicer pomembno vpliva pH okolja in vsebnost mineralov. Razpolovni čas razgradnje v gnoju in zemlji je pri tilozinu najdaljši.

4.5.3.3 Vpliv presnove in razgradnje na toksičnost preostankov učinkovin

Na podlagi izračunov narejenih po smernicah VICH GL 6 in GL 38 smo pokazali, da nobena od predstavljenih učinkovin ne predstavlja tveganja za kopensko ali vodno okolje. Začetne PEC_{soil} z upoštevanjem popolnega zaostanka so sicer visoke, nad predpisano mejo 100 $\mu\text{g/kg}$ in kvocient tveganja je za večino učinkovin > 1 . Iz preračunanih PEC_{soil} z upoštevanom presnovo, razgradnjo med hranjenjem gnoja oz. razgradnjo v zemlji pa lahko vidimo, kako se s temi procesi postopno zmanjšujejo predvidene koncentracije preostankov učinkovin v

okolju do koncentracij, ki predvidoma nimajo škodljivega vpliva za organizme v okolju. Z izračuni na primeru florfenikola, sulfadiazina in tilozina smo potrdili postavljeno hipotezo, da se toksičnost učinkovin za okolje lahko zmanjša z njihovo intenzivno razgradnjo v iztrebkih in zemlji ali z ireverzibilno vezavo na minerale oz. organske snovi. Pri florfenikolu in sulfadiazinu se PEC_{soil} ustrezno zniža že ob upoštevanju presnovi in razgradnji med hranjenjem gnoja pred raztrosom v okolje. Pri tilozinu, ki se počasneje razgrajuje, pa se tveganje zniža na spremenljivo raven po upoštevanju še razgradnje v zemlji.

5 SKLEP

V magistrski nalogi smo zbrali in primerjali podatke o fizikalno-kemijskih lastnostih, značilnostih v kopenskem in vodnem okolju ter vplivu na prisotne organizme za veterinarske protimikrobne učinkovine florfenikol, sulfadiazin in tilozin. Ugotovili smo, da laboratorijski oz. OECD testi pogosto precenijo vpliv posamezne učinkovine na okolje, saj ne upoštevajo njenega celotnega življenjskega cikla, ki vključuje najprej presnovo v tarčni živali in razgradnjo v iztrebkih ter nadaljnjo razgradnjo v kopenskem in vodnem okolju. Brez upoštevanja zgoraj naštetih dejavnikov namreč vse tri učinkovine predstavljajo tveganje za okolje, vendar se ta vpliv pomembno zmanjša oz. zanemari, če upoštevamo, kaj se s preostanki učinkovin dogaja v realnem okolju.

Z rezultati izračunov predvidenih koncentracij v okolju in izračunov kvocienta tveganja za organizme v kopenskem in vodnem okolju smo dokazali, da se na podlagi presnove in razgradnje v zemlji PEC_{soil} lahko zniža do ravni, ko pri običajni kmetijski praksi in ustreznem ravnanju z iztrebki posamezne učinkovine v naravnem okolju ne predstavljajo tveganja za prisotne organizme. V kolikor upoštevamo še razgradnjo v zemlji, se tveganje še dodatno zmanjša. S tem smo potrdili hipotezo, da lahko intenzivna razgradnja preostankov učinkovin v iztrebkih in zemlji ali ireverzibilna vezava na minerale oz. organske snovi zmanjša toksičnost preostankov učinkovin za okolje.

Za predstavljene učinkovine smo pokazali, da v splošnem ne predstavljajo tveganja za okolje skozi njihov življenjski cikel, v kolikor se zdravila uporabljajo v skladu z navodili za uporabo. Poudariti pa je potrebno, da interakcije med različnimi učinkovinami, ki prehajajo v okolje, še niso dobro raziskane, zato bi bile v bodoče potrebne terenske raziskave, ki bi podrobneje razjasnile morebitni vpliv preostankov učinkovin na okolje.

6 VIRI IN LITERATURA

- 1 Bártíková H., Podlipná R., Skálová L.: Review, Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere* 144; 2016; 2290-2301.
- 2 Tasho R.T., Cho J.Y.: Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *Science of the Total Environment*, 2016; 563-564; 366-376.
- 3 Kemper N.: Review, Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological indicators* 8; 2008; 1-13.
- 4 Wang S., Wang H.: Adsorption behaviour of antibiotic in soil environment: a critical review. *Front. Environ. Sci. Eng.* 9(4); 2015; 565-574.
- 5 Slana M.: Razgradnja enrofloksacina v iztrebkih piščancev pitancev. Doktorska disertacija; 2014.
- 6 Uradni list Republike Slovenije: Zakon o zdravilih (ZZdr-2), februar 2014. Dostopno na: <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/116550> (dostopano: 10.11.2017)
- 7 Grenni P., Ancona V., Caracciolo A.B.: Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Jurnal* 2017.
- 8 Jerzsele A.: Comparative Veterinary Pharmacokinetics, Readings in Advanced Pharmacokinetics – Theory, Methods and Applications, Dr. Ayman Noreddin (Ed.). InTech, 2012; 179-198.
- 9 Slana M., Sollner Dolenc M. : Environmental Risk Assessment of antimicrobials applied in veterinary medicine – A field study and laboratory approach. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 35; 2013; 131-141.
- 10 Wegst-Uhrich S.R., AG Navarro D., Zimmerman L., S Aga D: Assessing antibiotic sorption in soil: a review and new case studies on sulfonamides and macrolides. *Chemistry Central Journal*; 8; 2014; 1-12
- 11 Jechalke S., Heuer H., Siemens J., Amelung W., Smalla K.: Review, Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology* 22; 2014; 536-545.
- 12 Thiele-Bruhn S.: Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 166; 2003; 145-167.

- 13 Kumar K., Gupta S.C., Chander Y., Singh A.K.: Antibiotic Use in Agriculture and Its Impact on the Terrestrial Environment. *Advances in Agronomy* 87, 2005.
- 14 Verbič J...[et.al.]: Svetovalni kodeks dobre kmetijske prakse – Varovanje voda, tal, zraka in ohranjanje biotske raznovrstnosti. Kmetijski inštitut Slovenije, 2006.
- 15 Mihelič R., Čop J., Jakše M., Štampar F., Majer D., Tojnko S., Vršič S.: Smernice za strokovno utemeljeno gnojenje. Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, 2010.
- 16 Nitratna direktiva: Uradni list Evropske unije: Direktiva Sveta 91/676/EGS, o varstvu voda pred onesnaževanjem z nitrati iz kmetijskih virov; december 1991.
- 17 Oenema O., Oudendag D., Velthof G.L.: Nutrient losses from manure management in the European Union. *Livestock Science* 112; 2007; 261-272.
- 18 Loyon L.: Review, Overview of manure treatment in France. *Waste Management* 61; 2017; 516-520.
- 19 Florfenicol (Extension to pigs) Summary Report (4). Committee for Veterinary Medicinal Products. Report No.: EMEA/MRL/591/99-FINAL. April 1999: str.: 1-4. Dostopno na:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014281.pdf (dostopano, 17.09.2017)
- 20 Moore E.: Therapeutic Review Florfenicol. *Jurnal of Exotic Pet Medicine* 16; 2007; 52-54.
- 21 Florkem 300 mg/ml solution for injection for cattle and pigs. 2015; str.: 1-6.
- 22 Floron 40 mg/g Oral powder for Swine. 2013; str.: 1-5.
- 23 Trimacare 24% Solution for injection. 2008; str.: 1-7.
- 24 Trimacare Tablets Bolus. 2008; str.: 1-4.
- 25 Baran W., Adamek E., Ziemianska J., Sobczak A.: Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Jurnal of Hazardous Materials* 196; 2011; 1-15.
- 26 TYLAXEN 200 mg/ml solution for injection for cattle, sheep, goats and pigs. 2011; str.: 1-24.
- 27 Pharmsin 100 % w/w Granules for Use in Drinking Water for pigs, Chickens, Turkeys and Calves. str.: 1-20.

- 28 Tylosin Summary Report (3). Committee for Veterinary Medicinal Products. Report No.: EMEA/MRL/205/97-FINAL. April 1997: str.: 1-8. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015764.pdf (dostupno, 17.09.2017)
- 29 Evropska baza prodaje veterinarskih protimikrobnih učinakova: <https://bi.ema.europa.eu/analyticsSOAP/saw.dll?Dashboard> (dostupno: 08.07.2017)
- 30 U.S. Environmental Protection Agency. Chemistry Dashboard. <https://comptox.epa.gov/dashboard/DTXSID9045500> (dostupno: 24. 1. 2018), Florfenicol
- 31 U.S. Environmental Protection Agency. Chemistry Dashboard. <https://comptox.epa.gov/dashboard/DTXSID7044130> (dostupno: 24. 1. 2018), Sulfadiazine
- 32 U.S. Environmental Protection Agency. Chemistry Dashboard. <https://comptox.epa.gov/dashboard/DTXSID3043996> (dostupno: 24. 1. 2018), Tylosin
- 33 Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products in support of the VICH guidelines GL6 and GL 38. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1 – Corr., Junij, 2016: p. 1-77. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004386.pdf (dostupno: 11.09.2017).
- 34 Wegst-Uhrich S., AG Navarro D., Zimmerman L. Aga D.: Assessing antibiotic sorption in soil: a literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides. Chemistry Central Journal; 8:5; 2014.
- 35 European centre for ecotoxicology and toxicology of chemicals: Development of interim guidance for the inclusion of non-extractable residues (NER) in the risk assessment of chemicals. Technical Report No. 118; 2013.
- 36 Merck Animal Health: Environmental assessment for Aquaflox® for Freshwater-reared Finfish; 2011.
- 37 Schering-Plough Animal Health Corporation: Nuflor (Type A Medicated Article for Swine) – Technical monograph.

- 38 Yates J.A., Tuomari D.L., Kreider C.: Environmental assessment for the use of Nuflor® injectable solution in cattle; Schering Plough Animal Health; 1996.
- 39 García-Galán M. J., Díaz-Cruz M.S., Barceló D.: Combining chemical analysis and ecotoxicity to determine environmental exposure and to assess risk from sulfonamides. *Trends in Analytical Chemistry* 28; 2009; 804-819.
- 40 Engelhardt I., Sittig S., Šimunek J., Groenweg J., Pütz T., Veerecken H.: Fate of antibiotic sulfadiazine in natural soils: Experimental and numerical investigations. *Journal of Contaminant Hydrology*; 177-178; 2015; 30-42.
- 41 Guo X., Yang C., Wu Y., Dang Z.: The influences of pH and ionic strength on the sorption of tylosin on goethite. *Environ. Sci. Pollut. Res*; 21; 2014; 2572-2578.
- 42 Loke M.-L., Jette Tjørnelund, Halling-Sørensen B.: Determination of the distribution coefficient (log K_d) of oxytetracycline, tylosin A, olaquinox and metronidazole in manure. *Chemosphere* 48; 2002; 351-361.
- 43 Zhang Q., Yang C., Huang W., Dang Z., Shu X.: Sorption of tylosin on clay minerals. *Chemosphere* 93; 2013; 2180-2186.
- 44 Simon M., Herrchen M.: Concept development for an extended plant test in the environmental risk assessment of veterinary medicinal products; Environmental Research of the Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation, Building and Nuclear Safety.; 2014.
- 45 Florfenicol (Extension to chicken) Summary Report (3). Committee for Veterinary Medicinal Products. Report No.: EMEA/MRL/589/99-FINAL. March 1999; str.: 1-3. Dostopno na:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014277.pdf (dostopano: 26.02.2018)
- 46 C. Zafri: Chemical Fate of Sulfadiazine in Soil: Mechanisms and Modelling Approaches. University of Osnabrück, 2008.
- 47 Lamshöft M., Sukul P., Zühlke S., Spittler M.: Metabolism of ¹⁴C-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 388; 2007; 1733-1745.
- 48 For Elanco Animal Health Perkins A.N.: Tylan® Soluble, Environmental Assessment for the Use of Tylosin Tartrate for Control of Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. Environmental Risk Assessment Tylosin Tartrate; 2012.

- 49 Teeter J.S., Meyerhoff R.D.: Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken and swine excreta. *Environmental Research* 93; 2003; 45-51.
- 50 Jack Lewicki: Tylosin – A review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods. Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Agricultural University.
- 51 Yu Bin Ho, Zakaria M.P., Latif P.A, Saari N.: Degradation of veterinary antibiotics and hormone during broiler manure composting. *Bioresource Technology*; 131; 2013; 476-484.
- 52 Massé D.I., Cata Saady N.M., Gilbert Y.: Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An overview. *Animals* 4; 2014; 146 – 163.
- 53 Simon M., Herrchen M.: Concept development for an extended plant test in the environmental risk assessment of veterinary medicinal products; *Environmental Research of the Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation, Building and Nuclear Safety.*; 2014.
- 54 Kreuzig R., Hölte S.: Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: laboratory experiments and test plot studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 24;4; 2005; 771-776.
- 55 Boxall A.B.A.: Veterinary Medicines and the Environment. F. Cunningham et al.: *Comparative and Veterinary Pharmacology, Handbook of Experimental Pharmacology*; 199; 2010; 291-314.
- 56 Boxall A. B. A., Fogg L., Blackwell P. A., Kay P., Pemberton E. J.: Review of Veterinary Medicines in the Environment. Environment Agency Bristol; R&D Technical Report P6-012/8/TR, 2002.
- 57 Müller T., Rosendahl I., Focks A., Siemens J., Klasmeier J. Matthies M.: Short-term extractability of sulfadiazine after application to soils. *Environmental Pollution* 172; 2013; 180-185.
- 58 Schauss K. et al.: Analysis, fate and effect of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems. *Trends in Analytical Chemistry*; 28 (5); 2009; 612 – 618.
- 59 Zhou D., Thiele-Bruhn S., Arenz-Leufen M.G., Jacques D., Lichtner P., Engelhardt I.: Impact of manure-related DOM on sulfonamide transport in arable soils. *Journal of Contaminant Hydrology*; 192; 2016; 118-128.

- 60 Kolz A.C., Ong S.K.; Moorman T.B.: Sorption of tylosin on swine manure. *Chemosphere*; 60; 2005; 284-289.
- 61 Sttig S., Kasteel R., Groeneweg J., Hofmann D., Thiele B., Köppchen S., Vereecken H.: Dynamics of transformation of the veterinary antibiotic sulfadiazine in two soils. *Chemosphere* 95; 2014; 470-477.
- 62 Hammesfahr U., Kotzerke A., Lamshöft M., Wike B.M., Kandeler E., Thiele-Bruhn S.: Effects of sulfadiazine-contaminated fresh and stored manure on soil microbial community. *European Journal of Soil Biology* 47; 2011; 61-68.
- 63 Coats J., Hu D.: Aerobic degradation and photolysis of tylozin in water and soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*; Vol. 26, No. 5; 2007; 884-889.
- 64 Kay P., Blackwell P.A., Boxall A.B.A: Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere* 59; 2005; 951 – 959.
- 65 Michelini L.: Sulfonamide accumulation and effects on herbaceous and woody plants and microorganisms. University of Padova, 2012.
- 66 Baran W., Sochacka J., Wardas W.: Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions. *Chemosphere* 65; 2006; 1295-1299.
- 67 Merck Animal Health: Environmental assessment for Aquaflor® (florfenicol) 50 % Type A Medicated Article Fed at Dose up to 15 mg florfenicol/kg body weight/day for Control of Mortality Associated with Bacterial Diseases in Freshwater-Reared Finfish; 2013.
- 68 Jin C., Chen Q., Sun R., Zhou Q., Liu J.: Eco-toxic effects of sulfadiazine sodium, sulfamonomethoxine sodium and enrofloxacin on wheat, Chinese cabbage and tomato. *Ecotoxicology* 18; 2009; 878-885.
- 69 Eguchi K., Nagase H., Ozawa M., Endoh Y.S., Goto K., Hirata K., Miyamoto K., Yoshimura H.: Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere* 57; 2004; 1733-1738.
- 70 Bialk-Bielińska A., Stolte S., Arning J., Uebers U., Bösch A., Stepnowski P., Matzke M.: Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. *Chemosphere* 85; 2011; 928-933.

- 71 Liu F., Ying G.G., Tao R., Zhao J.L., Yang J.F., Zhao L.F.: Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution* 157; 2009; 1636-1642.
- 72 Sulfaprex Premix 250/50 mg/g granulated powder for medicated feeding stuff for pigs and ovine. Str.: 1-8.
- 73 Imran M., Habib F., Tawab A., Rauf W., Rahman M., Khan Q.M., Ais M.R., Iqbal M.: LC_MS/MS based method development for the analysis of florfenicol and its application to estimate relative distribution in various tissues of broiler chicken. *Journal of Chromatography B* 1063; 2017; 163-173.
- 74 VSDB – Veterinary Substances DataBase - Florfenicol:
<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/Reports/1777.htm#none> (dostopano: 05.01.2018)
- 75 VSDB – Veterinary Substances DataBase - Sulfadiazin:
<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/Reports/1740.htm> (dostopano: 05.01.2018)
- 76 VSDB – Veterinary Substances DataBase - Tilozin:
<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/Reports/1742.htm> (dostopano: 05.01.2018)
- 77 Slika strukturna formula Florfenikola: Wikipedia - Florfenicol:
<https://en.wikipedia.org/wiki/Florfenicol> (dostopano: 10.03.2018)
- 78 Slika: Strukturna formula Sulfadiazina: Wikipedia – Sulfadiazin:
<https://en.wikipedia.org/wiki/Sulfadiazine> (dostopano: 10.03.2018)
- 79 Slika: strukturna formula Tilozina: Wikipedia – Tilozin:
<https://en.wikipedia.org/wiki/Tylosin> (dostopano: 10.03.2018)
- 80 Emily Moore: Therapeutic review – Florfenicol. *Journal of Exotic Pet Medicine* 16; 2007; 52-54.
- 81 Brandt K.K., Amézquita A., Backhaus T., Boxall A., Coors A., Heberer T., Lawrence J.R., Lazorchak J., Schönfeld J., Snape J.R., Zhu Y-G., Topp E.: Review article, Ecotoxicological assessment of antibiotics: A call for improved consideration of microorganisms. *Environment International* 85; 2015; 189-205.
- 82 Environmental Classified Pharmaceuticals 2009:
https://noharm.org/sites/default/files/lib/downloads/pharmaceuticals/Envir_Classified_Pharmaceuticals.pdf (dostopano: 17.04.2018)

7 PRILOGE

PRILOGA I - Preglednice s standardnimi vrednostmi parametrov, ki se uporabljajo pri izračunih PEC_{soil} povzete po CVMP navodilih

Preglednica VI: Razlaga parametrov, ki nastopajo v enačbi 1 iz CVMP navodil (33) z enotami in standardnimi vrednostmi.

Parametri oz. vrednosti v enačbah	Enote	Razlaga pomena parametrov
$PEC_{soil-initial}$	[$\mu g/kg$]	= začetna predvidena koncentracija aktivne učinkovine v zemlji
D	[mg/kg telesne mase]	= dnevni odmerek aktivne učinkovine
Ad	[dnevi]	= trajanje terapije
BW	[kg]	= telesna masa tarčnih živali (Preglednica 3 v navodilih CVMP)
P	-	= število živali vzrejenih v enem letu (Preglednica 3 v navodilih CVMP)
170	[kg N/ha]	= omejitev raztrosa iztrebkov v EU glede na količine dušika v zemlji
Fh	-	= delež črede zdravljen z učinkovino (Preglednica 2 v CVMP navodilih)
1500	[kg/m ³]	= gostota zemlje
10 000	[m ² /ha]	= površina hektarja
0,05	[m]	= globina prodiranja v zemljo po raztrosu iztrebkov na obdelovalno površino
Ny	[kg N/leto]	= količina letno proizvedenega dušika v iztrebkih za določeno živalsko vrsto (Preglednica 3 v navodilih CVMP)
H	-	= faktor vhlevitve (Preglednica 3 v navodilih CVMP)
1000	-	= faktor pretvorbe mg v μg

Preglednici 2 in 3 iz CVMP navodil sta predstavljeni spodaj v preglednicah VIII in IX.

Preglednica VII: Razlaga parametrov, ki nastopajo v enačbi 2 iz CVMP navodil (33) z enotami in standardnimi vrednostmi.

Parametri oz. vrednosti v enačbah	Enote	Razlaga pomena parametrov
PEC _{soil-initial}	[µg/kg]	= začetna predvidena koncentracija aktivne učinkovine v zemlji
D	[mg/kg telesne mase]	= dnevni odmerek aktivne učinkovine
Ad	[dnevi]	= trajanje terapije
BW	[kg]	= telesna masa tarčnih živali, posebej podana za pašne živali (Preglednica 4 v navodilih CVMP)
SD	[žival/ha]	= gostota živine (Preglednica 4 v navodilih CVMP)
Fh	-	= delež črede zdravljene z učinkovino (Preglednica 2 v CVMP navodilih)
1500	[kg/m ³]	= gostota zemlje
10 000	[m ² /ha]	= površina hektarja
0,05	[m]	= globina prodiranja v zemljo po raztrosu iztrebkov na obdelovalno površino
1000	-	= faktor pretvorbe mg v µg

Preglednici 2 in 4 iz CVMP navodil sta predstavljeni spodaj v preglednicah VIII in X.

Preglednica VIII: Standardne vrednosti za deleže črede zdravljene z učinkovino za različne skupine veterinarskih zdravilnih učinkovin, ki se uporabljajo pri izračunih PEC.

Farmacevtska skupina učinkovine	Delež črede zdravljen z učinkovino [%]
Antihelmintiki	100
Zdravila za zdravljenje diareje pri teletih, jagnjetini in prašičih (z izjemo zdravil, ki se aplicirajo v hrani ali vodi)	30
Kokcidostatiki	100
Ektoparazitiki	100
Zdravila za mlečno živino	
- V obdobju suhe dobe	100
- V obdobju laktacije	25
Protimikrobne učinkovine (aplikacija s hrano ali vodo)	100
Protimikrobne učinkovine (injektabilne)	
- Zdravljenje prašičev (vse bolezni)	50
- Respiratorne infekcije goveda	50
- Gnojno stopalo pri ovcah	100
Vsa zdravila za perutnino	100
Vsa zdravila za ribe	100

Podatki v preglednici so povzeti po preglednici 2 v CVMP navodilih (33).

Preglednica IX: Standardne vrednosti parametrov, ki se uporabljajo pri izračunih PEC_{soil} za intenzivno rejene živali.

Vrsta živali	Število živali vzrejenih v enem letu (P)	Telesna masa tarčnih živali (BW) [kg]	Količina letno proizvedenega dušika v iztrebkih (Ny) [kgN]	Faktor vhlavitve (H)
Teleta	1,8	140	10	1
Krave molznice	1	425	60	0,5
Krave (0-1 leto)	1	200	18	0,5
Krave (>2 leti)	1	450	35	0,5
Odstavni prašiči	6,9	12,5	2,25	1
Prašiči pitanci	3	65	7,5	1
Svinje z mladiči	1	240	26 ²	1
Broilerji	9	1	0,23	1
Nesnice	1	1,6	0,35	1
Nadomestne jate	2,6	0,8	0,24	1
Matične jate	1	1,7	0,69	1
Purani	2,7	6,5	0,9	1
Race	7	1,6	0,41	1
Konji	1	400	35	0,5

Podatki v preglednici so povzeti po preglednici 3 v CVMP navodilih (33).

Preglednica X: Standardne vrednosti parametrov, ki se uporabljajo pri izračunih PEC_{soil} za pašno rejene živali.

Vrsta živali	Gostota živine [žival/ha]	Telesna masa tarčnih živali [kg]
Krava molznica	3,5	600
Govedo	9,5	330
Ovca	15	80
Konj	3	600
Poni	5	250
Koza	15	60

Podatki v preglednici so povzeti po preglednici 4 v CVMP navodilih (33).

PRILOGA II - Izračuni začetne PEC_{soil} za predstavljene učinkovine na primeru intenzivno rejenih piščancev in prašičev

Preglednica XI: Izračuni PEC_{soil} za intenzivno rejene piščance in prašiče zdravljene s florfenikolom v zdravilu Floron 40 mg/g - peroralni prašek.

	D [mg/kg]	Ad	BW [kg]	P	Fh	Globina prodiranja v zemljo	Ny	H	PEC_{soil} [μg/kg]
Piščanci pitanci (brojlerji)	10	5	1	9	1	0,05	0,23	1	443,48
Nesnice	10	5	1,6	1	1	0,05	0,35	1	51,81
Nadomestne jate	10	5	0,8	2,6	1	0,05	0,24	1	98,22
Matične jate	10	5	1,7	1	1	0,05	0,69	1	27,92
Odstavni prašiči	10	5	12,5	6,9	1	0,05	2,25	1	434,44
Prašiči pitanci	10	5	65	3	1	0,05	7,5	1	294,66
Svinja z mladiči	10	5	240	1	1	0,05	676	1	104,60

Parameter v enačbi	Enota / vrednost	Razlaga parametra
$PEC_{soil\ initial}$	[μg/kg]	= predvidena koncentracija aktivne učinkovine v zemlji
D	[mg/kg telesne mase]	= dnevni odmerek aktivne učinkovine
Ad	dnevi	= trajanje terapije
BW	[kg]	= telesna masa tarčnih živali
P	[kg N/ha]	= število živali vzrejenih v enem letu
Fh	/	= delež črede zdravljen z učinkovino
Ny	[kg N/leto]	= količina letno proizvedenega dušika v iztrebkih za določeno živalsko vrsto
H	/	= faktor vhlevitve

Preglednica XII: Izračuni PEC_{soil} za intenzivno rejene piščance in prašiče zdravljene s sulfadiazinom v zdravilu Sulfaprex Premix 250/50 mg/g - predmešanica za pripravo zdravilne krme.

	D [mg/kg]	Ad	BW [kg]	P	Fh	Globina prodiranja v zemljo	Ny	H	PEC_{soil} [µg/kg]
Piščanci pitanci (brojlerji)	25	5	1	9	1	0,05	0,23	1	1108,70
Nesnice	25	5	1,6	1	1	0,05	0,35	1	129,52
Nadomestne jate	25	5	0,8	2,6	1	0,05	0,24	1	245,55
Matične jate	25	5	1,7	1	1	0,05	0,69	1	69,81
Odstavni prašiči	25	5	12,5	6,9	1	0,05	2,25	1	1086,11
Prašiči pitanci	25	5	65	3	1	0,05	7,5	1	736,66
Svinja z mladiči	25	5	240	1	1	0,05	676	1	261,50

Za razlago parametrov glej preglednico XI.

Preglednica XIII: Izračuni PEC_{soil} za intenzivno rejene piščance in prašiče zdravljene s tilozinom v zdravilu Pharmasin 100 % w/w - granule za pripravo peroralne raztopine.

	D [mg/kg]	Ad	BW [kg]	P	Fh	Globina prodiranja v zemljo	Ny	H	PEC_{soil} [µg/kg]
Piščanci pitanci (brojlerji)	20	10	1	9	1	0,05	0,23	1	1773,90
Nesnice	20	10	1,6	1	1	0,05	0,35	1	207,20
Nadomestne jate	20	10	0,8	2,6	1	0,05	0,24	1	392,90
Matične jate	20	10	1,7	1	1	0,05	0,69	1	111,70
Odstavni prašiči	100	5	12,5	6,9	1	0,05	2,25	1	4344,40
Prašiči pitanci	100	5	65	3	1	0,05	7,5	1	2946,70
Svinja z mladiči	100	5	240	1	1	0,05	676	1	1046,20

Za razlago parametrov glej preglednico XI.

PRILOGA III - Izračun predvidenih koncentracij učinkovin, ki prehajajo v površinske in podzemne vode

Enačbe za izračun predvidenih koncentracij učinkovin v površinskih in podzemnih vodah (Povzete po CVMP navodilih (12).):

Enačba 32 iz CVMP navodil

$$PEC_{groundwater} = PEC_{porewater}$$

Enačba 33 iz CVMP navodil

$$CONV_{soil} = \frac{RHO_{soil}}{F_{solid_{soil}} \times RHO_{solid}}$$

Enačba 34 iz CVMP navodil

$$PEC_{soil_{initial_pw_ww}} = \frac{PEC_{soil_{initial}}}{4}$$

Enačba 35 iz CVMP navodil

$$PEC_{soil_{initial_pw_ww}} = \frac{PEC_{soil_{initial_pw_dw}}}{CONV_{soil}}$$

Enačba 36 iz CVMP navodil

$$PEC_{groundwater} = \frac{PEC_{soil_{initial_pw_ww}} \times RHO_{soil}}{K_{soilwater} \times 1000}$$

Enačba 37 iz CVMP navodil

$$K_{soilwater} = (Fair_{soil} \times K_{air_{water}}) + F_{water_{soil}} + \left(F_{solid_{soil}} \times \frac{Kp_{soil}}{1000} \times RHO_{solid} \right)$$

Enačba 38 iz CVMP navodil

$$K_{air_{water}} = \frac{VP \times MW}{SOL \times R \times TEMP}$$

Enačba 39 iz CVMP navodil

$$Kp_{soil} = Foc_{soil} \times K_{oc}$$

Enačba 40 iz CVMP navodil

$$PEC_{surfacewater} = \frac{PEC_{porewater}}{3}$$

Preglednica XIV: Razlaga parametrov v enačbah 32 – 40 z enotami in standardnimi vrednostmi.

Parametri v enačbah	Enote (in vrednosti)	Razlaga pomena parametrov
$PEC_{groundwater}$	$[\mu\text{g/L}]$	= napovedana začetna koncentracija v površinski vodi
$PEC_{surfacewater}$	$[\mu\text{g/L}]$	= napovedana začetna koncentracija v podzemni vodi
RHO_{soil}	$[1700 \text{ kg/m}^3]$	= prostorninska gostota sveže prsti
RHO_{solid}	$[2500 \text{ kg/m}^3]$	= gostota trdnih delcev prsti
$F_{air_{soil}}$	$[0,2 \text{ m}^3/\text{m}^3]$	= delež zraka v prsti
$F_{water_{soil}}$	$[0,2 \text{ m}^3/\text{m}^3]$	= delež vode v prsti
$F_{solid_{soil}}$	$[0,6 \text{ m}^3/\text{m}^3]$	= delež trdnih delcev v prsti
$F_{OC_{soil}}$	$[0,02 \text{ kg/kg}^1]$	= masni delež organskega ogljika v prsti
$TEMP$	$[285 \text{ K}]$	= temperatura na površini zrak-voda
R	$[8,314 \text{ Pa m}^3/\text{mol K}]$	= plinska konstanta
VP	$[\text{Pa}]$	= parni tlak
MW	$[\text{g/mol}]$	= molska masa
SOL	$[\text{mg/L}]$	= topnost v vodi
$K_{soil_{water}}$	$[\text{m}^3/\text{m}^3]$	= porazdelitveni koeficient trdnih delcev in vode v prsti (v/v)
Kp_{soil}	$[\text{L/kg}]$	= porazdelitveni koeficient trdnih delcev in vode v prsti (v/m)
$K_{air_{water}}$	$[\text{m}^3/\text{m}^3]$	= porazdelitveni koeficient zraka in vode v prsti
K_{oc}	$[\text{L kg}]$	= adsorpcijski koeficient normaliziran na vsebnost organskega ogljika v prsti
$CONV_{soil}$	$[1,13 \text{ kg}_{dw}/\text{kg}_{ww}]$	= faktor pretvorbe iz suhe v mokro maso prsti
$PEC_{soil_{initial_pw_dw}}$		= napovedana začetna koncentracija v suhi masi prsti, korigirana na globino prsti 20 cm (tj. $PEC_{soil-initial}/4$)
$PEC_{soil_{initial_pw_ww}}$		= napovedana začetna koncentracija v mokri masi prsti, korigirana na globino prsti 20 cm (tj. $PEC_{soil-initial}/4$)

PRILOGA IV - Na osnovi začetne PEC_{soil} izračune koncentracije učinkovin, ki potencialno prehajajo v vodno okolje

A) Izračun predvidene koncentracije florfenikola v vodnem okolju

Preglednica XV: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za florfenikol.

Parametri v enačbah	Vrednosti
VP	$4,83 \times 10^{-07}$ Pa
MW	358,21 g/mol
SOL	1320 mg/L
K_{oc}	18,5 L/kg
$PEC_{soil-initial}$ (najvišji izračunan)	443,48 μ g/L
$PEC_{soil-initial}$ (najnižji izračunan)	104,60 μ g/L

Preglednica XVI: Parametri v enačbah izračunani za florfenikol.

Parametri v enačbah	Za florfenikol izračunane vrednosti parametrov
$PEC_{soil-initial_pw_ww}$ (za najvišji $PEC_{soil-initial}$)	$443,48 / 4 = 110,87$ μ g/L
$PEC_{soil-initial_pw_ww}$ (za najnižji $PEC_{soil-initial}$)	$104,60 / 4 = 26,15$ μ g/L
K_{air_water}	$5,531667 \times 10^{-11}$ m ³ /m ³
K_{p_soil}	0,37 L/kg
K_{soil_water}	0,755 m ³ /m ³
$PEC_{groundwater}$ (za najvišji $PEC_{soil-initial}$)	249,641 μ g/L
$PEC_{surfacedwater}$ (za najvišji $PEC_{soil-initial}$)	83,214 μ g/L
$PEC_{groundwater}$ (za najnižji $PEC_{soil-initial}$)	58,881 μ g/L
$PEC_{surfacedwater}$ (za najnižji $PEC_{soil-initial}$)	19,627 μ g/L

B) Izračun predvidene koncentracije sulfadiazina v vodnem okolju

Preglednica XVII: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za sulfadiazin.

Parametri v enačbah	Vrednosti
VP	$9,32 \times 10^{-08}$ Pa
MW	250,28 g/mol
SOL	130 mg/L
K _{oc}	81 L/kg
PEC _{soil-initial} (najvišji izračunan)	1108,70 µg/L
PEC _{soil-initial} (najnižji izračunan)	129,52 µg/L

Preglednica XVIII: Parametri v enačbah izračunani za sulfadiazin.

Parametri v enačbah	Za sulfadiazin izračunane vrednosti parametrov
$PEC_{soil_initial_pw_ww}$ (za najvišji PEC _{soil-initial})	$1108,70 / 4 = 277,175$ µg/L
$PEC_{soil_initial_pw_ww}$ (za najnižji PEC _{soil-initial})	$129,52 / 4 = 32,38$ µg/L
K _{air} _{water}	$7,572579 \times 10^{-11}$ m ³ /m ³
K _p _{soil}	1,62 L/kg
K _{soil} _{water}	2,63 m ³ /m ³
PEC _{groundwater} (za najvišji PEC _{soil-initial})	179,162 µg/L
PEC _{surfacedwater} (za najvišji PEC _{soil-initial})	59,721 µg/L
PEC _{groundwater} (za najnižji PEC _{soil-initial})	20,930 µg/L
PEC _{surfacedwater} (za najnižji PEC _{soil-initial})	6,977 µg/L

C) Izračun predvidene koncentracije tilozina v vodnem okolju

Preglednica XIX: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za tilozin.

Parametri v enačbah	Vrednosti
VP	$3,87 \times 10^{-08}$ Pa
MW	916,1 g/mol
SOL	5000 mg/L
K _{oc}	4270,5 L/kg
PEC _{soil-initial} (najvišji izračunan)	4344,40 µg/L
PEC _{soil-initial} (najnižji izračunan)	111,70 µg/L

Preglednica XX: Parametri v enačbah izračunani za tilozin.

Parametri v enačbah	Za tilozin izračunane vrednosti parametrov
$PEC_{soil_initial_pw_ww}$ (za najvišji PEC _{soil-initial})	$4344,40 / 4 = 1086,1$ µg/L
$PEC_{soil_initial_pw_ww}$ (za najnižji PEC _{soil-initial})	$111,70 / 4 = 27,925$ µg/L
K _{air water}	$2,992464 \times 10^{-12}$ m ³ /m ³
K _{p soil}	85,41 L/kg
K _{soil water}	128,315 m ³ /m ³
PEC _{groundwater} (za najvišji PEC _{soil-initial})	14,389 µg/L
PEC _{surfacedwater} (za najvišji PEC _{soil-initial})	4,797 µg/L
PEC _{groundwater} (za najnižji PEC _{soil-initial})	0,370 µg/L
PEC _{surfacedwater} (za najnižji PEC _{soil-initial})	0,123 µg/L

PRILOGA V - Izračuni kvocienta tveganja (RQ) za predstavljene učinkovine na osnovi izračunanih začetnih PEC_{soil} vrednosti in podatkov za akutno toksičnost, zbranih iz objavljenih študij (Ocena tveganja - Stopnja A).

Preglednica XXI: Izračun kvocienta tveganja (RQ) za florfenikol.

KOPENSKI ORGANIZMI					
Organizem	EC50/LC50/NOEC [mg/kg]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/kg]	RQ = PEC/PNEC
Vpliv na organizme vključene v proces nitrifikacije	NOEC = 2,5	1	2,5	0,44348 0,10460	0,177 0,042
<i>Eisenia foetida</i>	NOEC = 1,56	10	0,156	0,44348 0,10460	2,843 0,671
Kreša (vpliv na biomaso)	EC ₅₀ = 0,50	100	0,005	0,44348 0,10460	88,696 20,920
Gorčica (preživetje poganjka)	EC ₅₀ = 0,60	100	0,006	0,44348 0,10460	73,913 17,433
Oljna ogščica (vpliv na biomaso)	EC ₅₀ = 0,25	100	0,0025	0,44348 0,10460	177,392 41,840
VODNI ORGANIZMI					
Organizem	EC50/LC50/NOEC [mg/L]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/L]	RQ = PEC/PNEC
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC ₅₀ = 1	100	0,01	0,08321 0,01963	8,321 1,963
<i>Navicula pelliculosa</i>	EC ₅₀ = 61	100	0,61	0,08321 0,01963	0,136 0,032
<i>Anabaena flos-aquae</i>	EC ₅₀ = 0,23	100	0,0023	0,08321 0,01963	36,178 8,535
<i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ >330	1000	0,330	0,08321 0,01963	0,277 0,065
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LC ₅₀ >780	1000	0,780	0,08321 0,01963	0,107 0,025
<i>Lepomis macrochirus</i>	LC ₅₀ >830	1000	0,830	0,08321 0,01963	0,100 0,024

Preglednica XXII: Izračun kvocienta tveganja (RQ) za sulfadiazin.

KOPENSKI ORGANIZMI					
Organizem	EC50/LC50/NOEC [mg/kg]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/kg]	RQ = PEC/PNEC
Amoniak oksidirajoče bakterije	EC ₅₀ = 8	100	0,08	1,10870 0,12952	13,859 1,619
Amoniak oksidirajoče arheje	EC ₅₀ = 30	100	0,30	1,10870 0,12952	3,696 0,432
Pšenica	IC ₅₀ = 28	100	0,28	1,10870 0,12952	3,960 0,463
Zelje	IC ₅₀ = 31	100	0,31	1,10870 0,12952	3,576 0,418
Beli volčji bob	EC ₅₀ = 100	100	1	1,10870 0,12952	1,109 0,130
VODNI ORGANIZMI					
Organizem	EC50/LC50/NOEC [mg/L]	AF	PNEC [mg/L]	PEC [mg/L]	RQ = PEC/PNEC
<i>Mycrocistis aeruginos</i>	EC ₅₀ = 135	100	1,35	0,05972 0,0698	0,044 0,052
<i>Selenastrum capricornutum</i>	EC ₅₀ = 2,19	100	0,0219	0,05972 0,0698	2,727 3,187
<i>Scendesmus vacuolatus</i>	EC ₅₀ = 2,2	100	0,022	0,05972 0,0698	2,715 3,173
<i>Lemna minor</i>	EC ₅₀ = 0,07	100	0,0007	0,05972 0,0698	85,314 99,714
<i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ = 221	1000	0,221	0,05972 0,0698	0,270 0,316

Preglednica XXIII: Izračun kvocienta tveganja (RQ) za tilozin.

KOPENSKI ORGANIZMI					
Organizem	EC50/LC50/NOEC [mg/kg]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/kg]	RQ = PEC/PNEC
Vpliv na organizme vključene v proces nitrifikacije	NOEC = 5	1	5	4,3444 0,1117	0,869 0,022
<i>Lumbricus terrestris</i>	NOEC ≥ 102,6	10	10,26	4,3444 0,1117	0,423 0,011
<i>Eisenia fetida</i>	NOEC = 62,5	10	6,25	4,3444 0,1117	0,695 0,018
Črna detelja	EC ₅₀ = 23,5	100	0,235	4,3444 0,1117	18,487 0,475
Paradižnik	EC ₅₀ = 43	100	0,43	4,3444 0,1117	10,103 0,260
VODNI ORGANIZMI					
Organizem	EC50/LC50/NOEC [mg/L]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/L]	RQ = PEC/PNEC
<i>Pseudokirchineriella subcapitata</i>	EC ₅₀ = 0,22	100	0,0022	0,00480 0,00012	2,182 0,055
<i>Microcystis aeruginosa</i>	EC ₅₀ = 0,034	100	0,00034	0,00480 0,00012	14,118 0,353
<i>Selenastrum capricornutum</i>	EC ₅₀ = 0,411	100	0,00411	0,00480 0,00012	1,168 0,029
<i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ > 87	1000	0,087	0,00480 0,00012	0,055 0,001
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	EC ₅₀ > 96	1000	0,096	0,00480 0,00012	0,050 0,001

PRILOGA VI - Izračuni kvocienta tveganja (RQ) za predstavljene učinkovine na osnovi vrednosti $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanom presnovo v tarčni živali in podatkov za akutno toksičnost, zbranih iz objavljenih študij (Ocena tveganja - Stopnja A).

Preglednica XXIV: Koncentracije učinkovin, ki potencialno prehajajo v vodno okolje, če se upošteva presnova učinkovine v tarčni živali.

	Florfenikol	Sulfadiazin	Tilozin
$PEC_{\text{soil-refined}}$ [µg/kg]	334,52 80,39	988,36 237,97	3779,63 83,78
$PEC_{\text{groundwater}}$ [µg/L]	188,31 45,26	159,72 53,24	12,519 0,278
$PEC_{\text{surfacewater}}$ [µg/L]	62,77 15,09	38,45 12,82	4,173 0,093

Preglednica XXV: Florfenikol - izračun kvocienta tveganja (RQ) za $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem presnove v živalih, višji od 100 µg/kg, za organizme, kjer je bil RQ pri začetnem PEC_{soil} večji od 1.

KOPENSKI ORGANIZMI					
Organizem	EC50/LC50/NOEC [mg/kg]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/kg]	RQ = PEC/PNEC
<i>Eisenia foetida</i>	NOEC = 1,56	10	0,156	0,33452	2,144
Kreša (vpliv na biomaso)	EC ₅₀ = 0,50	100	0,005	0,33452	0,669
Gorčica (preživetje poganjka)	EC ₅₀ = 0,60	100	0,006	0,33452	55,753
Oljna ogščica (vpliv na biomaso)	EC ₅₀ = 0,25	100	0,0025	0,33452	133,808
VODNI ORGANIZMI					
Organizem	EC50/LC50/NOEC [mg/L]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/L]	RQ = PEC/PNEC
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC ₅₀ = 1	100	0,01	0,06277	6,277
<i>Anabaena flos-aquae</i>	EC ₅₀ = 0,23	100	0,0023	0,06277	27,291

Preglednica XXVI: Sulfadiazin:- izračun kvocienta tveganja (*RQ*) za *PEC_{soil-refined}* z upoštevanjem presnove v živalih, višji od 100 µg/kg, za organizme, kjer je bil *RQ* pri začetnem *PEC_{soil}* večji od 1.

KOPENSKI ORGANIZMI					
Organizem	EC50/LC50/NOEC [mg/kg]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/kg]	RQ = PEC/PNEC
Amoniak oksidirajoče bakterije	EC ₅₀ = 8	100	0,08	0,98836 0,23797	12,354 2,975
Amoniak oksidirajoče arheje	EC ₅₀ = 30	100	0,30	0,98836 0,23797	3,295 0,793
Pšenica	IC ₅₀ = 28	100	0,28	0,98836 0,23797	3,530 0,850
Zelje	IC ₅₀ = 31	100	0,31	0,98836 0,23797	3,188 0,768
Beli volčji bob	EC ₅₀ = 100	100	1	0,98836 0,23797	0,988 0,238
VODNI ORGANIZMI					
Organizem	EC50/LC50/NOEC [mg/L]	AF	PNEC [mg/L]	PEC [mg/L]	RQ = PEC/PNEC
<i>Selenastrum capricornutum</i>	EC ₅₀ = 2,19	100	0,0219	0,03845 0,01282	1,756 0,585
<i>Scendesmus vacuolatus</i>	EC ₅₀ = 2,2	100	0,022	0,03845 0,01282	1,748 0,582
<i>Lemna minor</i>	EC ₅₀ = 0,07	100	0,0007	0,03845 0,01282	54,929 18,314

Preglednica XXVII: Tilozin - izračun kvocienta tveganja (RQ) za $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem presnove v živalih, višji od 100 µg/kg, za organizme, kjer je bil RQ pri začetnem PEC_{soil} večji od 1.

KOPENSKI ORGANIZMI					
Organizem	EC ₅₀ /LC ₅₀ /NOEC [mg/kg]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/kg]	RQ = PEC/PNEC
Črna detelja	EC ₅₀ = 23,5	100	0,235	3,77963	16,084
Paradižnik	EC ₅₀ = 43	100	0,43	3,77963	8,790
VODNI ORGANIZMI					
Organizem	EC ₅₀ /LC ₅₀ /NOEC [mg/L]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/L]	RQ = PEC/PNEC
<i>Pseudokirchineriella subcapitata</i>	EC ₅₀ = 0,22	100	0,0022	0,004173	1,897
<i>Microcystis aeruginosa</i>	EC ₅₀ = 0,034	100	0,00034	0,004173	12,274
<i>Selenastrum capricornutum</i>	EC ₅₀ = 0,411	100	0,00411	0,004173	1,015

PRILOGA VII - Enačbe za izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja (Povzete po CVMP navodilih (12)).

Enačba 9 iz CVMP navodil:

$$Mi = D \times Ad \times BW \times Fh$$

Enačba 10 iz CVMP navodil:

$$Mt = Mi \times e^{\left[\frac{(-\ln(2) \times (\frac{Tst}{2}))}{DT_{50}} \right]}$$

Enačba 11 iz CVMP navodil:

$$PEC_{soilrefinement} = \left[\frac{Mt \times 170}{1500 \times 10\,000 \times 0,05 \times Ns} \right] \times 1000$$

Preglednica XXVIII: Razlaga parametrov v enačbah 9 - 11.

Parametri v enačbah	Enote (in vrednosti)	Razlaga pomena parametrov
$PEC_{soil-refined}$	$[\mu g/L]$	= predvidena koncentracija aktivne učinkovine v zemlji preračunana z upoštevanjem razgradnje v gnoju
Mi	$[mg]$	= masa aktivne učinkovine v gnoju
D	$[mg/kg_{BW} d]$	= dnevni odmerek aktivne učinkovine
Ad	$[d]$	= trajanje terapije
BW	$[kg_{BW}]$	= telesna masa tarčnih živali
Fh		= delež črede zdravljen z učinkovino (od 0 do 1)
Tst	$[dnevi]$	= čas hranjenja gnoja
DT_{50}	$[dnevi]$	= razpolovni čas učinkovine v gnoju
Mt	$[mg]$	= masa aktivne učinkovine v gnoju po glavnem času hranjenja
170	$[kg N/ha]$	= omejitev raztrosa iztrebkov v EU glede na količine dušika v zemlji
1 500	$[kg/m^3]$	= gostota zemlje
10 000	$[m^2/ha]$	= površina hektarja
0,05	$[m]$	= globina prodiranja v zemljo po raztrosu iztrebkov na obdelovalno površino
Ns	$[mg]$	= v času hranjenja gnoja nastali dušik
1 000	$[1000 \mu g/mg]$	= faktor pretvorbe mg v μg

PRILOGA VIII - Izračuni $PEC_{\text{soil-refined}}$ za predstavljene učinkovine z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem iztrebkov

A) Florfenikol: Izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem prašičjih iztrebkov

Preglednica XXIX: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za florfenikol.

Parametri v enačbah	Vrednosti	Vir podatka
D	10 mg/kg	Navodila za uporabo zdravila <i>Floron 40 mg/kg peroralni prašek</i>
Ad	5	Navodila za uporabo zdravila
BW	12,5 kg	Preglednica 6 v CVMP navodilih
Fh	1	Preglednica 2 v CVMP navodilih
Ns	0,33 kgN	Preglednica 6 v CVMP navodilih
Tst	53 dni	Preglednica 6 v CVMP navodilih
DT ₅₀	1 dan	Vir 35

Preglednica XXX: Za florfenikol izračunane vrednosti parametrov v enačbah za izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja..

Parametri v enačbah	Za florfenikol izračunane vrednosti
Mi	625
Mt	$6,5854 \times 10^{-06}$
$PEC_{\text{soil-refined}}$	$4,5233 \times 10^{-06} \mu\text{g/kg}$

B) Sulfadiazin: Izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem prašičjih iztrebkov

Preglednica XXXI: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za sulfadiazin.

Parametri v enačbah	Vrednosti	Vir podatka
D	25 mg/kg	Navodila za uporabo zdravila <i>Sulfaprex Premix 250/50 mg/g predmešanica za pripravo zdravilne krmne mešanice</i>
Ad	5	Navodila za uporabo zdravila
BW	12,5 kg	Preglednica 6 v CVMP navodilih
Fh	1	Preglednica 2 v CVMP navodilih
Ns	0,33 kgN	Preglednica 6 v CVMP navodilih
Tst	53 dni	Preglednica 6 v CVMP navodilih
DT ₅₀	1,4 dni	Vir 58

Preglednica XXXII: Za sulfadiazin izračunane vrednosti parametrov v enačbah za izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja..

Parametri v enačbah	Za sulfadiazin izračunane vrednosti
Mi	1562,5
Mt	$3,132 \times 10^{-03}$
$PEC_{soil-refined}$	$2,151 \times 10^{-03} \mu\text{g/kg}$

C) Tilozin: Izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem prašičjih iztrebkov

Preglednica XXXIII: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za tilozin.

Parametri v enačbah	Vrednosti	Vir podatka
D	100 mg/kg	Navodila za uporabo zdravila <i>Pharmasin 100 %w/w granule za pripravo peroralne raztopine</i>
Ad	5	Navodila za uporabo zdravila
BW	12,5 kg	Preglednica 6 v CVMP navodilih
Fh	1	Preglednica 2 v CVMP navodilih
Ns	0,33 kgN	Preglednica 6 v CVMP navodilih
Tst	53 dni	Preglednica 6 v CVMP navodilih
DT ₅₀	7,6 dni	Vir 78

Preglednica XXXIV: Za tilozin izračunane vrednosti parametrov v enačbah za izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja (brez upoštevanja presnove v tarčni živali).

Parametri v enačbah	Za tilozin izračunane vrednosti
Mi	6250
Mt	557,49
$PEC_{soil-refined}$	382,92 µg/kg

Preglednica XXXV: Za tilozin izračunane vrednosti parametrov v enačbah za izračun PEC_{soil} z upoštevanjem razgradnje med hranjenjem gnoja (z upoštevanjem presnove v tarčni živali).

Parametri v enačbah	Za tilozin izračunane vrednosti
Mi*	5437,5
Mt	485,02
$PEC_{soil-refined}$	333,14 µg/kg

*pri izračunu Mi je upoštevan delež aktivne učinkovine (0,87), ki pride v okolje s prašičjimi iztrebki, če se upošteva presnova v tarčnih živalih.

PRILOGA IX - Izračuni kvocienta tveganja (RQ) za tilozin na osnovi $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanom razgradnjo med hranjenjem iztrebkov in podatkov za akutno toksičnost zbranih iz objavljenih študij (Ocena tveganja - Stopnja A).

Preglednica XXXVI: Koncentracija tilozina, ki potencialno prehaja v vodno okolje, če se upošteva razgradnja učinkovine med hranjenjem iztrebkov (brez in z upoštevanjem predhodne presnove v tarčni živali).

	$PEC_{soil-refined}$ [μg/kg]	$PEC_{groundwater}$ [μg/L]	$PEC_{surfacewater}$ [μg/L]
Tilozin			
Brez upoštevanja presnove	382,92	1,268	0,423
Z upoštevanjem presnove	333,14	1,103	0,368

Preglednica XXXVII: Tilozin - izračun kvocienta tveganja (RQ) za $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem razgradnje učinkovine v gnoju, za organizme, kjer je bil RQ pri $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem presnove učinkovine v živali večji od 1.

KOPENSKI ORGANIZMI					
Organizem	EC ₅₀ /LC ₅₀ /NOEC [mg/kg]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/kg]	RQ = PEC/PNEC
Črna detelja	EC ₅₀ = 23,5	100	0,235	0,38292 0,33314	1,629 1,418
Paradižnik	EC ₅₀ = 43	100	0,43	0,38292 0,33314	0,891 0,775
VODNI ORGANIZMI					
Organizem	EC ₅₀ /LC ₅₀ /NOEC [mg/L]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/L]	RQ = PEC/PNEC
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC ₅₀ = 0,22	100	0,0022	0,000423 0,000368	0,192 0,167
<i>Microcystis aeruginosa</i>	EC ₅₀ = 0,034	100	0,00034	0,000423 0,000368	1,244 1,082
<i>Selenastrum capricornutum</i>	EC ₅₀ = 0,411	100	0,00411	0,000423 0,000368	0,103 0,090

PRILOGA X – Enačbe za izračun $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem razgradnje v zemlji (Povzete po CVMP navodilih (12)).

Enačba 12 iz CVMP navodil:

$$PEC_{soil-refined} = PEC_{soil\ single\ event} \times \frac{1 - Frs^{N_{spreading}}}{1 - Frs}$$

Enačba 13 iz CVMP navodil:

$$PEC_{soil\ single\ event} = \frac{PEC_{soil\ initial}}{N_{spreading}}$$

Enačba 14 iz CVMP navodil:

$$Frs = \frac{e^{-k T_{interval\ spreading}}}{N_{spreading}}$$

Enačba 15 iz CVMP navodil:

$$k = \frac{\ln 2}{DT_{50}}$$

Preglednica XXXVIII: Razlaga parametrov v enačbah 12 – 15.

Parametri v enačbah	Enote	Razlaga pomena parametrov
$PEC_{soil\ initial}$	[µg/kg]	= začetna predvidena koncentracija aktivne učinkovine v zemlji
$PEC_{soil\ single\ event}$	[µg/kg]	= predvidena koncentracija aktivne učinkovine v zemlji takoj po gnojenju (koncentracija v zemlji po eni aplikaciji iztrebkov v zemljo; brez upoštevanja razgradnje)
$PEC_{soil-refined}$	[µg/kg]	= predvidena koncentracija aktivne učinkovine v zemlji po zadnjem gnojenju
Frs	/	= delež aktivne učinkovine, ki ostane v zemlji po času intervala gnojenja
$N_{spreading}$	/	= število letnih aplikacij iztrebkov na zemljo
$T_{interval\ spreading}$	dnevi	= čas med posameznimi aplikacijami iztrebkov na zemljo
DT_{50}	dnevi	= razpolovni čas aktivne učinkovine v zemlji
k	/	= hitrostna konstanta

PRILOGA XI – Izračun $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem razgradnje v zemlji za tilozin

Preglednica XXXIX: Vrednosti parametrov uporabljene v izračunih, specifične za tilozin.

Parametri v enačbah	Vrednost
$PEC_{\text{soil initial}}$	333,14 $\mu\text{g/kg}$
DT_{50}	105 dni
$N_{\text{spreading}}$	3
$T_{\text{interval spreading}}$	365 dni / 3 = 121,67 dni

Preglednica XL: Za tilozin izračunane vrednosti parametrov v enačbah za izračun $PEC_{\text{soil-refined}}$ z upoštevanjem razgradnje v zemlji.

Parametri v enačbah	Vrednost
$PEC_{\text{soil single event}}$	111,05 $\mu\text{g/kg}$
F_{rs}	0,149299
k	$6,6014 \times 10^{-03}$
$PEC_{\text{soil-refined}}$	130,10 $\mu\text{g/kg}$

PRILOGA XII – Izračuni kvocienta tveganja (RQ) za tilozin na osnovi $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanom razgradnjo učinkovine v zemlji in podatkov za akutno toksičnost zbranih iz objavljenih študij (Ocena tveganje – Stopnja A)

Preglednica XLI: *Koncentracije tilozina, ki potencialno prehajajo v vodno okolje, če se upošteva razgradnja učinkovine v zemlji*

	$PEC_{soil-refined}$ [µg/kg]	$PEC_{groundwater}$ [µg/L]	$PEC_{surfacewater}$ [µg/L]
Tilozin	130,10	0,431	0,144

Preglednica XLII: *Tilozin - izračun kvocienta tveganja (RQ) za $PEC_{soil-refined}$ z upoštevanjem razgradnje učinkovine v zemlji za organizme, kjer je bil RQ pri začetnem PEC_{soil} večji od 1.*

KOPENSKI ORGANIZMI					
Organizem	EC₅₀/LC₅₀/NOEC [mg/kg]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/kg]	RQ = PEC/PNEC
Črna detelja	EC ₅₀ = 23,5	100	0,235	0,13010	0,554
Paradižnik	EC ₅₀ = 43	100	0,43	0,13010	0,303
VODNI ORGANIZMI					
Organizem	EC₅₀/LC₅₀/NOEC [mg/L]	AF	PNEC [mg/kg]	PEC [mg/L]	RQ = PEC/PNEC
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC ₅₀ = 0,22	100	0,0022	0,000144	0,065
<i>Microcystis aeruginosa</i>	EC ₅₀ = 0,034	100	0,00034	0,000144	0,424
<i>Selenastrum capricornutum</i>	EC ₅₀ = 0,411	100	0,00411	0,000144	0,004