

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Boris KOLAR

**VPLIV PROTIMIKROBNIH VETERINARSKIH ZDRAVIL NA ORGANIZME V  
VODNEM OKOLJU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Boris KOLAR

**VPLIV PROTIMIKROBNIH VETERINARSKIH ZDRAVIL NA ORGANIZME V  
VODNEM OKOLJU**  
DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE IMPACT OF ANTIMICROBIAL DRUGS ON ORGANISMS IN THE  
AQUATIC ENVIRONMENT**  
DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete 20. 1. 2009 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski študij Bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti na znanstvenem področju biologije.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor, ki se je 1. 1. 2014 preoblikoval v Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, in na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Damjana Drobne.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Primož ZIDAR  
Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Mihael J. TOMAN  
Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Stane SRČIČ,  
Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Boris Kolar

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD	Dd
DK	UDK 591:504.5 (043.3)=163.6
KG	Ekotoksikološki učinki/protimikrobna zdravila/oksitetraciklin/trimetoprim/okoljski standard kakovosti
AV	KOLAR, Boris, univ. dipl. biol.
SA	DROBNE, Damjana (mentorica)
KZ	SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biologije
LI	2015
IN	VPLIV PROTIMIKROBNIH VETERINARSKIH ZDRAVIL NA ORGANIZME V VODNEM OKOLJU
TD	Doktorska disertacija
OP	XI, 74 str., 10 pregl., 11 sl., 19 pril., 92 vir.
IJ	sl.
JJ	sl/en.
AI	Namen študije je bila preiskava strupenostnih učinkov oksitetraciklina (OTC) in trimetoprima (TMP) na vodno okolje ter predlog okoljskih standardov kakovosti (OSK). OSK so z ekotoksikološkega vidika varne mejne koncentracije za obe izbrani učinkovini. Protimikrobni učinkovini sta bili med testirani najbolj strupeni za planktonski fotosintetski vrsti: cianobakterijo <i>Anabaena flos-aquae</i> ter algo <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . V primerjavi z OTC ( <i>A. flos-aquae</i> 72 h $ErC_{50}$ 2,7 mg/L, <i>P. subcapitata</i> 72 h $ErC_{50}$ 1,04 mg/L) je TMP približno za 100 krat manj strupen za fotosintetske planktonske modelne organizme. OTC je razmeroma strupen za mikrobno združbo aktivnega blata ( $EC_{50}$ 17,9 mg/L), medtem ko je izračunana koncentracija 3 h $EC_{50}$ presegla topnost za TMP v vodi. OTC in TMP sta razmeroma nestrupeni za vodne bolhe. Za obe učinkovini smo pripravili predloge za OSK (LP: letno povprečje, NDK: najvišja dovoljena koncentracija) za celinske površinske vode. Testirali smo dve metodologiji, ki izhajata iz ocene tveganja za kemikalije in ocene tveganje za veterinarska zdravila. Za OTC predlagamo LP-OSK 0,0018 mg/L na osnovi rezultatov SSD in uporabo varnostnega faktorja 5, za TMP pa LP-OSK za 0,016 mg/L na osnovi dolgodobnega testa reproduktivne strupenosti na ribah <i>Danio rerio</i> in varnostnega faktorja 10. Za OTC predlagamo NDK-OSK 0,007 mg/L na osnovi rezultatov SSD in varnostnega faktorja 10. NDK-OSK za TMP 1,1 mg/L smo izračunali na osnovi vrednosti $EC_{50}$ za <i>A. variabilis</i> in varnostnega faktorja 10. Ocenjujemo, da je metoda, ki izhaja iz ocene tveganja za kemijske snovi v skladu z zakonodajo REACH, primernejša za pripravo OSK v primerjavi s tisto, ki izhaja iz okoljske ocene tveganja za vetrinarska zdravila.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN	Dd
DC	UDK 591:504.5 (043.3)=163.6
KX	Ecotoxic effect/antimicrobial drugs/oxytetracycline/trimethoprim/ Environmental Quality Criteria
AU	KOLAR, Boris
AA	DROBNE, Damjana (mentor)
PP	SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biology
PY	2015
TI	THE IMPACT OF ANTIMICROBIAL DRUGS ON ORGANISMS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT
DT	Doctoral Dissertation
NO	XI, 74 p., 10 tab., 11 fig., 19 ann., 92 ref.
LA	Sl.
AL	sl/en
AB	The aim of the study is the analysis of the toxic effects of oxytetracycline (OTC) and trimethoprim (TMP) on the water environment and the proposal of environmental quality standards (EQS) as safe threshold concentrations for both selected substances from the ecotoxicological perspective. The two substances, OTC and TMP, were most toxic for the photosynthetic plankton species: cyanobacteria <i>Anabaena flos-aquae</i> and algae <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Compared to the OTC ( <i>A. flos-aquae</i> 72 h ErC <sub>50</sub> 2,7 mg/L, <i>P. subcapitata</i> 72 h ErC <sub>50</sub> 1,04 mg/L), the TMP is approximately 100-fold less toxic for the photosynthetic plankton species. The OTC is relatively toxic for the microbial community of active mud (EC <sub>50</sub> 17,9 mg/L), while the calculated concentration of 3 h EC <sub>50</sub> has exceeded the solubility for the TMP in water. The OTC and the TMP are relatively non-toxic for daphnia. For both substances, proposals for the environmental quality standards (EQS) were prepared (AA: the annual average concentration of the substance concerned, calculated over a one-year period; MAC: the maximum allowable concentration of the substance, measured specifically) for inland surface waters. We tested two methods, deriving from risk evaluation for the chemicals and from risk evaluation for veterinary drugs. For the OTC, we propose AA-EQS as 0.0018 mg/L based on the results of the species sensitivity distribution (SSD) and the use of safety factor 5; and for the TMP we propose the AA-EQS as 0.016 mg/L based on the long-term test of reproductive toxicity for the fish <i>Danio rerio</i> and the safety factor 10. For the OTC we propose the MAC-EQS of 0.007 mg/L based on the results of the SSD and the safety factor 10. We calculated the MAC-EQS for the TMP as 1.1 mg/L based on the values EC <sub>50</sub> for <i>A. variabilis</i> and the safety factor 10. We believe that the method derived from risk evaluation for chemicals according to the REACH legislation is more suitable for the preparation of the EQS than the method derived from environmental risk evaluation for veterinary drugs.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG.....</b>	<b>X</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV IN POJMOV .....</b>	<b>XI</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI.....	4
1.2 HIPOTEZE .....	5
<b>2. PREGLED OBJAV .....</b>	<b>7</b>
2.1 OKOLJSKA OCENA TVEGANJA ZA VETERINARSKA ZDRAVILA.....	7
2.2 OKOLJSKI STANDARDI KAKOVOSTI.....	15
2.3 PROTIMIKROBNI UČINKOVINI OTC IN TMP V VODNEM OKOLJU .....	19
<b>3. MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>22</b>
3.1 DOLOČITEV OKOLJSKIH STANDARDOV KAKOVOSTI.....	22
<b>3.1.1 Podatki o identiteti, fizikalnih in kemijskih lastnostih ter podatki o obnašanju in usodi učinkovin v okolju .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.2 Ekotoksikološki podatki.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.3 Deterministična metoda določanja OSK .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.4 Verjetnostna metoda določanja OSK .....</b>	<b>27</b>
3.2 TESTNE METODE.....	28
<b>3.2.1 Fizikalne in kemijske značilnosti OTC in TMP.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.2 Kemijske analize učinkovin in meritve fizikalnih in kemijskih parametrov ...</b>	<b>29</b>
<b>3.2.3 Testi biorazgradljivosti in ekotoksikološki testi.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.4 Testi strupenostnega učinka .....</b>	<b>33</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>39</b>
4.1 REZULTATI EKOTOKSIKOLOŠKIH TESTOV IN TESTOV BIORAZGRADLJIVOSTI.....	39
<b>4.1.1 Test biorazgradljivosti.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.2 Strupenostni učinek OTC in TMP na cianobakterije <i>A. flos-aquae</i> in alge <i>P.</i> <i>subcapitata</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.3 Strupenost OTC in TMP za <i>D. magna</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.4 Inhibicija respiracije aktivnega blata .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.5 Povzetek rezultatov testov toksičnosti .....</b>	<b>42</b>
4.2 REZULTATI DOLOČITVE OKOLJSKIH STANDARDOV KAKOVOSTI ZA OTC IN TMP.....	43
<b>5. RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>47</b>

---

5.1	RAZPRAVA.....	47
<b>5.1.1</b>	<b>Testi biorazgradljivosti in ekotoksikološki testi.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1.2.</b>	<b>Določitev okoljskih standardov kakovosti.....</b>	<b>52</b>
5.2	SKLEP .....	56
<b>6.</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY) .....</b>	<b>59</b>
6.1	POVZETEK.....	59
6.2	SUMMARY.....	61
<b>7.</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>63</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Seznam varnostnih faktorjev (VF) za določitev vrednosti PNEC .....	25
Pregl. 2: Varnostni faktorji in testne metode po navodilu VICH GL38 (VICH Expert Working Group, 2005) .....	27
Pregl. 3: Fizikalne in kemijske značilnosti OTC in TMP .....	28
Pregl. 4: Izmerjene začetne koncentracije učinkovin v testih strupenosti .....	42
Pregl. 5: Pregled rezultatov testov strupenosti za OTC in TMP .....	42
Pregl. 6: Povzetek predloga OSK za površinske celinske vode za OTC .....	43
Pregl. 7: Vrednosti PNEC, izračunane za OTC po navodilih VICH GL38 .....	44
Pregl. 8: Povzetek predloga OSK za površinske celinske vode za TMP .....	45
Pregl. 9: Vrednosti PNEC, izračunane za TMP po navodilih VICH GL38 .....	46
Pregl. 10: Nabor vseh vrednosti za izbor OSK za celinske površinske vode za OTC in TMP .....	46



## KAZALO SLIK

Sl. 1: Emisijske poti protimikrobnih učinkovin v okolju ob različnih rabah .....	3
Sl. 2: Faza I okoljske ocene tveganja za veterinarska zdravila (VZ) .....	12
Sl. 3: Faza II okoljske ocene tveganja za veterinarska zdravila za rabo v intenzivni reji in pri pašnih živalih.....	14
Sl. 4: Faza II okoljske ocene tveganja za veterinarska zdravila za rabo v akvakulturah...	15
Sl. 5: Shema poteka določanja okoljskih standardov kakovosti za posebna onesnaževala v površinskih vodnih telesih v Sloveniji (Kolar in sod., 2006) .....	18
Sl. 6: Strukturna zgradba oksitetraciklina (levo) in trimetoprima (desno) .....	28
Sl. 7: Sistem HPLC v povezavi s tandemskim masnim spektrometrom .....	29
Sl. 8: Test biorazgradljivosti po OECD 302 B "Zahn-Wellens/EMPA Test" (OECD, 1992).....	32
Sl. 9: Inkubacija alge <i>P. subcapitata</i> v rastni komori pri svetlobnem toku 7000 lux.....	35
Sl. 10: Testne kamrice za testiranje kratkodobne strupenosti na <i>D. magna</i> .....	37
Sl. 11: Razgradnja DOC v testih biorazgradljivosti z OTC in TMP .....	39

## KAZALO PRILOG

### **Priloge A: OECD TG 201 “Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test” (OECD, 2011) – *A. flos-aquae***

Priloga A1: Sestava rastnega medija BG 11 za cianobakterije

Priloga A2: Validacija surogatne meritve (fluorescence) za *A. flos-aquae*

Priloga A3: Meritve fluorometričnega odziva v medijih z OTC in TMP – test z *A. flos-aquae*

Priloga A4: Izračun rezultatov za testiranje strupenosti OTC in TMP na *A. flos-aquae*

Priloga A5: Validacija testov strupenosti z OTC in TMP na *A. flos-aquae*

### **Priloge B: OECD TG 201 “Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test” (OECD, 2011) – *P. subcapitata***

Priloga B1: Priprava testnega medija za zelene alge po tehničnem navodilu OECD

Priloga B2: Validacija surogatne meritve (fluorometrije) za *P. subcapitata*

Priloga B3: Meritve fluorometričnega odziva v medijih z OTC in TMP – test s *P. subcapitata*

Priloga B4: Izračun rezultatov za testiranje strupenosti OTC in TMP za *P. subcapitata*

Priloga B5: Validacija testov strupenosti z OTC in TMP za *P. subcapitata*

### **Priloga C: OECD TG 302 B “Zahn-Wellens/EMPA Test” (OECD, 1992)**

Priloga C1: Sestava mineralnega medija za test biorazgradljivosti

### **Priloge D: OECD TG 202 “*Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test” (OECD, 2004)**

Priloga D1: Sestava in priprava razredčevalne vode za test strupenosti na vodnih bolhah

Priloga D2: Testni protokol in izvedba testa strupenosti na vodnih bolhah *D. magna* z OTC in TMP

Priloga D3: Statistična analiza rezultatov testa strupenosti na vodnih bolhah z OTC in TMP

### **Priloge E: OECD TG 209 “Respiration Inhibition Test” (OECD, 2010)**

Priloga E1: Izotonična raztopina in sintetična odpadna voda za testiranje inhibicije respiracije

Priloga E2: Potek in rezultati inhibicije respiracije aktivnega blata v medijih z OTC in TMP

Priloga E3: Statistična analiza rezultatov testa inhibicije respiracije v mediju z OTC in TMP

### **Priloge F: Poročili o pripravi okoljskih standardov kakovosti**

Priloga F1: Poročilo o pripravi okoljskega standarda kakovosti za površinske celinske vode – oksitetraciklin

Priloga F2: Poročilo o pripravi okoljskega standarda kakovosti za površinske celinske vode – trimetoprim

## SEZNAM OKRAJŠAV IN POJMOV

AA – EQS	Annual Average – Environmental Quality Standard; okoljski standard za povprečno letno koncentracijo snovi
AF	Assessment factor; varnostni faktor
BCF	Bioconcentration factor; biokoncentracijski faktor
CVMP	Committee for Medicinal Products for Veterinary Use
DOC	Dissolved Organic Carbon; raztopljeni organski ogljik
EC	Effective concentration; koncentracija učinka
EC <sub>50(10)</sub>	Effective concentration; koncentracija, pri kateri se ob izpostavljenosti pokažejo učinki na 50 (oziroma 10) % testnih organizmov
GL	Guidelines; navodila
ErC	Growth inhibition concentration; koncentracija inhibicije stopnje rasti alg
ErC <sub>50(10)</sub>	Koncentracija, pri kateri se ob izpostavljenosti pokažejo 50 (oziroma 10) % zaviranje rasti alg
VICH	International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products
LC	Lethal concentration; smrtonosna koncentracija
LC <sub>50(10)</sub>	Smrtonosna koncentracija, pri kateri je učinek izpostavljenosti 50 (oziroma 10) % smrtnost
LP-OSK	Letno povprečje okoljskega standarda kakovosti
MAC-EQS	Maximum Allowable Concentration – Environmental Quality Standard
NDK-OSK	Najvišja dovoljena koncentracija okoljskega standarda kakovosti
NOEC	No Observed Effect Concentration, najvišja koncentracija, pri kateri se ne pokaže učinek testne snovi
OTC	Oksitetraciklin
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PEC	Predicted Environmental Concentration; predvidena okoljska koncentracija
PNEC	Predicted No Effect Concentration; predvidena koncentracija snovi, pri kateri se še ne izkaže učinek; tudi varna mejna koncentracija
ETX 2.0	Računalniško orodje za izračun SSD
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RCR	Risk Characterization Ratio; značilnost okoljskega tveganja; rezultat okoljske ocene tveganja
SSD	Species Sensitivity Distribution; porazdelitev občutljivosti vrst – statistična metoda

LC-MS- Tekočinska kromatografija z masno spektroskopijo

MS

TOXCALC Toxicity Data Analysis Software; program za statistično obdelavo podatkov  
ob ekotoksikološkem testiranju

TMP Trimetoprim

VD Vodna direktiva

## 1. UVOD

Protimikrobne učinkovine so v široki rabi v zdravilih v humani in veterinarski medicini, v akvakulturah ter v kmetijstvu kot dodatek živalski krmí. Ocena porabe protimikrobnih učinkovin v svetovnem merilu znaša med 100.000 in 200.000 tonami (Wise, 2002). Podatki o vrsti in količinah protimikrobnih učinkovin na trgih držav niso zanimivi le zaradi nadzora in upravljanja s tveganji, povezanimi z protimikrobno rezistenco, temveč tudi zaradi akutnih in dolgodobnih učinkov teh snovi v vodnih in kopenskih ekosistemih. Posplošena ocena tveganj, ki jih predstavljajo protimikrobne učinkovine v okolju, ni mogoča. Njihovo obnašanje in usoda v okolju namreč nista enovita, saj protimikrobne učinkovine predstavljajo pester nabor kemijskih snovi. Na globalni in nacionalni ravni je zelo težko oceniti izpostavljenost posameznih segmentov okolja, saj ni dogovorjenih mehanizmov za zbiranje podatkov o vrsti in načinu rabe protimikrobnih učinkovin, prav tako ni podatkov o količinah protimikrobnih snovi na skupnih ali nacionalnih trgih.

Po navedbah evropskega združenja European Federation for Animal Health je bilo v letu 1999 65 % učinkovin uporabljenih v humani medicini (Kümmerer, 2009). V EU po letu 2006 ni več dovoljeno dodajanje protimikrobnih učinkovin živalskim krmilom (European Commission, 2005). Nasprotno pa je bilo je med leti 2009 in 2011 v Združenih državah Amerike 72 % vseh prodanih zdravil uporabljenih v kmetijstvu kot dodatek živalski krmí (Wallinga in Burch, 2013). Po podatkih Evropske agencije za zdravila (European Medical Agency, EMA) je bilo v letu 2012 v Sloveniji prodanih 7,2t protimikrobnih učinkovin za uporabo v veterinarski medicini, v EU pa v istem obdobju 8046,4t (European Medicines Agency, 2014). Podatki o količini protimikrobnih učinkovin za humano uporabo na slovenskem trgu niso zbrani, vendar ocenjujemo, da je v primerjavi z ostalimi državami njihov delež enak ali do polovice večji od deleža, ki ga porabimo za zdravljenje živali.

Veterinarska zdravila (vključno z zdravili s protimikrobnim učinkovanjem) so v EU tudi pravni pojem, ki opredeljuje, v kateri zakonodajni okvir sodijo (Kolar in sod. n. d.). Nekateri kokcidiostatiki, ki bi jih zaradi njihovega načina delovanja lahko šteli k protimikrobnim zdravilom, evropska zakonodaja uvršča med dodatke h krmí.

Ob proizvodnji in rabi protimikrobnih zdravil v humani in veterinarski medicini nujno prihaja do emisije njihovih ostankov v okolje. V zadnjih dveh desetletjih se je v svetu povečala skrb zaradi prisotnosti protimikrobnih učinkovin v okolju. V prvi vrsti se je ta porodila zaradi številnih ugotovitev, ki kažejo na okoljsko porojeno multiplo rezistenco in prenos odpornih genov med mikrobnimi združbami iz okolja na patogene mikrobe, s

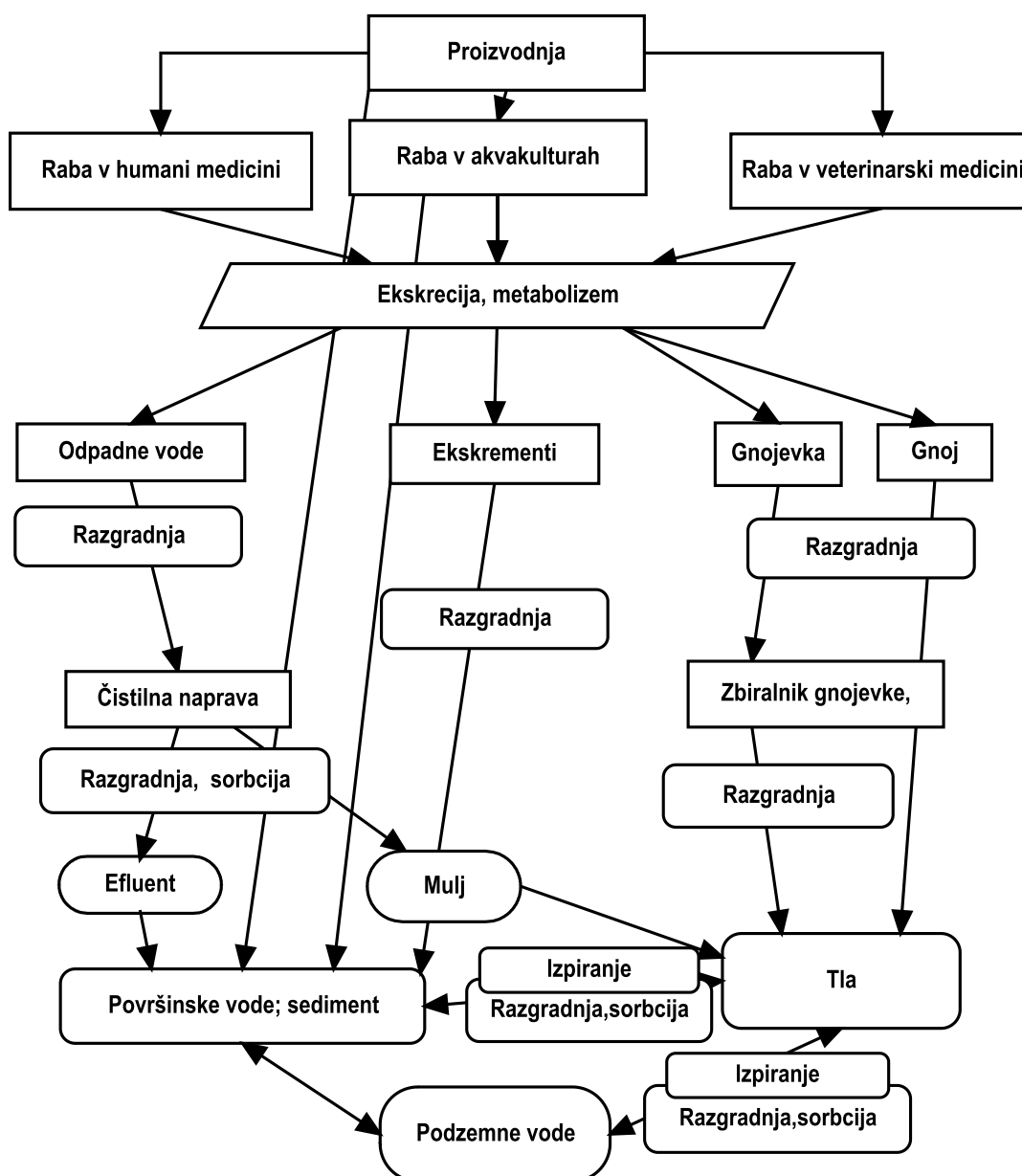
katerimi se srečuje humana in veterinarska medicina. Raziskave nedvomno opozarjajo na pojav multiple rezistence na iztokih komunalnih čistilnih naprav in v njihovi neposredni okolici, zlasti kjer se z odpadno vodo mešajo bolnišnične odplake (Costanzo in sod., 2005). V reki Seni je skoraj polovica od 214 vzorcev izolatov *E. coli* iz rečnega sedimenta rezistentna na vsaj eno izmed protimikrobnih učinkovin, medtem ko je bilo 35 % vzorcev multiplo rezistentnih (Servais in Passerat, 2009). Vendar pa obseg tega problema in predvsem vpliv na javno zdravje in zdravljenje živali še ni ovrednoten. Strokovna javnost namreč še ni odgovorila, kakšen delež ima naravno porojena protimikrobna rezistenca v primerjavi z rezistenco, ki je porojena iz rabe v humani in veterinarski medicini.

Protimikrobne učinkovine predstavljajo tveganje za neciljne vrste organizmov ali za posamezne trofične nivoje v sprejemnem ekosistemu tudi zaradi njihove kratkodobne in dolgodobne strupenosti. Učinkovine so pogosto obstojne in mobilne, zato se njihovi učinki lahko izrazijo v več segmentih okolja. V nasprotju z vse večjim številom podatkov, ki kažejo na obremenjenost vodnega okolja s protimikrobnimi učinkovinami, pa imamo le malo nedvoumnih pokazateljev o učinkih teh zdravil na strukturo in funkcijo vodnih ekosistemov. Negativna korelacija med diverzitetnim indeksom za vodne makroinvertebrate in indeksom nevarnih lastnosti nabora farmacevtskih učinkovin iz različnih terapevtskih skupin je pokazala merljiv vpliv učinkovin na biodiverzitetu in biomaso v rečnem ekosistemu (Ginebreda in sod., 2010). Vendar pa v kompleksnem vodnem okolju sinergistično delovanje stresorjev preprečuje ugotavljanje učinka posamezne učinkovine.

Sprejemni segmenti okolja so odvisni predvsem od rabe protimikrobnih zdravil. Učinkovine iz zdravil za rabo v humani medicini v največji meri prehajajo kot nespremenjene snovi ali razgradni produkti v komunalne odpadne vode. V Sloveniji se, z izjemo nekaj manjših mest, urbana kanalizacijska omrežja končajo s komunalno čistilno napravo. Vendar številne skupine protimikrobnih učinkovin biološko niso razgradljive ali so slabo razgradljive, zato prehajajo biološke čistilne naprave in odtekaajo v vodotoke. Del učinkovin in njihovih ostankov lahko upravljavci v stabiliziranem aktivnem blatu raztresejo po kmetijskih površinah. V zadnjih letih pa v Sloveniji predstavlja zelo verjeten scenarij obremenjevanja kopnih ekosistemov z ostanki protimikrobnih učinkovin tudi rečni sediment, ki ga ob poplavah prenašajo in odlagajo visoke vode.

V nasprotju s točkovnimi viri emisij protimikrobnih zdravil v humani uporabi, so emisije protimikrobnih učinkovin iz zdravil v veterinarski rabi navadno razpršene, saj prehajajo v tla preko iztrebkov pašnih živali oziroma gnoja in gnojevke živali v

intenzivni reji. Razen ob rabi veterinarskih zdravil v akvakulturah, kjer je vodno okolje neposredno izpostavljeno, prehajajo učinkovine in njihovi razgradni produkti v vodno okolje s spiranjem ostankov v površinske vode in izcejanjem v podzemne vode. Emisijske poti učinkovin, ki so v rabi v humani in veterinarski medicini kaže slika 1.



Slika 1: Emisijske poti protimikrobnih učinkovin v okolju ob različnih rabah

Fig. 1: Emission pathways of antimicrobials according to their use

V naši študiji smo izbrali protimikrobni učinkovini oksitetraciklin (OTC) in trimetoprim (TMP), da bi ovrednotili njun učinek na vodno okolje. OTC in TMP sta v rabi v humani in veterinarski medicini in tudi v akvakulturah.

V skladu s tehničnimi navodili VICH GL38 (VICH Expert Working Group, 2005) za fazo II ocene tveganja za veterinarska zdravila smo za OTC in TMP izvedli teste toksičnih učinkov na cianobakterijah, zelenih algah, vodnih bolhah in na mikrobni združbi aktivnega blata. Ob študiju navedenih ekotoksikoloških lastnosti smo obe učinkovini preizkusili tudi v testu biorazgradljivosti. Testiranja smo izvedli v skladu s standardiziranimi testnimi metodami, ki so nam omogočile neposredno primerjavo rezultatov za posamezne modelne organizme, taksonomske skupine in mikrobno združbo aktivnega blata.

Rezultate izvedenih testiranj in ekotoksikoloških testov, zbranih iz javno dostopne literature, smo ovrenotili, ekstrapolirali ter določili koncentracije, s katerimi ocenjujemo učinek kemijskih snovi na vodne ekosisteme. To so predvidene okoljske koncentracije PNEC (Predicted No Effect Concentration – PNEC), pri katerih je verjetnost, da bo nevarna snov učinkovala na sprejemni ekosistem, zanemarljivo majhna. Vrednosti PNEC smo označili kot varne mejne koncentracije za vodno okolje. V skladu s tehničnimi navodili (European Commission, 2011) smo za OTC in TMP določili varne mejne koncentracije za vodno okolje, ki jih predlagamo kot okoljske standarde kakovosti (OSK) za celinske površinske vode. Na osnovi zbranih in ovrednotenih ekotoksikoloških podatkov smo pripravili OSK za OTC in TMP za letno povprečje ter za največje dovoljene koncentracije v celinskih površinskih vodah. Primerjali smo metodo za določitev vrednosti PNEC, ki je v skladu z oceno tveganja za veterinarska zdravila, ter metodo po navodilih kemijske zakonodaje REACH (Uredba (ES) št. 1907/2006). Uporabili smo verjetnostno metodo, ki temelji na statistični porazdelitvi občutljivih vrst (Species Sensitivity Distribution – SSD), ter deterministično metodo z uporabo varnostnega faktorja (VF). Kot najprimernejšo smo izbrali metodo, po kateri je najnižja upoštevana negotovost izražena kot VF.

## 1.1 CILJI

Naš prvi cilj je bil ugotoviti strupenostne učinke protimikrobnih učinkovin oksitetraciklina (OTC) in trimetoprima (TMP) na modelne vodne organizme in modelne življenjske združbe vodnega okolja. Zato smo:

- izvedli akutne teste strupenosti z izbranimi protimikrobnima učinkovinama na vodnih bolhah in na mikrobni združbi aktivnega blata;
- izvedli večgeneracijske teste na zelenih planktonskih algah in cianobakterijah in jih validirali v skladu s tehničnimi navodili OECD. Ob upoštevanju validacijskih kriterijev sta morala testa na cianobakterijah in zelenih algah trajati enako dolgo.



Naš drugi cilj je bil ugotoviti in ovrednotiti strupenostne učinke izbranih protimikrobnih učinkovin na vodno okolje. Zato smo:

- ugotavljali biorazgradljivost izbranih protimikrobnih učinkovin z izvedbo testa biorazgradljivosti;
- določili vrednosti varne mejne koncentracije (PNEC) za kratkodobne in dolgodobne učinke za izbrani protimikrobni učinkovini (med predpisanimi metodami smo kot najbolj ustrezno izbrali tisto z najmanjšo negotovostjo);
- pripravili in utemeljili predlog okoljskih standardov kakovosti za površinske celinske vode za izbrani protimikrobni učinkovini.

## 1.2 HIPOTEZE

V študiji smo postavili dve hipotezi.

Hipoteza 1:

- Prokariotske cianobakterije kot modelni testni organizmi niso vedno najbolj občutljiva fotosintetska planktonska skupina za ugotavljanje strupenostnih učinkov protimikrobnih učinkovin. Čas izpostavljenosti protimikrobnim učinkovinam med testiranjem je pomemben dejavnik pri ugotavljanju strupenosti teh snovi.

Hipotezo 1 utemeljujemo z razlago, da so v postopkih registracije in v drugih regulatornih postopkih veterinarskih zdravil, v katerih je potrebno izvajati okoljsko oceno tveganja za vodno okolje, cianobakterije upoštevane kot najbolj občutljiva taksonomska skupina za strupenostne učinke protimikrobnih učinkovin. Tako posplošeno pojmovanje občutljivosti taksonomske skupine fotosintetskih planktonskih organizmov želimo ovreči. Novejše raziskave ter kritično vrednotenje in primerjava javno dostopnih rezultatov ekotoksikoloških testov so podlaga za dvom o enoznačni opredelitvi cianobakterij kot najbolj občutljive modelne taksonomske skupine za ugotavljanje učinkov protimikrobnih učinkovin v vodnem okolju.

Hipoteza 2:

- Za določitev varnih mejnih koncentracij protimikrobnih zdravil v vodnem okolju in iz njih izhajajočih okoljskih standardov kakovosti za površinske celinske vode je najprimernejša metoda po kemijski zakonodaji REACH.

Hipotezo 2 utemeljujemo z razlago, da tehnična navodila za pripravo okoljskih standardov kakovosti kot izhodišče dopuščajo različne metode za okoljsko oceno tveganja. Vendar je metoda, ki sledi tehničnim navodilom VICH za oceno tveganja veterinarskih zdravil

namenjena oceni posameznih pripravkov in ne učinkovin oziroma snovi, kot to velja po kemijski zakonodaji REACH. Domnevamo, da bomo z metodo določanja varnih mejnih vrednosti po kemijski zakonodaji REACH določili okoljske standarde kakovosti z manjšo upoštevano negotovostjo kot z metodo po tehničnih navodilih VICH.

## 2. PREGLED OBJAV

### 2.1 OKOLJSKA OCENA TVEGANJA ZA VETERINARSKA ZDRAVILA

Okoljska ocena tveganja za kemikalije v skladu s kemijsko zakonodajo REACH (Uredba (ES) št. 1907/2006) kot tudi s slednjo skladna okoljska ocena tveganja za veterinarska zdravila temeljita na primerjavi med izpostavljenostjo stresorju in njegovim učinkom na ciljni ekosistem. Rezultat ocene tveganja je kvantificirano razmerje med predvideno okoljsko koncentracijo stresorja, označeno kot vrednost PEC (Predicted Environmental Concentration), ter varno okoljsko koncentracijo oziroma vrednostjo PNEC (Predicted No Effect Concentration). Rezultat je razmerje tveganja ali RCR (Risk Characterization Ratio):

$$RCR = PEC/PNEC \quad \dots (1)$$

Tveganje za okolje pričakujemo, kadar je rezultat RCR enak ali večji od 1.

V okoljski oceni tveganja za kemijske snovi so stresorji industrijske kemikalije, aktivne snovi v biocidnem sredstvu oziroma v pripravku za varstvo rastlin ali pa farmacevtske učinkovine. Predvidena okoljska koncentracija PEC, ki ji bodo organizmi ali populacije izpostavljeni v ciljnem ekosistemu, je rezultat izračunov koncentracij stresorja s pomočjo okoljskih modelov. V izračunih so upoštevani različni scenariji, ki jih opredeljuje raba stresorja.

Najvišja koncentracija stresorja, pri katerem se učinek na izpostavljeni ekosistem z veliko verjetnostjo ne bo izrazil, je označena kot PNEC (Predicted No Effect Concentration). Vrednost PNEC je pridobljena iz rezultatov ekotoksikoloških testiranj na modelnih organizmih (tudi mikro- ali mezokozmosu kot modelnem ekosistemu). Pri določanju vrednosti PNEC nastopi negotovost zaradi razlik v občutljivosti na stresor med posameznimi organizmi znotraj modelne vrste kot tudi zaradi razlik v medvrstni občutljivosti. Negotovost, da vrednost PNEC res predstavlja koncentracijo, pri kateri se učinki ne bodo izrazili, je pokrita z uporabo ekstrapolacijskega oziroma varnostnega faktorja (VF). Vrednost PNEC lahko označimo tudi kot varno mejno koncentracijo.

Vrednost PNEC je pridobljena z ekstrapolacijo rezultatov ekotoksikoloških testov na modelnih vrstah oziroma taksonomskih skupinah (vodnih bolhah, ribah in zelenih planktonskih algah), s katerimi ugotavljamo tveganje za posamezne trofične nivoje ciljnega ekosistema. Modelne vrste ali taksonomske skupine so izbrane zaradi njihove

občutljivosti na stresorje ter kot take navedene in standardizirane v tehničnih navodilih, na primer v tehničnih navodilih OECD (OECD, 2002).

Med zgodnjimi raziskovalci je na večjo občutljivost cianobakterij (takrat imenovanih modrozelenih alge) opozoril Harass in sod (1985), ki je spremljal rast različnih vrst cianobakterij in zelenih alg po enomesečni izpostavljenosti streptomycinu. Domneval je, da je večja občutljivost cianobakterij posledica inhibicije sinteze proteinov v prokariotskih celicah, medtem ko so receptorji za stresor pri evkariotskih zelenih algah v kloroplastih.

Ob koncu devetdesetih let sta danska raziskovalca Holten Lutzhøft in Halling-Sørensen s sodelavci (Holten Lutzhøft in sod., 1999) ugotovila, da so cianobakterije za velikostni razred koncentracij bolj občutljive na delovanje protimikrobnih učinkovin kot zelene alge. Njihove raziskave so podprle paradigmo, da so cianobakterije za učinke protimikrobnih učinkovin najbolj občutljiva skupina enoceličnih, fotosintetskih organizmov v planktonu celinskih voda, kar so povzele vse pomembnejše raziskave na področju protimikrobnih učinkovin in njihovih ostankov v okolju (Boxall in sod., 2002; Kümmerer, 2009). Tudi tehnična navodila za izvajanje okoljske ocene tveganja za veterinarska zdravila VICH GL38 (VICH Expert Working Group, 2005) upoštevajo občutljivost cianobakterij za protimikrobne učinkovine. V praksi ocenjevalci okoljskih tveganj praviloma ne zahtevajo podatkov o učinku na zelene alge, v kolikor so na razpolago podatki o strupenosti za cianobakterije (European Medicines Agency, 2009).

Prokariotske cianobakterije naj bi bile občutljive na delovanje protimikrobnih učinkovin zaradi bakterijski podobne brezjedrne celične organizacije, medtem ko so zelene alge evkariotske, torej so organizmi s celičnim jedrom. Vendar pa je podrobnejši pregled javno dostopnih podatkov o ekotoksičnih učinkih protimikrobnih učinkovin na vodne organizme pokazal, da v strokovnih krogih sprejeto prepričanje nima trdne podlage v eksperimentalnih rezultatih. Podatki so namreč pridobljeni na zelo omejenem številu modelnih tesnih vrst, izvedeni testi v številnih študijah pa niso sledili standardiziranim metodam (Ando in sod., 2007). Avtorji preiskav postopkov pogosto niso validirali, obenem pa so bili v večini primerov rezultati pridobljeni iz testov, v katerih je bila izpostavljenost organizmov protimikrobni učinkovini različno dolga (Holten Lutzhøft, in sod., 1999). Navedene ugotovitve onemogočajo neposredno primerjanje rezultatov različnih testov. Vir neskladij so tudi tehnična navodila OECD, ki dopuščajo različno trajanje testa. Kriterij validnosti je namreč doseganje eksponencialne rasti v kontroli. Počasi rastoče cianobakterije zahteve testa dosežejo šele po petih ali več dneh, medtem ko je test na zelenih algah mogoče zaključiti po treh dneh. Ob upoštevanju ekoloških značilnosti standardiziranih cianobakterijskih vrst pa je mogoče doseči predpisane kriterije za rast v kontroli tudi po treh dneh. To omogočajo

skrajne dovoljene vrednosti za parametre v tehničnih navodilih OECD (OECD, 2002). Ob navedenem nekatere novejšje raziskave nakazujejo, da razlike v občutljivosti na stresorje med obema taksonomskima skupinama niso tako izrazite (Grinten in sod., 2010).

V državah članicah EU določata Direktiva 2001/82/EC (Directive 2001/82/EC, 2001) in Direktiva 2004/28/EC (Directive 2004/28/EC, 2004) zakonsko osnovo za avtorizacijo trženja veterinarskih zdravil. V dosjeju za avtorizacijo trženja veterinarskega zdravila mora biti izdelana okoljska ocena tveganja za vse nove aplikacije, vključno s tistimi, ki vsebujejo generične učinkovine. Rezultat okoljske ocene tveganja postane del analize razmerja med dobrobitjo in tveganjem, pri čemer je tveganje definirano kot „vsako tveganje za neželene učinke v okolju“. Avtorizacija trženja se lahko zavrže, če predstavlja predvidena raba veterinarskega zdravila večja tveganja za okolje, kot je dobrobit zdravila. Za razliko od navedenega pa okoljska ocena ni del vrednotenja dobrobiti in tveganja v postopku avtorizacije trženja humanih zdravil. Okoljska tveganja torej ne morejo biti razlog za zavrnitev avtorizacije trženja zdravil, ki so v rabi v humani medicini.

Zakonodaja v EU ne predvideva neposredne povezave oziroma soodvisnosti med postopki avtorizacije trženja veterinarskih zdravil (vključno z okoljsko oceno tveganja) ter njihovo ugotovljeno prisotnostjo v okolju. Tako je bila na primer v številnih državah članicah izdana avtorizacija trženja za zdravilo v veterinarski rabi s protiparazitskim delovanjem in učinkovino cipermetrin. Avtorizacija je bila sprejeta brez zavez v okviru ekofarmakovigilance, ki bi omogočala ukrepe ob rabi te učinkovine. Medtem pa je bil cipermetrin uvrščen na seznam prednostnih snovi v vodnem okolju (Direktiva 2013/39/EU, 2013). Koncentracije cipermetrina, ki veljajo kot okoljski standardi kakovosti v celinskih površinskih vodah, so skrajno nizke ( $8 \cdot 10^{-5}$  µg/L za letno povprečje okoljskega standarda kakovosti ter  $6 \cdot 10^{-4}$  µg/L za najvišjo dovoljeno koncentracijo okoljskega standarda kakovosti) in bodo zelo verjetno presežene v številnih vodotokih na območjih z živinorejo.

Postopek in metodologija okoljske ocene tveganja (Environmental Risk Assessment – ERA) sta opisana v dveh dokumentih tehničnih navodil, ki jih je izdala ekspertna skupina v okviru VICH (International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products). VICH je trilateralni program med EU, ZDA in Japonsko s ciljem harmonizacije zahtev v registracijskih postopkih veterinarskih zdravil. Komite za veterinarska zdravila (Committee for Veterinary Medicinal Products – CVMP) pri Evropski agenciji za zdravila (European Medical Agency – EMA) je navodili pripravil za uporabo v članicah EU. Izdani sta bili kot Faza I, Tehnično navodilo 6 (VICH Expert Working Group, 2000) in Faza II, Tehnično navodilo 38 (VICH Expert Working

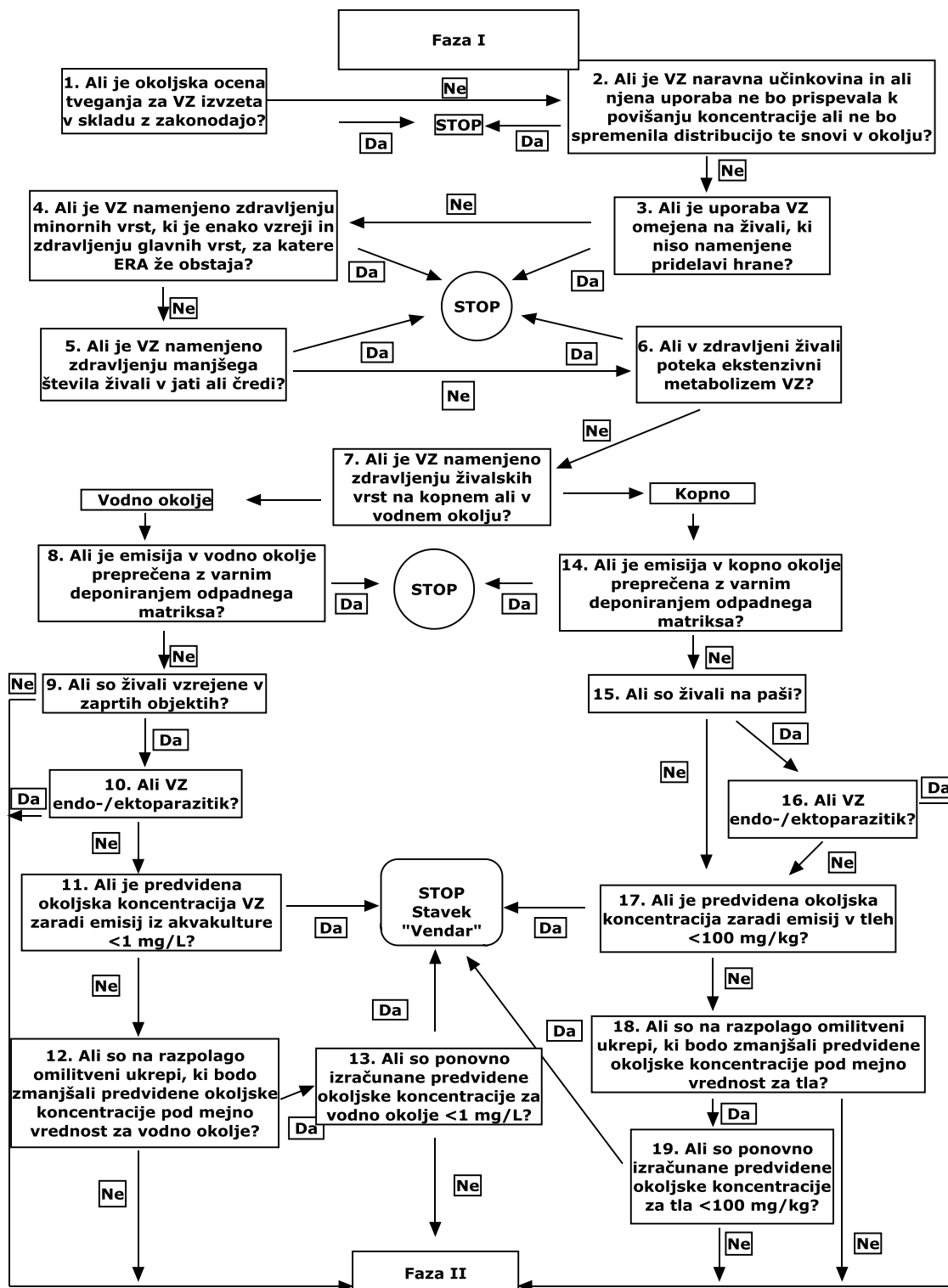
Group, 2005). V letu 2008 je izšel dokument tehničnih navodil, ki natančneje razlaga oba dokumenta (European Medicines Agency, 2008). Namen navodil je predvsem v harmonizaciji scenarijev izpostavljenosti v Evropi, pri čemer navaja enačbe za izračun predvidenih okoljskih koncentracij (Predicted Environmental Concentration – PEC). Podaja tudi privzete vrednosti za živali in okolje (teža, proizvodnja gnoja, vrednost proizvedenega dušika na žival) ter okoljske parametre za sprejemne okoljske segmente (dovoljeni vnos dušika na enoto obdelovalne površine). V postopku avtorizacije trženja velja okoljska ocena tveganja kot del varnostnega poročila za vsako veterinarsko zdravilo posebej. V postopkih registracije to pomeni, da je za vsako veterinarsko zdravilo potrebno izvesti okoljsko oceno tveganja, tudi če vsebuje učinkovino, ki se pojavlja v večih različnih pripravkih. Postopki avtorizacije trženja veterinarskih zdravil se zato bistveno razlikujejo od registracijskih postopkov drugih kemijskih snovi. Fitofarmacevtska sredstva na primer temeljijo na skupnem registracijskem dosjeju, v katerem so zbrani podatki (tudi ekotoksikološki) za posamezno aktivno snov (91/414/EEC, 1991). Ekotoksikološki zaključki za fitofarmacevtska sredstva so javno dostopni, omejena je le raba podatkov o izvedenih testih, iz katerih so bili pridobljeni zaključki.

Ekotoksikološki testi in iz njih izvedeni zaključki, ki so bili generirani za pripravo okoljske ocene tveganja za veterinarska zdravila, so last nosilca avtorizacije in niso javno dostopni. V postopku je sicer mogoče uporabiti tudi podatke iz javno dostopne literature (European Medicines Agency, 2012), vendar morajo ti zadostiti validacijskim kriterijem, kot veljajo za standardizirane teste za pripravo posamezne ocene. Zaradi te posebnosti v registracijskem postopku so zelo pomembne objave validiranih ekotoksikoloških podatkov ter podatkov o obnašanju učinkovin v prosto dostopni znanstveni literaturi.

Okoljska ocena tveganja za veterinarska zdravila poteka v dveh fazah. Zaključek, ali veterinarsko zdravilo predstavlja tveganje oziroma ali je sprejemljivo majhno, temelji na vrednotenju razmerja med predvideno okoljsko koncentracijo PEC ter koncentracijo snovi, pri kateri se še ne izkaže učinek (Predicted No Effect Concentration – PNEC). Razmerje je podano kot značilnost razmerja tveganja (Risk Characterization Ratio – RCR). V kolikor je razmerje enako ali večje kot 1, je verjetnost tveganja za okolje potrjena. V tem primeru mora predlagatelj navesti omilitvene ukrepe, ki bodo tveganje zmanjšali na sprejemljivo raven. Rezultat faze I je izključitev veterinarskega zdravila iz nadaljnjega postopka ali izračun vrednosti PEC ter nadaljevanje ocene v fazi II.

Faza I, ki je opisana v Tehničnem navodilu 6 (VICH Expert Working Group, 2000), je podana v obliki izločevalnega ključa. Sestavlja ga vrsta vprašanj, ki izločijo rabe, ob katerih se emitirajo zanemarljivo majhne količine učinkovine v okolje. Faza I temelji na simplicistični predpostavki, da so vplivi na okolje sorazmerni s količino emitiranih snovi.

Postavljene so tudi ciljne mejne koncentracije za vrednosti PEC v kopnih in vodnih segmentih ekosistema. Te determinirajo najvišjo mejo, pri kateri lahko učinke štejemo kot še zanemarljive. V kolikor vprašanja ne pripeljejo do zaključka pred koncem ključa, je potrebno oceniti rabo veterinarskega zdravila v fazi II. Izločevalni ključ faze I je prikazan na sliki 2.



Slika 2: Faza I okoljske ocene tveganja za veterinarska zdravila (VZ)

Fig. 2: Phase I of Environmental risk assessment for veterinary medicinal products (VZ)



Vprašanja v fazi I okoljske ocene tveganja za veterinarska zdravila obsegajo štiri področja:

1. Ali je učinkovina izvzeta iz ovrednotenja zaradi zakonskih določil, zaradi narave snovi (ali gre za naravno učinkovino; ali raba ne bi povišala naravno prisotnih koncentracij; zdravilo je namenjeno imunološki terapiji in preventivi; zdravilo je za zdravljenje živali, ki niso namenjene človeški prehrani)?
2. Po kakšni poti je izpostavljeno okolje (paša, intenzivna reja, akvakultura)?
3. Ali bo učinkovina emitirana v okolje v količini, ki bo presegala mejne vrednosti 100 µg/kg za tla ter 1 µg/L za vodo?
4. Ali sodi učinkovina med snovi, ki jih je potrebno vedno oceniti (kot so antiparazitiki v uporabi na pašnih živalih), oziroma ali jih je potrebno oceniti, ker gre za izjeme (t. i. „however clause“) in sodijo med obstojne, bioakumulativne in strupenostne snovi (PBT), ker gre za hormone oziroma snovi, za katere je znano, da izkazujejo učinek pri nižjih koncentracijah, kot so mejne vrednosti 100 µg/kg za tla in 1 µg/L za vodo?

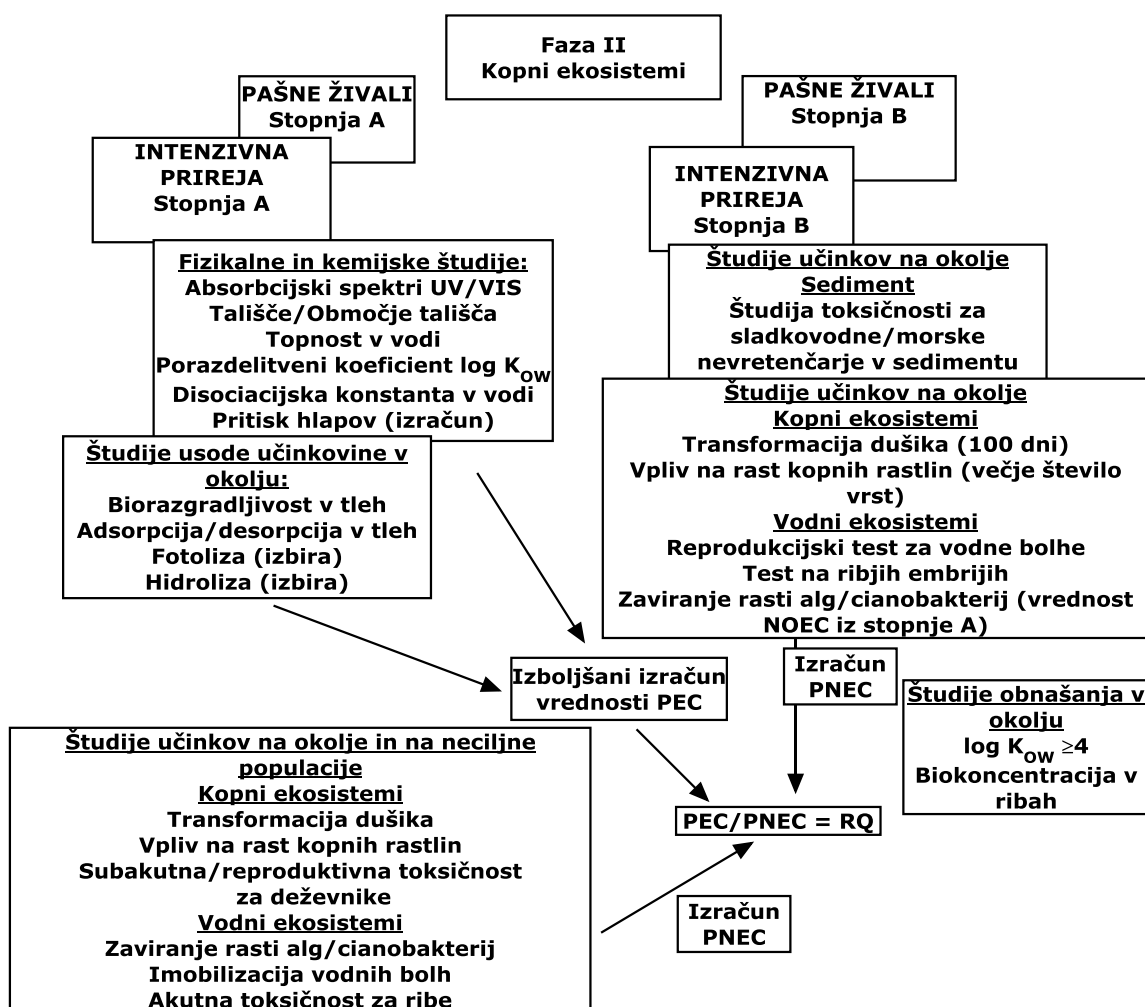
Rezultat faze I je tudi izračun preprostih vrednosti PEC za učinkovine, ki bodo prešle v fazo II okoljske ocene tveganja za veterinarska zdravila. Vrednosti PEC so izračunane na osnovi odmerka in rabe zdravila.

V Tehničnem navodilu 38 (VICH Expert Working Group, 2005) so navedene standardizirane testne metode za izvedbo faze II. Prijavitelj avtorizacije trženja veterinarskega zdravila izvede nabor študij in preiskav, ki jih navodila predpisujejo glede na sprejemni segment okolja. Nabor podatkov vsebuje zaključke študij fizikalnih in kemijskih lastnosti, ki opredeljujejo usodo in obnašanje učinkovine v okolju ter njene ekotoksikološke značilnosti. Razpoložljivi podatki o fizikalnih in kemijskih lastnostih ter usodi in obnašanju učinkovine omogočajo tudi zanesljivejši izračun vrednosti PEC.

Zaključki ekotoksikoloških testov so osnova za izračun vrednosti za predvideno koncentracijo snovi, pri kateri se še ne izkaže učinek (PNEC). Vrednost PNEC je sestavljena iz ekotoksikološke vrednosti, ki je ulomljena z varnostnim faktorjem (VF). Ta znaša od 1000 za študije akutne strupenosti do 10 za dolgodobna testiranja kroničnih učinkov.

PNEC je potrebno izračunati za vsak segment okolja posebej. Zahteve po ekotoksikoloških podatkih so razdeljene na dve sosledni stopnji. V stopnji A so zahtevani podatki iz kratkodobnih, razmeroma preprostih testiranj. Varnostni faktor za določitev PNEC je visok. V primeru identificiranega okoljskega tveganja v stopnji A je potrebno pridobiti dodatne podatke iz razširjenega nabora preiskav v stopnji B, ter tako zmanjšati negotovost in konservativnost ocene. V kolikor je razmerje PEC/PNEC še vedno večje od 1, kar kaže

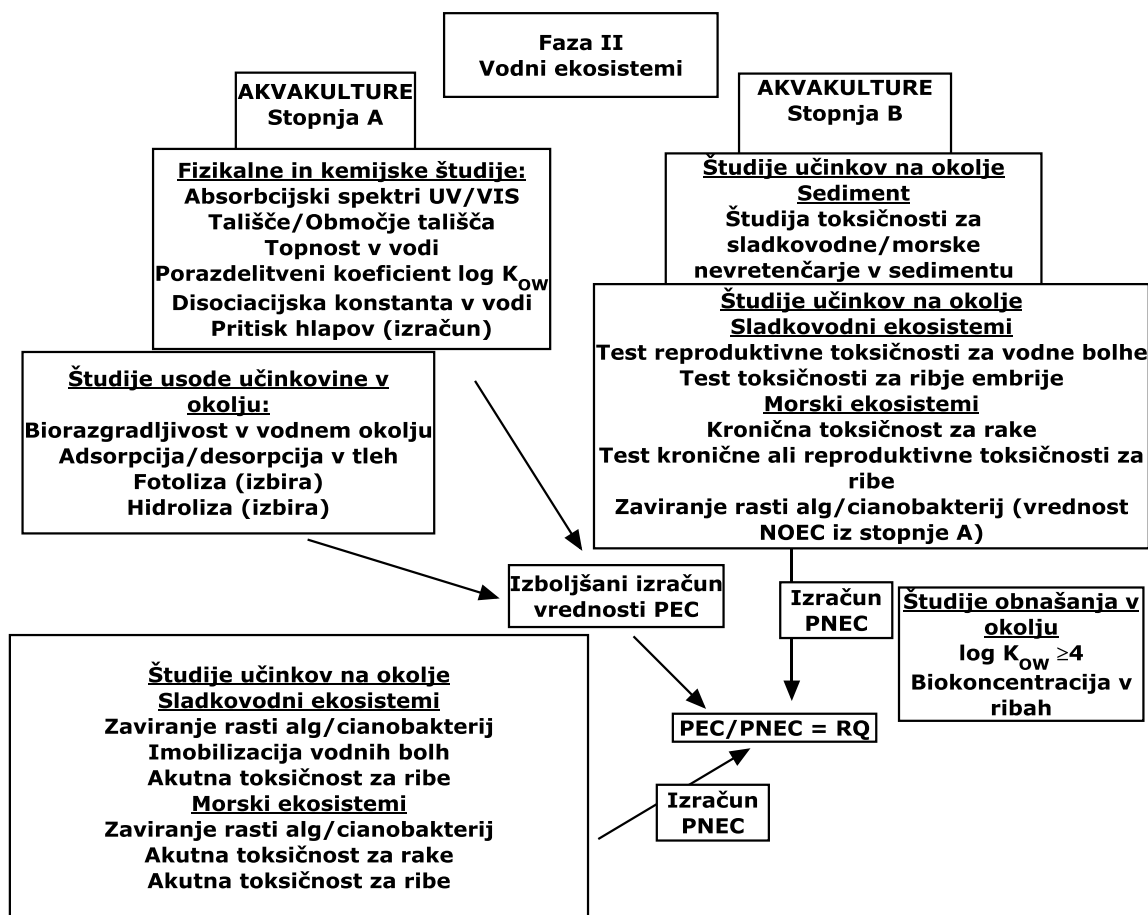
na nesprejemljivo tveganje, je potrebno predvideti omilitvene ukrepe za vsak segment okolja posebej. Faza II je prikazana na sliki 3 za veterinarska zdravila za živali v kopnih ekosistemih in na sliki 4 za veterinarska zdravila v rabi v akvakulturah.



Slika 3: Faza II okoljske ocene tveganja za veterinarska zdravila za rabo v intenzivni reji in pri pašnih živalih

Fig. 3: Phase II of Environmental risk assessment for veterinary medicinal products for use in pasture animals and in the intensively reared animals

V fazi II okoljske ocene tveganja za veterinarska zdravila je med študijami učinkov na vodno okolje predvideno tudi testiranje protimikrobnih zdravil na cianobakterijah kot najbolj občutljivi skupini iz osnovnega nabora ekotoksikoloških testov (base set) za testiranje kemijskih snovi (VICH Expert Working Group, 2005) (European Medicines Agency, 2009).



Slika 4: Faza II okoljske ocene tveganja za veterinarska zdravila za rabo v akvakulturah

Fig. 4: Phase II of Environmental risk assessment for veterinary medicinal products for use in aquacultures

## 2.2 OKOLJSKI STANDARDI KAKOVOSTI

Okoljski standard kakovosti (OSK) za vodno okolje je tista najvišja koncentracija stresorja (onesnaževala), pri kateri je še zagotovljeno varovanje strukture in funkcije vodnega ekosistema. Statistični kriterij sprejemljivosti je zaščita 95 % vseh vrst v ekosistemu (ali njegovem delu), pri čemer so upoštevane vrste iz vsaj treh trofičnih nivojev (Solomon, 2000). Iz teh izhaja tudi nabor osnovnih modelnih organizmov, kot so planktonske alge, planktonski rakci ter ribe. Pri izbiri standardiziranega modelnega organizma ali taksonomske skupine velja načelo, da varna koncentracija stresorja za najbolj občutljivo vrsto pomeni tudi varno koncentracijo za manj občutljive vrste v izpostavljenem ekosistemu (European Chemicals Bureau, 2003).

Člen 16 Vodne direktive (2000/60/ES, 2000) postavlja temelje strategije za omejevanje kemijskega onesnaževanja površinskih voda. Za določanje kakovosti vodnega telesa je ob ekološkem stanju potrebno določiti in spremljati kemijsko stanje voda. OSK so eno izmed osnovnih orodij za določitev kemijskega in ekološkega stanja površinskih voda. Za področje EU so bile določene mejne vrednosti za seznam prednostnih snovi in prednostnih nevarnih snovi (2008/105/ES, 2008). Direktiva je bila sprejeta v času predsedovanja Slovenije Svetu Evropske unije, slovenski strokovnjaki pa smo sodelovali pri nastajanju direktive. Seznam je bil dopolnjen leta 2013 (Evropski parlament in Svet Evropske unije, 2013). V kolikor OSK niso preseženi, je stanje površinskih voda ocenjeno kot dobro.

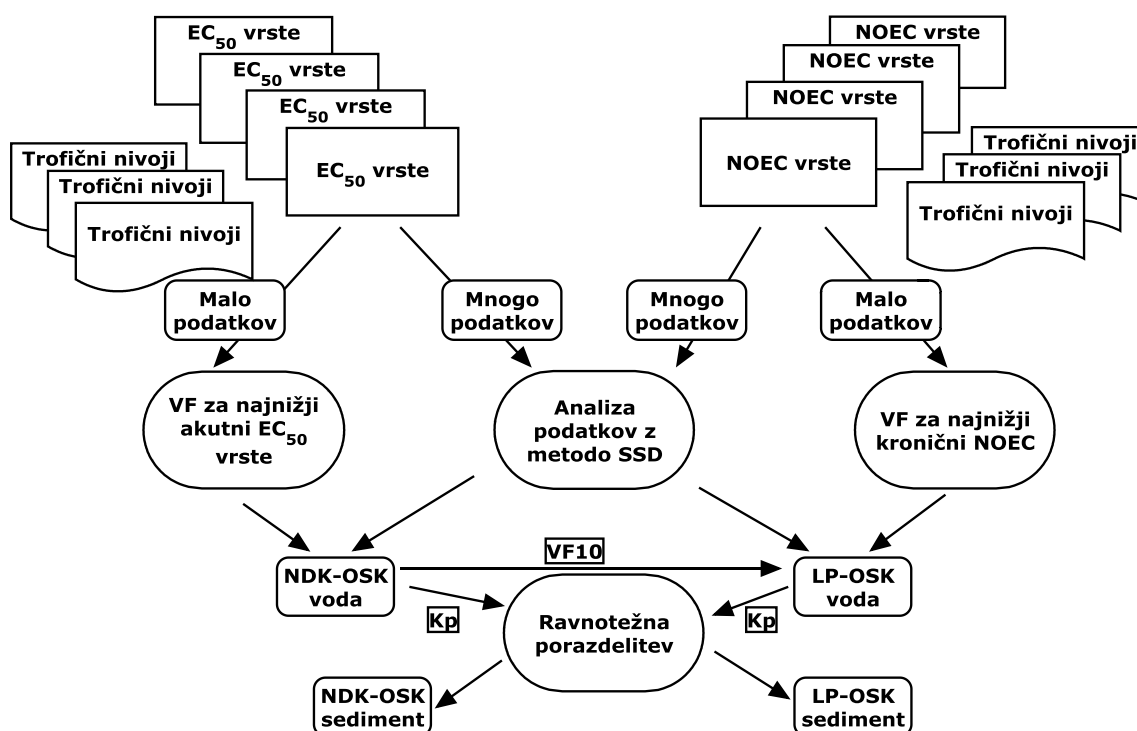
Po opravljeni razpravi za spremembo in dopolnitev Direktive o Okoljskih standardih kakovosti iz leta 2008, se je s členom 8c oblikoval strateški pristop k preprečevanju onesnaženja voda s farmacevtskimi snovmi ( Direktiva 2013/39/EU, 2013). Tako so bili v začetnem predlogu na seznam prednostnih snovi uvrščene tudi tri farmacevtske učinkovine: diklofenak, 17 alfa-etinilestradiol in 17 beta-estradiol (The European Parliament and the Council of the European Union, 2012), ki pa so bile v končni uredbi (Direktiva 2013/39/EU, 2013) umaknjene na opazovalni seznam. Na seznamu prednostnih snovi so tudi učinkovine, ki so (bile) v uporabi kot insekticidi, v veterinarski medicini pa je njihova raba še vedno odobrena v protiparazitskih zdravilih. Na omenjenem seznamu trenutno ni protimikrobnih zdravil.

V skladu z Vodno direktivo morajo države članice EU za oceno ekološkega stanja površinskih voda med drugim pripraviti tudi seznam posebnih onesnaževal, ki so relevantni v njihovem vodnem okolju. Za omenjena onesnaževala morajo države članice opraviti tudi OSK v skladu z metodologijo, ki je bila uporabljena za prednostne snovi v Direktivi o Okoljskih standardih kakovosti leta 2008 in njeni dopolnitvi v letu 2013. V obdobju 2005–2010 smo pripravili seznam relevantnih snovi za slovensko vodno okolje (Kolar in sod., 2005). V slovenski zakonodaji so nacionalno relevantne snovi označene kot posebna onesnaževala, ki so merilo ekološkega stanja voda. Za nabor 29 posebnih onesnaževal smo določili OSK (Kolar in sod., 2006). V primerjavi z OSK na Nizozemskem, v Franciji in Nemčiji, so koncentracijske vrednosti višje za 6 snovi kot v omenjenih državah. Primerjava OSK je pokazala tudi potrebo po revizijah in evalvaciji OSK znotraj EU in zunaj nje (Durjava in sod., 2015). Protimikrobnih učinkovin nismo uvrstili med posebna onesnaževala. V času nastanka seznama namreč ni bilo na razpolago podatkov o porabljenih količinah, kar je bil eden izmed kriterijev za uvrstitev snovi na seznam. Seznam snovi, relevantnih za vodno okolje v Sloveniji (Kolar in sod., 2005) je nastajal sočasno z navodili VICH številka 38. Pri pripravi seznama relevantnih snovi za slovensko vodno okolje smo izračunali vrednosti PEC, OSK pa smo izračunali na osnovi vrednosti PNEC. Navodila, ki so predpisala postopke ter zahteve za izračun vrednosti PEC

in PNEC za veterinarska zdravila so izšla v istem letu, zato jih ni bilo mogoče uporabiti pri nastanku snovi, relevantnih za slovensko vodno okolje.

Pri pripravi seznama smo sledili načelom za uvrstitev snovi na prioriteto listo iz 16. člena Vodne direktive (2000/60/ES, 2000). Snovi smo uvrstili na seznam na osnovi poenostavljenega postopka ocene tveganja. Upoštevali smo dokaze za nevarne ekotoksikološke in izbrane toksikološke lastnosti snovi (intrinzična nevarnost) ob izpostavljenosti v vodnem okolju. Kot dokaz izpostavljenosti v vodnem okolju smo uporabili podatke iz nacionalnih monitoringov površinskih voda. Za oceno izpostavljenosti vodnega okolja površinskih voda smo uporabili podatke, kot so proizvodnja ali porabljeni tonaža. OSK za izbrani nabor snovi smo izračunali z metodologijo določitve PNEC za kemijske snovi v skladu z dokumentom tehničnih navodil (Technical Guidance Document – TGD), ki je veljal za nove in obstoječe kemikalije (European Chemicals Bureau, 2003). Zakonodaja na področju kemikalij je posodobila kemijska zakonodaja REACH, ki pa metod za določanje vrednosti PNEC ni spremenila.

V postopku smo določili dve mejni vrednosti, in sicer AA QS (Annual Average Quality Standard), ki je v Slovenski uredbi LP-OSK (letno povprečje, okoljski standard kakovosti) ter MAC QS (Maximal Acceptable Concentration Quality Standard), ki je pozneje v uredbi dobila slovensko poimenovanje NDK-OSK (najvišja dovoljena koncentracija, okoljski standard kakovosti). Shema na sliki 5 prikazuje potek določitve mejnih vrednosti za vodno okolje, pri čemer je NDK-OSK izračunana iz ekotoksikoloških rezultatov za kartkodobni PNEC, LP-OSK pa iz rezultatov za dolgodobni PNEC. Izračunane so bile tudi vrednosti okoljskih standardov za sediment, pri čemer je bil upoštevan koeficient porazdelitve ( $K_p$ ). V postopku smo uporabili tudi statistično metodo porazdelitve občutljivosti vrst – SSD (Species Sensitivity Distribution) za obdelavo večjega števila ekotoksikoloških podatkov.



Slika 5: Shema poteka določanja okoljskih standardov kakovosti za posebna onesnaževala v površinskih vodnih telesih v Sloveniji (Kolar in sod., 2006)

Fig. 5: Scheme of derivation of environmental quality standards for the special pollutants in Slovenian water bodies (Kolar et al., 2006)

Danska je med redkimi državami članicami, ki so pripravile okoljske standarde kakovosti tudi za protimikrobne učinkovine. Tako so na danski Agenciji za zaščito okolja (Danish EPA) pripravili OSK za TMP (Danish Environmental Protection Agency, 2006) in OTC (Danish Environmental Protection Agency, 2007). Posebnost danskega pristopa in izračuna OSK za protimikrobne učinkovine je bila v uporabi mikrobiološkega parametra minimalne inhibicijske koncentracije MIK (Minimum Inhibitory Concentration – MIC). Vrednosti MIK so uporabili pri oceni tveganja za razvoj rezistence patogenih bakterij. Obenem so parameter MIK uvedli zaradi celovitosti opisa delovanja protimikrobne učinkovine v okolju. Za izhodišče je veljala ocena, da je tveganje za razvoj protimikrobne rezistence zanemarljivo, v kolikor je vrednost OSK desetkrat nižja od najnižje vrednosti za MIK. OSK za površinske vode so izračunali z deterministično metodo na osnovi razmeroma majhnega števila ekotoksikoloških podatkov. Predlog za TMP LP-OSK je bil 100 µg/L ter NDK-OSK 160 µg/L. Za OTC je bil predlagan LP-OSK 10 µg/L ter NDK-OSK 21 µg/L.

### 2.3 PROTIMIKROBNI UČINKOVINI OTC IN TMP V VODNEM OKOLJU

Celovit pregled vpliva protimikrobnih zdravil na okolje je v svoji študiji podal Kümmerer (Kümmerer, 2009). Problematiko teh snovi obravnava holistično, brez težnje, da bi podajal okoljsko oceno tveganja za posamezne učinkovine. Med viri emisij protimikrobnih učinkovin navaja naravno ozadje, saj zlasti mikroorganizmi tal proizvajajo snovi, kot so  $\beta$ -laktami, streptomicini in aminoglikozidi. Viri emisij protimikrobnih učinkovin so proizvodnja, raba v humani in veterinarski medicini vključno z akvakulturami ter v kmetijstvu in živinoreji kot dodatek k prehrani (raba v fitofarmacevtske namene in kot dodatek krmilom v članicah EU ni dovoljena). Pomemben vir emisij protimikrobnih učinkovin je tudi odlaganje neporabljenih zdravil (Kolar in sod., n. d.).

Medtem ko so viri emisij protimikrobnih učinkovin pri rabi v veterinarski medicini razpršeni, so viri emisije iz proizvodnje točkasti. V tako imenovanih razvitih državah naj bi bile emisije iz proizvodnje zanemarljive. Po navedbah farmacevtskega združenja EFPIA (European Pharmaceutical Industry Associations and Pharmaceutical Companies) emisije iz proizvodnje ne presegajo 2 % vseh okoljskih emisij v življenjskem ciklu učinkovine (BIO Intelligence Service, 2013). Razlog je predvsem v izjemno visoki ekonomski vrednosti učinkovin. Vendar pa so razlike v svetovnem merilu zelo velike. Najvišje kadarkoli izmerjene koncentracije farmacevtskih učinkovin so ugotovili v efluentu iz skupne čistilne naprave, v katero dotekajo vode iz največjega centra za proizvodnjo generičnih zdravil na svetu (približno 90 proizvodnih obratov) v indijskem mestu Hyderabad v indijski zvezni državi Telangana (Larsson in sod., 2007). Koncentracija ciprofloksacina na iztokih iz čistilne naprave je dosegala koncentracijo 31 mg/L.

Podatki o merjenih okoljskih koncentracijah OTC in TMP v vodnem okolju so sporadični in niso rezultat njunega načrtnega spremljanja. Zato o deležu obeh protimikrobnih učinkovin, ki ga k okoljskim koncentracijam prispeva veterinarska raba lahko sklepamo na osnovi meritev emisij (na primer iz akvakulture) ter modelnih izračunov vrednosti PEC. Protimikrobne učinkovine niso na seznamu prednostnih snovi. Po dostopnih podatkih OTC in TMP tudi nista uvrščeni na sezame posebnih onesnaževal, ki so jih pripravile države članice in jih morajo vključiti v nacionalni monitoring za opredelitev ekološkega stanja površinskih voda. Vendar pa sta izbrani protimikrobni učinkovini na seznamu novih onesnaževal (emerging pollutants), (OECD, 2012). To so snovi, ki jih v preteklosti nismo dojemali kot onesnaževala, danes pa jih zaradi velike pogostosti izmerjenih okoljskih koncentracij, ugotovljenih strupenih učinkov, obstojnosti oziroma bioakumulativnih lastnosti štejemo med onesnaževala. TMP je v naboru protimikrobnih zdravil, ki so v rabi v veterinarski in humani medicini, ter v ožjem naboru novih onesnaževal (Wells in sod., 2009).

Najvišje izmerjene koncentracije OTC in TMP v celinskih površinskih vodah v državah EU so v mikrogramskih oziroma nanogramskih koncentracijah. Kümmerer (Kümmerer, 2009) navaja študijo Kaya in sod. (2005), ki so po dežju v vodi namerili do 71 µg/L OTC. Koncentracija je bila izmerjena v izcedni vodi iz njive, na katero so pred dežjem aplicirali gnojevko. OTC se v vodnem okolju zaradi velike sorptivne kapacitete kopiči v sedimentu. V organsko bogatem anaerobnem sedimentu, ki je pod prosto plavajočimi vzrejališči rib, je OTC lahko prisoten tudi do pol leta (Loke in sod., 2003). V okolici ribogojnic so koncentracije OTC lahko razmeroma visoke. Pod vzrejališčem brancinov so bile izmerjene koncentracije v anaerobnem sedimentu tudi do 246 µg/kg (Laumera in sod., 2004). Campagnolo in sod (2002) so med drugim spremljali vsebnost protimikrobnih učinkovin v svinjski gnojevki (v lagunah za hranjenje gnojevke), v potoku sredi polja, ki so ga gnojili s kurjim gnojem, ter na vodnem izviru na piščančji farmi. Koncentracije OTC (v povezavi z ostalimi tetraciklini) so v gnojevki dosegale vrednosti do 410 mg/L, v potoku do 1 µg/L, na izviru pa do 2 µg/L. TMP so na teh lokacijah izmerili v koncentraciji do 2,5 mg/L v lagunah svinjske gnojevke ter do 0,27 µg/L v potoku. TMP na vodnem izviru ni bil ugotovljen. Obnašanje in usodo OTC na kmetijskih površinah je demonstrirala študija, v kateri so po aplikaciji gnojevke v dveh zaporednih letih spremljali izbrane protimikrobne učinkovine. Gnojevka, ki so jo aplicirali v skladu z dobro kmetijsko prakso v količini 45 m<sup>3</sup>/ha, je vsebovala 18,85 mg/L dodanega OTC. Koncentracija je bila pripravljena na osnovi izračunane vrednosti PEC za OTC, ki je znašala 0,9 kg/ha. Vršne izmerjene koncentracije OTC v tleh so bile 1691 µg/kg, v izcedni vodi pa le 36,1 µg/L. Ob ugotovljenih minimalnih masnih izgubah <0,5 %, rezultati potrjujejo veliko sorptivno sposobnost OTC (Kay in sod., 2004).

V preiskavi učinka kompostiranja na koncentracije protimikrobnih učinkovin v aktivnem blatu čistilnih naprav, grezničnem mulju ter govejem, svinjskem, perutninskem in konjskem gnoju so Motoyama s sod. (2011) spremljali izginevanje nabora protimikrobnih učinkovin. V 30-dnevnem procesu kompostiranja v termofilnih razmerah pri 38 °C je krivulja procesa degradacije OTC (kot so avtorji označili izginevanje snovi), pokazala značilno stopničasto obliko. Po 10 dneh se je koncentracija OTC znižala na 13 % začetne vrednosti. V naslednjih 20 dneh pa se koncentracija OTC ni več spreminjala in je ostala med 9,4 in 14,6 %. Tudi koncentracija TMP je bila po koncu testiranja v podobnem koncentracijskem območju (13,5 % od začetne vrednosti), vendar pa je bilo upadanje v času kompostiranja zvezno.

V dostopni literaturi je razmeroma malo podatkov o izmerjenih koncentracijah OTC v vodnem stolpcu evropskih površinskih celinskih voda. Zaradi sorptivnih lastnosti so koncentracije pričakovano nizke in so pod ali v območju 1 µg/L (Boxall, 2004). V površinskih vodah v Združenih državah Amerike so bile najvišje izmerjene koncentracije



OTC 0,34 µg/L in TMP med 0,30 µg/L in 0,71 µg/L (Kolpin in Meyer, 2002). V nasprotju z omejenim naborom podatkov o pojavu OTC v vodnem okolju, pa je teh veliko več za TMP. 50. percentila nabora več kot 1000 zbranih koncentracijskih vrednosti v površinskih vodah je ~0,012 µg/L TMP, 95. percentila pa ~0,129 µg/L (Straub, 2013). Najvišjo koncentracijo TMP v površinski vodi 0,710 µg/L so izmerili v vodotokih v ZDA (Kolpin in Meyer, 2002). Podobna je najvišja koncentracija, ki je bila izmerjena v Evropi in je znašala 0,690 µg/L (Valcárcel in sod., 2011).

Že omenjena Holten-Lutzhøft in Halling-Sørensen (Holten-Lutzhøft in sod., 1999) sta raiskovala učinek protimikrobnih učinkovin, ki so bile v rabi v danskih ribogojnicah, na vodno okolje. Teste so izvedli z amoksicilinom, flumekinom, oksilinsko kislino, oksitetraciklinom, sarafloksacinom, sulfadiazinom in trimetoprinom in jih testirali na cianobakteriji *Microcystis aeruginosa*, *Selenastrum capricornutum* (danes *Pseudokirchneriella subcapitata*) ter morski algi *Rhodomonas salina*. Teste strupenosti sta izvedla v skladu z standardiziranimi in validiranimi metodami, ter tako določila referenčne ekotoksikološke vrednosti za učinke izbranih protimikrobnih učinkovin. Cianobakterija *Microcystis aeruginosa* je bila med najbolj občutljivimi vrstami, če upoštevamo, da je bila izpostavljenost protimikrobnim učinkovinam v testih s cianobakterijami bistveno daljša kot v testu z algami.

### 3. MATERIAL IN METODE

#### 3.1 DOLOČITEV OKOLJSKIH STANDARDOV KAKOVOSTI

Okoljski standardi kakovosti izhajajo iz načel okoljske ocene tveganja za kemijske snovi. Vrednost PNEC je določena na osnovi ekotoksikoloških podatkov in VF (varnostnega ali tudi ekstrapolacijskega faktorja) za pokrivanje negotovosti, ki izhaja iz ekstrapolacije rezultatov, pridobljenih na modelnih organizmih za ves ekosistem. Za posamezno snov je torej PNEC lahko neposredno prevedljiva v OSK. Vendar to velja le za OSK, ki predstavljajo varne koncentracije za dolgodobne učinke na vodno okolje. Ti OSK so v direktivi o mejnih vrednostih za površinske vode (Direktiva 2008/105/ES, 2008) označeni kot najvišje dovoljene mejne koncentracijske vrednosti za letno povprečje stresorja v vodnem ekosistemu površinskih celinskih voda. Direktiva pa postavlja še drugi okoljski standard kakovosti, in sicer največjo dovoljeno koncentracijo. To je mejna vrednost za največji dovoljeni enkratni vnos snovi, ki je izračunana iz kratkodobnih oziroma akutnih rezultatov ekotoksikoloških testov. Za snovi, ki se naravno pojavljajo v okolju, je potrebno upoštevati tako imenovano koncentracijo ozadja ter jo prišteti k izračunanemu OSK.

V naši študiji smo določili OSK za izbrani protimikrobni učinkovini za pelagične organizme celinskih površinskih voda v skladu s tehničnim navodilom Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards (European Commission, 2011), po katerem veljata za pripravo OSK dve metodi. Deterministična metoda temelji na izboru najnižje toksikološke vrednosti iz enega izmed treh trofičnih nivojev, negotovost ob ekstrapolaciji varne mejne vrednosti na ekosistem pa pokriva zelo širok nabor VF (preglednica 1). Visoki VF pokrivajo veliko negotovost pri ekstrapolaciji rezultatov kratkodobni akutnih ekotoksikoloških testov na ekosistem, medtem ko so nižji za rezultate, pridobljene iz kroničnih testov. Nižji VF pokriva negotovost, kadar so na razpolago rezultati, pridobljeni iz več trofičnih nivojev.

Verjetnostna metoda temelji na aglomeraciji večjega števila podatkov ter statistični obdelavi porazdelitve občutljivosti vrst, izračunu 5. percentila porazdelitve ter nizkega varnostnega faktorja, ki pokriva negotovost ob ekstrapolaciji na ekosistem. Za pripravo OSK po deterministični metodi smo primerjali dva pristopa za določanje vrednosti PNEC. Pristop, ki izhaja iz kemijske zakonodaje REACH, ter postopek, ki izhaja iz Faze II Tehničnega navodila 38 (GL 38) za oceno okoljskih tveganj veterinarskih zdravil VICH (VICH Expert Working Group, 2005). Tehnično navodilo za pripravo OSK namreč načelno zahteva upoštevanje zaključkov ocen tveganja, ki so bile izvedene v okviru drugih direktiv in sodijo v širši okvir zakonodaje REACH.

V študiji smo za OTC in TMP določili okoljske standarde kakovosti za pelagični del površinskih celinskih voda, pri čemer smo uporabili podatke iz prosto dostopne literature ter rezultate našega eksperimentalnega dela. Določili smo dve skupini okoljskih standardov kakovosti:

- **LP-OSK** (letno povprečje okoljskega standarda kakovosti); OSK je mejna vrednost koncentracije, ki varuje pelagični del vodnega ekosistema pred dolgodobno izpostavljenostjo protimikrobni učinkovini.
- **NDK-OSK** (najvišja dovoljena koncentracija okoljskega standarda kakovosti); OSK je mejna vrednost koncentracije, ki varuje pelagični del vodnega ekosistema pred kratkotrajno izpostavljenostjo vršnih koncentracij protimikrobne učinkovine.

Pri določanju OSK smo uporabili en ekotoksikološki podatek (na primer rezultat za  $EC_{50}$ ) za eno vrsto. V primeru, da je bilo na razpolago več enakovrednih podatkov za posamezno vrsto, smo izračunali in uporabili geometrijsko sredino vseh vrednosti. Glede na razmeroma veliko število ekotoksikoloških podatkov, pridobljenih na vrstah iz celinskih voda, se nismo odločili za uporabo rezultatov testov na morskih organizmih. Obseg in kakovost rezultatov sta omogočila pripravo OSK po dveh metodah:

- Deterministična metoda z uporabo varnostnega faktorja VF. Najnižjo relevantno ekotoksikološko vrednost (ki zadovoljuje standarde kakovosti) deli VF. Ta se nahaja med 1000 in 10.
- Verjetnostna metoda z uporabo modeliranja porazdelitve občutljivosti vrst SSD. Rezultat, ki je 5. percentil (HC5) statistične porazdelitve rezultatov, deli VF. Ta se nahaja med 5 in 1, oziroma 10 v primeru ekstrapolacije vrednosti HC5 na osnovi rezultatov kratkodobnih testov.

Tehnična navodila navajajo še tretjo metodo, po kateri OSK izhaja iz rezultatov terenskih preiskav na modelu ekosistema. Ta metoda za našo študijo ni relevantna zaradi umanjkanja relevantnih dostopnih podakov.

V kolikor je na razpolago dovolj veliko število kakovostnih podatkov, je potrebno slediti verjetnostni metodi, nujno potrebna pa je tudi primerjava rezultata, pridobljenega po deterministični metodi. Tudi rezultat robustne ocene občutljivosti večjega števila vrst z izračunom SSD se zaradi negotovosti deli z VF.

V študiji nismo podali mikrobiološke mejne vrednosti, ki bi varovala pred nastankom protimikrobne rezistence. Obravnava problematike v okolju porojene protimikrobne

rezistence je razmeroma nova, regulatorni organi pa tehnična navodila za metode določanja varnih mejnih vrednosti šele pripravljajo.

### **3.1.1 Podatki o identiteti, fizikalnih in kemijskih lastnostih ter podatki o obnašanju in usodi učinkovin v okolju**

Rezultate določitve OSK praviloma podajamo tabelarično. V povzetku so podatki, s katerimi smo identificirali kemijsko snov, to je ime in številka CAS, sledijo navedba ekosistema, za katerega je bil izračunan OKS (v našem primeru za površinske celinske vode) ter rezultati za posamezne matrikse (voda, sediment), podani za letno povprečje in kot najvišje dovoljene koncentracije. Metode izračuna za posamezne OSK smo obrazložili v opombah. V drugi tabeli so navedeni podatki, ki opisujejo identiteto snovi, kot so ob številki CAS še sinonim, ime kemijske skupine, molekulska ter strukturna formula. V tabeli s fizikalnimi in kemijskimi parametri so navedeni molekulska masa, parni tlak in topnost v vodi. Navedeni pa so tudi parametri, kot so porazdelitveni koeficienti, na primer porazdelitveni koeficient med vodo in oktanolom ter koeficient Henrijevega zakona, ki opisuje porazdelitev molekul med plinasto snovjo in topilom. V tabeli, ki opisuje usodo in obnašanje snovi, so podatki o biorazgradljivosti snovi in njenih bioakumulativnih lastnostih.

### **3.1.2 Ekotoksikološki podatki**

Osnovni set ekotoksikoloških testov je v skladu s V. aneksom Vodne direktive omejen na tri trofične nivoje, ki jih direktiva upošteva pri ugotavljanju ekološkega stanja površinskih celinskih voda. Set vključuje alge in/ali makrofite, vodne bolhe ter ribe. Kljub temu pa so v obravnavo vključeni ekotoksikološki podatki za vse razpoložljive taksonomske skupine. V primeru, da je več podatkov pridobljenih iz testiranj po istih testnih metodah in po isti izpostavljenosti, je potrebno določiti geometrijsko sredino rezultatov za posamezno vrsto. Ekotoksikološke podatke smo pred aglomeriranjem pregledali in vrednotili z namenom zagotovitve zanesljivosti in relevantnosti. Zanesljivost se nanaša na kakovost metode, ki je bila uporabljena. Preferenčne metode sledijo mednarodnim standardom, kot so na primer navodila OECD. Dolgodobni testi se lahko zaključijo z več rezultati, pri čemer niso vsi enako pomembni za zaključke o strupenosti. Rezultati, ki smo jih uporabili za pripravo okoljskih standardov, so podani kot koncentracije  $E(r)C_{50}$ , NOEC oziroma  $EC_{10}$ . Vsak uporabljen rezultat smo predhodno preverili, uporabni pa so le podatki, ki dosegajo oceno zanesljivosti 1 ali 2 po Klimichu (Klimisch in sod., 1997). Vključeni so tudi podatki, ki so pridobljeni po nestandardiziranih metodah, vendar so bili ustrezno dokumentirani in validirani, da dosegajo zanesljivost 2 po Kimlichu. V tabeli z zbranimi podatki so ob imenu taksonomske skupine in vrste navedeni še trajanje testa, rezultat in koncentracija učinka ter referenca.

### 3.1.3 Deterministična metoda določanja OSK

Deterministična metoda določanja LP-OSK je po vsebini skladna z metodo po REACH za določanje vrednosti PNEC (European Chemicals Agency, 2008). Primerna je za snovi, za katere je na razpolago omejeno število podatkov o rezultatih ekotoksikoloških testiranj. Metoda sloni na temeljni ekotoksikološki paradigmi, ki pravi, da občutljivost ekosistema temelji na najbolj občutljivi vrsti in da zaščita strukture ekosistema ščiti tudi ekosistemske funkcije. Ali drugače povedano, v kolikor varujemo vrsto, ki je na stresor najbolj občutljiva, varujemo tudi ves ekosistem. Kadar je na razpolago omejen nabor ekotoksikoloških podatkov, izberemo tistega z najnižjo koncentracijo. Pri ekstrapolaciji kratkodobnih učinkov je negotovost večja kot pri ekstrapolaciji dolgodobnih učinkov. Večji obseg nabora podatkov prinaša večjo realnost napovedi učinka na ekosistem in s tem manjšo negotovost. Slednjo pokrijemo z varnostnim faktorjem, ki je lahko med 1000 in 10. Nabor varnostnih faktorjev glede na obseg in vrsto ekotoksikoloških podatkov in iz njih izhajajoče negotovosti je predstavljen v preglednici 1.

Preglednica 1: Seznam varnostnih faktorjev (VF) za določitev vrednosti PNEC

Table 1: List of assessment factors (AF) to be applied to aquatic toxicity data to derive EQS (European Commission, 2011)

Razpoložljivost ekotoksikoloških podatkov	VF
Vsaj ena akutna vrednost $LC_{50}$ za vsakega od treh trofičnih nivojev osnovnega niza (ribe, vodne bolhe in alge)	1000
Ena kronična vrednost NOEC (ribe ali vodne bolhe)	100
Dve kronični vrednosti NOEC za vrste dveh trofičnih nivojev (ribe in/ali vodne bolhe in/ali alge)	50
Vsaj tri kronične vrednosti NOEC za vrste treh trofičnih nivojev (običajno ribe, vodne bolhe in alge)	10
Statistična ekstrapolacijska metoda "Species Sensitivity Distribution" SSD	5–1
Podatki iz terenskih eksperimentov ali modelnih ekosistemov	odločitev od primera do primera

Medtem ko naj LP-OSK ščiti ekosisteme površinskih celinskih voda pred stresorji v koncentracijah, ki povzročajo dolgodobne učinke, je namen NDK-OSK postaviti mejne vrednosti, ki ekosistem ščitijo pred akutnimi zastrupitvami ob enkratnem vnosu. Varna mejna koncentracija je izračunana iz rezultatov kratkodobnih ekotoksikoloških testov. Upošteva VF 100, vendar je ta lahko izjemoma tudi nižji. Nižjo negotovost lahko pričakujemo, kadar je splošno znan mehanizem delovanja stresorja oziroma je znana najbolj občutljiva taksonomska skupina. V primeru kratkodobnih učinkov protimikrobnih

učinkovin sta znani najbolj občutljivi taksonomski skupini (cianobakterije in zelene alge), zato smo ocenili, da je VF 10 realistična in opravičljiva vrednost, ki zadostno pokriva negotovost ob ekstrapolaciji rezultatov.

Iz tehničnih navodil za pripravo okoljskih standardov (European Commission, 2011) izhaja, da je potrebno upoštevati in ovrednotiti obstoječe ocene tveganja in vrednosti PNEC ali njim sorazmerne ekotoksikološke zaključke. Take ocene so lahko bile izvedene tudi v okviru drugih zakonodaj ali pa sodijo v široki okvir zakonodaje REACH. Tak primer je stara kemijska zakonodaja o obstoječih snoveh (Regulation [EC] No. 793/93 in Direktiva 98/8/EC) ali zakonodaja o pesticidih (91/414/EEC). V širši okvir REACH sodi tudi okoljska ocena tveganja (Environmental Risk Assessment – ERA), ki je sestavni del predtržnega registracijskega postopka za veterinarska zdravila v skladu tehničnimi navodili VICH za Fazo I (VICH Expert Working Group, 2000) in Fazo II (VICH Expert Working Group, 2005).

V drugi fazi ocene tveganja so predpisani nabori ekotoksikoloških testov za tri področja rabe veterinarskih zdravil: intenzivna reja, živali na paši ter akvakulture. Ocene tveganja potekajo v dveh stopnjah. RCR v stopnji A predstavlja primerjavo vrednosti PEC iz emisijskih scenarijev po načelu najslabšega primera (worst case scenario) z vrednostmi PNEC iz osnovnega nabora rezultatov kratkodobnih ekotoksikoloških testov. Sprejemljivo nizko tveganje pomeni rezultat  $RCR < 1$ . V nasprotnem primeru se v stopnji B izvede revidirana ocena tveganja, ki zahteva več podatkov o izpostavljenosti in s tem praviloma nižjo vrednost PEC. Vrednost PNEC je manj konzervativna, saj temelji na dolgodobnih testih. Negotovost pokrivajo predpisani, za metodo po VICH posebni VF. Vrednost PNEC je potrebno določiti za vsako testirano taksonomsko skupino posebej. Tudi metode za izvedbo ekotoksikoloških testov so natančno predpisane. Primerno je, da so testi izvedeni v skladu z dobro laboratorijsko prakso, vendar so lahko rezultati pridobljeni tudi iz proste literature, v kolikor so validirani in navedeni vsi v protokolu zahtevani podatki in rezultati. Ekotoksikološki testi in varnostni faktorji za posamezne rabe in stopnje druge faze okoljske ocene tveganja so v preglednici 2. Navedbe veljajo za teste na organizmih celinskih voda.

Preglednica 2: Varnostni faktorji in testne metode po navodilu VICH GL38 (VICH Expert Working Group, 2005)

Table 2: Assessment factors according to VICH GK 38 (VICH Expert Working Group, 2005)

Test	Rezultat	Varnostni faktor	Testna metoda po standardu
Algal growth inhibition*	EC <sub>50</sub>	100	OECD 201
<i>Daphnia</i> immobilization	EC <sub>50</sub>	1000	OECD 202
Fish acute toxicity	EC <sub>50</sub>	1000	OECD 203
Algae growth inhibition*	NOEC	10	OECD 201
<i>Daphnia magna</i> reproduction	NOEC	10	OECD 221
Fish, early-life stage	NOEC	10	OECD 210

\*Test na protimikrobnih učinkovinah se v nekaterih regijah VICH, med drugim tudi v Evropi, izvaja na cianobakterijah. EC<sub>50</sub> in NOEC izhajata iz enega testa.

### 3.1.4 Verjetnostna metoda določanja OSK

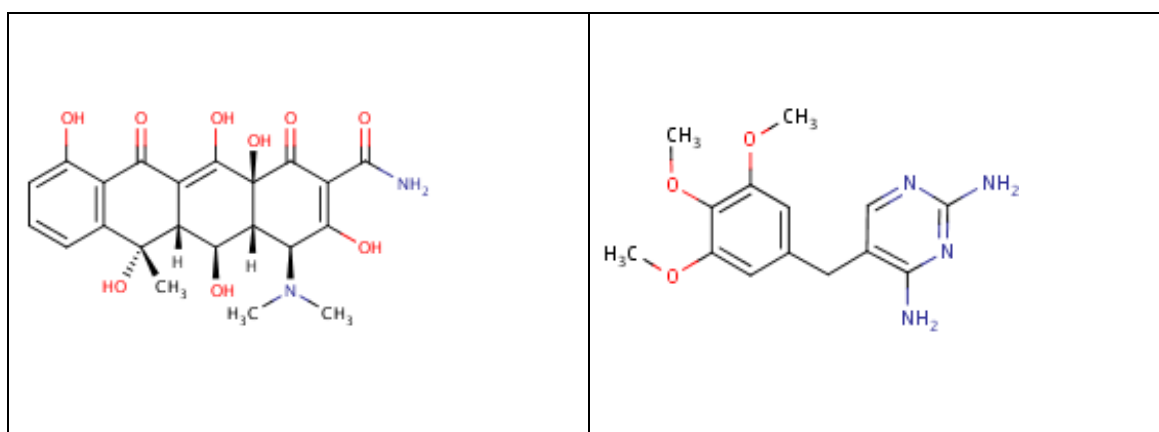
Statistična metoda določanja OSK izhaja iz ocene tveganja, ki jo za kemijske snovi predpisuje zakonodaja o kemikalijah REACH. Ekotoksikološko vrednost praviloma izberemo s pomočjo statistične metode SSD (Species Sensitivity Distribution), kadar so na razpolago rezultati testov strupenosti iz vsaj osmih taksonomskih skupin. Metoda omogoča tudi obravnavo rezultatov iz manjšega nabora taksonomskih skupin. Z aglomeracijo podatkov in log-normalno porazdelitvijo koncentracijskih vrednosti, ki pripadajo posamezni vrsti (kot rezultat ekotoksikološkega testa), izračunamo 5. percentil porazdelitve. Slednji, označen kot HC5, je rezultat, ki ustreza načelom varovanja 95 % vrst izpostavljenega ekosistema. Za določitev mejnih vrednosti za okoljske standarde s statistično metodo SSD smo uporabili računalniško orodje ETX 2.0, ki ga je leta 2000 razvil Van Vlaardingen s sodelavci (Van Vlaardingen in sod., 2004). Kljub večji realističnosti kot pri uporabi deterministične metode, tudi po tej metodi ekstrapolacija koncentracij učinka na ekosistem vsebuje negotovosti, ki jih pokriva VF. Ta je določen med 5 in 1, vendar se praviloma uporablja VF 5. Za dodatno znižanje VF bi bile potrebne dodatne, temeljite razlage. V naši študiji takega znižanja VF nismo mogli argumentirati. Ekotoksikološki podatki so aglomerirani glede na cilje OSK. NDK-OSK, ki varuje pred kratkotrajno izpostavljenostjo vršnih koncentracij, je izračunan na osnovi rezultatov testov po kratkodobni izpostavljenosti (EC<sub>50</sub>), OSK za letno povprečje pa na osnovi rezultatov dolgodobnih testov, izraženih kot EC<sub>10</sub> ali NOEC. V kolikor je na razpolago dovolj ekotoksikoloških podatkov, je za pripravo OSK nujna uporaba metode SSD. Ne glede na uporabo metode SSD, pa tehnično navodilo za določitev NDK-OSK ne dovoljuje nižjega VF od 10.

## 3.2 TESTNE METODE

### 3.2.1 Fizikalne in kemijske značilnosti OTC in TMP

OTC je učinkovina širokega protimikrobnega spektra iz skupine tetraciklinov, ki zavira sintezo beljakovin (Schmidt in sod., 2007). Učinkovina TMP deluje bakteriostatično tako, da vpliva na encim dihidrofolat reduktazo (Straub, 2013). Obe učinkovini sta v rabi v humani in veterinarski medicini.

Strukturni zgradbi in opis fizikalnih in kemijskih značilnosti OTC in TMP sta vidni v sliki 7 in preglednici 3.



Slika 6: Strukturna zgradba oksitetraciklina (levo) in trimetoprime (desno)

Fig. 6: Structure of oxytetracycline (left) and trimethoprim (right) Vir: HSDB (<http://toxnet.nlm.nih.gov>)

Preglednica 3: Fizikalne in kemijske značilnosti OTC in TMP

Table 3: Physical and chemical properties of OTC and TMP

Protimikrobna učinkovina	CAS	Topnost v vodi (mg/L)	Log $K_{ow}$
Oksitetraciklin	79-57-2	$3,13 \times 10^{2a}$	$-0,90^b$
Trimetoprim	738-70-5	$400^a$	$0,91^c$

<sup>a</sup>Yalkowsky, 2003

<sup>b</sup>Sangster, 2006

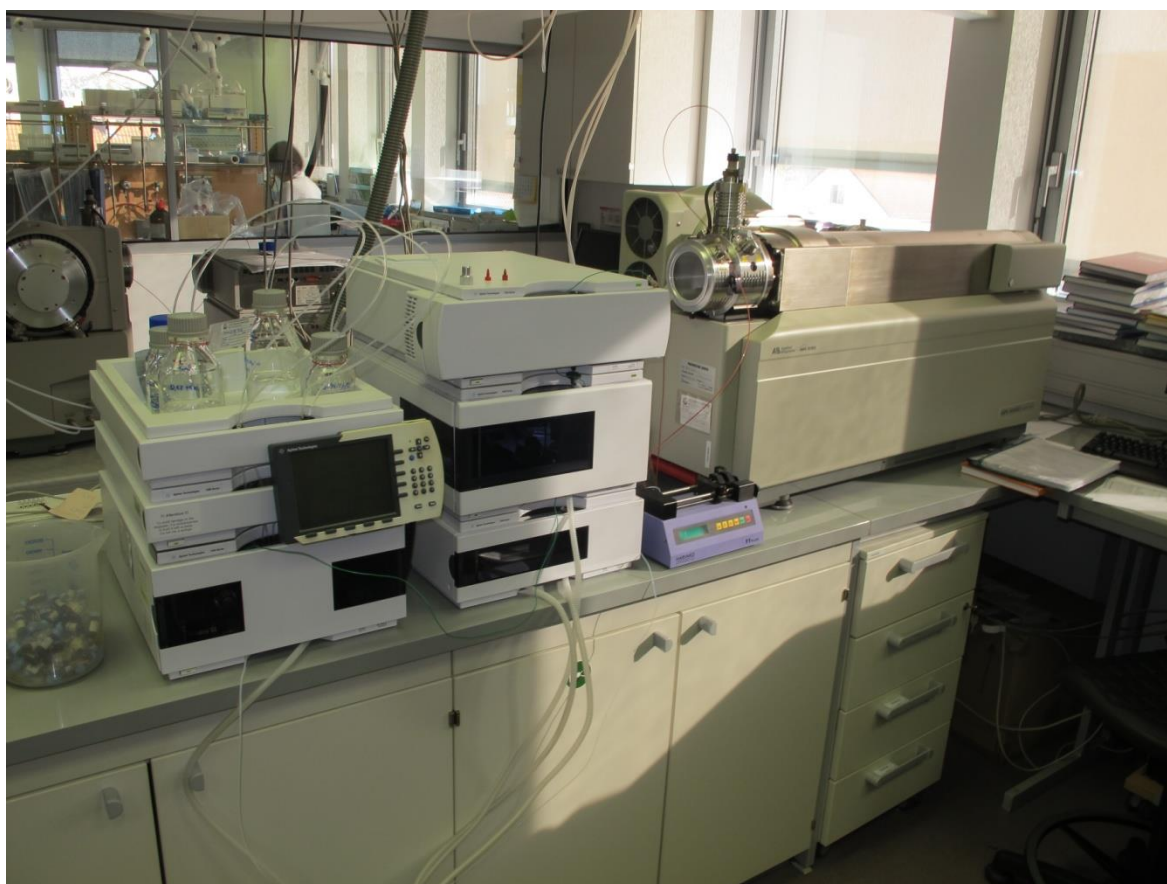
<sup>c</sup>Hansch, 1995

Obsežni nabor podatkov o fizikalnih in kemijskih lastnostih ter podatki o usodi in obnašanju OTC in TMP v okolju so zbrani v prilogi F1 oziroma F2 kot del poročila o pripravi okoljskega standarda kakovosti za površinske celinske vode.



### 3.2.2 Kemijske analize učinkovin in meritve fizikalnih in kemijskih parametrov

Kemijske analize OTC in TMP in meritve njihovih koncentracij na začetku in ob koncu testiranja zagotavljajo natančne vrednosti koncentracij izpostavljenosti cianobakterij, alg, vodnih bolh in mikrobne združbe aktivnega blata med testiranjem. Na osnovi izmerjenih koncentracij učinkovin smo določili koncentracije za izračun njihovega strupenostnega učinka. Koncentracije OTC in TMP smo ob začetku in koncu testiranja analizirali na vezanem sistemu LC-MS-MS, kot ga kaže slika 6.



Slika 7: Sistem HPLC v povezavi s tandemskim masnim spektrometrom

Fig. 7: HPLC system in the connection with the tandem mass spectrometer

Za določitev obeh spojin smo uporabili Agilentov sistem 1200 HPLC v povezavi s tandemskim masnim spektrometrom AB Sciex API 4000 s pozitivno elektrosprej ionizacijo (ESI).

Za OTC smo izbrali prehoda  $m/z$  461 $\rightarrow$ 426 in  $m/z$  461 $\rightarrow$ 443, za TMP pa prehoda 291 $\rightarrow$ 230 in 291 $\rightarrow$ 123. Ločitev je potekala na koloni Luna C18(2) 100 x 2 mm s 3- $\mu$ m

delci. Mobilna faza A je bila sestavljena iz 0,1 % mravljične kisline in acetonitrila (95/5). Mobilna faza B je predstavljala 0,1 % mravljične kisline v acetonitrilu. Uporabili smo gradientni program z začetno sestavo mobilne faze A–B (95–5). V 8. minuti je odstotek mobilne faze B narasel na 40 %. Pretok je bil 0,3 ml/min, temperatura kolone 40 °C in volumen injiciranja 20 µl.

Meja zaznavanja (LOD) je 0,01 mg/L in meja določanja (LOQ) 0,025 mg/L za obe spojini. Povprečen izkoristek za OTA je 95 % in za TMP 96 % z 9,8 % RSD za OTA in 15,7 % RSD za TMP.

V testih biorazgradljivosti smo spremljali koncentracijo raztopljenega organskega ogljika (Dissolved Organic Carbon – DOC) in koncentracijo učinkovin tudi v vzorcih, odvzetih med testom. DOC smo določili s termično katalitično oksidacijo, generirani CO<sub>2</sub> pa je bil izmerjen s spektrometričnim detektorjem NDIR.

V testih smo za spremljanje vrednosti kisika in pH uporabili WTW Multimenter P4 z merilno celico WTW Cell Oxi 325 oziroma pH elektrodo WTW Sen Tix ORP.

### **3.2.3 Testi biorazgradljivosti in ekotoksikološki testi**

Ekotoksikološke lastnosti in biorazgradljivost protimikrobnih učinkovin smo testirali v ekotoksikološkem laboratoriju Inštituta za varstvo okolja na Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor. (Kemijska tveganja z ekotoksikološkim laboratorijem po reorganizaciji v letu 2014 potekajo v okviru Centra za okolje in zdravje na Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano). Laboratorijske preiskave smo opravili v skladu z navodili OECD za testiranje strupenostnih učinkov kemikalij na cianobakterije *Anabaena flos-aquae*, alge *Pseudokirchneriella subcapitata*, vodne bolhe *Daphnia magna* ter kot inhibicijo respiracije mikrobne združbe aktivnega blata. Prav tako smo v skladu z navodili OECD ugotavljali biorazgradljivost obeh učinkovin. Testirani učinkovini farmakopejske čistosti nam je donirala farmacevtska družba Krka d. o. o. Kemikalije proizvajalca Merck, ki smo jih uporabili za pripravo rastnega medija, so bile analitske čistosti.

#### **Test biorazgradljivosti**

Test biorazgradljivosti smo izvedli v skladu s tehničnimi navodili OECD 302 B “Zahn-Wellens/EMPA Test” (OECD, 1992). Biorazgradljivost testne snovi smo 28 dni spremljali z meritvami koncentracije raztopljenega organskega ogljika (DOC) v aerobnem vodnem mediju. Krivuljo biorazgradljivosti smo izrisali na osnovi izmerjene koncentracije DOC po času. Biorazgradljivost smo podali kot delež inherentnega razgrajenega DOC v % po 28-ih

dneh testa. Rezultat testa je sprejemljiv (validen), v kolikor je bila razgradnja referenčne snovi v kontroli v 14 dneh najmanj 70 %.

#### Priprava testnih raztopin

Mineralni medij smo pripravili v skladu s tehničnimi navodili OECD 302 (glej prilogo C1). Natrijev acetat (NaAc; CH<sub>3</sub>COONa) smo med ponujenimi referenčnimi snovmi izbrali zaradi dolgoletnih izkušenj pri uporabi te snovi v testih biorazgradljivosti. NaAc smo pripravili v testni raztopini po predpisani koncentraciji, biorazgradljivost pa preverjali vzporedno in pod enakimi testnimi pogoji, kot so veljali za testirani protimikrobni učinkovini.

#### Inokulat in abiotična razgradnja

Inokulat aktivnega blata aerobne čistilne naprave smo odvzeli na komunalni čistilni napravi v Račah. Vzorec smo sprali pod vodo iz pipe in ga prezračevali 24 ur pri temperaturi okolice (temperatura v laboratoriju je  $21 \pm 3$  °C). Začetna koncentracija suhe snovi v inokulatu je bila 3 mg/L. Abiotično razgradnjo smo preverjali z raztopino živosrebrovega (II) klorida.

#### Izvedba testa

Testne snovi, mineralna hranila in inokulat aktivnega blata v vodnem mediju smo ob rahlem mešanju in prezračevanju vzdrževali v 1000-ml merilnih valjih s prirejenimi pokrovi iz umetne mase. Test smo izvajali 28 dni v temni testni komori pri temperaturi  $20 \pm 2$  °C. Paralelno smo pod istimi testnimi pogoji vzdrževali kontrolno serijo z referenčno snovjo NaAc in slepo probo brez testirane učinkovine oziroma referenčne snovi. Abiotično razgradnjo smo preverjali z dodatkom živosrebrovega (II) klorida v posodi s testiranimi učinkovinami. Testne raztopine smo prezračevali z brezoljnim in brezprašnim zrakom, ki smo ga dovajali s pomočjo akvarijskega kompresorja in čistili z zračnimi filtri. Abiotično razgradnjo smo ugotavljali v valjih, ki smo jih pripravili kot tiste s testirano učinkovino, le da smo raztopini dodali 0,1 g živosrebrovega (II) klorida in tako zavrli delovanje živih organizmov. Slika 8 kaže inkubacijo serije testnih mešanic OTC, TMP in kontrolnega vzorca z NaAc.



Slika 8: Test biorazgradljivosti po OECD 302 B “Zahn-Wellens/EMPA Test” (OECD, 1992)

Fig. 8: Biodegradability test according to OECD 302 B “Zahn-Wellens/EMPA Test” (OECD, 1992)

#### DOC in spremljevalne analize protimikrobnih učinkovin

Meritve DOC in spremljevalne analize OTC in TRIM smo izvajali na vzorcih testne suspenzije, odvzetih v rednih vzorčevalnih intervalih, ki so si sledili na 0., 1., 7. in 28. dan. Med vzorčenjem je bila vrednost pH testne suspenzije uravnana na 6,5–8,0 ob uporabi NaOH (40 g/L). Začetna koncentracija DOC v testu je bila nižja od predvidenega koncentracijskega območja DOC (50–400 mg/L). Pri načrtovanju testa in testiranih koncentracij protimikrobnih učinkovin smo poiskali kompromisno rešitev, saj smo za izvedbo potrebovali dovolj visoko koncentracijo DOC, obenem pa smo morali upoštevati toksično delovanje OTC in TMP na mikrobnno združbo aktivnega blata. V testnih serijah s protimikrobno učinkovino TMP smo pripravili njeno koncentracijo v suspenziji 20 mg/L, kar je znašalo približno 21 mg/L DOC ter 0,75 % suhe snovi. Učinkovina OTC je kazala strupenostne učinke na aktivno blato v koncentracijskem območju 20 mg/L. Za test biorazgradljivosti učinkovine OTC smo pripravili njeno raztopino, 4,5 mg/L. DOC suspenzije na začetku testa je znašal 15 mg/L.

#### Izračun rezultatov

Za izračun deleža biorazgradljivosti po 28-ih dneh ( $D_t$ ) smo uporabili rezultate meritev DOC, in sicer srednjo vrednost paralelnih serij s posamezno protimikrobno učinkovino, in

prazne serije, kjer smo medij nacepili z inokulatom brez učinkovine. Podobno smo izračunali biorazgradljivost za vsak dan vzorčenja in iz vrednosti dobili krivuljo poteka razgradnje v primerjavi z referenčno snovjo. Izračun biorazgradljivosti prikazuje enačba 2:

$$D_t = \left[ 1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_0 - C_{bl0}} \right] * 100 \quad \dots(2)$$

pri čemer je:

$D_t$  = % degradacije na dan  $t$  v trajanju testa;

$C_0$  = povprečna srednja začetna koncentracija DOC v inokuliranem testnem mediju s testno učinkovino, podana v mg/L;

$C_t$  = povprečna srednja koncentracija DOC v inokuliranem mediju s testno učinkovino na dan  $t$ , podana v mg/L;

$C_{bl0}$  = povprečna srednja začetna koncentracija DOC v inokuliranem testnem mediju brez testne učinkovine (prazna), podana v mg/L;

$C_{blt}$  = povprečna srednja koncentracija DOC v inokuliranem mediju brez testne učinkovine (prazne) na dan  $t$ , podana v mg/L.

### 3.2.4 Testi strupenostnega učinka

#### Test strupenosti na algah in cianobakterijah

V 72-urnem testu strupenosti smo koncentracijski vrsti učinkovin OTC in TMP izpostavili alge *Pseudokirchneriella subcapitata* in cianobakterijske vrste *Anabaena flos-aquae*.

Test smo izvedli v skladu s tehničnimi navodili OECD TG 201 "Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test" (OECD, 2011). Tudi modelni planktonski testni vrsti zelenih alg in cianobakterij smo izbrali v skladu z omenjenim tehničnim navodilom.

#### Priprava testnih raztopin

Zelene alge in cianobakterije smo testirali v rastnem mediju OECD TG 201 oziroma v rastnem mediju BG 11 (Stanier in sod., 1971). Sestava rastnih medijev za cianobakterije in alge je razvidna iz priloge A1 oziroma priloge B1.

Kot referenčno snov smo uporabili 3,5-diklorofenol, s katerim smo validirali testni postopek.

#### Testirani sevi

Zeleno algo vrste *P. subcapitata*, sev CCAP 278/4, cianobakterijo vrste *A. flos-aquae*, sev CCAP 1403/13A smo pridobili od dobavitelja SAMS Research Service Ltd. Scottish

Marine Institute, Dunbeg, Argyll, PA 37 1QA, Združeno kraljestvo. Oba seva smo kultivirali vsaj deset dni v pripravljenih testnih medijih.

#### Testni postopek

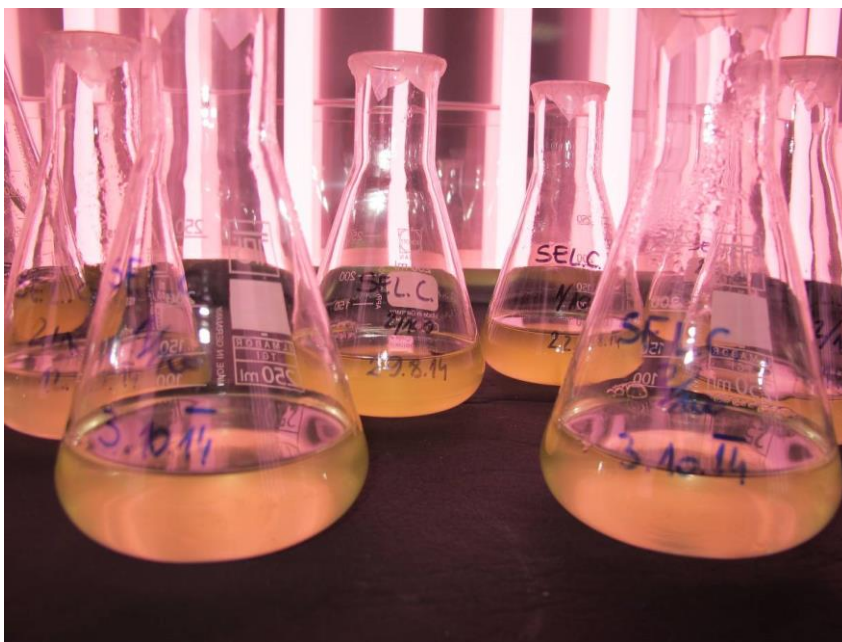
Alge in cianobakterije v eksponentni fazi rasti smo za 72 ur izpostavili protimikrobni učinkovini. Rezultat testa je inhibicija rasti, izražena kot  $ErC_{50}$  in  $ErC_{10}$ . Za posamezno učinkovino smo pripravili pet koncentracij v geometrijski vrsti. V testu z *A. flos-aquae* je bila geometrijska vrsta za OTC in TMP 2 oziroma 1,3, v testu z algo *P. subcapitata* pa 3 oziroma 2.

Testne razmere za cianobakterije in zelene alge smo prilagodili ekološkim strategijam obeh taksonomskih skupin. Kljub prilagoditvam pa nismo pomembno odstopali od tehničnih navodil OECD. Slednja manjša odstopanja dovoljujejo in predvidevajo, potrebno pa jih je dokumentirati. Teste strupenosti na cianobakterijah smo prilagodili z namenom, da dosežemo kriterije validnosti že po treh dneh in tako pridobimo rezultate, ki bodo primerljivi z rezultati tridnevnega testiranja zelenih alg.

Strupenost testnih učinkovin za alge in cianobakterije smo testirali v 250-ml Erlenmeyerjevih stekleničkah v treh ponovitvah za vsako testno koncentracijo. Stekleničke, dopolnjene do 100 ml, smo inkubirali 72 ur pri temperaturi  $20 \pm 1$  °C v rastni komori Kambič pri 7000 lux. Erlenmeyerjeve stekleničke s cianobakterijami smo inkubirali pri višji temperaturi in v nižjem svetlobnem toku. Inkubacijsko komoro smo segreli do najvišje temperature, ki jo še predvidevajo tehnična navodila, to je  $24 \pm 2$  °C, in jih osvetljevali s svetlobnim tokom 3500–4000 lux. Alge smo neprekinjeno mešali na stresalni mizi pri približno 120 obratih na minuto, medtem ko smo cianobakterije pretresli na stresalniku šele pred vzorčenjem in meritvami. Alge in cianobakterije smo občasno nadzirali z opazovanjem pod mikroskopom pri 500-kratni povečavi. Alge in cianobakterije so imele značilno obliko in niso vsebovale drugih vključkov.

Koncentracijo celic smo ugotavljali v vsaki steklenički po 24-ih, 48-ih in 72-ih urah inkubacije. Koncentracije celic smo ugotavljali s fluorometričnimi meritvami (440/680 nm), Perkin Elmer Victor 3, 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Singapur, Republika Singapur). Fluorometrija kot surogatna meritev je bila validirana z meritvami suhe snovi cianobakterij in s štetjem celic alg. Vrednosti pH testnega medija smo spremljali na začetku in ob koncu testa. Inkubacijo alg v rastni komori prikazuje slika 9.





Slika 9: Inkubacija alge *P. subcapitata* v rastni komori pri svetlobnem toku 7000 lux

Fig. 9: Incubation of alga *P. subcapitata* at light intensity 7000 lux

#### Analiza podatkov

Povprečno specifično stopnjo rasti in odstotek inhibicije stopnje rasti za vsako ponovitev smo izračunali z uporabo programske opreme TOXCALC – Toxicity Data Analysis Software, verzija 5.0.32. Validacijski kriterij za specifično stopnjo rasti biomase v kontroli je  $0,92 \text{ d}^{-1}$  (kar ustreza 16-kratnemu povečanju biomase v 72 urah). Najvišji srednji koeficient variacije (CV) dnevne specifične stopnje rasti v ponovitvah kontrole je 35 % in CV povprečne specifične stopnje rasti v kontrolah med posameznimi dnevi v testu 7 % za algo *P. subcapitata* ter 10 % za cianobakterijo *A. flos-aquae*. Procent zmanjšanja povprečne stopnje rasti v vsaki testirani koncentraciji protimikrobne učinkovine v primerjavi s kontrolo smo v grafu postavili na logaritemsko skalo koncentracij. Vrednosti  $E_{rC}$  so izračunane iz presečišč obeh vrednosti.

#### Test strupenosti na vodnih bolhah

Namen testa je bil ugotoviti učinek OTC in TMP na planktonske rakce *Daphnia magna*. Test smo izvedli v skladu s tehničnimi navodili OECD TG 202 “*Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test” (OECD, 2004).

#### Priprava testnega medija

Testni medij za vodne bolhe smo pripravili v skladu s tehničnimi navodili OECD TG 202 (OECD, 2004). Sestava testnega medija je opisana v prilogi D1.

### Vodne bolhe

Sev *D. magna* smo nabavili pri MicroBioTests Inc., v Belgiji, v obliki zimskih trajnih jajčec, iz katerih smo izvalili prvo generacijo potomk. Več partenogenetskih generacij smo gojili v postani vodi iz pipe in jih hranili s posušenimi algami, ki so sicer na razpolago kot ribja hrana. Na začetku testa so bili testni osebki stari med 8 in 24 ur. Zaradi zmanjšanja variabilnosti smo uporabili drugo ali poznejšo generacijo potomk.

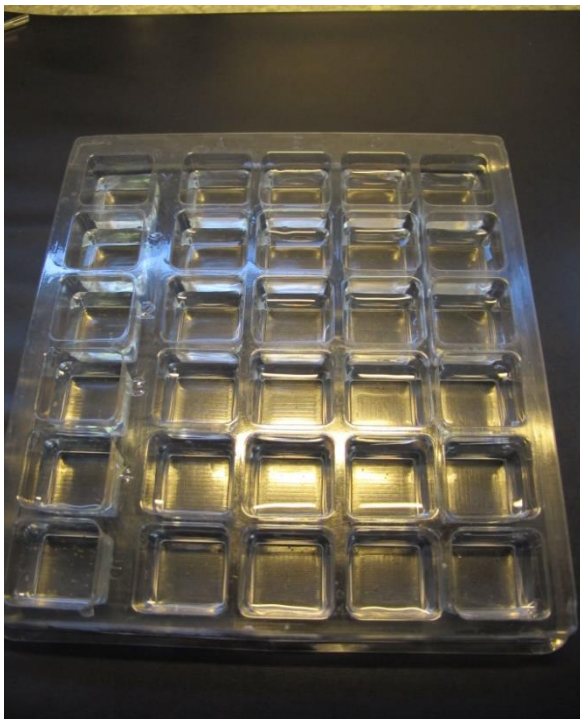
### Izvedba testa

Juvenilne vodne bolhe, ki so bile na začetku testa stare med 8 in 24 ur, smo v 48-urnem testu izpostavili seriji koncentracij testnih učinkovin. Postavili smo serijo petih koncentracij z geometrijskim zaporedjem 2 ter kontrolo. V testne plošče s po štirimi kamricami za vsako od koncentracij in štirimi kamricami za kontrolo smo dolili testne raztopine in sintetični testni medij kot kontrolo. V vsako kamrico smo dodali po pet juvenilnih vodnih bolh. Po 24-ih in 48-ih urah smo preverjali mobilnost izpostavljenih testnih osebkov v primerjavi s tistimi v kontroli. Kalijev bikromat smo uporabili kot referenčno testno snov.

### Analiza podatkov

Rezultate smo ovrednotili in preračunali v rezultate akutne strupenosti za vodne bolhe, podane kot  $EC_{50}$  in  $EC_{10}$  po 48-ih urah. Za izračun naklona krivulje smo uporabili program EPA Probit Analysis Program, verzija 1.5, s 95-odstotno vrednostjo zaupanja ( $p = 0,95$ ). Testne kamrice z vodnimi bolhami prikazuje slika 10.





Slika 10: Testne kamrice za testiranje kratkodobne strupenosti na *D. magna*

Fig. 10: Testing chambers for short term toxicity test on *D. magna*

### **Test zaviranja dihanja mikroorganizmov aktivnega blata**

“Respiration Inhibition Test” (OECD, 2010). Namen testa je bila ocena vpliva protimikrobnih učinkovin na mikrobnno združbo aktivnega blata z meritvami stopnje respiracije (porabe kisika) pri definiranih pogojih in v prisotnosti koncentracijske vrste testnih protimikrobnih učinkovin.

#### **Priprava testnih raztopin**

Izotonično osnovno testno raztopino in sintetično odpadno vodo smo pripravili v skladu s tehničnimi navodili OECD TG 209. Glej prilogo E1.

#### **Inokulat**

Inokulat smo odvzeli iz iztoka areacijskega bazena dobro delujoče komunalne čistilne naprave v Račah pri Mariboru, v katero se stekajo predvsem odpadne vode iz gospodinjstev. Izhodiščna koncentracija suhe snovi v aktivnem blatu je bila 4,2 mg/L. Stopnja porabe kisika v času odvzema vzorca aktivnega blata je znašala 23,4 mgO<sub>2</sub>/g. h. (podano na suho snov).

#### Izvedba testa

V respiracijskih merilnih posodah smo spremljali upadanje koncentracije kisika v mešanici aktivnega blata, sintetične odpadne vode ter protimikrobne učinkovine. Pripravili smo pet koncentracij testne učinkovine v geometrijski vrsti 2 ter jim 3 ure izpostavili mikroorganizme aktivnega blata. Dve kontrolni seriji smo pripravili brez protimikrobne učinkovine. Izračun učinka na zaviranje respiracije smo podali kot koncentracijo 3 h  $EC_{50}$ , to je koncentracija protimikrobne učinkovine, pri kateri stopnja respiracije znaša 50 % od povprečne vrednosti, izmerjene v dveh kontrolnih serijah. Test smo izvedli pri  $20 \pm 2$  °C v 300-ml stekleničkah, prirejenih za merjenje vsebnosti kisika. Spremljali smo mešanico pH, ki smo jo pred začetkom testa pol ure prezračevali z magnetnim mešalom. Kot referenčno snov smo uporabili 3,5-diklorofenol.

#### Analiza podatkov

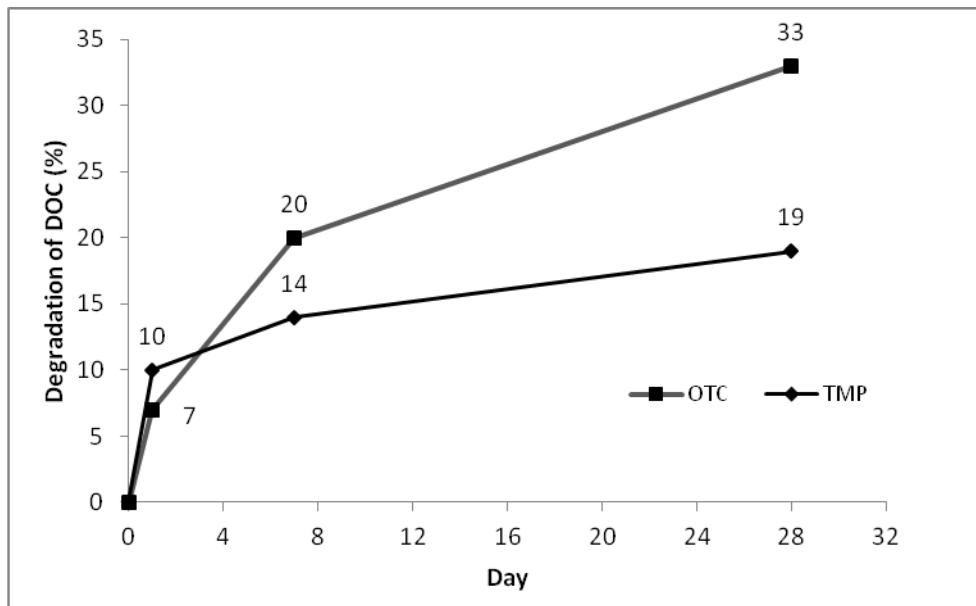
Za izračun naklona krivulje smo uporabili program EPA Probit Analysis Program, verzija 1.5, s 95-odstotno vrednostjo zaupanja ( $p = 0,95$ ).

## 4. REZULTATI

### 4.1 REZULTATI EKOTOKSIKOLOŠKIH TESTOV IN TESTOV BIORAZGRADLJIVOSTI

#### 4.1.1 Test biorazgradljivosti

Rezultat testa je pokazal, da protimikrobni učinkovini OTC in TMP nista biorazgradljivi po kriterijih tehničnega navodila OECD 302 B (OECD, 1992). Delež biološke razgradnje DOC je po 28-ih dneh testa znašal manj kot 70 % glede na koncentracijo DOC ob začetku testiranja. Koncentracija DOC za OTC in TMP se je v 28-ih dneh testa znižala za 33 % oziroma 19 %. Med testom smo spremljali tudi koncentracije protimikrobnih učinkovin. Koncentracija izvorne učinkovine OTC se je med testom znižala in je ob zaključku znašala le še 6 % začetne vrednosti. Molekula TMP se je pokazala za bolj obstojno v razmerah testa. Ob koncu testa smo lahko ekstrahirali še 61 % TMP v primerjavi s koncentracijo te učinkovine ob začetku testa. Po 14-ih dneh testiranja je potekla razgradnja 90 % referenčne snovi NaAc. Potek biorazgradljivosti DOC v testnem mediju s posamezno testno snovjo je prikazan na sliki 11.



Slika 11: Razgradnja DOC v testih biorazgradljivosti z OTC in TMP

Fig. 11: Degradation of DOC in biodegradability tests with OTC and TMP

#### 4.1.2 Strupenostni učinek OTC in TMP na cianobakterije *A. flos-aquae* in alge *P. subcapitata*

Po 72-urni izpostavljenosti cianobakterije *A. flos-aquae* protimikrobni učinkovini OTC se je izkazala inhibicija rasti testne kulture pri koncentraciji  $ErC_{50}$  2,7 mg/L. Izračunana vrednost  $ErC_{10}$  znaša 1,57 mg/L, kar je manj od najnižje testirane koncentracije te učinkovine. Koncentracije učinka TMP so v primerjavi z OTC za približno 100 krat višje. Koncentracija, pri kateri TMP inhibira rast testirane cianobakterije  $ErC_{50}$ , je 253 mg/L. Izračunana vrednost  $ErC_{10}$  za TMP je 26 mg/L, kar je nižje od najnižje testirane koncentracije. Izračun rezultatov za OTC in TMP je v prilogi A4.

Alga *P. subcapitata* je bolj občutljiva na delovanje OTC kot cianobakterija *A. flos-aquae*, vendar je razlika med občutljivostjo za OTC med obema testiranima vrstama razmeroma majhna. Po 72-urni izpostavljenosti OTC sta rezultata  $ErC_{50}$  in  $ErC_{10}$  1,04 mg/L oziroma 0,47 mg/L. Podobno je tudi za toksični učinek TMP bolj občutljiva testirana alga kot pa cianobakterija. Po 72-urni izpostavljenosti TMP sta rezultata inhibicije rasti  $ErC_{50}$  in  $ErC_{10}$  169 mg/L oziroma 65 mg/L. Izračun rezultatov za OTC in TMP je razviden iz priloge B4.

Začetno število celic alge *P. subcapitata* je  $5,6 \times 10^3$  celic/ml (ujemanje z meritvijo surogata  $r^2$  0,98). Začetna biomasa cianobakterije *A. flos-aquae* je 0,008 g/L (ujemanje z meritvijo surogata  $r^2$  0,99). Validacija surogatnih metod za *A. flos-aquae* in *P. subcapitata* je podana v prilogah A2 oziroma B2.

Raztopina OTC v vodnem mediju ni stabilna pod osvetlitvijo z umetno svetlobo. Ob koncu testa s cianobakterijo *A. flos-aquae* smo lahko v elermajericah detektirali le še 40 % začetne koncentracije protimikrobne učinkovine. V skladu s tehničnimi navodili OECD TG 201 smo za izračun koncentracije učinka uporabili geometrijsko srednjo vrednost koncentracij, izmerjenih na dan 0, 2 in 3. Pod intenzivno osvetlitvijo z umetno svetlobo med inkubacijo alg sta se ohranila le 2 % od začetne koncentracije OTC. V skladu s tehničnimi navodili smo vrednosti  $ErC_x$  za *P. subcapitata* izračunali na osnovi začetne izmerjene koncentracije po načelu „pristopa skupnega ostanka“ (Total Residue Approach), saj zmanjšanju koncentracije učinkovine ni sledilo zmanjšanje inhibicije rasti. Čeprav je torej učinkovina v času testa razpadla, pa to ni zmanjšalo njenega strupenostnega učinka.

Izračun koncentracije strupenostnega učinka TMP na cianobakterije in zelene alge je temeljil na začetni merjeni koncentraciji, saj se meritve na začetku in ob koncu testa niso razlikovale za več kot 20 %.

Validacija kontrole za teste strupenosti na *A. flos-aquae* in *P. subcapitata*:

Specifična stopnja rasti biomase cianobakterije *A. flos-aquae* v kontroli je bila  $0,92 \text{ d}^{-1}$  (kar ustreza 16-kratnemu povečanju biomase v 72-ih urah), srednji koeficient variacije (CV) dnevne specifične stopnje rasti v ponovitvah kontrole je bil 35,9 %, CV povprečne specifične stopnje rasti v kontrolah med testom pa je znašal 11,7 %. Vrednost pH medijev z OTC in TMP je med testom nihala med 7,1 in 7,6 oziroma med 7,1 in 7,4. Glej prilogo A3 ter prilogo A5.

Specifična stopnja rasti biomase alge *P. subcapitata* v kontroli je bila  $1,25 \text{ d}^{-1}$ , srednji CV v ponovitvah kontrole 21 %, CV povprečne stopnje rasti v kontrolah med celotnim testom pa 4,48 %. Vrednost pH medijev z OTC in TMP med testom smo izmerili med 7,4 in 7,5 oziroma med 7,6 in 8,3. Glej prilogo B3, ter prilogo B5.

#### 4.1.3 Strupenost OTC in TMP za *D. magna*

Izračun rezultatov testiranja strupenosti za obe protimikrobni učinkovini je temeljil na začetnih merjenih koncentracijah. Izračunana vrednost  $EC_{50}$  za OTC po 48-urni izpostavljenosti presega koncentracijo topnosti za to snov ( $313 \text{ mg/L}$  pri  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), medtem ko je vrednost  $EC_{10}$   $197 \text{ mg/L}$ . Med testom je vrednost pH najvišje testne koncentracije nihala med 6,4 in 7,1. Koncentracija kisika se je znižala z 6,4 na  $5,6 \text{ mg/L}$ .

Koncentracija  $EC_{50}$  za TMP po 48-urni izpostavljenosti vodnih bolh je  $100 \text{ mg/L}$ , vrednost  $EC_{10}$  pa  $66 \text{ mg/L}$ . pH testne raztopine z najvišjo koncentracijo protimikrobne učinkovine je znašala 8,1 na začetku in 7,6 po koncu inkubacije. Koncentracija kisika je bila ves čas testa približno  $6 \text{ mg/L}$ . Parametri za izvedena testa z OTC in TMP so v prilogi D2, izračun pa je v prilogi D3.

Koncentracija  $EC_{50}$  referenčne snovi  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$   $1,1 \text{ mg/L}$  je bila v okviru meje zaupanja ( $p = 0,95$ )  $0,1\text{--}1,4 \text{ mg/L}$ .

#### 4.1.4 Inhibicija respiracije aktivnega blata

Po 3-urni izpostavljenosti mikrobne združbe aktivnega blata testu smo izračunali efektivni koncentraciji  $EC_{50}$  in  $EC_{10}$  za OTC, ki sta znašali  $17,9 \text{ mg/L}$  oziroma  $0,2 \text{ mg/L}$ . Za TMP je izračunana vrednost  $EC_{50}$  presegla koncentracijo topnosti v vodi ( $400 \text{ mg/L}$  pri  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), medtem ko je bila efektivna koncentracija  $EC_{10}$   $9,8 \text{ mg/L}$ . Izračun efektivnih koncentracij je v tem testu temeljil na izmerjenih začetnih koncentracijah. Vrednosti pH med testom so bile stabilne pri vrednosti  $7,2 (\pm 0,2)$ . Koncentracija suspendiranih snovi pred začetkom testiranja je v suspenzijah z OTC in TMP znašala  $4,8 \text{ mg/L}$  oziroma  $4,5 \text{ mg/L}$ . Vrednost  $EC_{50}$  (3 h) za referenčno snov 3,5-diklorofenol je bila  $11,4 \text{ mg/L}$ . Potek inhibicije

respiracije ter rezultat inhibicije s OTC in TMP sta prikazana v prilogi E2, statistična analiza slednjega pa v prilogi E3.

#### 4.1.5 Povzetek rezultatov testov toksičnosti

V preglednici 4 so izmerjene začetne koncentracije, ki so bile uporabljene za izračun rezultatov v posameznem testu.

Preglednica 4: Izmerjene začetne koncentracije učinkovin v testih strupenosti

Table 4: Measured initial concentrations in toxicity tests

Vrsta testnega organizma	OTC (mg/L)	TMP (mg/L)
<i>A. flos-aquae</i>	25,3	300
<i>P. subcapitata</i>	10,1	353
<i>D. magna</i>	234	320
Aktivno blato	12,7	270

Povzetek rezultatov testov ekotoksičnosti in biorazgradljivosti za protimikrobni učinkovini OTC in TMP za cianobakterije, zelene alge, vodne bolhe ter mikrobnou združbo aktivnega blata je v preglednici 5.

Preglednica 5: Pregled rezultatov testov strupenosti za OTC in TMP

Table 5: Results on toxicity of OTC and TMP

Testna vsta	Rezultat	OTC		TMP	
		Vrednost (mg/L)	95 % CI (mg/L)	Vrednost (mg/L)	95 % CI (mg/L)
<i>A. flos-aquae</i>	72 h ErC <sub>50</sub>	2,7	0,01–10,4	253	187–319
<i>A. flos-aquae</i>	72 h ErC <sub>10</sub>	1,5	0–3,5	26	7–44
<i>P. subcapitata</i>	72 h ErC <sub>50</sub>	1,04	0,98–1,1	129	123–136
<i>P. subcapitata</i>	72 h ErC <sub>10</sub>	0,47	0,35–0,56	65	0,01–103
<i>D. magna</i>	48 h EC <sub>50</sub>	669 <sup>a</sup>	n. a.	100	89–112
<i>D. magna</i>	48 h EC <sub>10</sub>	197	126–492 <sup>a</sup>	66	53–76
Aktivno blato	3 h EC <sub>50</sub>	17,9	9,9–64,9	671 <sup>a</sup>	n. a.
Aktivno blato	3 h EC <sub>10</sub>	0,2	0,03–0,51	9,8	1,9–19,9

<sup>a</sup> Vrednost je preseгла koncentracijo topnosti.

Rezultati so bili izračunani na osnovi merjenih koncentracij CI = interval zaupanja; n. a. = ni sprejemljivo.

#### 4.2 REZULTATI DOLOČITVE OKOLJSKIH STANDARDOV KAKOVOSTI ZA OTC IN TMP

OSK smo izvedli v skladu s tehničnimi navodili za določanje okoljskih standardov kakovosti (European Commission, 2011): vrednosti PNEC smo določili po metodi, kot jo opredeljuje zakonodaja REACH, in po metodi, ki jo predlagajo navodila VICH (VICH Expert Working Group, 2005) za oceno okoljskega tveganja ob rabi veterinarskih zdravil.

Povzeti zaključki za pripravo OSK za OTC so v preglednicah 6 in 7. Povzeti zaključki za pripravo OSK za TMP pa so v preglednicah 8 in 9.

Preglednica 6: Povzetek predloga OSK za površinske celinske vode za OTC

Table 6: Summary of the proposal for the OTC EQS for the inland surface waters

Ime snovi		Oksitetraciklin	
Število CAS		79-57-2 313	
Predlagani okoljski standard kakovosti		Površinske celinske vode	
		LP-OSK	NDK-OSK
Voda (mg/L)	VF	0,003	0,021
	SSD	0,0018	0,007
Sediment		/	/
Opombe		LP-OSK: izračun SSD na osnovi normalne porazdelitve: JA NDK-OSK: izračun SSD na osnovi normalne porazdelitve: JA	

OTC je nehlapna, v vodi slabo topna učinkovina (313 mg/L) s porazdelitvenim koeficientom Log Kow  $-0,90$ , ki ni biorazgradljiva ali bioakumulativna. Za izračune NDK-OSK smo upoštevali 30 podatkov o rezultatih iz kratkodobnih ekotoksikoloških testov iz osmih taksonomskih skupin in združbe aktivnega blata. Podatki se nanašajo na vrste iz treh (predpisanih) trofičnih nivojev. Nabolj občutljive taksonomske skupine na kratkotrajne učinke OTC so cianobakterije, kritosemenke in zelene alge, med manj občutljivimi pa vodne bolhe, ribe in bakterije (*Vibrio fisheri*). Podatki za statistično obdelavo so bili normalno porazdeljeni.

V naboru rezultatov dolgodobnih ekotoksikoloških testov za določitev LP-OSK smo upoštevali 25 podatkov iz šestih taksonomskih skupin ter združbe aktivnega blata in iz treh predpisanih trofičnih nivojev. Za dolgodobne učinke OTC so se izkale najbolj občutljive

cianobakterije, kritosemenke (*Lemna gibba*) in zelene alge, najmanj pa ožigalkarji in nekatere kritosemenke (*Egeria densa*). Podatki za statistično obdelavo so bili normalno porazdeljeni. Po metodi VICH je PNEC za kratkodobne učinke nižji kot PNEC za dolgodobne učinke. Rezultat kratkodobnega testa na zelenih algah ni sprejemljiv, saj je bil test izveden pri 25 °C.

Preglednica 7: Vrednosti PNEC, izračunane za OTC po navodilih VICH GL38

Table 7: PNEC values derived for OTC according to VICH GL38  
(VICH Expert Working Group, 2005)

Test	Rezultat	Vrednost (mg/L)	VF	PNEC (mg/L)	Metoda	Referenca
Zaviranje rasti alg	EC <sub>50</sub>	0,17	100	0,0017	OECD 201	(Isidori, 2005)*
Zaviranje rasti cianobakterij	EC <sub>50</sub>	0,21	100	<b>0,0021</b>	OECD 201	(Holten Luthøft in sod., 1999)
Imobilizacija vodnih bolh	EC <sub>50</sub>	92	1000	0,09	OECD 202	(Park in Choi, 2008)
Akutna strupenost za ribe	EC <sub>50</sub>	78,9	1000	0,079	OECD 203	(Park in Choi, 2008)
Zaviranje rasti alg	NOEC	0,18	10	<b>0,018</b>	OECD 201	(Eguchi in sod., 2004)
Zaviranje rasti cianobakterij	EC <sub>10</sub>	1,5	10	0,15	OECD 201	(Kolar in sod., 2014)
Učinek na reprodukcijo vodnih bolh	EC <sub>10</sub>	7,40	10	0,74	OECD 221	(Wollenberger in sod., 2000)
Učinek na zgodnje življenjske stadije rib	NOEC	/	10	/	OECD 210	/

\*podatek ni sprejemljiv



## Preglednica 8: Povzetek predloga OSK za površinske celinske vode za TMP

Table 8: Summary of the proposal for the TMP EQS for inland surface waters

Ime snovi		Trimetoprim	
Število CAS		738-70-5	
Predlagani okoljski standard kakovosti		Površinske celinske vode	
		LP-OSK	NDK-OSK
Voda (mg/L)	VF	0,016	1,1
	SSD	0,114	/
Opombe		LP-OSK: izračun SSD na osnovi normalne porazdelitve: JA	
		NDK-OSK: izračun SSD na osnovi normalne porazdelitve: NE	

TMP je nehlapna, v vodi slabo topna učinkovina (400 mg/L) s porazdelitvenim koeficientom Log Kow 0,91, ki ni biorazgradljiva ali bioakumulativna. Za izračune NDK-OSK smo upoštevali 21 podatkov o rezultatih iz kratkodobnih ekotoksikoloških testov iz devetih taksonomskih skupin in združbe aktivnega blata. Taksonomske skupine testiranih organizmov so bile tudi iz treh predpisanih trofičnih nivojev. Najbolj občutljivi so bili cianobakterije in mikroorganizmi aktivnega blata, vodne bolhe in zelene alge. Najmanj občutljive so bile cianobakterije (*A. flos-aquae*), ki smo jih testirali v naši študiji, pa tudi nekatere kritosemenke in kotačniki. Podatki za statistično obdelavo imajo normalno porazdelitev.

Podatki o dolgodobni strupenosti za izračun LP-OSK za TMP so se nanašali na 14 rezultatov ekotoksikoloških testov, ki so bili izvedeni na vrstah iz petih taksonomskih skupin in združbi aktivnega blata. Najbolj občutljive so bile ribe, cianobakterije, vodne bolhe in mikroorganizmi aktivnega blata, najmanj občutljive pa cianobakterije iz naše študije ter sladkovodni ožigalkarji. Podatki za statistično obdelavo nimajo normalne porazdelitve.

## Preglednica 9: Vrednosti PNEC, izračunane za TMP po navodilih VICH GL38

Table 9: PNEC values for TMP derived according to the VICH GL38 (VICH Expert Working Group, 2005)

Test	Rezultat	Vrednost (mg/L)	VF	PNEC (mg/L)	Metoda	Referenca
Zaviranje rasti alg	EC <sub>50</sub>	40	100	0,4	OECD 201	(Yang in sod., 2008)
Zaviranje rasti cianobakterij	EC <sub>50</sub>	112	100	1,12	OECD 201	(Holten Lutzhöft in sod., 1999)
Imobilizacija vodnih bolh	EC <sub>50</sub>	100	1000	<b>0,1</b>	OECD 202	(Kolar in sod., 2014)
Akutna strupenost za ribe	EC <sub>50</sub>	100	1000	<b>0,1</b>	OECD 203	(Kim in sod., 2007)
Zaviranje rasti alg	NOEC	16	10	1,6	OECD 201	(Yang in sod., 2008)
Zaviranje rasti cianobakterij	EC <sub>10</sub>	26	10	2,6	OECD 201	(Kolar in sod., 2014)
Učinek na reprodukcijo vodnih bolh	NOEC	6	10	0,6	OECD 221	(Park in Choi, 2008)
Učinek na zgodnje življenjske stadije rib	NOEC	0,157	10	<b>0,016</b>	OECD 210	(Madureira in sod., 2012)

V preglednici 10 so zbrani zaključki izračunov, iz katerih smo izbrali predloge za OSK za OTC in TMP. Predloge OSK smo pripravili v obliki standardnih Poročil o pripravi predloga za kokoljske standarde kakovosti. Poročili o predlogih OSK za OTC in TMP prilagamo v prilogah F1 oziroma F2.

## Preglednica 10: Nabor vseh vrednosti za izbor OSK za celinske površinske vode za OTC in TMP

Table 10: Calculated values for the proposal on EQS for OTC and TMP for inland surface waters

Okoljski standard kakovosti	Deterministična metoda z VF		Določitev PNEC po VICH g 138		Verjetnostna metoda SSD	
	OTC	TMP	OTC	TMP	OTC	TMP
Učinkovina						
LP-OSK (mg/L)	0,003	0,016	0,018	0,016	0,0018	0,114
NDK-OSK (mg/L)	0,022	1,1	0,0021	0,1	0,007	–

## 5. RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Testi biorazgradljivosti in ekotoksikološki testi

V eksperimentalnem delu naloge smo preiskovali strupenostne učinke in biorazgradljivost protimikrobnih učinkovin oksitetraciklina (OTC) in trimetoprima (TMP) na vodno okolje. Teste smo izvajali v skladu s tehničnimi navodili OECD za testiranje biorazgradljivosti kemijskih snovi ter testiranje strupenosti na cianobakteriji *A. flos-aquae*, zeleni algi *P. subcapitata*, planktonskem rakcu *Daphnia magna* in mikrobnii združbi aktivnega blata. Izvedeni so bili po standardiziranih metodah v skladu z validacijskimi kriteriji iz tehničnih navodil OECD ter po kriterijih kakovosti, ki jih postavljajo navodila Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products Phase II za oceno tveganja za veterinarska zdravila (VICH Expert Working Group, 2005).

#### Biorazgradljivost OTC in TMP

Robustna testna metoda v skladu s tehničnim navodilom OECD 302 B (OECD, 1992) "Zahn-Wellens/EMPA Test" kaže na obnašanje testiranih protimikrobnih učinkovin v razmerah aerobnega čiščenja v areatorju biološke čistilne naprave. Snovi, ki se v pogojih testa razgradijo več kot 70-odstotno, se bodo z veliko verjetnostjo tudi dokončno razgradile. S spremljanjem vrednosti DOC kot indikatorja organskega ogljika smo ugotavljali delež organske snovi, ki se je pretvarjal v CO<sub>2</sub>. Ker meritev DOC ni specifična, smo koncentracije OTC in TMP med testiranjem analizirali na vezanem sistemu LC-MS-MS. Rezultati analiz OTC so pokazali, da molekula ni stabilna v razmerah čistilne naprave, saj je bila njena koncentracija ob koncu testa le še 6-odstotna od začetne vrednosti, medtem ko se je razgradilo 33 % DOC v mediju. Iz rezultatov testa lahko sklepamo na hitro razgradnjo OTC do vmesnih razgradnih produktov, ki ostajajo stabilni v razmerah testa. Uporabljena testna metoda ni dovolj specifična, da bi iz dobljenih rezultatov lahko neposredno sklepali na usodo OTC v biološki čistilni napravi. Test biorazgradljivosti OTC je potrebno izvajati z dopirano učinkovino C<sup>14</sup>, kar omogoča kvantificirano oceno masne bilance učinkovine in njenih metabolitov. Za študijo ni bilo mogoče pridobiti dopirane učinkovine. Zaradi podatkovne luknje smo eksperimentalne podatke primerjali z zaključki iz dostopne literature. V študiji razgradljivost OTC v govejem gnoju v aerobnih razmerah je bila razpolovna doba za OTC 3,5 dni (Wang in Yates, 2008). Med relevantnimi razgradnimi produkti so prevladovali 4-epi-OTC,  $\alpha$ -apo-OTC in  $\beta$ -apo-OTC. Do podobnih zaključkov so prišli Li in sodelavci (2010) med analizo odpadne vode v čistilni napravi iztoka iz proizvodnje OTC. Identificirani metaboliti so bili OTC 4-epi-OTC (EOTC),  $\alpha$ -apo-OTC in  $\beta$ -apo-OTC. Učinkovitost odstranjevanja učinkovine OTC je bila 38-odstotna, kar je blizu vrednosti odstranjenega DOC. Na osnovi primerjave rezultatov izvedenega

testa biorazgradljivosti lahko zaključimo, da OTC ni biorazgradljiv v skladu s kriteriji tehničnih navodil OECD 302 B (OECD, 1992).

Rezultati testa biorazgradljivosti TMP nedvoumno kažejo, da ta učinkovina ni biorazgradljiva. V 28-ih dneh testa se je razgradilo 19 % DOC iz testirane suspenzije ter 39% glede na inicialno koncentracijo TMP.

Rezultati so primerljivi s tistimi iz študije Gartiserja in sodelavcev (2007), ki so ugotovili le 16-odstotno razgradnjo DOC v testu s TMP po metodi Zahn-Wellens/EMPA. Na osnovi rezultatov testiranja biorazgradljivosti ter njihove primerjave z drugimi viri lahko zaključimo, da se TMP v vodnem okolju ne bo popolnoma razgradil.

### **Strupenost za alge in cianobakterije**

Tehnično navodilo OECD TG 201 "Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test" (OECD, 2011) dopušča različno trajanje izvedbe testa za alge in cianobakterije. Kriterij validnosti je namreč dosežena specifična stopnja rasti biomase, ki mora biti vsaj  $0,92 \text{ d}^{-1}$ . Rast cianobakterije je namreč počasnejša od rasti zelenih alg, zato testi na algah praviloma trajajo 3 dni, medtem ko na cianobakterijah 5–7 dni. Med našim testiranjem smo dosegli dovolj hitro rast cianobakterij, tako da smo test lahko zaključili v treh dneh, torej v istem času kot test na algah. Enako dolga izpostavljenost cianobakterij in zelenih alg nam je omogočila neposredno primerjavo učinka obeh testiranih organizmov.

V multigeneracijskem testu z algami in s cianobakterijami je 72 h  $\text{EC}_{50}$  kratkodobni rezultat, medtem ko je 72 h  $\text{EC}_{10}$  ali NOEC dolgodobni rezultat. Statistično izračunana vrednost  $\text{EC}_{10}$  se uporablja prednostno in nadomešča vrednost NOEC (European Chemicals Agency, 2008). V naši študiji smo kot rezultat podajali vrednosti  $\text{ErC}_{50}$  in  $\text{ErC}_{10}$  kot procent zmanjšanja stopnje rasti ob izpostavljenosti posamezni protimikrobni učinkovini. Tehnično navodilo predlaga kot modelni organizem eno izmed dveh vrst zelenih alg (*P. subcapitata* in *Desmodesmus subspicatus*) ter eno izmed dveh cianobakterijskih vrst (*A. flos-aquae* in *Synechococcus leopoliensis*), ki so glede na Aneks II navodil OECD 201 primerne za izvajanje testa (OECD, 2011). Za izvedbo smo uporabili testni vrsti *A. flos-aquae* in *P. subcapitata*. Pred začetkom testiranja smo primerjali obnašanje obeh cianobakterijskih vrst ter zlasti hitrost rasti biomase v testnih pogojih. *A. flos-aquae* se je izkazala za bolj stabilno in hitreje rastočo vrsto, ki jo je bilo tudi lažje kultivirati kot *S. leopoliensis*.

Rezultat strupenosti za *P. subcapitata* (OTC 72 h  $\text{ErC}_{50}$  1,04 mg/L in TMP 72 h  $\text{ErC}_{50}$  129 mg/L) se ujema s podatki iz literature. Avtorji, ki so teste izvajali v skladu s standardiziranimi metodami, so poročali o podobnih rezultatih. Holten Lutzthøft s sodelavci

(1999) so določili 72 h ErC<sub>50</sub> za OTC 4,5 mg/L in 72 h ErC<sub>50</sub> za TMP 130 mg/L, medtem ko so Eguchi in sodelavci (2004) poročali o nižjih koncentracijskih vrednostih, in sicer 72 h ErC<sub>50</sub> za OTC 0,34 mg/L in 72 h ErC<sub>50</sub> za TMP 80,3 mg/L.

O najnižji kratkodobni vrednosti 72 h EC<sub>50</sub> 0,17 mg/L za OTC so poročali Isidori in sodelavci (2005), vendar pa so bili testi izvedeni pri 25 °C in so zato primerljivi z zadržkom. Podobno nizke vrednosti (EC<sub>50</sub> 0,60 mg/L) so ugotavljali Grintenova in sodelavci (2010) v testiranju fotosintetske učinkovitosti po 24-urni izpostavljenosti.

V prosto dostopni strokovni literaturi je razmeroma malo podatkov o dolgodobnih učinkih, ki so podani kot NOEC oziroma EC<sub>10</sub>. Za zeleni algi *Chlorella vulgaris* in *P. subcapitata* je 72 h NOEC za OTC 0,183 mg/L ter 72 h NOEC za TMP 25,5 mg/L (Eguchi in sod., 2004). Primerjava vrednosti za *P. subcapitata* je pokazala, da so naši rezultati višji, vendar še vedno v istem velikostnem razredu (72 h ErC<sub>10</sub> za OTC 0,47 mg/L in 72 h ErC<sub>10</sub> za TMP 65 mg/L), kar smo objavili v znanstveni reviji (Kolar in sod., 2014).

Poročila številnih, tudi zgodnejših raziskav navajajo cianobakterije kot najbolj občutljivo skupino modelnih vodnih organizmov, s katerimi izvajamo teste strupenosti na protimikrobnih učinkovinah (Harrass in sod., 1985; Halling-Sørensen, 2000; Ando in sod., 2007). Vendar pa pregled prosto dostopne znanstvene literature pokaže, da so za OTC in TMP najpogosteje citirani rezultati testov z eno samo cianobakterijsko vrsto *Mycrocystis aeruginosa*. V dobro dokumentirani študiji ekotoksičnih lastnosti OTC, TMP ter še petih drugih protimikrobnih učinkovin, ki so bila v uporabi na ribjih farmah, so Holten Lutzhoft in sodelavci (1999) testiral cianobakterijo *M. aeruginosa* in algo *P. subcapitata*. Rezultat testa za *M. aeruginosa* ErC<sub>50</sub> za OTC je bil 0,207 mg/L in ErC<sub>50</sub> za TMP 112 mg/L, toksični učinek na *P. subcapitata* pa se je izkazal pri višjih koncentracijah (ErC<sub>50</sub> za OTC 4,5 mg/L in ErC<sub>50</sub> za TMP 130 mg/L). Vendar pa je rezultate testa težko primerjati, saj je test na cianobakterijah trajal sedem dni, test na zelenih algah pa je bil zaključen v treh dneh. *M. aeruginosa* tudi ni v naboru standardnih modelnih organizmov za izvajanje testa strupenosti v skladu z OECD 201 (OECD, 2011).

Ekotoksikološko testiranje protimikrobnih učinkovin na cianobakterijah smo prilagodili tako, da smo omogočili cianobakterijam optimalne pogoje za rast. V testu smo dosegli specifično stopnjo rasti 0,92 d<sup>-1</sup>, kot to zahtevajo tehnična navodila OECD 201 (OECD, 2011), ter test zaključili po treh dneh. Skrajšanje standardiziranega testa s 7 ali 6 dni na 3 dni ni pomembno le zaradi boljše neposredne primerjave strupenosti za cianobakterije in zelene alge, temveč tudi za boljši nadzor nad masno bilanco testirane učinkovine. Po treh dneh izpostavljenosti smo izračunali kratkodobno in dolgodobno strupenost za *A. flos-*

*aquae*, in sicer  $ErC_{50}$  za OTC 2,7 mg/L ( $ErC_{10}$  za OTC 1,5 mg/L) ter  $ErC_{50}$  za TMP 253 mg/L ( $ErC_{10}$  za TMP 26 mg/L) kar je bilo že predhodno objavljeno (Kolar in sod., 2014).

Vpliv trajanja izpostavljenosti stresorju je v s testnimi rezultati podprti diskusiji obravnavala Grintenova in sod. (2010). V študiji je bila po enodnevni izpostavljenosti protimikrobnim učinkovinam s fluorescentnimi meritvami spremljana količina fotosintetskega sistema II. Fotosintetska učinkovitost je bila ovrednotena kot rezultat akutne strupenosti po 24-urni izpostavljenosti. V študiji, v kateri so bile vse testirane vrste enak čas izpostavljene delovanju protimikrobnih učinkovin, se je pokazala cianobakterijska vrsta *M. aeruginosa* kot manj občutljiva za OTC kot alga *P. subcapitata*, kar podpira našo hipotezo, da cianobakterije niso nujno bolj občutljiva skupina za OTC kot zelene planktonske alge. Študija je tudi pokazala pomen trajanja testa. S krajšanjem izpostavljenosti cianobakterij so se dvignile vrednosti rezultatov. Krajšanje časa ekotoksikološkega testiranja cianobakterij iz 7 na 5 dni je rezultiralo tudi v za velikostni razred višjih 5-dnevnih vrednostih  $EC_{50}$  (Robinson in sod., 2005). Primerjava kratkodobnih in dolgodobnih rezultatov testiranja strupenosti obeh testnih fotosintetskih taksonomskih skupin iz naše študije je pokazala, da je zelena alga *P. subcapitata* približno dvakrat bolj občutljiva na OTC in TMP kot cianobakterija *A. flos-aquae*. Naši zaključki se skladajo z ugotovitvami iz študije Anda in sod. (2007), ki so preizkušali strupenostne učinke skupine protimikrobnih zdravil na cianobakterije in zelene alge. Po 6-dnevni izpostavljenosti je bila koncentracija  $EC_{50}$  za OTC v istem velikostnem razredu za *M. aeruginosa*, *A. flos-aquae* in zeleno algo *P. subcapitata* (0,23 do 0,39 mg/L). OTC je bil manj toksičen za *Nostoc sp.* (6 d  $EC_{50}$  7,0 mg/L) in dve vrsti cianobakterije iz rodu *Synechococcus* (6 d  $EC_{50}$  med 1,1 in 2 mg/L). Ista študija je pokazala, da je kratkodobni učinek TMP največji na cianobakterijo *Nostoc*, ki ji po občutljivosti sledi *P. subcapitata* ( $EC_{50}$  7,0 mg/L oziroma 80,3 mg/L). Ando in sod. (2007) so kratkodobne učinke na cianobakterije in zelene alge opisali s planimetrijsko metodo analize površine pod krivuljo rasti ter z uporabo programa Eco-Tox R1.1 določil vrednosti  $EC_{50}$ .

Primerjava občutljivosti obeh taksonomskih skupin na osnovi rezultatov ekotoksikoloških testov je negotova predvsem zaradi različno uporabljene metodologije pri izvedbi testov ter različno dolge izpostavljenosti testnih organizmov protimikrobnim učinkovinam. Pogosto tudi v znanstveni, kolegialno presojeni literaturi ni dovolj podatkov o uporabljeni metodologiji ter izpoljenih kriterijih validnosti za izvedene ekotoksikološke teste. Zlasti v primerih, kjer tudi standardizirane metode, kot so tehnična navodila OECD, dopuščajo velika odstopanja v trajanju izpostavljenosti, ni mogoča neposredna primerjava med občutljivostjo različnih vrst testnih organizmov ali taksonomskih skupin.

### **Strupenost za vodne nevretenčarje**

V naši študiji nismo ugotovili kratkodobnih strupenostnih učinkov OTC na *D. magna*, saj je izračunana vrednost koncentracije 48 h EC<sub>50</sub> presegala koncentracijo topnosti te učinkovine v vodi. Temu sledijo tudi podatki iz razpoložljive znanstvene literature, ki navajajo strupenostne koncentracije OTC za vodne bolhe nad mejo topnosti v vodnem mediju (Wollenberger in sod., 2000). Po 48-urni izpostavljenosti sta Park in Choi (2008) ugotovila strupenostne učinke na *D. magna* in kladocerne rake *Monia macropopa* pri koncentraciji EC<sub>50</sub> 92 mg/L oziroma 124 mg/L. Bistveno bolj občutljivi so se pokazali planktonski rakci v preiskavi strupenostnih in genotoksičnih učinkov (Isidori in sod., 2005), v kateri je bila kratkodobna toksična koncentracija za *D. magna*, *Ceratodaphnia dubia* in *Thamnocephalus platyurus* med 18,65 mg/L in 25 mg/L. Med razmeroma redkimi objavljenimi podatki o dolgodobni strupenosti za vodne nevretenčarje je dobro dokumentiran 21-dnevni test reproduktivne strupenosti na vodnih bolhah *D. magna* z rezultatom EC<sub>10</sub> za OTC 7,10 mg/L (Wollenberger in sod., 2000).

TMP je zmerno akutno toksičen za vodne nevretenčarje. Rezultat testa EC<sub>50</sub> na *D. magna* je bil 100 mg/L (Kolar in sod., 2014). Rezultat je skladen z rezultati, ki jih navajajo drugi avtorji, kot so na primer EC<sub>50</sub> 123 mg/L (Halling-Sorensen in sod., 1998), 149 mg/L (Liguoro in sod., 2009), 167,4 mg/L (Park in Choi, 2008). Tudi rezultati kratkodobne strupenosti za *M. macropapo* EC<sub>50</sub> 144,8 so v enakem koncentracijskem območju (Park in Choi, 2008). V študiji strupenostnih lastnosti vrste protimikrobnih učinkovin je bil rezultat dolgodobne reproduktivne strupenosti NOEC za vodne bolhe *D. magna* za TMP 6 mg/L območju (Park in Choi, 2008).

### **Inhibicija repiracije aktivnega blata**

Aktivno blato čistilnih naprav je v navideznem ekosistemu ocene tveganja eden izmed segmentov okolja, za katerega določamo vrednosti PNEC. Najprimernejša modelna populacija za oceno tveganja je mikrobna združba aktivnega blata. Test inhibicije respiracije kot rezultat testa akutnega učinka testne snovi na mikrobno združbo aktivnega blata napove strupene koncentracijske meje učinkovin v odpadni vodi. Podatki o biorazgradljivosti in strupenosti učinkovin za mikroorganizme aktivnega blata so pomembni za napoved usode učinkovin, ki v okolje odtekajo z očiščeno komunalno odpadno vodo. Iz ekotoksičnega učinka učinkovine na mikrobno združbo in njene biorazgradljivosti lahko sklepamo še na vpliv na samočistilno sposobnost v celinskih površinskih vodah (Straub, 2013). Rezultate po standardiziranem času izpostavljenosti treh ur smo šteli kot kratkodobni učinek, EC<sub>10</sub> oziroma NOEC pa kot dolgodobni učinek, saj se mikrobna združba v času testa prilagaja testnim razmeram. Trimetoprim, ki ni bil razgradljiv po 28-ih dneh, ni kazal zaviralnega učinka na respiracijo aktivnega blata.

Izračunana koncentracija  $EC_{50}$  je presegala vrednost za topnost, medtem ko je bila koncentracija  $EC_{10}$  10 mg/L. Inokulat, ki smo ga uporabili, je bil v primerjavi bistveno manj občutljiv na TMP, kot tisti v primerjavi okoljskih ocen tveganja trimetoprima in še mecilinama in trimetoprima (Halling-Sørensen in sod., 2000), kjer je bil  $EC_{50}$  aktivnega blata za TMP 17,8 mg/L. V novejši oceni tveganja za TMP je bila ugotovljena koncentracija  $EC_{10}$  20 mg/L, koncentracija  $EC_{50}$  pa je presegla mejo topnosti (Straub, 2013). Isti avtor je opravil tudi obsežni pregled uspešnosti odstranjevanja TMP iz odpadne vode na večjih čistilnih napravah. Izkazalo se je, da je v številnih primerih uspešnost čiščenja nizka, vendar pa na nekaterih čistilnih sistemih tudi zelo visoka in presega 90 % začetne koncentracije. Veliko nihanje v učinkovitosti odstranjevanja TMP med drugim kaže, da se aktivno blato lahko učinkovito prilagodi povišanim koncentracijam TMP in ga uspešno metabolizira.

V nasprotju s TMP pa je OTC bolj strupen za mikrobo združbo aktivnega blata. V naši preiskavi smo izmerili vrednost inhibicije respiracije aktivnega blata  $EC_{50}$  za OTC pri koncentraciji 20 mg/L ter koncentraciji  $EC_{10}$  0,2 mg/L.

### 5.1.2. Določitev okoljskih standardov kakovosti

Predlagani OSK so določeni v skladu s skupno strategijo implementacije Vodne direktive (European Commission, 2011), zato jih je mogoče vključiti v nacionalno zakonodajo, v kolikor bi zakonodajalec ugotovil, da je potrebno protimikrobni učinkovini uvrstiti na seznam nacionalno relevantnih snovi. Tak seznam je bil pripravljen za slovenske površinske vode (Kolar in sod., 2006), vendar ni vseboval farmacevtskih učinkovin.

Vrednosti OSK izhajajo iz vrednosti PNEC, zato niso stalne in jih je potrebno zaradi novih spoznanj in novih relevantnih podatkov revidirati. Prva navodila za določitev OSK so bila pripravljena 2004 (Lepper, 2004). Metodologijo po Lepperju smo uporabili za določitev OSK tudi v Sloveniji (Kolar in sod., 2006). Omenjena navodila so izšla kot del strategije Vodne direktive šele leta 2011 (European Commission, 2011). Medtem pa so bila zakonodaja in tehnična navodila za okoljsko oceno tveganja za veterinarska zdravila dokončno usklajena šele leta 2008 (European Medicines Agency, 2008).

Metodologiji za oceno tveganja za kemikalije v skladu z zakonodajo REACH ter ocena tveganja za Veterinarska zdravila (VICH GL6 in GL38) se pomembno razlikujeta v ciljih in namenu ocene. Medtem ko v okviru kemijske zakonodaje REACH poteka ocena tveganja za snovi, rezultati pa so zbrani v enotnem dosjeju, pa ocena tveganja za veterinarska zdravila poteka izključno na ravni pripravka ter za vsak pripravek posebej. Za oceno tveganja veterinarskih zdravil so odgovorni nosilci tržne avtorizacije (Marketing



Authorization Holders). Raziskovalci in zainteresirana javnost se lahko pri ocenjevanju okoljskih tveganj zanesejo izključno na podatke iz kolegično presojane znanstvene literature. Podatki za zdravila v veterinarski rabi namreč niso zbrani v dosjejih, kot to velja za aktivne snovi fitofarmaceutskih sredstev oziroma kemijske snovi. Ekotoksikološki ter podatki o obnašanju in usodi učinkovin v okolju so poslovna skrivnost. Ker za posamezno učinkovino ni enotnega dosjeja, temveč je za vsako zdravilo potrebno generirati nove ekotoksikološke podatke, obstaja verjetnost, da so njihovi zaključki za posamezno učinkovino različni. Zato so za pripravo objektivne ocene tveganja in določitev vrednosti PNEC neobhodno potrebni kakovostni ekotoksikološki ter podatki o usodi in obnašanju v okolju, ki so generirani v skladu s predpisanimi metodami in objavljeni v recenzirani znanstveni literaturi. Menimo, da je določitev vrednosti PNEC v skladu z navodili VICH, kot izhodišče za predlog OSK, manj primerna v primerjavi s tisto v skladu z metodologijo iz zakonodaje REACH.

V naši študiji smo pripravili OSK na način, kot ga predvideva Uredba o stanju površinskih voda (Ur. l. RS, št. 14/2009) za letne povprečne vrednosti parametra kemijskega stanja (LP-OSK) ter največjo dovoljeno koncentracijo parametra kemijskega stanja (NDK-OSK). Izbrali smo dve metodi, ki ju predpisujejo tehnična navodila za pripravo OSK: deterministično metodo in verjetnostno metodo. Ob verjetnostni metodi smo izračunali OSK tudi po deterministični metodi, in sicer iz vrednosti PNEC v skladu z zakonodajo REACH, ter tako, kot predvideva faza II okoljske ocene tveganja za veterinarska zdravila.

### **Okoljski standardi kakovosti za OTC**

Okoljski standardi kakovosti za letno povprečje (LP-OSK) za OTC

Po deterministični metodi, kot jo predpisuje zakonodaja REACH za pripravo vrednosti PNEC in uporabo varnostnega faktorja, smo kot najnižjo vrednost NOEC izbrali rezultat študije Anda in sod. (2007). Test sicer ni bil izveden v skladu s standardiziranimi metodami, vendar nudi osnovne podatke o postopku, zato je rezultat sprejemljiv za določanje vrednosti. Za testirani cianobakteriji *M. aeruginosa* in *A. flos-aquae* avtor navaja NOEC 0,03 mg/L. Ostali ekotoksikološki podatki o dolgodobnih testih ustrezno pokrivajo tri trofične nivoje, zato smo izbrali varnostni faktor 10 ter določili LP-OSK 0,003 mg/L.

Izbrani rezultat pa ne vzdrži kriterijev derivacije vrednosti PNEC v skladu z navodili VICH za okoljsko oceno tveganja za veterinarska zdravila, saj ni bil generiran v predpisanem standardiziranem ekotoksikološkem testu. Zato smo izbrali najnižjo vrednost NOEC iz študije Eguchija in sod. (2004), 0,18 mg/L, ter predpisani varnostni faktor 10. LP-OSK po tej metodi je 0,018 mg/L.

Rezultat verjetnostne metode SSD po dolgodobni izpostavljenosti je 0,009 mg/L. Izbrani varnostni faktor 5 je sicer konservativen glede na največje število podatkov, ki se nanašajo na najbolj občutljivi taksonomski skupini. Glede na navodila je težko upravičiti nižji varnostni faktor, zato smo določili LP-OSK 0,0018 mg/L.

Okoljski standardi kakovosti za najvišjo dovoljeno koncentracijo (NDK-OSK) za OTC

Najnižja vrednost za OTC,  $EC_{50}$  0,22 mg/L, je izbrana iz študije, ki je ugotavljala vpliv protimikrobnih zdravil na danskih ribjih farmah in je bila izvedena na cianobakteriji *M. aeruginosa*. Varnostni faktor 10, s katerim smo določili NDK-OSK 0,022 mg/L, opravičujemo z dejstvom, da poznamo najbolj občutljivo taksonomsko skupino in trofični nivo.

Najnižja vrednost PNEC, ki izhaja iz ocene učinka po kratkodobni izpostavljenosti VICH, je 0,21. Isidorijeva je s sodelavci sicer objavila rezultat za *P. subcapitata* 0,17 mg/L, vendar pa je bil test izveden pri povišani temperaturi (25 °C). Predpisani varnostni faktor za kratkodobne teste po navodilih VICH je 100. Izračunani NDK-OSK za OTC po navodilih VICH je 0,0021 mg/L.

Rezultat verjetnostne metode SSD za OTC je 0,07 mg/L. Ob upoštevanju obveznega varnostnega faktorja za kratkodobno izpostavljenost 10, smo izračunali NDK-OSK 0,007 mg/L.

Primerjava vrednosti za LP-OSK, izračunanih po različnih metodah, pokaže, da je najnižja vrednost PNEC, izračunana po navodilih VICH, za velikostni razred nižja od ostalih dveh zaradi VF.

**Predlog:** Predlagamo LP-OSK za OTC 0,0018 mg/L na osnovi rezultatov SSD in uporabo varnostnega faktorja 5.

Najnižji OSK za kratkodobno izpostavljenost za OTC smo izračunali po metodologiji VICH (0,0021 mg/L). Vrednost se bistveno ne razlikuje od rezultata verjetnostne metode (0,007 mg/L). Slednji rezultat je veliko bolj realističen in pokrit z varnostnim faktorjem 5, v nasprotju z varnostnim faktorjem 100 po navodilih VICH.

**Predlog:** Predlagamo NDK-OSK za OTC 0,007 mg/L na osnovi rezultatov SSD in uporabo varnostnega faktorja 10.

## Okoljski standardi kakovosti za TMP

### Okoljski standardi kakovosti za letno povprečje (LP-OSK) za TMP

Najnižja toksikološka vrednost po dolgodobni izpostavljenosti je bila objavljena v študiji Madureire in sod. (2012). V dobro dokumentiranem dolgodobnem testu učinkov na reprodukcijo rib zebrič (*Danio rerio*) je vrednost NOEC 0,157 mg/L. To vrednost smo uporabili kot izhodišče za izračun LP-OSK po obeh determinističnih metodah, saj je rezultat najnižji, obenem pa zadovoljuje kriterije kakovosti, ki jih zahtevajo tehnična navodila REACH in tehnična navodila VICH. Ker je tudi varnostni faktor v obeh primerih enak ( $VF = 10$ ), je enak tudi rezultat. Dobljeni LP-OSK po deterministični metodi določanja za TMP je 0,016 mg/L.

Za izračun OSK z metodo SSD smo imeli na razpolago 14 rezultatov dolgodobnih testov. 5. percentil (HC5) normalne statistične porazdelitve rezultatov ekotoksikoloških testov po dolgodobni izpostavljenosti je 0,569 mg/L. Rezultat pokriva dogovorjeni varnostni faktor 5. LP-OSK za TMP, izračunan po verjetnostni metodi SSD, znaša 0,114 mg/L.

### Okoljski standardi kakovosti za najvišjo dovoljeno koncentracijo (NDK-OSK) za TMP

Najnižja vrednost  $EC_{50}$ , 11 mg/L za TMP po kratkodobni izpostavljenosti je bila ugotovljena za *Anabaena variabilis* v testu Anda in sod. (2007). Z VF 10 je NDK-OSK po tej metodi 1,1 mg/L.

Izbrani test na *A. variabilis* ne zadovoljuje kriterijev navodil VICH, saj ni bil izveden v skladu s standardizirano metodo. Med rezultati testov, ki jih je mogoče uporabiti, je bila izračunana najnižja vrednost PNEC po kratkodobni izpostavljenosti na osnovi  $EC_{50}$  za ribe in bolhe (100 mg/L) in v obeh primerih z VF 100 (Kim in sod., 2007; Kolar s s sod., 2014). Po tej metodi je NDK-OSK 0,1 mg/L.

Rezultati enaindvajsetih kratkodobnih ekotoksikoloških testov statistično niso normalno razporejeni. Navodila za pripravo okoljskih standardov za vodno okolje v takem primeru zavračajo določitev OSK na osnovi SSD, zato smo se odločili, da predlagamo NDK-OSK za TMP 1,1 mg/L na osnovi testa na cianobakterijski vrsti *Anabaena variabilis* ob uporabi VF 10.

Primerjava LP-OSK, ki smo jih generirali ob različnih metodah, je pokazala, da so ribe v razvojnih fazah zelo občutljive za delovanje TMP. V naboru rezultatov iz dolgodobnih testov strupenosti je najnižja vrednost NOEC za TMP iz reproduktivnega testa na ribah

zebricah. Vrednosti LP-OSK, izračunane po deterministični metodi, so za velikostni razred nižje kot vrednosti, pridobljene s pomočjo statistične metode SSD. Zaradi razmeroma majhnega števila relevantnih ekotoksikoloških rezultatov ter le petih testiranih taksonomskih skupinah, ki smo jih uporabili pri izračunu, smo se odločili, da je za vodno okolje varnejša nižja vrednost 0,016 mg/L. Ta temelji na reproduktivnih učinkih OTC na organizme tretjega trofičnega nivoja. Konservativni pristop opravičuje tudi persistentnost TMP v okolju ter razmeroma malo podatkov o imisijah te učinkovine v vodnem ekosistemu.

**Predlog:** Predlagamo LP-OSK za TMP 0,016 mg/L. Vrednost je izračunana po deterministični metodi na osnovi dolgodobnega reproduktivnega testa na ribah in uporabi VF 10.

Rezultat HC5 statistične porazdelitve rezultatov kratkodobnih testov ni sprejemljiv za pripravo OSK, zato smo izbrali deterministično metodo, kot jo predvideva kemijska zakonodaja REACH. Najnižji rezultat EC<sub>50</sub> za cianobakterije smo pokrili z varnostnim faktorjem 10. TMP je v vseh testiranjih s kratkodobno izpostavljenostjo izkazoval razmeroma nizko strupenost.

**Predlog:** Predlagamo NDK-OSK za TMP 1,1 mg/L na osnovi EC<sub>50</sub> vrednosti za *A. variabilis*.

## 5.2 SKLEP

V predstavljeni študiji smo izvedli zastavljene cilje:

- Izvedli smo akutne teste strupenosti z OTC in TMP na vodnih bolhah, mikrobnih združbi aktivnega blata ter multigeneracijske teste strupenosti na zelenih planktonskih algah in cianobakterijah. Izračunali smo rezultate izvedenih testov.
- Vse teste smo izvajali v skladu s standardiziranimi metodami tehničnih navodil OECD, kar nam je omogočilo neposredno primerjanje z rezultati iz literature in uporabo v postopkih okoljske ocene tveganja.
- Teste na cianobakterijah in zelenih algah smo izvedli v istem časovnem intervalu, kar je omogočilo primerjavo rezultatov strupenosti za obe testirani taksonomski skupini.
- Izvedli smo teste biorazgradljivosti za OTC in TMP ter izračunali rezultate.
- Določili smo vrednosti PNEC za OTC in TMP.

- Predlagali smo okoljske standarde kakovosti za površinske celinske vode za OTC in TMP.

Testirani učinkovini nista biorazgradljivi v skladu z zahtevami tehničnih navodil OECD 302 B (test po Zahn-Wellensu/EMPA):

- V mediju z OTC je glede na začetno koncentracijo ostalo le 6 % OTC, ter 67 % DOC. Kljub razgradnji učinkovine, nerazgrajeni delež DOC kaže, da učinkovina ni biološko razgradljiva v skladu z navodili za izvedbo testa.
- V mediju s TMP je bilo po 28-ih dneh testiranja razgrajenih 39 % učinkovine, kar nedvomno kaže, da učinkovina ni biološko razgradljiva.

Preiskava je pokazala, da je OTC pri kratkodobni izpostavljenosti za približno 100 krat bolj strupen za alge in cianobakterije kot TMP. Kratkodobni toksični učinek OTC na cianobakterije ( $ErC_{50}$  2,7 mg/L) in zelene alge ( $ErC_{50}$  1,04 mg/L) je v podobnem koncentracijskem območju. Razmerje med toksičnim učinkom TMP na zelene alge in cianobakterije je skoraj enako kot pri OTC. Zelene alge so za delovanje TMP bolj občutljive kot cianobakterije.

Izračuni dolgodobne strupenosti  $ErC_{10}$  kažejo, da so zelene alge ( $ErC_{10}$  0,47 mg/L) občutljivejše na učinke OTC kot cianobakterije ( $ErC_{10}$  1,5 mg/L). Slednje pa so bolj občutljive na dolgodobne učinke TMP ( $ErC_{10}$  26 mg/L) kot zelene alge ( $ErC_{10}$  65 mg/L). TMP je zmerno strupen za vodne bolhe ( $EC_{50}$  100 mg/L), medtem, ko OTC za vodne bolhe ni strupen v mejah topnosti učinkovine. Prav nasprotno pa TMP ne kaže akutnih strupenostnih učinkov na dihanje aktivnega blata pri najvišjih v vodi topnih koncentracijah, medtem ko je OTC strupen pri koncentraciji  $EC_{50}$  17,9 mg/L.

Varne mejne vrednosti oziroma vrednosti PNEC za protimikrobni učinkovini v vodnem okolju smo določili na osnovi rezultatov ekotoksikoloških testov ter jih predlagali kot okoljske standarde kakovosti (OSK) za letno povprečje (LP-OSK) in najvišje dovoljene koncentracije (NDK-OSK). Varne mejne vrednosti PNEC smo postavili tudi v skladu z metodologijo za okoljsko oceno tveganja za veterinarska zdravila VICH. Pokazalo se je, da je ta manj primerna za določitev okoljskih standardov kakovosti, kot jih zahteva Vodna direktiva. Predlagali smo naslednje OSK za OTC in TMP v celinskih površinskih vodah:

- LP-OSK za OTC 0,0018 mg/L na osnovi rezultatov SSD in uporabo varnostnega faktorja 5.
- NDK-OSK za OTC 0,007 mg/L na osnovi rezultatov SSD in uporabo varnostnega faktorja 10.

- LP-OSK za TM 0,016 mg/L na osnovi dolgodobnega testa reproduktivne strupenosti na ribah *D. rerio* in uporabo varnostnega faktorja 10.
- NDK-OSK za TMP 1,1 mg/L na osnovi vrednosti  $EC_{50}$  za *A. variabilis* in uporabo varnostnega faktorja 10.

Študija je pokazala nedvomno potrebo po kakovostnih ekotoksikoloških podatkih, pridobljenih v skladu s standardiziranimi metodami, kot sta OECD in ISO, objavljenih v znanstvenih publikacijah. Realnost rezultata ocene tveganj, ki jih predstavljajo protimikrobne učinkovine pa tudi druga farmacevtska sredstva, je namreč odvisna predvsem od kakovostnih, med seboj primerljivih rezultatov. V prihodnje bo potrebno generirati tudi ekotoksikološke podatke o učinkih protimikrobnih zdravil na druge segmente vodnega okolja, kot je na primer sediment, ter združbe, ki se z njim hranijo.

Razviti bo potrebno ustrezno metodo za ugotavljanje varne koncentracije protimikrobnih učinkovin v okolju, ki bo preprečevala razvoj protimikrobne rezistence, ter jo upoštevati pri izračunu in določanju okoljskih standardov kakovosti za vodno okolje.

## 6. POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Namen študije je bila preiskava strupenostnih učinkov dveh protimikrobnih učinkovin, oksitetraciklina (OTC) in trimetoprima (TMP), na vodno okolje. Obe učinkovini sta v uporabi v humani in veterinarski medicini. Izvedli smo serijo laboratorijskih testov ter določili varne mejne vrednosti ter okoljske standarde kakovosti. Laboratorijske preizkuse smo izvedli v skladu s tehničnimi navodili OECD za testiranje kemikalij. Izvedli smo teste biorazgradljivosti ter ekotoksikološke teste na cianobakteriji *Anabaena flos-aquae*, na algi *Pseudokirchneriella subcapitata*, na planktonskih rakih *Daphnia magna* ter na združbi aktivnega blata. Teste na cianobakterijah nam je uspelo zaključiti v treh dneh, torej v času testiranja zelenih alg, kar je omogočilo neposredno primerjanje občutljivosti obeh modelnih vrst. Rezultat testa strupenosti  $ErC_{50}$  za *P. subcapitata* 72 h za OTC je 1,04 mg/L (72 h  $ErC_{10}$  0,47 mg/L). Te vrednosti koncentracij so nižje v primerjavi s strupenostjo OTC za *A. flos-aquae*, kjer je  $ErC_{50}$  2,7 mg/L (72 h  $ErC_{10}$  1,5 mg/L). TMP je približno 100 krat manj strupen za fotosintetske planktonske modelne organizme. Podobno kot za OTC, je tudi za TMP bolj občuljiva alga kot pa cianobakterija. Rezultat strupenosti 72 h  $ErC_{50}$  za *P. subcapitata* je bil 129 mg/L in  $ErC_{10}$  65 mg/L, medtem ko smo za *A. flos-aquae* izračunali 72 h  $ErC_{50}$  253 mg/L in 72 h  $ErC_{10}$  26 mg/L. OTC je razmeroma strupen za mikrobo združbo aktivnega blata (3 h  $EC_{50}$  17,9 mg/L), izračunana koncentracija 3 h  $EC_{50}$  pa je preseгла topnost za TMP v vodi. Obe testirani učinkovini sta razmeroma nestrupeni za vodne bolhe.

Metodologija določanja okoljskih standardov kakovosti (OSK) temelji na paradigmi okoljske ocene tveganja za kemijske snovi, saj izhaja iz vrednosti PNEC, torej koncentracije, ki jo lahko označimo kot varno mejno vrednost. Pri pripravi mejne vrednosti za celinske površinske vode smo uporabili dve metodologiji, ki ju predvideva tehnično navodilo za pripravo mejnih vrednosti za Vodno direktivo. Po deterministični metodi smo izračunali vrednosti PNEC v skladu z navodili iz kemijske zakonodaje REACH in tehničnimi navodili VICH za okoljsko oceno tveganja za veterinarska zdravila. Glede na razmeroma veliko število podatkov pa smo lahko uporabili tudi probabilistično metodo SSD (Species Sensitivity Distribution).

Iz razpoložljivih objavljenih podatkov smo zbrali rezultate testov  $EC_{10}$  in NOEC po dolgodobni izpostavljenosti OTC in TMP ter jih uporabili za pripravo predloga okoljskega standarda kakovosti za letno povprečje (LP-OSK). Za OTC predlagamo LP-OSK 0,0018 mg/L na osnovi rezultatov SSD in uporabo varnostnega faktorja 5, za TMP pa LP-OSK

0,016 mg/L na osnovi dolgodobnega testa reproduktivne strupenosti na ribah *D. rerio* in uporabo varnostnega faktorja 10.

Na osnovi kratkodobnih podatkov  $EC_{50}$  smo predlagali okoljski standard kakovosti za kratkotrajno izpostavljenost najvišjim dovoljenim koncentracijam. Za OTC smo izračunali NDK-OSK 0,007 mg/L na osnovi rezultatov SSD z uporabo varnostnega faktorja 10.

Vrednost NDK-OSK za TMP 1,1 mg/L pa smo izračunali na osnovi vrednosti  $EC_{50}$  za *A. variabilis* in uporabo varnostnega faktorja 10.



## 6.2 SUMMARY

The objective of our study was the investigation of toxic properties of antimicrobial drugs: oxytetracycline (OTC) and trimethoprim (TMP) in the aquatic environment. Both active substances are used in human and veterinarian medicine. The laboratory testing on the effect of antimicrobial compounds was performed and environmental risk limits were set to derive environmental quality standards.

According to the OECD guidelines for the testing of chemicals, tests on the biodegradation and toxic effect on cyanobacteria *Anabaena flos-aquae*, on the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, on the daphnid *Daphnia magna* as well as on the activated sludge were performed. We discussed short-term and long-term results of tests on cyanobacteria and microalgae. Both experiments were concluded in 72 hours, allowing direct comparison of the sensitivity of the two tested species. The results of our study showed a toxic effect in the same range for both groups. In the test on the toxicity of OTC to *P. subcapitata* we obtained the 72 h ErC<sub>50</sub> of 1.04 mg/L (72h ErC<sub>10</sub> 0.47 mg/L), which in comparison are lower than the results on the toxicity to *A. flos-aquae* of ErC<sub>50</sub> of 2.7 mg/L (72 h ErC<sub>10</sub> 1.5 mg/L). TMP is less toxic to both photosynthetic plankton species. Similar to the test results on OTC, the *P. subcapitata* is more sensitive to TMP (ErC<sub>50</sub> 129 mg/L; ErC<sub>10</sub> 65 mg/L) than *A. flos-aquae* (72 h ErC<sub>50</sub> 253 mg/L; 72 h ErC<sub>10</sub> 26 mg/L). OTC is toxic to the activated sludge (3 h EC<sub>50</sub> 17.9 mg/L), while the calculated 3 h EC<sub>50</sub> value for TMP exceeded solubility for the compound. In comparison to other species, both tested antimicrobials showed low toxicity to daphnids.

The methodology for setting Environmental Quality Criteria (EQS) is derived from the paradigm of the Environmental risk assessment for chemical substances as the PNEC (Predicted No Effect Concentration) that is considered as a safe concentration. We employed two methodologies described in the guidelines for setting environmental quality criteria (European Commission, 2011) for inland waters, in line with requirements of the Water Framework Directive (Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, 2000) and the Directive on the Environmental Quality Standards (Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy, 2008). To set the EQS for surface water for antimicrobial active substances, we employed two methods. Following the principles of the deterministic method, we calculated PNEC values according to the REACH guidelines for the derivation of PNEC (European Chemicals Agency, 2008) and the Guidance on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products Phase II. (VICH

Expert Working Group, 2005). According to the sufficient number of data, we also employed the probabilistic method SSD (Species Sensitivity Distribution).

Based on the agglomeration of test results  $EC_{10}$  and NOEC after the long-term exposure of OTC and TMP, we derived annual average environmental quality standards (AA-EQS). For the OTC, we propose the AA-EQS of 0.0018 mg/L based on results of statistical SSD calculation, employing an AF of 5. For TMP we propose AA-EQS of 0.016 mg/L based on the long-term reproduction test on fish *D. rerio*, which is covered with the AF of 10.

The maximum acceptable concentration environmental quality standard (MAC-EQS) is based on short-term toxicity  $EC_{50}$ . For the OTC, we propose the MAC-EQS of 0.007 mg/L based on results of SSD by employing the AF of 10.

MAC-EQS for the TMP is proposed to be 1.1 mg/L, which is calculated on the  $EC_{50}$  concentration for the *A. variabilis* and is covered with the AF of 10.

## 7. VIRI

- Ando, T., Nagase, H., Eguchi, K., Hirooka, T., Nakamura, T., Miyamoto, K. & Hirata, K. 2007. A novel method using cyanobacteria for ecotoxicity test of veterinary antimicrobial agents. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 26, 4: 601–606  
<http://doi.org/10.1897/06-195R.1:20-04-2012> (20. apr.2012)
- BIO Intelligence Service. 2013. Study on the environmental risks of medicinal products, Final Report prepared for Executive Agency for Health and Consumer  
[http://ec.europa.eu/health/files/environment/study\\_environment.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/environment/study_environment.pdf) (16. dec. 2014)
- Boxall, A. B. A. 2004. The environmental side effects of medication. *EMBO Reports*  
<http://doi.org/10.1038/sj.embor.7400307> (29. dec. 2014)
- Boxall, A. B. A., Fogg, L., Blackwell, P. A., Kay, P. & Pemberton, E. J. 2002. Review of Veterinary Medicines in the Environment. Environment Agency  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561076> (4. jun. 2012)
- Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K. & Solomon, K. R. 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 2: 371–382  
<http://doi.org/10.1897/02-576> (19. maj 2015)
- Campagnolo, E. R., Johnson, K. R., Karpati, A., Rubin, C. S., Kolpin, D. W., Meyer, M. T., McGeehin, M. 2002. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Science of the Total Environment*, 299, 1-3: 89–95  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969702002334> (1. feb. 2015)
- Capleton, A. C., Courage, C., Rumsby, P., Holmes, P., Stutt, E., Boxall, A. B. A. & Levy, L. S. 2006. Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile. *Toxicology Letters*, 163, 3: 213–223  
<http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.10.023> (19. maj 2015)
- Costanzo, S. D., Murby, J. & Bates, J. 2005. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*, 51, 1-4: 218–223  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15757723:31-082012> (31. avg. 2012)

COUNCIL DIRECTIVE of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market (91 /414/EEC), The Council of the European Communities. 1991. Official Journal of the European Communities, L230/1  
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:31991L0414> (31. jan 2015)

Danish Environmental Protection Agency. 2006. Trimethoprim, Determination of quality standards. Datasheet, hcl/13; Bekendtgørelse Nr. 1022 Af 25/8-2010 Bekendtgørelse Om Miljøkvalitetskrav for Vandområder Og Krav Til Udledning Af Forurenende Stoffer Til Vandløb, Søer Eller Havet, 1-3

Danish Environmental Protection Agency. 2007. Oxytetracycline and Oxytetracycline hydrochloride, Determination of quality standards. Datasheet, hcl/13; Bekendtgørelse Nr. 1022 Af 25/8-2010 Bekendtgørelse Om Miljøkvalitetskrav for Vandområder Og Krav Til Udledning Af Forurenende Stoffer Til Vandløb, Søer Eller Havet, 1-4

Direktiva 2000/60/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 23. oktobra 2000 o določitvi okvira za ukrepe Skupnosti na področju vodne politike. 2000. Uradni list evropskih skupnosti, L 327: 275–346  
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:02000L0060-20090113&from=EL> (20. nov. 2014)

Direktiva 2008/105/ES Evropskega parlamenta in Sveta o okoljskih standardih kakovosti na področju vodne politike. 2008, p: 84–97 Uradni list Evropske unije 24.12.2008  
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:348:0084:0097:sl:PDF2> (31. avg. 2014)

Direktiva 2013/39/EU Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 12. avgusta 2013 o spremembi direktiv 2000/60/ES in 2008/105/ES v zvezi s prednostnimi snovmi na področju vodne politike. Uradni list Evropske unije 2013: 1–17  
<http://old.eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:226:0001:01:S L:HTML> (4. nov. 2014)

Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products. Official Journal of the European Union, L311: 1–60  
[http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/dir\\_2001\\_82/dir\\_2001\\_82\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/dir_2001_82/dir_2001_82_en.pdf) (14. dec. 2014)

- Directive 2004/28/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/82/EC on the Community code relating to veterinary medicinal products. Official Journal of the European Union, L 136: 58–84  
[http://www.biosafety.be/PDF/2004\\_28.pdf](http://www.biosafety.be/PDF/2004_28.pdf) (1. sept. 2012)
- Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Miyamoto, K. & Yoshimura, H. 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*, 57, 1733–1738  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653504006046> (26. apr. 2011)
- European Chemicals Agency. 2008. Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R . 10 : Characterisation of dose [ concentration ] -response for environment, 1-65  
<http://echa.europa.eu/support/guidance> (22. jan. 2014)
- European Chemicals Bureau. 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment, 1-203  
[https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart1\\_2ed\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart1_2ed_en.pdf) (22. maj 2015)
- European Commission. 2005. Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. IP/05/1687  
[http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-05-1687\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm) (31. avg. 2014)
- European Commission. 2011. Technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards, 1-202  
[https://circabc.europa.eu/sd/a/0cc3581b-5f65-4b6f-91c6-433a1e947838/TGD EQS%20CIS-WFD%2027%20EC%202011.pdf](https://circabc.europa.eu/sd/a/0cc3581b-5f65-4b6f-91c6-433a1e947838/TGD%20EQS%20CIS-WFD%2027%20EC%202011.pdf) (4. nov. 2014)
- European Medicines Agency. 2008. Revised guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH guidelines GL6 and GL 38. EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1, 1-65
- European Medicines Agency. 2009. Opinion following an article 33 (4) referral for ENRO-K 10% ORAL SOLUTION, 5 May 2009, EMEA/214378/2009, 1-2

- Europena Medicines Agency. 2012. Questions and answers. Implementation of CVMP Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products in support of the VICH Guidelines GL6 (Phase I) and GL38 (Phase II). EMEA/CVMP/ERA/172074/2008-Rev. 4, 44: 1-5  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Other/2009/10/WC500004391.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2009/10/WC500004391.pdf) (24. jan. 2014)
- European Medicines Agency. 2014. Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU / EEA countries in 2012, Fourth ESVAC report, 1-128
- Ferreira, J. G., Hawkins, A. J. S. & Bricker, S. B. 2007. Management of productivity, environmental effects and profitability of shellfish aquaculture - the Farm Aquaculture Resource Management (FARM) model. *Aquaculture*, 264, 1-4: 160–174  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848606009094> (19. maj 2015)
- Gartiser, S., Urich, E., Alexy, R. & Kümmerer, K. 2007. Ultimate biodegradation and elimination of antibiotics in inherent tests. *Chemosphere*, 67, 3: 604–13  
<http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.038> (8. avg. 2013)
- Ginebreda, A., Muñoz, I., López, M., Alda, D., Brix, R., López-doal, J. & Barceló, D. 2010. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers : Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River ( NE Spain ). *Environment International*, 36, 2: 153–162  
<http://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.003> (1.sep. 2012)
- Grinten, E. Van Der, Pikkemaat, M. G. & Brandhof, E. Van Den. 2010. *Chemosphere* Comparing the sensitivity of algal , cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere*, 80, 1: 1–6  
<http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.011> (26. apr. 2011)
- Halling-Sørensen, B. 2000. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*, 40, 7: 731–739  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653599004452> (26. apr. 2011)
- Halling-Sørensen, B., Lutzhoft, H. H., Andersen, H. R. & Ingerslev, F. 2000. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 1: 53–58  
[http://jac.oxfordjournals.org/content/46/suppl\\_1/53](http://jac.oxfordjournals.org/content/46/suppl_1/53) (26. apr. 2011)

- Halling-Sorensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P., Ingerslev, F., Liitzhofl, Holten, H. C. & Jorgensen, S. E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review. *Chemosphere*, 36, 2: 357–393  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653597003548> (2. mar. 2012)
- Hansch, C., Leo, A., D. Hoekman. Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, DC: American Chemical Society., 1995., p. 124  
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6781>  
(16. avg. 2015)
- Hanson, M. L., Knapp, C. W. & Graham, D. W. 2006. Field assessment of oxytetracycline exposure to the freshwater macrophytes *Egeria densa* Planch. and *Ceratophyllum demersum* L. *Environmental Pollution*, 141, 3: 434–42  
<http://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.068> (19. maj. 2015)
- Harrass, M. C., Kindig, A. C., Taub, F. B. & Sciences, F. 1985. Responses of blue-green and green algae to streptomycin in unialgal and paired culture. *Aquatic Toxicology*, 6, 665: 1–11  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166445X85900153> (17. sep. 2012)
- Holten Lutzhöft, H.-C., Halling-Sørensen, B. & Jørgensen, S. E. 1999. Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming. *Environmental Contamination and Toxicology*, 6, 1–6  
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002449900435> (6. apr. 2012)
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L. & Parrella, A. 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of the Total Environment*, 346, 1-3: 87–98  
<http://doi.org/10.1016/j.scitotenv> (6. april 2012)
- Kay, P., Blackwell, P. A. & Boxall, A. 2004. Fate of Veterinary Antibiotics in a Macroporous Tile Drained Clay Soil. *Environmental Toxicology*, 23, 5: 1136–1144  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/03-374/full> (6. april 2012)
- Kay, P., Blackwell, P. A. & Boxall, A. B. A. 2005. Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere*, 59, 7: 951–959  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653504011300> (19. jan. 2015)

- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P. & Park, J. 2007. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment*, 33, 370–375  
<http://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.017> (29. avg. 2012)
- Klimisch, H. J., Andreae, M. & Tillmann, U. 1997. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 25, 1: 1–5  
<http://doi.org/10.1006/rtph.1996.1076> (25. jun. 2015)
- Kolar, B., Arnuš, L., Jeretin, B., Gutmaier, A., Drobne, D. & Durjava, M. K. 2014. The toxic effect of oxytetracycline and trimethoprim in the aquatic environment. *Chemosphere*, 115, 75–80
- Kolar, B., Kos Durjava, M., Derksen, A., Balk, F. & Peijnenburg, W. 2005. Priprava okoljskih standardov za kemijske snovi v vodnem okolju. Poročilo I. faze projekta: priprava seznama za vodno okolje relevantnih snovi. Ciljni raziskovalni projekt, Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, 1-61
- Kolar, B., Kos Durjava, M., Derksen, A., Balk, F. & Peijnenburg, W. 2006. Priprava okoljskih standardov za kemijske snovi v vodnem okolju. Poročilo II. faze projekta: določitev okoljskih standardov kakovosti za vodno okolje relevantnih snovi. Ciljni raziskovalni projekt, Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, 1-37
- Kolar, B., C. Moermond, & S. Hickmann. V tisku. Veterinary pharmaceuticals. In: *Pharmaceuticals in the Environment*, Hester R. (ed.). Cambridge, Royal Society for Chemistry, 41: 255-284
- Kolpin, D. W. & Meyer, M. T. 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36, 6: 1202–1211  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es011055j> (26. apr. 2011)
- Kos Durjava, M., Kolar, B., Balk, F. & Peijnenburg, W. 2015. Water Framework Directive and Specific Pollutants in Surface Waters in Slovenia. *Acta Hydrotechnica*, 45, 2013: 61–69



- Kümmerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75, 4: 417-434  
<http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086> (26. apr. 2011)
- Larsson, D. G. J., de Pedro, C. & Paxeus, N. 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 148, 3: 751–755  
<http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.008> (30. dec. 2014)
- Laumera, G., M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G. & Fanelli, R. 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*, 54, 5: 661–668  
<http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.08.001> (26. apr. 2011)
- Lepper, P. 2004. Manual of the Methodological Framework Used to Derive Quality Standards for Priority Substances of the Water Framework Directive.  
<http://www.wrrl-info.de/docs/manual-derivation-qs.pdf> (9. apr. 2015)
- Li, D., Yu, T., Zhang, Y., Yang, M., Li, Z., Liu, M. & Qi, R. 2010. Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 11: 3444–3451  
<http://aem.asm.org/content/76/11/3444> (6. nov. 2014)
- Liguoro, M. De, Cibir, V., Capolongo, F., Halling-sørensen, B. & Montesissa, C. 2003. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming : evaluation of transfer to manure and soil, 52, 1: 203–212  
[http://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00284-4](http://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00284-4) (1. sep. 2012)
- Liguoro, M. De, Fioretto, B., Poltronieri, C. & Gallina, G. 2009. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim. *Chemosphere*, 75, 11: 1519–1524  
<http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.002> (6. apr. 2012)

- Loke, M. L., Jespersen, S., Vreeken, R., Halling-Sørensen, B. & Tjørnelund, J. 2003. Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 783, 1: 11–23  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023202004683> (19. jan. 2015)
- Madureira, T. V., Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Rodrigues, I., Monteiro, R. a F. & Rocha, E. 2012. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): evaluation of impacts on fish liver, by histopathology, stereology, vitellogenin and CYP1A immunohistochemistry, after sub-acute exposures of the zebrafish model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34, 1: 34–45  
<http://doi.org/10.1016/j.etap.2012.02.007> (16. dec. 2014)
- Motoyama, M., Nakagawa, S., Tanoue, R., Sato, Y., Nomiyama, K. & Shinohara, R. 2011. Residues of pharmaceutical products in recycled organic manure produced from sewage sludge and solid waste from livestock and relationship to their fermentation level. *Chemosphere*, 84, 4: 432–438 <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.048> (16. dec. 2014)
- OECD. 1992. OECD Guideline for testing of chemicals 302B: Zahn-Wellens/EMPA Test. *Oecd Guidelines for the Testing of Chemicals*, 1-8  
<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/E302B.pdf> (20. dec. 2007)
- OECD. 2004. OECD Guideline for testing of chemicals 202: Daphnia sp., Acute Immobilisation Test. *Oecd Guidelines for the Testing of Chemicals*, 1-16  
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948249.pdf> (6. mar. 2005)
- OECD. 2010. OECD Guideline for testing of chemicals 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test. *Oecd Guidelines for the Testing of Chemicals*, 1-18  
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/36037355.pdf> (3. mar. 2011)
- OECD. 2011. OECD Guidelines for the testing of chemicals 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. *Oecd Guidelines for the Testing of Chemicals*, 1-25  
<http://dx.doi.org/10.1787/9789264069923-en> (8. apr. 2012)

- 
- OECD. 2012. New and Emerging Water Pollutants Arizing from Agriculture.  
<http://www.oecd.org/tad/sustainable-agriculture/49848768.pdf> (15. okt. 2014)
- Park, S. & Choi, Æ. K. 2008. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*, 17, 6: 526–538  
<http://doi.org/10.1007/s10646-008-0209-x> (26. apr. 2011)
- Pro, J., Ortiz, J. a, Boleas, S., Fernández, C., Carbonell, G. & Tarazona, J. V. 2003. Effect assessment of antimicrobial pharmaceuticals on the aquatic plant *Lemna minor*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 2: 290–5  
<http://doi.org/10.1007/s00128-002-0208-1> (1. sep. 2012)
- Quinn, B., Gagné, F. & Blaise, C. 2008. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals ( and their solvents ) found in wastewater effluent on the cnidarian , *Hydra attenuata*. *Science of Total Environment*, 389, 2-3: 306-314  
<http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.038> (16. dec. 2014)
- Quinn, B., Gagné, F. & Blaise, C. 2009. Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of the Total Environment*, 407, 3: 1072–1079  
<http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.022> (19. maj 2015)
- Reda, R. M., Ibrahim, R. E., Ahmed, E.-N. G. & El-Bouhy, Z. M. 2013. Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39, 4: 241–248  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1687428513001167> (19. maj 2015)
- Rhee, J. S., Jeong, C. B., Kim, B. M. & Lee, J. S. 2012. P-glycoprotein (P-gp) in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*: Molecular characterization and expression in response to pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 114-115: 104–118  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X12000598> (19. maj 2015)
- Richards, S. & Cole, S. 2006. A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. *Ecotoxicology*, 15, 8: 647–656  
<http://doi.org/10.1007/s10646-006-0102-4> (19. maj 2015)

- Rijkers, G. T., Teunissen, a. G., Van Oosterom, R. & Van Muiswinkel, W. B. 1980. The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 19,2: 177–189.  
[http://doi.org/10.1016/0044-8486\(80\)90018-6](http://doi.org/10.1016/0044-8486(80)90018-6) (19. maj 2015)
- Robinson, A. A., Belden, J. B. & Lydy, M. J. 2005. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 24, 2: 423–430  
<http://doi.org/10.1897/04-210R.1> (19. maj 2015)
- Sangster J; LOGKOW Database. A databank of evaluated octanol-water partition coefficients (Log P). Available from, as of May 23, 2006  
<http://logkow.cisti.nrc.ca/logkow/search.html> (16. avg. 2015)
- Schmidt, L. J., Gaikowski, M. P., Gingerich, W. H., Dawson, V. K. & Schreier, T. M. 2007. An Environmental Assessment of the Proposed Use of Oxytetracycline-Medicated Feed in Freshwater Aquaculture. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division. Prepared for submission to the Center for Veterinary Medicine U.S. Food and Drug Administration, 1-97  
<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/EnvironmentalAssessments/UCM303588.pdf> (28. okt. 2014)
- Servais, P. & Passerat, J. 2009. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *The Science of the Total Environment*, 408, 2: 365–372  
<http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.09.042> (28. okt. 2014)
- Solomon, K. Giesy J., Jones P., 2000. Probabilistic Risk Assessment of agrochemicals in the Environment. *Crop Protection*, 19, 8-10: 649-655  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219400000867?np=y> (25. maj 2015)
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Choen-Bazire, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 35, 2: 171  
<http://mmb.asm.org/cgi/reprint/35/2/171.pdf>: ( 20. avg. 2013)

Straub, J. 2013. An Environmental Risk Assessment for Human-Use Trimethoprim in European Surface Waters. *Antibiotics*, 2, 1: 115–162  
<http://doi.org/10.3390/antibiotics2010115> (3. jan. 2014)

The European Parliament and the Council of the European Union. Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*, 429, 2011: 1–35  
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52011PC0876> (7. jan. 2015)

Uredba (ES) št. 1907/2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH). 2006. Uradni List Evropske Unije SL, 2005, L 396/ 1-849  
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:396:0001:0849:sl:PDF> (9. okt. 2014)

Valcárcel, Y., González Alonso, S., Rodríguez-Gil, J. L., Gil, A. & Catalá, M. 2011. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere*, 84, 10: 1336–1348  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565351100539X> (1.feb. 2015)

Van Vlaardingen P.L.A., Traas, T. P., Wintersen, A. M. & Aldenberg, T. 2004. Etx 2.0. RIVM Report 601501028, 1-68  
<http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/9005/1/601501028.pdf> (7. jun. 2015)

VICH Expert Working Group. 2000. Environmental Impact Assessment ( EIAs ) for Veterinary Medicinal Products (VMPs ) - Phase I. VICH GL6 (ECOTOXICITY PHASE I). International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products. June 2000, 1-9

VICH Expert Working Group. 2005. Environmental Impact Assessment For Veterinary Medicinal Products Phase II. VICH GL 38 (ECOTOXICITY PHASE II). International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products. October 2004, 1–38

- Wallinga, D. & Burch, D. G. S. 2013. Does adding routine antibiotics to animal feed pose a serious risk to human health ? *BMJ*, 347, f4214: 9–11  
<http://doi.org/10.1136/bmj.f4214> (30. avg. 2014)
- Wang Qiquan & R. Yates, S. 2008. Laboratory Study of Oxytetracycline Degradation Kinetics in Animal Manure and Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17: 1683–1688  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf072927p>: (1. sep. 2012)
- Wells, M. J. M., Morse, A., Bell, K. Y., Pellegrin, M.-L. & Fono, L. J. 2009. Emerging Pollutants. *Water Environment Research*, 81,10: 2211–2254  
<http://doi.org/10.2175/106143011X13075599870298> (19. jan. 2015)
- Wise, R. 2002. Leading articles Antimicrobial resistance : priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 4: 585–586  
<http://jac.oxfordjournals.org/content/49/4/585> (27. avg. 2012)
- Wollenberger, L., Halling-sørensen, B. & Kusk, K. O. 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 40, 7: 723–730  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653599004439> (1. dec. 2014)
- Yang, L.-H., Ying, G.-G., Su, H.-C., Stauber, J. L., Adams, M. S. & Binet, M. T. 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, SETAC, 27, 5: 1201–1208  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/07-471.1> (11. nov. 2014)

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici za stalne spodbude in prijazno svetovanje. Zahvaljujem se podjetju Krka d. o. o. za donacijo protimikrobnih učinkovin, ki smo jih uporabili v testu.

Zahvaljujem se sodelavcem, ki so kot operaterji sodelovali pri izvedbi načrtovanih testov, pa tudi kolegom in prijateljem, ki so mi pomagali, ko je računalniški škrt požrl podatke. Hvala tudi družini, ki je potrpežljivo čakala vsa ta leta in mi stala ob strani ves čas nastajanja naloge.

## PRILOGE

### Priloga A1

#### Sestava rastnega medija BG 11 za cianobakterije

Recipe for BG 11 medium

Stocks		Per Litre
1	NaNO <sub>3</sub>	15,0 g
2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 g
3	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5 g
4	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,6 g
5	Citric acid	0,6 g
6	Ammonium ferric citrate green	0,6 g
7	EDTANa <sub>2</sub>	0,1 g
8	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,0 g
9	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81 g
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22 g
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,39 g
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,08 g
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,05 g
Medium		per litre
Stock 1		100,0 ml
Stock 2–8		10,0 ml each
Stock 9		1,0 ml

Make up to 1 litre with deionized water. Adjust pH to 7,1 with 1M NaOH or HCl.

Po tehničnih navodilih OECD 201 "Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test" (OECD, 2011).

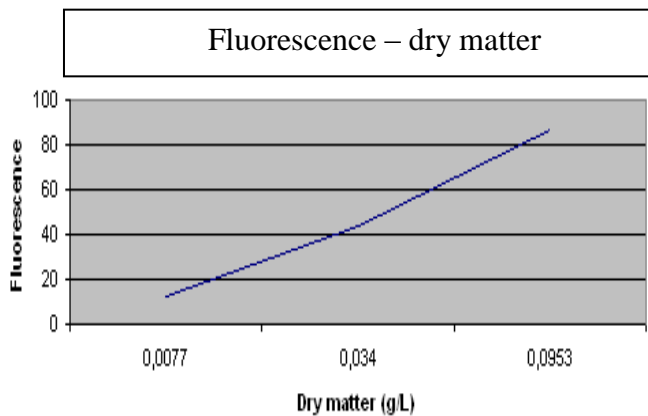


## Priloga A2

### Validacija surogatne meritve (fluorescence) za *A. flos-aquae*

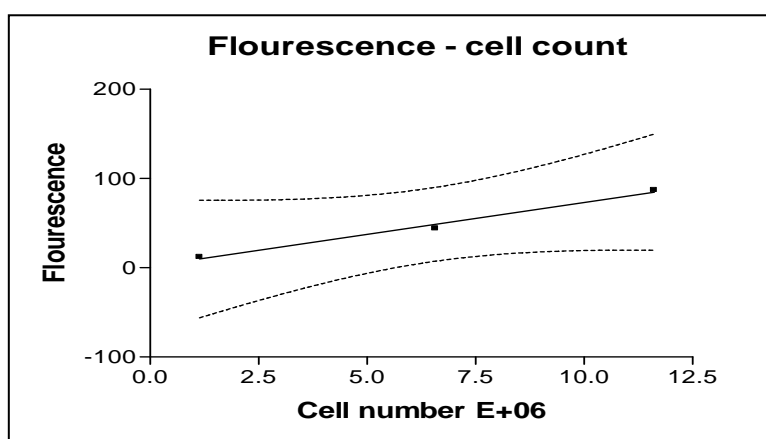
Validacija s pomočjo teže suhe snovi

Date	Dry Matter (g/L)	Fluorescence
6. 10. 2009	0,0077	12
9. 10. 2009	0,034	44
12. 10. 2009	0,0953	87
	Fluorescence	
Variables		
Slope	828,8 ± 118,7	
Y-intercept	9,819 ± 6,953	
X-intercept	-0,01185	
1/slope	0,001207	
95 % Confidence Intervals		
Slope	-679,2 to 2337	
Y-intercept	-78,53 to 98,17	
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,9799	
Sy.x	7,545	
Is slope significantly non-zero?		
F	48,76	
DFn, DFd	1,000, 1,000	
P value	0,0905	
Deviation from zero?	Not Significant	



### Validacija s pomočjo preštevanja celic

Date	Nr. of Cells	Fluorescence
6. 10. 2009	1,14	12
9. 10. 2009	6,575	44
12. 10. 2009	11,615	87
Variables		
Slope	7,143 ± 0,7618	
Y-intercept	1,640 ± 5,892	
X-intercept	-0,2296	
1/slope	0,14	
95 % Confidence Intervals		
Slope	-2,536 to 16,82	
Y-intercept	-73,22 to 76,50	
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,9888	
Sy.x	5,644	
Is slope significantly non-zero?		
F	87,92	
DFn, DFd	1,000, 1,000	
P value	0,0676	
Deviation from zero?	Not Significant	



**Priloga A3****Meritve fluorometričnega odziva v medijih z OTC in TMP – test z *A. flos-aquae***

Conc.	Time	Fluorometry OTC			Mean	Std. Dev.	CV %
		Replicate					
		1	2	3			
Control	t0	2,88	3,13	1,75	2,585	0,734	28,41
	t24	11,13	13,25	10,75	11,708	1,348	11,52
	t48	17,75	18,25	19,88	18,625	1,111	5,97
	t72	39,00	39,50	39,88	39,458	0,439	1,11
1,600	t0	5,88	2,00	3,00	3,625	2,012	55,49
	t24	5,75	3,38	5,25	4,792	1,252	26,13
	t48	14,00	17,50	14,13	15,208	1,986	13,06
	t72	36,50	38,38	40,38	38,417	1,938	5,04
3,100	t0	5,00	3,25	4,38	4,208	0,887	21,07
	t24	3,00	1,38	1,88	2,083	0,832	39,95
	t48	7,25	9,50	3,75	6,833	2,898	42,40
	t72	7,50	7,13	7,63	7,418	0,257	3,47
6,350	t0	2,00	0,38	4,00	2,125	1,816	85,45
	t24	3,00	3,75	2,50	3,083	0,629	20,40
	t48	3,63	5,38	3,00	4,000	1,231	30,78
	t72	4,50	7,13	8,38	6,667	1,978	29,67
12,650	t0	3,13	2,00	4,38	3,168	1,191	37,58
	t24	2,25	1,25	0,13	1,208	1,063	87,98
	t48	1,88	1,63	5,75	3,087	2,310	74,83
	t72	3,38	2,88	5,13	3,797	1,181	31,12
25,300	t0	3,75	2,88	3,25	3,292	0,439	13,34
	t24	1,01	1,38	2,75	1,710	0,919	53,77
	t48	3,13	5,00	4,75	4,292	1,018	23,72
	t72	5,50	5,00	5,88	5,458	0,439	8,04

Conc.	Time	Fluorometry TMP			Mean	Std. Dev.	CV %
		Replicate					
		1	2	3			
Control	t0	2,88	3,13	1,75	2,585	0,734	28,41
	t24	11,13	13,25	10,75	11,708	1,348	11,52
	t48	17,75	18,25	19,88	18,625	1,111	5,97
	t72	39,00	39,50	39,88	39,458	0,439	1,11
95,000	t0	11,88	9,88	8,75	10,167	1,583	15,57
	t24	14,00	12,00	10,88	12,292	1,583	12,88
	t48	35,63	37,50	39,50	37,542	1,938	5,16
	t72	54,13	52,25	65,63	57,333	7,242	12,63
127,000	t0	13,25	12,38	6,25	10,625	3,814	35,90
	t24	26,25	22,13	17,25	21,875	4,505	20,60
	t48	30,25	32,13	33,00	31,792	1,405	4,42
	t72	48,88	48,13	53,75	50,250	3,054	6,08
169,000	t0	13,50	11,75	8,38	11,208	2,605	23,24
	t24	19,88	13,38	18,50	17,250	3,426	19,86
	t48	27,75	16,63	24,88	23,083	5,775	25,02
	t72	53,63	44,25	53,50	50,458	5,377	10,66
225,000	t0	8,63	7,13	11,13	8,958	2,021	22,56
	t24	15,25	15,00	12,13	14,125	1,737	12,29
	t48	19,25	26,13	19,13	21,500	4,006	18,63
	t72	52,25	55,13	45,13	50,833	5,148	10,13
300,000	t0	8,13	10,63	9,50	9,417	1,252	13,30
	t24	10,63	11,75	8,25	10,208	1,787	17,50
	t48	12,38	9,25	10,88	10,833	1,563	14,43
	t72	26,75	20,75	26,13	24,542	3,299	13,44

**Priloga A4****Izračun rezultatov za testiranje strupenosti OTC in TMP na *A. flos-aquae***

Start Date:	6. 10. 2009		Test ID:	061009oxy	Sample ID:		FLUORESCENCE
End Date:	9. 10. 2009		Lab ID:	ZZV MB	Sample Type:		OXY
Sample Date:			Protocol:	OECD 201	Test Species:		<i>A. flos-aquae</i>
Comments:							
<b>Conc-mg/L</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
B-Control	0,0362	0,0352	0,0434				
1,6	0,0254	0,0410	0,0361				
3,1	0,0056	0,0109	0,0077				
6,35	0,0113	0,0407	0,0103				
12,65	0,0011	0,0051	0,0022				
25,3	0,0053	0,0077	0,0082				

Conc-mg/L	Mean	N-Mean	Mean	Min	Transform:		CV %	N
					Untransformed	Max		
B-Control	0,0383	1,0000	0,0383	0,0352		0,0434	11,713	3
1,6	0,0342	0,8927	0,0342	0,0254		0,0410	23,462	3
3,1	0,0081	0,2112	0,0081	0,0056		0,0109	32,906	3
6,35	0,0208	0,5422	0,0208	0,0103		0,0407	83,370	3
12,65	0,0028	0,0725	0,0028	0,0011		0,0051	74,247	3
25,3	0,0071	0,1848	0,0071	0,0053		0,0082	21,841	3

Auxiliary Tests	Statistic	Critical	Skew	Kurt
Shapiro-Wilk's Test indicates normal distribution ( $p > 0,01$ )	0,886939	0,858	1,183077	3,612825
Bartlett's Test indicates equal variances ( $p = 0,02$ )	13,43091	15,08627		

Point	mg/L	SD	95 % CL (Exp)		Skew
IC01*	0,149	0,581	0,000	2,554	1,4235
IC05*	0,745	0,567	0,000	3,092	0,3267
IC10*	1,491	0,486	0,000	3,502	-0,3642
IC15	1,724	0,406	0,044	3,404	-0,8085
IC20	1,869	0,350	0,421	3,318	-0,8230
IC25	2,015	0,319	0,694	3,335	-0,5222
IC40	2,451	1,101	0,000	7,010	3,6502
IC50	2,742	1,855	0,000	10,423	1,8433
IC60	3,032	2,709	0,000	14,249	0,8608
IC75	10,767	4,575	0,000	29,714	0,2329
IC80	12,511				
IC85	>25,3				
IC90	>25,3				
IC95	>25,3				
IC99	>25,3				

\*Indicates IC estimate less than the lowest concentration

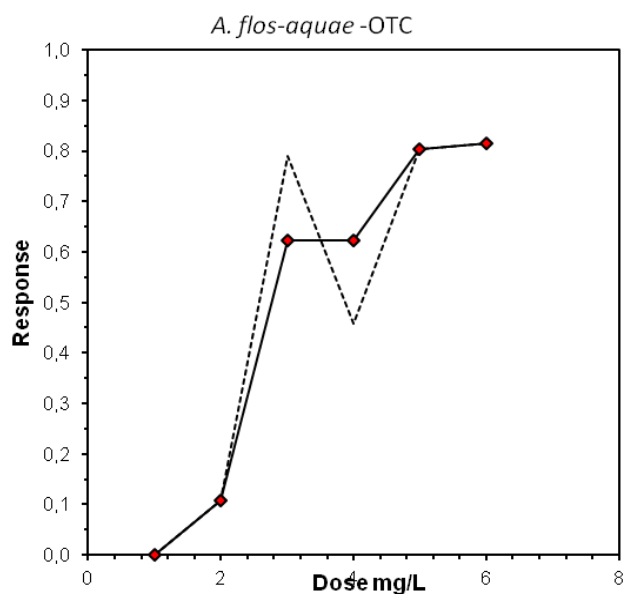
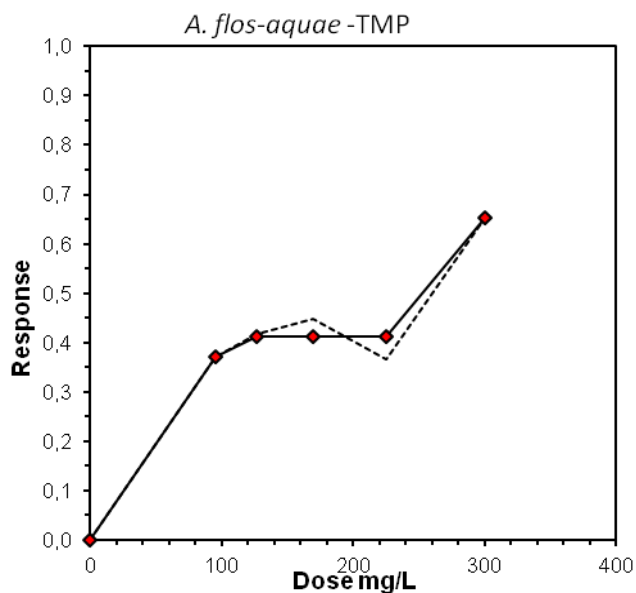
Start Date:	6. 10. 2009		Test ID:	061009oxy	Sample ID:		FLUORESCENCE
End Date:	9. 10. 2009		Lab ID:	ZZV MB	Sample Type:		TMP
Sample Date:			Protocol:	OECD 201	Test Species:		<i>A. flos-aquae</i>
Comments:							
<b>Conc-mg/L</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
B-Control	0,0362	0,0352	0,0434				
95	0,0211	0,0231	0,0280				
127	0,0181	0,0189	0,0299				
169	0,0192	0,0184	0,0258				
225	0,0250	0,0284	0,0194				
300	0,0165	0,0093	0,0141				

Conc-mg/L	Transform: Untransformed							Isotonic	
	Mean	N-Mean	Mean	Min	Max	CV %	N	Mean	N-Mean
B-Control	0,0383	1,0000	0,0383	0,0352	0,0434	11,694	3	0,0383	1,0000
95	0,0241	0,6286	0,0241	0,0211	0,0280	14,753	3	0,0241	0,6286
127	0,0223	0,5823	0,0223	0,0181	0,0299	29,544	3	0,0226	0,5895
169	0,0211	0,5514	0,0211	0,0184	0,0258	19,140	3	0,0226	0,5895
225	0,0243	0,6346	0,0243	0,0194	0,0284	18,638	3	0,0226	0,5895
300	0,0133	0,3474	0,0133	0,0093	0,0165	27,707	3	0,0133	0,3474

Auxiliary Tests	Statistic	Critical	Skew	Kurt
Shapiro-Wilk's Test indicates normal distribution ( $p > 0,01$ )	0,906883	0,858	0,526268	-1,10167
Bartlett's Test indicates equal variances ( $p = 0,02$ )	0,944533	15,08627		

Point	mg/L	SD	95 % CL (Exp)		Skew
IC01*	2,56	0,46	0,67	4,44	1,1926
IC05*	12,79	2,28	3,36	22,22	1,1926
IC10*	25,58	4,56	6,71	44,45	1,1926
IC15*	38,37	6,83	10,07	66,67	1,1926
IC20*	51,16	9,11	13,42	88,89	1,1926
IC25*	63,95	11,73	15,36	112,53	1,4586
IC40	118,38	59,68	0,00	365,54	0,3852
IC50	252,72	15,93	186,73	318,70	-2,1290
IC60	283,70				
IC75	>300				
IC80	>300				
IC85	>300				
IC90	>300				
IC95	>300				
IC99	>300				

\*Indicates IC estimate less than the lowest concentration



Krivulja razmerja koncentracije in učinka na *A. flos-aquae* po izpostavljenosti mediju z OTC oziroma TMP.

## Priloga A5

### Validacija testov strupenosti z OTC in TMP na *A. flos-aquae*

#### Validacija testa z OTC

<b>Biomass of the control cultures should have increased exponentially by a factor of at least 16 within 72 hours,</b>			
<b>this corresponds to a specific growth rate of 0,92 day<sup>-1</sup>.</b>			
<b>Mean coefficient of variation of daily specific growth rate (<math>\mu</math>) in replicate control cultures must not exceed 35 %</b>			
<b>CV % of average specific growth rates (<math>\mu</math>) for control during the whole test (must be &lt;7 %)</b>			

	Replicate			Mean $\mu$	Std. Dev.	CV %	2. Mean CV %													
	1	2	3																	
$\mu$ (0-1)	1,35	1,44	1,82	1,54	0,25	15,94	<b>35,89</b>													
$\mu$ (1-2)	0,47	0,32	0,61	0,47	0,15	31,50														
$\mu$ (2-3)	0,79	0,77	0,70	0,75	0,05	6,48														
	<table border="1"> <tr> <td></td> <td>Average</td> <td>0,92</td> </tr> <tr> <td>1.</td> <td>Antilogarithm</td> <td>2,5</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Expon. growth</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>3 d</td> <td>16</td> </tr> </table>				Average	0,92	1.	Antilogarithm	2,5		Expon. growth			3 d	16					
	Average	0,92																		
1.	Antilogarithm	2,5																		
	Expon. growth																			
	3 d	16																		
	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3"><math>\mu</math> (0-3) = 72 h in replicate</th> <th rowspan="2">Mean <math>\mu</math> (0-3)</th> <th rowspan="2">Std. Dev.</th> <th rowspan="2">3. CV %</th> </tr> <tr> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,87</td> <td>0,85</td> <td>1,04</td> <td>0,92</td> <td>0,11</td> <td><b>11,69</b></td> </tr> </tbody> </table>			$\mu$ (0-3) = 72 h in replicate			Mean $\mu$ (0-3)	Std. Dev.	3. CV %	1	2	3	0,87	0,85	1,04	0,92	0,11	<b>11,69</b>		
$\mu$ (0-3) = 72 h in replicate			Mean $\mu$ (0-3)	Std. Dev.	3. CV %															
1	2	3																		
0,87	0,85	1,04	0,92	0,11	<b>11,69</b>															



**Validacija testa s TMP**

<b>Biomass of the control cultures should have increased exponentially by a factor of at least 16 within 72 hours,</b>			
<b>this corresponds to a specific growth rate of 0,92 day<sup>-1</sup>.</b>			
<b>Mean coefficient of variation of daily specific growth rate (<math>\mu</math>) in replicate control cultures must not exceed 35 %</b>			
<b>CV % of average specific growth rates (<math>\mu</math>) for control during the whole test (must be &lt;7 %)</b>			

	Replicate			Mean $\mu$	Std. Dev.	CV %	2. Mean CV % <b>35,89</b>
	1	2	3				
$\mu$ (0-1)	1,35	1,44	1,82	1,54	0,25	15,94	
$\mu$ (1-2)	0,47	0,32	0,61	0,47	0,15	31,50	
$\mu$ (2-3)	0,79	0,77	0,70	0,75	0,05	6,48	

	Average	0,92
1.	Antilogarithm	2,5
	Expon. growth	
	3 d	16

$\mu$ (0-3) = 72 h in replicate			Mean $\mu$ (0-3)	Std. Dev.	3. CV % <b>11,69</b>
1	2	3			
0,87	0,85	1,04	0,92	0,11	

## Priloga B1

### Priprava testnega medija za zelene alge po tehničnem navodilu OECD

Nutrient	Concentration in stock solution
Stock solution 1: macro nutrients	
NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g/L
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,2 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,8 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16 g/L
Stock solution 2: iron	
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	64 mg/L
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	100 mg/L
Stock solution 3: trace elements	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185 mg/L
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	415 mg/L
ZnCl <sub>2</sub>	3 mg/L
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,5 mg/L
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7 mg/L
Stock solution 4: bicarbonate	
NaHCO <sub>3</sub>	50 g/L
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	

Sterilize the stock solutions by membrane filtration (mean pore diameter 0.2 μm) or by autoclaving (120 °C, 15 min). Store the solutions in the dark at 4 °C.

Do not autoclave stock solutions 2 and 4, but sterilize them by membrane filtration.

Prepare a growth medium by adding an appropriate volume of the stock solutions 1–4 to water:

Add to 500 ml of sterilized water:

- 10 ml of stock solution 1
- 1 ml of stock solution 2
- 1 ml of stock solution 3
- 1 ml of stock solution 4

Make up to 1 000 ml with sterilized water.

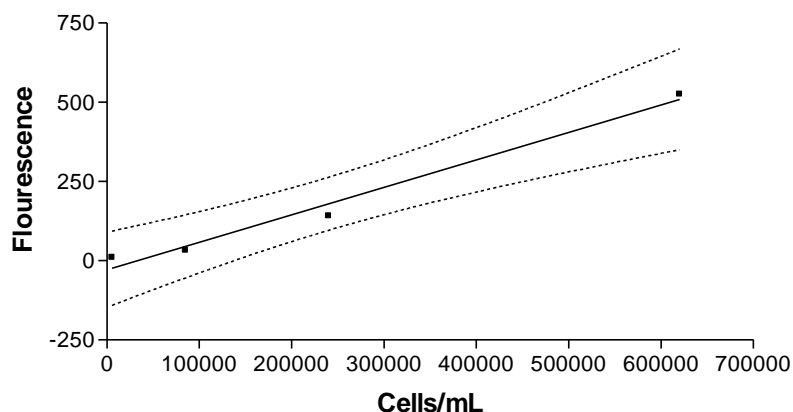
Allow sufficient time for equilibrating the medium with the atmospheric CO<sub>2</sub>, if necessary by bubbling with sterile, filtered air for some hours.

## Priloga B2

### Validacija surogatne meritve (fluorometrije) za *P. subcapitata*

Validacija s pomočjo prešteti celic		
Date	Nr. of cells (cells/ml)	Fluorescence
24. 11. 2009	5600	10
25. 11. 2009	85000	33
26. 11. 2009	240000	141
27. 11. 2009	620000	525
	Fluorescence	
Variables		
Slope	0,0008673 ± 0,00008227	
Y-intercept	-28,86 ± 27,57	
X-intercept	33280	
1/slope	1153	
95 % Confidence Intervals		
Slope	0,0005133 to 0,001221	
Y-intercept	-147,5 to 89,78	
Goodness of Fit		
r <sup>2</sup>	0,9823	
Sy.x	38,88	
Is slope significantly non-zero?		
F	111,1	
DFn, DFd	1,000, 2,000	
P value	0,0089	
Deviation from zero?	Significant	

**Flourescence - cell count**



**Priloga B3****Meritve fluorometričnega odziva v medijih z OTC in TMP – test s *P. subcapitata***

		Fluorescenceometry			Mean	Std. Dev.	CV %
Conc.	Time	OTC					
		Replicate					
		1	2	3			
Control	t0	10,000	10,000	10,000	10,000	0,000	0,00
	t24	33,000	30,000	28,000	30,333	2,517	8,30
	t48	141,000	126,000	136,000	134,333	7,638	5,69
	t72	525,000	418,000	511,000	484,667	58,158	12,00
0,120	t0	8,000	9,000	9,000	8,667	0,577	6,66
	t24	34,000	33,000	35,000	34,000	1,000	2,94
	t48	180,000	155,000	173,000	169,333	12,897	7,62
	t72	812,000	639,000	480,000	643,667	166,049	25,80
0,370	t0	9,000	11,000	8,000	9,333	1,528	16,37
	t24	33,000	26,000	27,000	28,667	3,786	13,21
	t48	111,000	98,000	98,000	102,333	7,506	7,33
	t72	392,000	539,000	516,000	482,333	79,072	16,39
1,120	t0	10,000	9,000	9,000	9,333	0,577	6,19
	t24	26,000	25,000	27,000	26,000	1,000	3,85
	t48	28,000	23,000	31,000	27,333	4,041	14,79
	t72	58,000	60,000	51,000	56,333	4,726	8,39
3,370	t0	8,000	11,000	12,000	10,333	2,082	20,15
	t24	23,000	24,000	25,000	24,000	1,000	4,17
	t48	20,000	21,000	21,000	20,667	0,577	2,79
	t72	19,000	25,000	21,000	21,667	3,055	14,10
10,100	t0	8,000	9,000	10,000	9,000	1,000	11,11
	t24	22,000	26,000	24,000	24,000	2,000	8,33
	t48	11,000	14,000	14,000	13,000	1,732	13,32
	t72	7,000	8,000	8,000	7,667	0,577	7,53

<b>Fluorescenceometry</b>							
<b>TMP</b>							
<b>Conc.</b>	<b>Time</b>	<b>Replicate</b>			<b>Mean</b>	<b>Std. Dev.</b>	<b>CV %</b>
		1	2	3			
Control	t0	9,000	12,000	12,000	11,000	1,732	15,75
	t24	19,000	19,000	17,000	18,333	1,155	6,30
	t48	84,000	78,000	81,000	81,000	3,000	3,70
	t72	470,000	485,000	456,000	470,333	14,503	3,08
21,100	t0	11,000	10,000	10,000	10,333	0,577	5,59
	t24	23,000	22,000	18,000	21,000	2,646	12,60
	t48	109,000	87,000	100,000	98,667	11,060	11,21
	t72	583,000	496,000	507,000	528,667	47,374	8,96
44,200	t0	13,000	14,000	11,000	12,667	1,528	12,06
	t24	21,000	18,000	21,000	20,000	1,732	8,66
	t48	112,000	90,000	102,000	101,333	11,015	10,87
	t72	429,000	408,000	495,000	444,000	45,398	10,22
88,300	t0	12,000	9,000	11,000	10,667	1,528	14,32
	t24	22,000	18,000	20,000	20,000	2,000	10,00
	t48	72,000	79,000	80,000	77,000	4,359	5,66
	t72	289,000	297,000	324,000	303,333	18,339	6,05
176,500	t0	11,000	13,000	12,000	12,000	1,000	8,33
	t24	17,000	15,000	15,000	15,667	1,155	7,37
	t48	15,000	15,000	18,000	16,000	1,732	10,83
	t72	16,000	16,000	16,000	16,000	0,000	0,00
353,000	t0	13,000	11,000	13,000	12,333	1,155	9,36
	t24	9,000	9,000	8,000	8,667	0,577	6,66
	t48	6,000	5,000	7,000	6,000	1,000	16,67
	t72	7,000	6,000	7,000	6,667	0,577	8,66

**Priloga B4****Izračun rezultatov za testiranje strupenosti OTC in TMP za *P. subcapitata***

Start Date:	24. 11. 2009		Test ID:	24112009	Sample ID:		FLUORESCENCE		
End Date:	27. 11. 2009		Lab ID:	ZZV MB	Sample Type:		OTC		
Sample Date:			Protocol:	OECD 201	Test Species:		<i>P. subcapitata</i>		
Comments:									
<b>Conc-mg/L</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>						
B-Control	0,0550	0,0548	0,0546						
0,12	0,0602	0,0592	0,0552						
0,37	0,0524	0,0541	0,0579						
1,12	0,0244	0,0263	0,0241						
3,37	0,0120	0,0114	0,0078						
10,1	0,0000	0,0000	0,0000						
					<b>Transform: Untransformed</b>		<b>Isotonic</b>		
<b>Conc-mg/L</b>	<b>Mean</b>	<b>N-Mean</b>	<b>Mean</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>CV %</b>	<b>N</b>	<b>Mean</b>	<b>N-Mean</b>
B-Control	0,0548	1,0000	0,0548	0,0546	0,0550	0,342	3	0,0565	1,0000
0,12	0,0582	1,0620	0,0582	0,0552	0,0602	4,542	3	0,0565	1,0000
0,37	0,0548	0,9992	0,0548	0,0524	0,0579	5,108	3	0,0548	0,9691
1,12	0,0250	0,4551	0,0250	0,0241	0,0263	4,892	3	0,0250	0,4414
3,37	0,0104	0,1896	0,0104	0,0078	0,0120	22,054	3	0,0104	0,1839
10,1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,000	3	0,0000	0,0000
<b>Auxiliary Tests</b>					<b>Statistic</b>	<b>Critical</b>	<b>Skew</b>	<b>Kurt</b>	
Shapiro-Wilk's Test indicates normal distribution ( $p > 0,01$ )					0,960912	0,858	-0,207	0,022184	
Equality of variance cannot be confirmed									

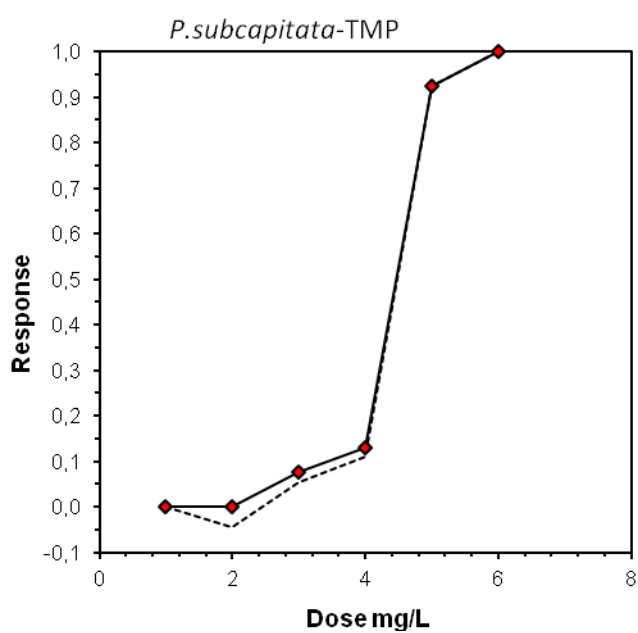
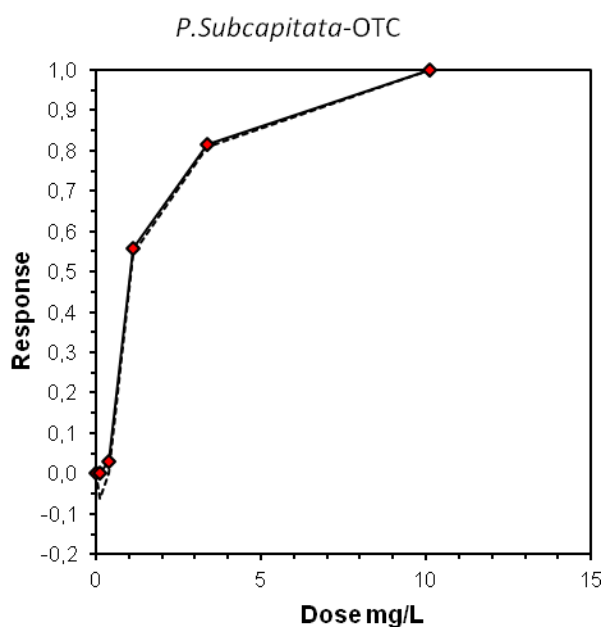
Point	mg/L	SD	95 % CL (Exp)		Skew
IC01	0,2010	0,0869	0,0000	0,5611	0,7698
IC05	0,3972	0,0431	0,2189	0,5755	-0,9632
IC10	0,4683	0,0293	0,3471	0,5894	-0,3357
IC15	0,5393	0,0265	0,4296	0,6491	-0,3291
IC20	0,6104	0,0239	0,5116	0,7092	-0,3188
IC25	0,6815	0,0214	0,5929	0,7701	-0,3012
IC40	0,8946	0,0158	0,8293	0,9600	-0,1126
IC50	1,0368	0,0147	0,9760	1,0975	0,2183
IC60	1,4820	0,0821	1,1422	1,8218	0,2630
IC75	2,7927	0,1206	2,2932	3,2921	-0,1975
IC80	3,2295	0,2154	2,3376	4,1215	0,6957
IC85	4,6114	0,5439	2,3590	6,8638	-0,6451
IC90	6,4409	0,4012	4,7795	8,1023	-1,1097
IC95	8,2705	0,2006	7,4398	9,1012	-1,1097
IC99	9,7341	0,0401	9,5680	9,9002	-1,1097

Start Date:	24. 11. 2009		Test ID:	201009/2	Sample ID:		FLUORESCENCE
End Date:	27. 11. 2009		Lab ID:	ZZV MB	Sample Type:		TMP
Sample Date:			Protocol:	OECD 201	Test Species:		<i>P. subcapitata</i>
Comments:							
<b>Conc-mg/L</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
B-Control	0,0549	0,0514	0,0505				
21,1	0,0551	0,0542	0,0545				
44,2	0,0486	0,0468	0,0529				
88,3	0,0442	0,0486	0,0470				
176,5	0,0052	0,0029	0,0040				
353	0,0000	0,0000	0,0000				

Conc-mg/L	Transform: Untransformed							Isotonic	
	Mean	N-Mean	Mean	Min	Max	CV %	N	Mean	N-Mean
B-Control	0,0523	1,0000	0,0523	0,0505	0,0549	4,479	3	0,0535	1,0000
21,1	0,0546	1,0450	0,0546	0,0542	0,0551	0,859	3	0,0535	1,0000
44,2	0,0494	0,9454	0,0494	0,0468	0,0529	6,288	3	0,0494	0,9246
88,3	0,0466	0,8909	0,0466	0,0442	0,0486	4,756	3	0,0466	0,8714
176,5	0,0040	0,0770	0,0040	0,0029	0,0052	28,810	3	0,0040	0,0754
353	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,000	3	0,0000	0,0000

Auxiliary Tests	Statistic	Critical	Skew	Kurt
Shapiro-Wilk's Test indicates normal distribution ( $p > 0,01$ )	0,956913	0,858	0,490603	0,257572
Equality of variance cannot be confirmed				

Point	mg/L	SD	95 % CL (Exp)		Skew
IC01	24,16	3,78	8,49	39,83	3,8482
IC05	36,41	7,97	3,42	69,41	1,2058
IC10	64,56	16,59	0,00	133,28	-0,0715
IC15	90,67	5,69	67,08	114,25	-2,8438
IC20	96,21	2,38	86,37	106,04	-0,4335
IC25	101,75	2,22	92,56	110,94	-0,4476
IC40	118,37	1,78	111,01	125,73	-0,4797
IC50	129,45	1,52	123,16	135,74	-0,4695
IC60	140,53	1,31	135,10	145,95	-0,3946
IC75	157,15	1,15	152,39	161,90	-0,1377
IC80	162,69	1,15	157,94	167,44	-0,0564
IC85	168,23	1,17	163,37	173,09	-0,0034
IC90	173,77	1,23	168,69	178,85	0,0192
IC95	235,88	19,52	155,05	316,71	-0,6341
IC99	329,58	3,90	313,41	345,74	-0,6341



Krivulja razmerja koncentracije in učinka na *P. subcapitata* po izpostavljenosti mediju z OTC oziroma TMP.



## Priloga B5

### Validacija testov strupenosti OTC in TMP za *P. subcapitata*

#### Validacija testa z OTC

<b>Biomass of the control cultures should have increased exponentially by a factor of at least 16 within 72 hours,</b>			
<b>this corresponds to a specific growth rate of 0,92 day<sup>-1</sup>.</b>			
<b>Mean coefficient of variation of daily specific growth rate (<math>\mu</math>) in replicate control cultures must not exceed 35 %</b>			
<b>CV % of average specific growth rates (<math>\mu</math>) for control during the whole test (must be &lt;7 %)</b>			

	Replicate			Mean $\mu$	Std. Dev.	CV %	2. Mean CV % <b>8,26</b>
	1	2	3				
$\mu$ (0-1)	1,10	1,10	1,03	1,08	0,04	3,70	
$\mu$ (1-2)	1,55	1,44	1,58	1,52	0,08	5,01	
$\mu$ (2-3)	1,31	1,20	1,32	1,28	0,07	5,43	
	Average			1,29			
	1. Antilogarithm			3,6			
	Expon. growth						
	3 d			48			
	$\mu$ (0-3) = 72 h in replicate			Mean $\mu$ (0-3)	Std. Dev.	CV %	3. <b>3,21</b>
	1	2	3				
	1,32	1,24	1,31	1,29	0,04		

### Validacija testa s TMP

<b>Biomass of the control cultures should have increased exponentially by a factor of at least 16 within 72 hours,</b>			
<b>this corresponds to a specific growth rate of 0,92 day<sup>-1</sup>.</b>			
<b>Mean coefficient of variation of daily specific growth rate (<math>\mu</math>) in replicate control cultures must not exceed 35 %</b>			
<b>CV % of average specific growth rates (<math>\mu</math>) for control during the whole test (must be &lt;7 %)</b>			

Replicate							2. Mean CV % <b>21,00</b>
	1	2	3	Mean $\mu$	Std. Dev.	CV %	
$\mu$ (0-1)	0,64	0,46	0,46	0,52	0,10	19,65	
$\mu$ (1-2)	1,60	1,41	1,45	1,49	0,10	6,59	
$\mu$ (2-3)	1,72	1,83	1,73	1,76	0,06	3,37	
	Average			1,25			
	1. Antilogarithm			3,5			
	Expon. growth						
	3 d.			43			
	$\mu$ (0-3) = 72h in replicate			Mean $\mu$ (0-3)	Std. Dev.	3. CV %	
	1	2	3				
	1,32	1,23	1,21	1,25	0,06	<b>4,48</b>	

## Priloga C1

### Sestava mineralnega medija za test biorazgradljivosti

a/ Potassium dihydrogen orthophosphate,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  . . . . . 8,5 g

Dipotassium hydrogen orthophosphate,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  . . . . . 21,75 g

Disodium hydrogen orthophosphate dihydrate,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  . . . . . 33,4 g

Ammonium chloride,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  . . . . . 0,5 g

Dissolve in water and make up to 1 litre.

The pH of the solution should be 7,4.

b/ Calcium chloride, anhydrous,  $\text{CaCl}_2$  . . . . . 27,5 g

or Calcium chloride dihydrate,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  . . . . . 36,4 g

Dissolve in water and make up to 1 litre.

c/ Magnesium sulphate heptahydrate,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  . . . . . 22,5 g

Dissolve in water and make up to 1 litre.

(d) Iron (III) chloride hexahydrate,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  . . . . . 0,25 g

Dissolve in water and make up to 1 litre.

Add one drop of concentrated HCl or add 0,4 g ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA, disodium salt) per litre.

Mix 10 ml of solution (a) with 800 ml water, add 1 ml of solutions (b), (c) and (d) and make up to 1 litre.

Po OECD 302 B "Zahn-Wellens/EMPA Test" (OECD, 1992), priloga C

## Priloga D1

### Sestava in priprava razredčevalne vode za test strupenosti na vodnih bolhah

Stock solutions (single substance)		To prepare the reconstituted water, add the following volumes of stock solutions to 1 litre water*
Substance	Amount added to 1 litre water*	
Calcium chloride CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	11,76 g	25 ml
Magnesium sulfate MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	4,93 g	25 ml
Sodium bicarbonate NaHCO <sub>3</sub>	2,59 g	25 ml
Potassium chloride KCl	0,23 g	25 ml

\*Water of suitable purity, for example deionised, distilled or reverse osmosis with conductivity preferably not exceeding 10  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Po OECD TG 202 “*Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test” (OECD, 2004)

## Priloga D2

### Testni protokol in izvedba testa strupenosti na vodnih bolhah *D. magna* z OTC in TMP

Substance tested	OTC	
CAS:	6153-64-6	
Date of the beginning	14. 10. 2009	
Temperature (°C)	20 ± 1°C	
Oxygen concentration (mgO <sub>2</sub> /l) at the beginning and at the end	5,6 / 6,4	
pH at the beginning and at the end	6,4 / 7,1	
Dilution serial	%	Unit mg/L
C1	100	234
C2	50	117
C3	25	59
C4	12,5	29
C5	6,3	15

Number of exposed organisms per concentration: 40

Number of immobile organisms

	Control		C5		C4		C3		C2		C1	
Time	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<b>A</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<b>B</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
<b>C</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>D</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2
<b>Sum</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	5

24 h EC<sub>50</sub>...../.....

48 h EC<sub>50</sub>... 669 mg/L

Substance tested	TMP	
CAS:	738-70-5	
Date of the beginning	14. 10. 2009	
Temperature (°C)	20 ± 1°C	
Oxygen concentration (mgO <sub>2</sub> /l) at the beginning and at the end	6,1 / 6,2	
pH at the beginning and at the end	8,2 / 7,6	
Dilution serial	%	Unit mg/L
C1	100	320
C2	50	160
C3	25	80
C4	12,5	40
C5	6,3	20

Number of exposed organisms per concentration: 40

Number of immobile organisms

	Control		C5		C4		C3		C2		C1	
Time	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<b>A</b>	0	0	0	0	0	0	3	4	8	10	10	10
<b>B</b>	0	0	0	0	0	0	3	3	6	8	10	10
<b>C</b>	0	0	0	0	0	0	0	2	6	9	10	10
<b>D</b>	0	0	0	0	0	0	1	1	7	10	10	10
<b>Sum</b>	0	0	0	0	0	0	7	10	27	37	40	40

24 h EC<sub>50</sub>...../.....

48 h EC<sub>50</sub>...100 mg/L

### Priloga D3

#### Statistična analiza rezultatov testa strupenosti na vodnih bolhah z OTC in TMP

Uporabljeni program za izračun rezultatov: EPA probit analysis program for calculating LC/EC value Version 1.

Statistična analiza rezultatov testa z OTC

Conc. (mg/L)	Number Exposed	Proportion			
		Observed Number Resp.	Responding Proportion	Predicted Adjusted for Controls	Proportion Responding
15,0000	40	0	0,0000	0,0000	0,0000
29,0000	40	0	0,0000	0,0000	0,0005
59,0000	40	0	0,0000	0,0000	0,0055
117,0000	40	2	0,0500	0,0500	0,0338
234,0000	40	5	0,1250	0,1250	0,1355

Chi – Square for Heterogeneity (calculated) = 0,599

Chi – Square for Heterogeneity

(tabular value at 0,05 level) = 7,815

Mu = 2,825146

Sigma = 0,414228

Parameter Estimate Std. Err. 95 % Confidence Limits

-----  
 Intercept -1,820266 2,188509 (-6,109744, 2,469212)  
 Slope 2,414129 0,975795 (0,501570, 4,326687)

#### Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	95 % Confidence Limits		
	Exposure Conc. (mg/L)	Lower	Upper
LC/EC 1,00	72,699	2,512	117,274
LC/EC 5,00	139,246	46,331	208,608
LC/EC 10,00	196,912	126,379	491,840
LC/EC 15,00	248,794	171,397	1273,594
LC/EC 50,00	668,569	343,535	128502,484
LC/EC 85,00	1796,603	612,366	14578681,000
LC/EC 90,00	2269,974	700,056	44785000,000
LC/EC 95,00	3210,037	852,760	236445280,000
LC/EC 99,00	6148,443	1232,131	5369357312,000

Statistična analiza rezultatov testa s TMP

Conc. (mg/L)	Proportion				
	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion	Responding Proportion	Predicted Proportion
20,0000	40	0	0,0000	0,0000	0,0000
40,0000	40	0	0,0000	0,0000	0,0021
80,0000	40	10	0,2500	0,2500	0,2420
160,0000	40	37	0,9250	0,9250	0,9287
320,0000	40	40	1,0000	1,0000	0,9999

Chi – Square for Heterogeneity (calculated) = 0,111

Chi – Square for Heterogeneity

(tabular value at 0,05 level) = 7,815

Mu = 2,000361

Sigma = 0,138955

Parameter Estimate Std. Err. 95 % Confidence Limits

-----  
 Intercept -9,395798 2,214102 (-13,735438, -5,056157)  
 Slope 7,196599 1,104698 (5,031392, 9,361806)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc. (mg/L)	95 % Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1,00	47,546	33,731	57,849
LC/EC 5,00	59,128	45,661	69,022
LC/EC 10,00	66,417	53,510	76,052
LC/EC 15,00	71,837	59,443	81,354
LC/EC 50,00	100,083	89,361	112,207
LC/EC 85,00	139,436	122,960	169,081
LC/EC 90,00	150,815	131,499	187,872
LC/EC 95,00	169,406	144,859	220,219
LC/EC 99,00	210,674	172,794	298,184



## **Priloga E1**

### **Izotonična raztopina in sintetična odpadna voda za testiranje inhibicije respiracije aktivnega blata**

#### ***Isotonic solution***

5g Sodium chloride (NaCl)

0,12g Magnesium sulphate heptahydrate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

1000 ml Water

#### ***Synthetic sewage feed***

A synthetic sewage feed is made by dissolving the following amounts of substances in

1 litre of water:

16 g peptone

11 g meat extract

3 g urea

0.7 g NaCl

0.4. g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2.8 g  $\text{K}_2 \text{HPO}_4$

Po tehničnih navodilih OECD "Respiration Inhibition Test" (OECD, 2010).

## Priloga E2

### Potek in rezultati inhibicije respiracije aktivnega blata v medijih z OTC in TMP

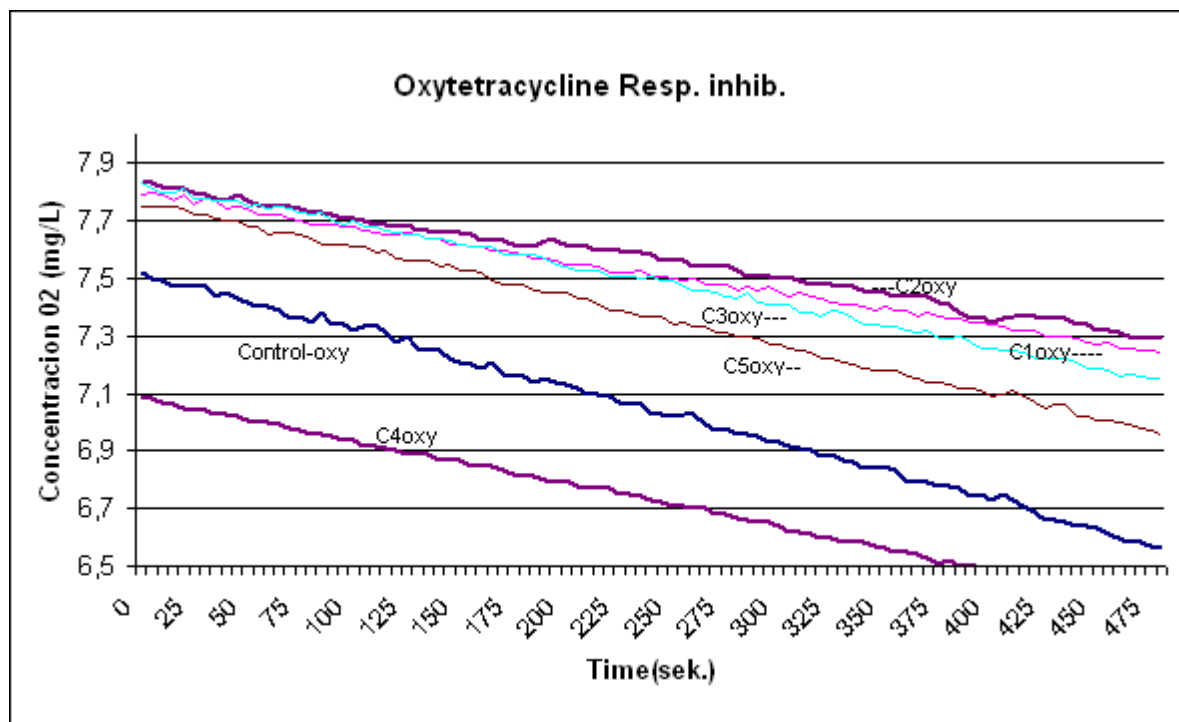
Rezultati meritev v mediju z OTC

% inhibition K	% inhibition C1	% inhibition C2	% inhibition C3	% inhibition C4	% inhibition C5
0	42,71	43,75	29,17	25,00	17,71

Testne koncentracije OTC

C1	15,4	mg/L
C2	7,7	mg/L
C3	3,8	mg/L
C4	1,9	mg/L
C5	1	mg/L

Potek respiracije aktivnega blata v prisotnosti različnih koncentracij OTC in v slepem poskusu



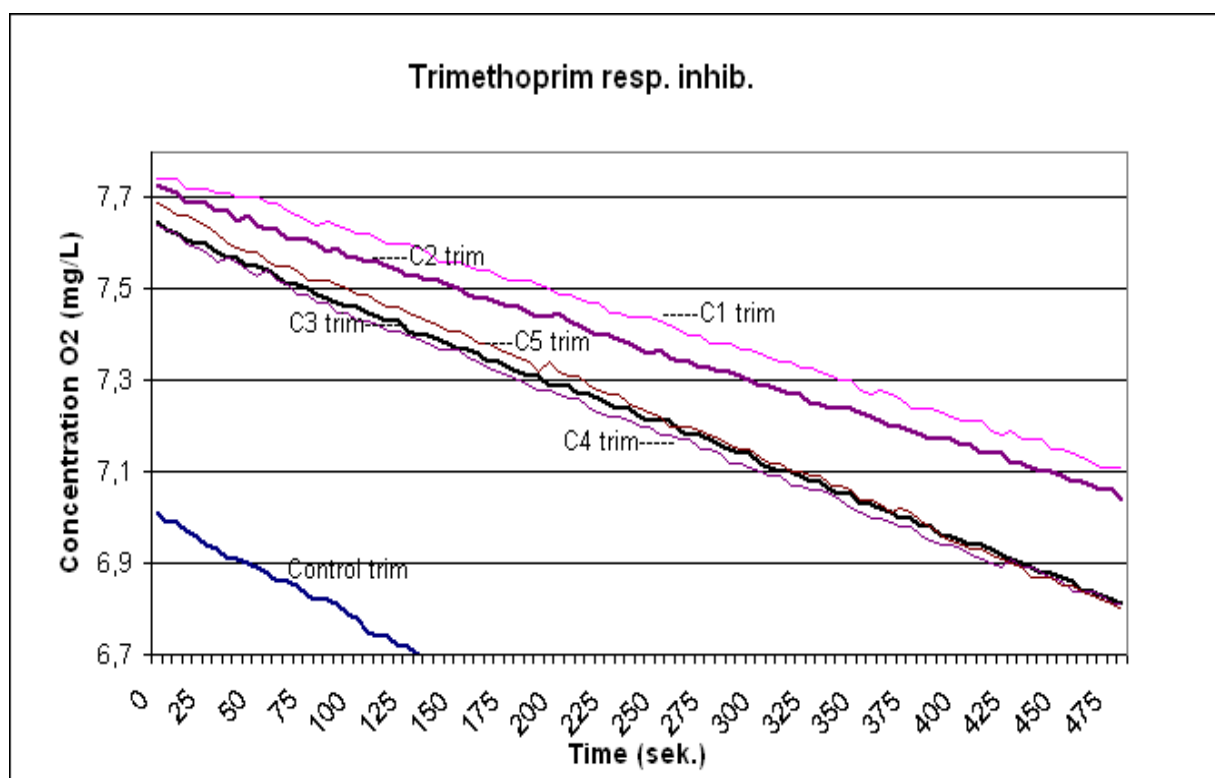
## Rezultati meritev v mediju s TMP

% inhibition K	% inhibition C1	% inhibition C2	% inhibition C3	% inhibition C4	% inhibition C5
0	39,42	33,65	19,23	20,19	14,42

## Testne koncentracije TMP

C1	269,2	mg/L
C2	134,6	mg/L
C3	67,3	mg/L
C4	33,7	mg/L
C5	16,8	mg/L

Potek repiracije aktivnega blata v prisotnosti različnih koncentracij TMP in v slepem poskusu



## Priloga E3

### Statistična analiza rezultatov testa inhibicije respiracije v mediju z OTC in TMP

Statistična analiza rezultatov testa z OTC

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES

Version 1.5

Conc. (mg/L)	Number Exposed	Number Responding	Proportion		
			Observed Proportion	Responding Proportion	Predicted Proportion
0,8000	100	18	0,1771	0,1771	0,1855
1,6000	100	25	0,2500	0,2500	0,2435
3,2000	100	29	0,2917	0,2917	0,3100
6,4000	100	44	0,4375	0,4375	0,3835
12,7000	100	43	0,4271	0,4271	0,4604

Chi – Square for Heterogeneity (calculated) = 1,910

Chi – Square for Heterogeneity

(tabular value at 0,05 level) = 7,815

Mu = 1,253753

Sigma = 1,509885

Parameter Estimate Std. Err. 95 % Confidence Limits

-----

Intercept 4,169637 0,097678 (3,978188, 4,361085)

Slope 0,662302 0,141713 (0,384545, 0,940059)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc. (mg/L)	95 % Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1,00	0,006	0,000	0,038
LC/EC 5,00	0,059	0,003	0,207
LC/EC 10,00	0,208	0,025	0,514
LC/EC 15,00	0,489	0,107	0,963
LC/EC 50,00	17,937	9,915	64,967
LC/EC 85,00	658,563	135,351	29863,426
LC/EC 90,00	1544,618	248,041	128987,195
LC/EC 95,00	5462,131	607,230	1129628,375
LC/EC 99,00	58371,137	3243,323	66391292,000

Statistična analiza rezultatov testa s TMP

Conc (mg/L)	Proportion				
	Number Exposed	Observed Number	Responding Resp.	Responding	Predicted
				Proportion	Adjusted for Proportion
			Responding	Controls	Responding
18,8000	100	14	0,1440	0,1440	0,1392
33,7000	100	20	0,2010	0,2010	0,1822
67,3000	100	19	0,1920	0,1920	0,2428
134,6000	100	34	0,3370	0,3370	0,3131
269,2000	100	39	0,3940	0,3940	0,3909

Chi – Square for Heterogeneity (calculated) = 1,931

Chi – Square for Heterogeneity

(tabular value at 0,05 level) = 7,815

Mu = 2,826974

Sigma = 1,432809

Parameter	Estimate	Std. Err.	95 % Confidence Limits
-----------	----------	-----------	------------------------

-----

Intercept	3,026970	0,294816	(2,449132, 3,604809)
Slope	0,697930	0,151957	(0,400093, 0,995766)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0,0000

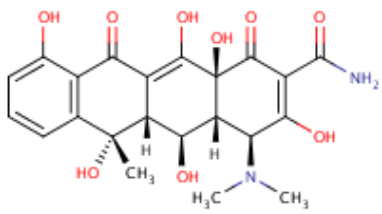
Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure		
	Conc. (mg/L)	Lower	Upper
LC/EC 1,00	0,312	0,005	1,687
LC/EC 5,00	2,952	0,242	8,342
LC/EC 10,00	9,788	1,899	19,919
LC/EC 15,00	21,979	7,430	36,804
LC/EC 50,00	671,389	325,225	3596,790
LC/EC 85,00	20508,641	3758,886	1331195,500
LC/EC 90,00	46053,422	6654,762	5435864,000
LC/EC 95,00	152686,688	15487,369	43783040,000
LC/EC 99,00	1445829,750	75286,828	2197676544,000

**Priloga F1****Poročilo o pripravi okoljskega standarda kakovosti za površinske celinske vode za OTC****Povzetek**

<b>Ime snovi</b>	<b>Oksitetraciklin</b>		
<b>Število CAS</b>	79-57-2 313		
<b>Predlagani okoljski standard kakovosti</b>	<b>Površinske celinske vode</b>		
	<b>LP-OSK</b>	<b>NDK-OSK</b>	
<b>Voda (mg/L)</b>	<b>VF</b>	<b>0,003</b>	<b>0,021</b>
	<b>SSD</b>	<b>0,0018</b>	<b>0,007</b>
<b>Sediment</b>	/		/
<b>Opombe</b>	LP-OSK: SSD izračun na osnovi normalne porazdelitve: JA NDK-OSK: SSD izračun na osnovi normalne porazdelitve: JA		

**Identiteta**

Ime učinkovine	Oksitetraciklin
Število CAS	79-57-2 313
Skupina	Organska snov – farmacevtska učinkovina
Sinonim	OTC
Molekulska formula	C22-H24-N2-O9
Strukturna formula	 <p style="text-align: right;">Source: HSDB</p>

**Fizikalne in kemijske lastnosti učinkovine**

Property	Values	Ref.
Molecular weight (g/mol)	460,43	TOXNET-HSDB
Vapour Pressure mm Hg at 25 °C	$9,7 \times 10^{-25}$	TOXNET-HSDB
Water Solubility (mg/L) at 25 °C	$3,13 \times 10^{+2}$	TOXNET-HSDB
Log Kow	-0,90	TOXNET-HSDB
Henry-coefficient atm-cu m/mol at 25 °C (est)	$1,7 \times 10^{-25}$	TOXNET-HSDB
pKa	9,5 (tertiary amine)	TOXNET-HSDB

**Usoda in obnašanje v okolju**

Characteristic		Ref.
BCF (est)	0,12	TOXNET-HSDB
(Aerobic bio)degradation	Not inherently biodegradable	(Kolar in sod., 2014)

**Rezultati testov po kratkodobni izpostavljenosti OTC (n = 30)**

Taksonomska skupina	Vrsta	Trajanje	Rezultat	Koncentracija (mg/L)	Reference
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena. flos-aquae</i>	3 d	ErC <sub>50</sub>	2,70	(Kolar in sod., 2014)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena flos-aquae</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	0,39	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Mycrocystis aeruginosa</i>	7 d	EC <sub>50</sub>	0,21	(Holten Lutzhöft in sod., 1999)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>M. aeruginosa</i>	7 d	EC <sub>50</sub>	0,23	(Holten Lutzhöft in sod., 1999)
			Geomean	<b>0,22</b>	
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena cylindrica</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	0,032*	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	0,36	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	0,23	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Microcystis wesenbergii</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	0,35	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostoc sp.</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	7	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus leopoldensis</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	1,1	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus sp.</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	2	(Ando in sod., 2007)
<i>Bacteria</i>	<i>Vibrio fisheri</i>	30 min	EC <sub>50</sub>	139,31	(Laumera, G. in sod., 2004)
<i>Bacteria</i>	<i>V. fisheri</i>	30 min	EC <sub>50</sub>	136,45	(Laumera, G. in sod., 2004)
<i>Bacteria</i>	<i>V. fisheri</i>	30 min	EC <sub>50</sub>	121,01	(Laumera, G. in sod., 2004)
<i>Bacteria</i>	<i>V. fisheri</i>	30 min	EC <sub>50</sub>	64,50	(Isidori in sod., 2005)
			Geomean	110,37	
<i>Bacteria</i>	<i>V. fisheri</i>	15 min	EC <sub>50</sub>	235,4	(Kim in sod., 2007)
<i>Bacteria</i>	<i>V. fisheri</i>	5 min	EC <sub>50</sub>	87	(Kim in sod., 2007)
<i>Microba</i>	Aktivno blato	3 h	EC <sub>50</sub>	17,90	(Kolar in sod., 2014)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>P. subcapitata</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	4,50	(Holten Lutzhöft in sod., 1999)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>P. subcapitata</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	4,18	(Liguoro in sod., 2003)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>P. subcapitata</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	0,17	(Isidori, 2005)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>P. subcapitata</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	0,34	(Eguchi in sod., 2004)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>P. subcapitata</i>	3 d	ErC <sub>50</sub>	1,04	(Kolar in sod., 2014)
<i>Chlorophyceae</i>			Geomean	<b>1,02</b>	
<i>Chlorophyceae</i>	<i>P. subcapitata</i>	1 d	EC <sub>50</sub>	0,60	(Grinten in sod., 2010)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>C. vulgaris</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	7,05	(Eguchi in sod., 2004)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Tetraselmis chunii</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	13,16	(Ferreira in sod., 2007)
<i>Angiospermae</i>	<i>Lemna gibba</i>	7 d	EC <sub>50</sub>	1,15	(Brain in sod., 2004)
<i>Angiospermae</i>	<i>L. gibba</i>	7 d	EC <sub>50</sub>	4,92	(Pro in sod., 2003)
			Geomean	2,38	
<i>Angiospermae</i>	<i>Ceratophyllum demersum</i>	28 d	EC <sub>50</sub>	0,30	(Hanson in sod., 2006)
<i>Angiospermae</i>	<i>Egeria densa</i>	28 d	EC <sub>50</sub>	<b>0,28</b>	(Hanson in sod., 2006)
<i>Cnidaria</i>	<i>Hydra vulgaris</i>	4 d		100,00	(Quinn in sod., 2008)
<i>Rotifera</i>	<i>Brachionus calyciflorus</i>	1 d	EC <sub>50</sub>	1,87	(Isidori in sod., 2005)
<i>Crustacea</i>	<i>Monia macrocopa</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	126,70	(Park in Choi, 2008)
<i>Crustacea</i>	<i>Daphnia magna</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	669,00	(Kolar in sod., 2014)

Taksonomska skupina	Vrsta	Trajanje	Rezultat	Koncentracija (mg/L)	Reference
Crustacea	<i>D. magna</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	621,1	(Kim in sod., 2007)
Crustacea	<i>D. magna</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	1000,00	(Liguoro in sod., 2003)
Crustacea	<i>D. magna</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	92,00	(Park in Choi, 2008)
			Geomean	442,17	
Crustacea	<i>D. magna</i>	1 d	EC <sub>50</sub>	22,64	(Park in Choi, 2008)
Crustacea	<i>Ceratodaphnia dubia</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	18,65*	(Isidori in sod., 2005)
Crustacea	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	1 d	EC <sub>50</sub>	25,00	(Isidori in sod., 2005)
Pisces	<i>Oryzias latipes</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	88,4	(Park in Choi, 2008)
Pisces	<i>O. latipes</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	215,4	(Kim in sod., 2007)
			Geomean	138,0	
Pisces	<i>O. latipes</i>	4 d	EC <sub>50</sub>	110,1	(Kim in sod., 2007)
Pisces	<i>O. latipes</i>	4 d	EC <sub>50</sub>	78,9	(Park in Choi, 2008)
			Geomean	<b>93,20</b>	

\*podatek ni zanesljiv

**Najnižji EC<sub>50</sub>:** *M. aeruginosa* (0,22 mg/L). Razpoložljivi podatki so za 3 trofične nivoje (cianobakterje, kritosemenke, rake in ribe); izbrani VF = 10

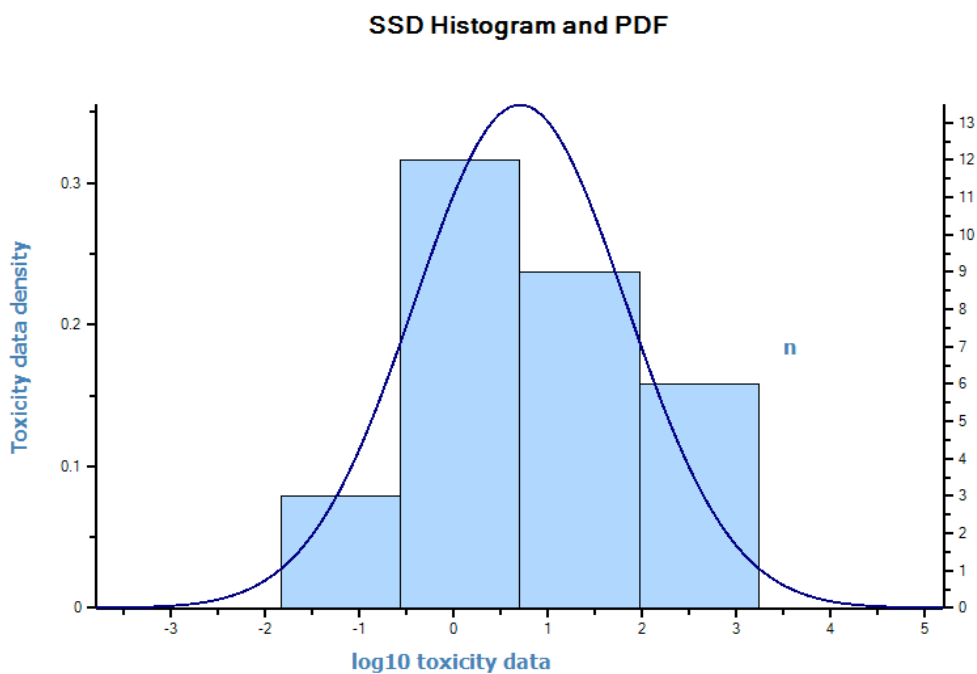
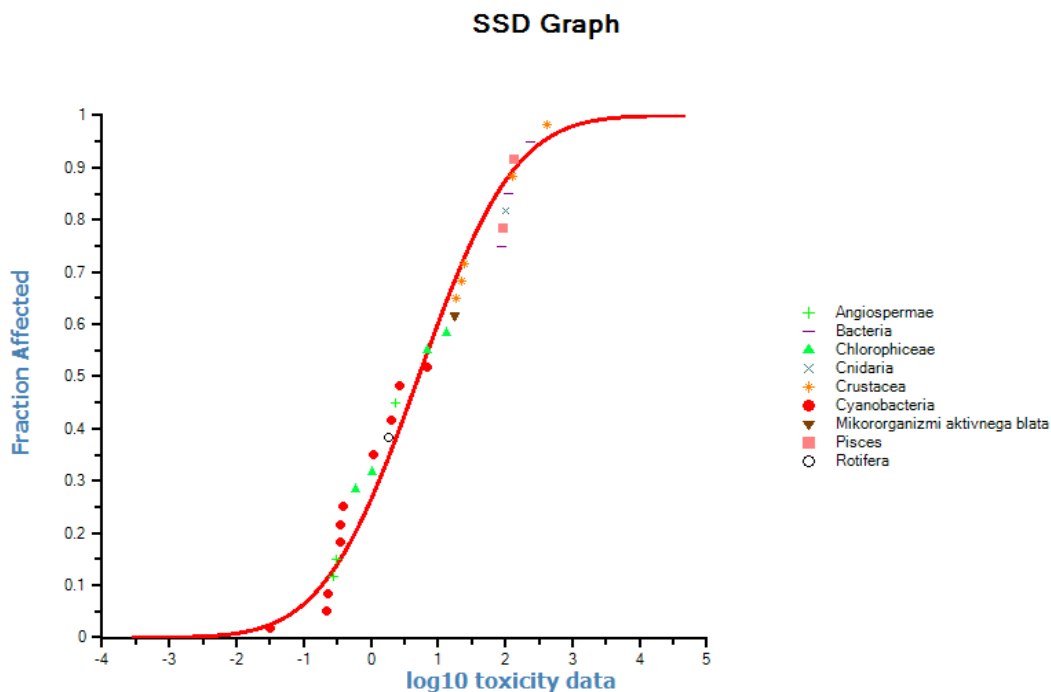
**HC5 = 0,07 mg/L; VF = 10**

Izračun SSD po kratkodobni izpostavljenosti OTC

	Value (mg/L)		log10 (Value)
LL HC5	0,02	-1,78	lower estimate of the HC5
<b>HC5</b>	<b>0,07</b>	-1,16	median estimate of the HC5
UL HC5	0,20	-0,69	upper estimate of the HC5
sprHC5	12,30	1,09	spread of the HC5 estimate



### Grafični ponazoritvi SSD na osnovi akutnih učinkov za OTC



**Rezultati testov po dolgodobni izpostavljenosti OTC (n = 25)**

Taksonomska skupina	Vrsta	Trajanje	Učinek	Rezultat	Koncentracija (mg/L)	Reference
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena flos-aquae</i>	3 d	Rast/reprodukcija	NOEC	1,50	(Kolar in sod., 2014)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena flos-aquae</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	<b>0,03</b>	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	0,10	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	<b>0,03</b>	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Microcystis wesenbergii</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	0,25	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostoc sp.</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	0,78	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus leopoldensis</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	0,25	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus sp.</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	0,25	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena cylindrica</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	0,0031*	(Ando in sod., 2007)
<i>Microba</i>	Aktivno blato	3 h	Inh. resp./reprodukcija	EC <sub>10</sub>	0,21	(Kolar in sod., 2014)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>P. subcapitata</i>	3 d	Rast/reprodukcija	ErC <sub>10</sub>	0,34	(Kolar in sod., 2014)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Tetraselmis chuii</i>	4 d	Rast/reprodukcija	NOEC	3,60	(Ferreira in sod., 2007)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>P. subcapitata</i>	72 h	Rast/reprodukcija	NOEC	<b>0,18</b>	(Eguchi in sod., 2004)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Chrorella vulgaris</i>	72 h	Rast/reprodukcija	NOEC	<3,58	(Eguchi in sod., 2004)
<i>Angiospermae</i>	<i>Ceratophyllum demersum</i>	28 d	Morfološke spremembe	EC <sub>10</sub>	<b>0,06</b>	(Hanson in sod., 2006)
<i>Angiospermae</i>	<i>L. gibba</i>	7 d	Reprodukcija	EC <sub>10</sub>	0,73	(Brain in sod., 2004)
<i>Angiospermae</i>	<i>L. gibba</i>	7 d	Reprodukcija	NOEC	0,30	(Brain in sod., 2004)
<i>Angiospermae</i>	<i>Egeria densa</i>	14 d	Rast	EC <sub>10</sub>	62,10	(Hanson in sod., 2006)
<i>Angiospermae</i>	<i>E. densa</i>	28 d	Rast	EC <sub>10</sub>	80,70	(Hanson in sod., 2006)
<i>Angiospermae</i>	<i>E. densa</i>	14 d	Rast/morfološke spremembe	EC <sub>10</sub>	47,90	(Hanson in sod., 2006)
<i>Angiospermae</i>	<i>E. densa</i>	28 d	Rast/morfološke spremembe	EC <sub>10</sub>	56,50	(Hanson in sod., 2006)
<i>Angiospermae</i>	<i>E. densa</i>	42 d	Rast/morfološke spremembe	EC <sub>10</sub>	<b>66,50</b>	(Hanson in sod., 2006)
<i>Cnidaria</i>	<i>Hydra vulgaris</i>	4 d	Reprodukcija	NOEC	100,00	(Quinn in sod., 2009)
<i>Crustacea</i>	<i>Daphnia magna</i>	21 d	Reprodukcija	EC <sub>10</sub>	7,40	(Wollenberger in sod., 2000)
<i>Fish</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	84 d	Rast	NOEC	50,00	(Reda in sod., 2013)
<i>Fish</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	33 d	Rast	NOEC	<b>2,00</b>	(Rijkers in sod., 1980)

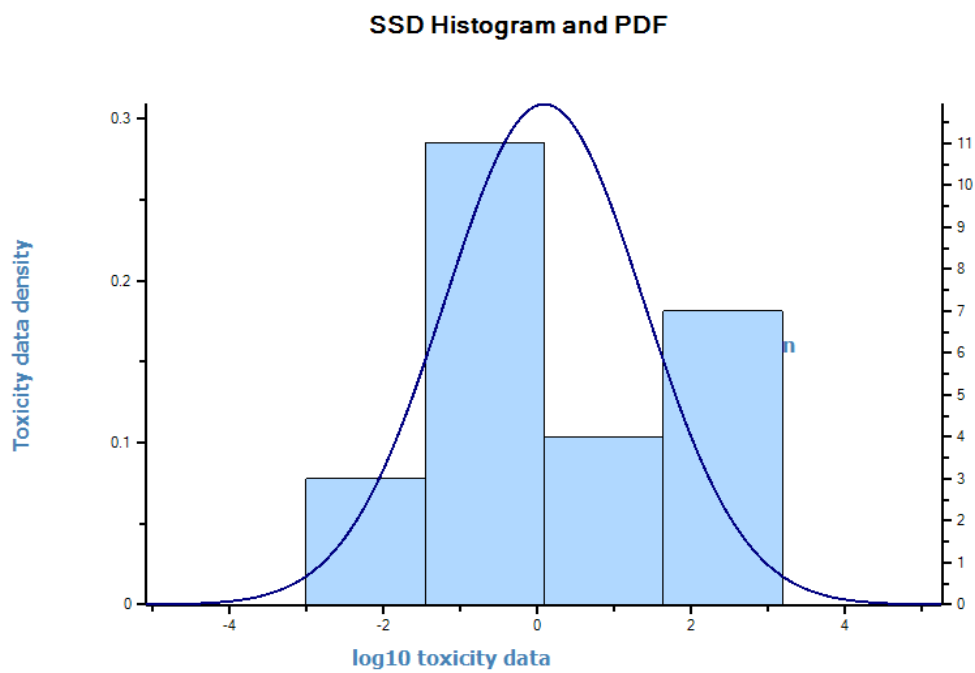
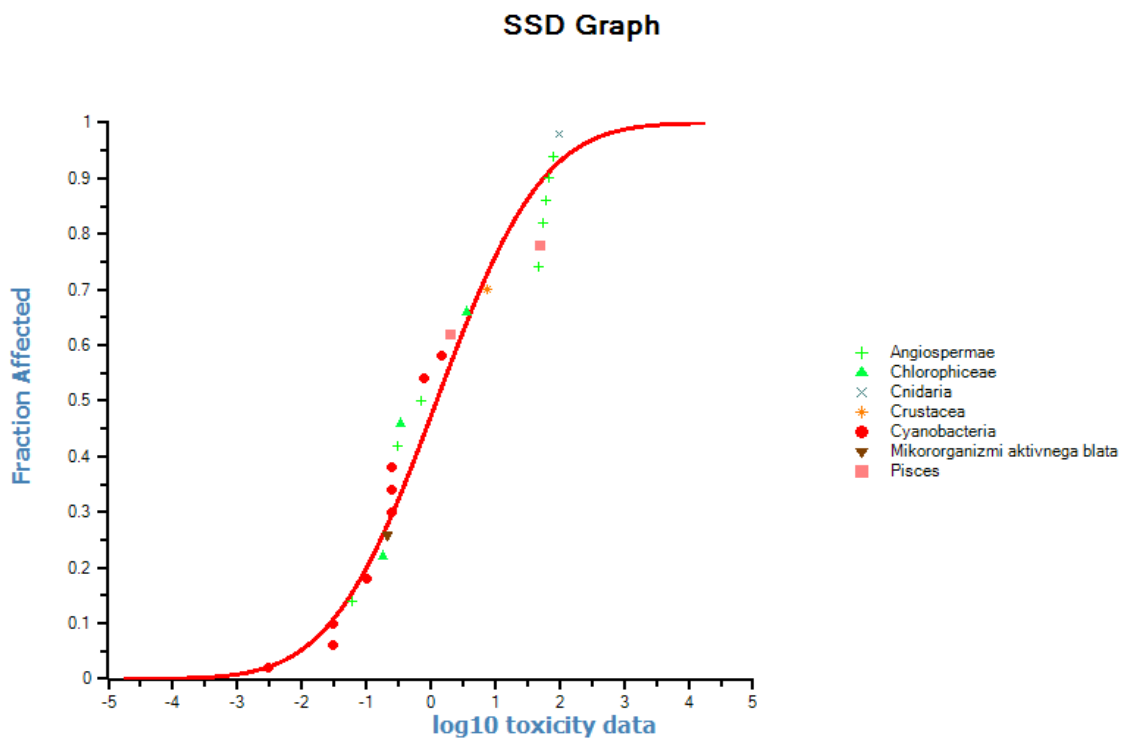
\*podatek ni dovolj zanesljiv

**Najnižji NOEC:** *Anabaena flos-aquae* in *Microcystis aeruginosa* 0,03 mg/L. Razpoložljivi podatki so za 3 trofične nivoje (cianobakterje, alge, kritosemne, rake in ribe); izbrani VF = 10  
**HC5 = 0,009 mg/L; VF = 5**

Izračun SSD po dolgodobni izpostavljenosti OTC

Name	Value (mg/L)	log10 (Value)	Description
LL HC5	0,001	-2,865	lower estimate of the HC5
<b>HC5</b>	<b>0,009</b>	-2,057	median estimate of the HC5
UL HC5	0,033	-1,479	upper estimate of the HC5
sprHC5	24,348	1,386	spread of the HC5 estimate

Grafični ponazoritvi SSD na osnovi dolgodobnih učinkov za OTC



### Določitev PNEC za OTC po navodilih VICH GL38

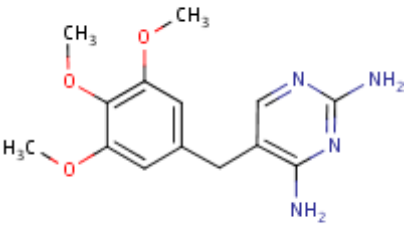
Test	Rezultat	Vrednost (mg/L)	Varnostni faktor	PNEC (mg/L)	Metoda	Referenca
Algal growth inhibition	EC <sub>50</sub>	0,17	100	0,0017	OECD 201	(Isidori, 2005)*
Cyanobacteria growth inhibition	EC <sub>50</sub>	0,21	100	0,0021	OECD 201	(Holten Lutzhöft in sod., 1999)
<i>Daphnia</i> immobilization	EC <sub>50</sub>	92	1000	0,09	OECD 202	(Park in Choi, 2008)
Fish acute toxicity	EC <sub>50</sub>	78,9	1000	0,079	OECD 203	(Park in Choi, 2008)
Algae growth inhibition	NOEC	0,18	10	0,018	OECD 201	(Eguchi in sod., 2004)
Cyanobacteria growth inhibition	EC <sub>10</sub>	1,5	10	0,15	OECD 201	(Kolar in sod., 2014)
<i>Daphnia magna</i> reproduction	EC <sub>10</sub>	7,40	10	0,74	OECD 221	(Wollenberger in sod., 2000)
Fish, early-life stage	NOEC	/	10	/	OECD 210	/

\*podatek ni sprejemljiv

**Priloga F2****Poročilo o pripravi okoljskega standarda kakovosti za površinske celinske vode za TMP****Povzetek**

<b>Ime snovi</b>		<b>Trimetoprim</b>	
<b>Število CAS</b>		738-70-5	
<b>Predlagani okoljski standard kakovosti</b>		<b>Površinske celinske vode</b>	
		<b>LP-OSK</b>	<b>NDK-OSK</b>
<b>Voda (mg/L)</b>	<b>VF</b>	<b>0,0157</b>	<b>1,1</b>
	<b>SSD</b>	<b>0,114</b>	–
<b>Opombe</b>		LP-OSK: SSD izračun na osnovi normalne porazdelitve: JA NDK-OSK: SSD izračun na osnovi normalne porazdelitve: NE	

**Identiteta**

Ime učinkovine	Trimetoprim
Število CAS	738-70-5
Skupina	Organska snov – farmacevtska učinkovina
Sinonim	TMP
Molekulska formula	C14-H18-N4-O3
Strukturna formula	 <p style="text-align: right;">Source: TOXNET-HSDB</p>

**Fizikalne in kemijske lastnosti učinkovine**

Property	Values	Ref.
Molecular weight (g/mol)	290,32	TOXNET-HSDB
Vapour Pressure mm Hg at 25 °C(est)	9,88.10 <sup>-009</sup>	TOXNET-HSDB
Water Solubility (mg/L) at 25 °C	400	TOXNET-HSDB
Log Kow	0,91	TOXNET-HSDB
Henry-coefficient atm-cu m/mol at 25 °C (est)	2,39.10 <sup>-14</sup>	TOXNET-HSDB
pKa	7,12	TOXNET-HSDB

**Usoda in obnašanje v okolju**

Characteristic		Ref.
BCF (est)	3	TOXNET-HSDB
(Aerobic bio)degradation	Not inherently biodegradable	(Kolar in sod., 2014)

**Rezultati testov po kratkodobni izpostavljenosti TMP (n = 21)**

Taksonomska skupina	Vrsta	Trajanje	Rezultat	Koncentracija (mg/L)	Reference
<i>Cyanobacteria</i>	<i>A. flos-aquae</i>	3 d	ErC <sub>50</sub>	253	(Kolar in sod., 2014)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	<b>11</b>	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Microcystis wesenbergii</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	>200	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostoc sp.</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	53	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus leopoldensis</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	>200	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus sp.</i>	6 d	EC <sub>50</sub>	>200	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	1 d	EC <sub>50</sub>	6,9*	(Grinten in sod., 2010)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	7 d	EC <sub>50</sub>	112	(Holten Lutzhöft in sod.,1999)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>M. aeruginosa</i>	7 d	EC <sub>50</sub>	150	(Ando in sod., 2007)
			Geomean	129,61	
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	16,00	(Capleton in sod., 2006)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	3 d	ErC <sub>50</sub>	129,00	(Kolar in sod., 2014)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	80,30	(Eguchi in sod., 2004)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	40,00	(Yang in sod., 2008)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	110,00	(Halling-Sørensen, 2000)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	130,00	(Holten Lutzhöft in sod.,1999)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	110,00	(Halling-Sorensen in sod., 1998)
			Geomean	<b>72,40</b>	
<i>Angiospermae</i>	<i>Lemna minor</i>	7 d	EC <sub>50</sub>	<b>215,00</b>	(Straub, 2013)
<i>Cnidaria</i>	<i>Hydra vulgaris</i>	4 d	EC <sub>50</sub>	100,00	(Quinn in sod., 2008)
<i>Rotifera</i>	<i>Brachionus koreanus</i>	1 d	EC <sub>50</sub>	187,50	(Rhee in sod., 2012)
<i>Crustacea</i>	<i>Daphnia magna</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	100,00	(Kolar in sod., 2014)
<i>Crustacea</i>	<i>D. magna</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	120,00	(GlaxoSmithKline, 2011)
<i>Crustacea</i>	<i>D. magna</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	167,40	(Kim in sod., 2007)
<i>Crustacea</i>	<i>D. magna</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	92,00	(Park in Choi, 2008)
<i>Crustacea</i>	<i>D. magna</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	123,00	(Halling-Sorensen in sod., 1998)
<i>Crustacea</i>	<i>D. magna</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	149,00	(Liguoro in sod., 2009)
			Geomean	122,55	
<i>Crustacea</i>	<i>D. magna</i>	1 d	EC <sub>50</sub>	155,60	(Park in Choi, 2008)
<i>Crustacea</i>	<i>D. magna</i>	3 d	EC <sub>50</sub>	120,7	(Kim in sod., 2007)
<i>Crustacea</i>	<i>Molna macrocopa</i>	2 d	EC <sub>50</sub>	<b>54,8</b>	(Park in Choi, 2008)

Taksonomska skupina	Vrsta	Trajanje	Rezultat	Koncentracija (mg/L)	Reference
<i>Crustacea</i>	<i>M. macrocopa</i>	1 d	EC <sub>50</sub>	144,8	(Park in Choi, 2008)
			EC <sub>50</sub>		
<i>Microba</i>	Aktivno blato	3 h	EC <sub>50</sub>	67,00	(Kolar in sod., 2014)
<i>Microba</i>	Aktivno blato	3 h	EC <sub>50</sub>	17,80	(Halling-Sørensen, 2000)
			Geomean	<b>34,53</b>	
<i>Pisces</i>	<i>Oryzias latipes</i>	4 d	LC <sub>50</sub>	<b>100,00</b>	(Kim in sod., 2007)
<i>Pisces</i>	<i>Brachydanio rerio</i>	4 d	LC <sub>50</sub>	123,00	(GlaxoSmithKline, 2011)
<i>Amphibia</i>	<i>Xenopus laevis</i>	4 d	EC <sub>50</sub>	<b>100,00</b>	(Richards in Cole, 2006)
<i>Bacteria</i>	<i>Vibrio fisheri</i>	15 min	EC <sub>50</sub>	176,70	(Kim in sod., 2007)
<i>Bacteria</i>	<i>V. fisheri</i>	5 min	EC <sub>50</sub>	165,1	(Kim in sod., 2007)

\*rezultat ni zanesljiv

**Najnižji EC<sub>50</sub>:** *Anabaena variabilis* (**11 mg/L**). Razpoložljivi podatki so za 3 trofične nivoje (cianobakterije, rake in ribe); izbrani VF = 10

**HC5 = 17,387 mg/L; VF = 10**

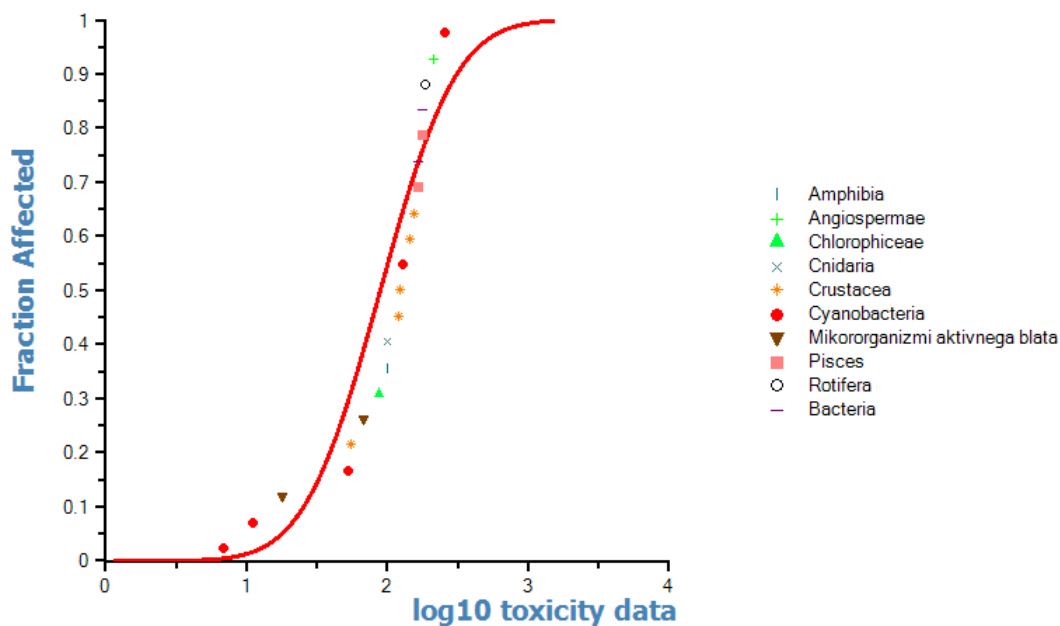
Izračun SSD po kratkodobni izpostavljenosti OTC

Name	Value	log10 (Value)	Description
LL HC5	8,755	0,942	lower estimate of the HC5
<b>HC5</b>	<b>17,387</b>	1,240	median estimate of the HC5
UL HC5	27,955	1,446	upper estimate of the HC5
sprHC5	3,193	0,504	spread of the HC5 estimate

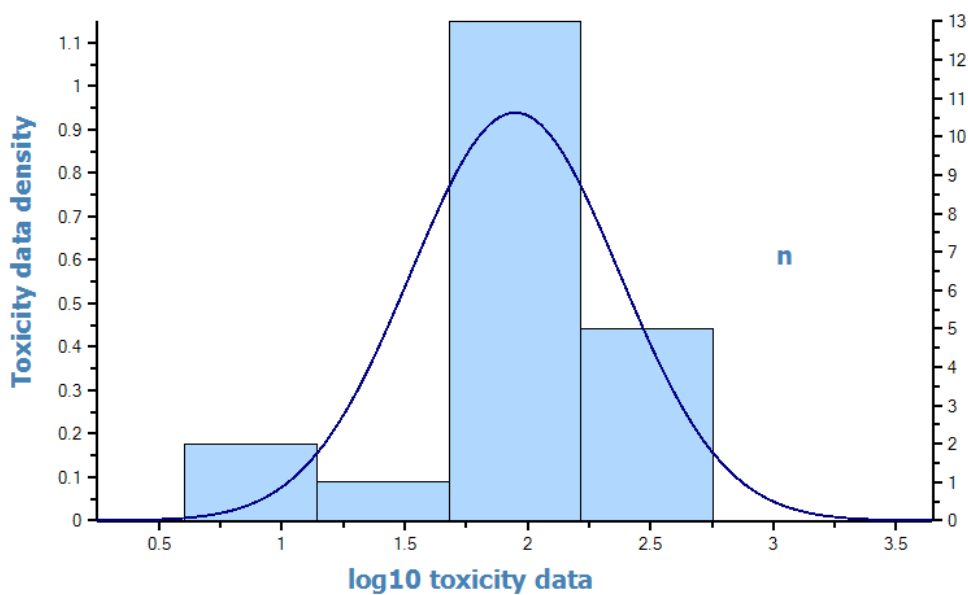


Grafični ponazoritvi SSD na osnovi akutnih učinkov za TMP

SSD Graph



SSD Histogram and PDF



**Rezultati testov po dolgodobni izpostavljenosti TMP (n = 14)**

Taksonomska skupina	Vrsta	Trajanje testa	Učinek	Rezultat	Koncentracija (mg/L)	Reference
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena flos-aquae</i>	3 d	Rast/reprodukcija	ErC <sub>10</sub>	266	(Kolar in sod., 2014)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	<b>3,1</b>	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Microcystis wesenbergii</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	<b>3,1</b>	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostoc sp.</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	<b>3,1</b>	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus leopoldensis</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	13	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus sp.</i>	6 d	Rast/reprodukcija	NOEC	50	(Ando in sod., 2007)
<i>Cyanobacteria</i>	<i>M. aeruginosa</i>	7 d	Rast/reprodukcija	NOEC	100	(Ando in sod., 2007)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	3 d	Rast/reprodukcija	ErC <sub>10</sub>	65	(Kolar in sod., 2014)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>P. subcapitata</i>	3 d	Rast/reprodukcija	NOEC	25,5	(Eguchi in sod., 2004)
<i>Chlorophyceae</i>	<i>P. subcapitata</i>	3 d	Rast/reprodukcija	NOEC	16	(Yang in sod., 2008)
				Geomean	20,20	
<i>Microba</i>	Aktivno blato	3 h	Inh. resp./reprodukcija	EC <sub>10</sub>	9,800	(Kolar in sod., 2014)
<i>Angiospermae</i>	<i>Lemna gibba</i>	7 d	Reprodukcija	EC <sub>10</sub>	1,00*	(Brain in sod., 2004)
<i>Cnidaria</i>	<i>Hydra vulgaris</i>	4 d	Reprodukcija	NOEC	100	(Quinn in sod., 2008)
<i>Crustacea</i>	<i>D. magna</i>	21 d	Reprodukcija	NOEC	<b>6,00</b>	(Park in Choi, 2008)
<i>Crustacea</i>	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	7 d	Reprodukcija	NOEC	5,60	(GlaxoSmithKline, 2011)
<i>Pisces</i>	<i>Danio rerio</i>	157 d	Reprodukcija	NOEC	<b>0,157</b>	(Madureira in sod., 2012)

\*podatek ni zanesljiv

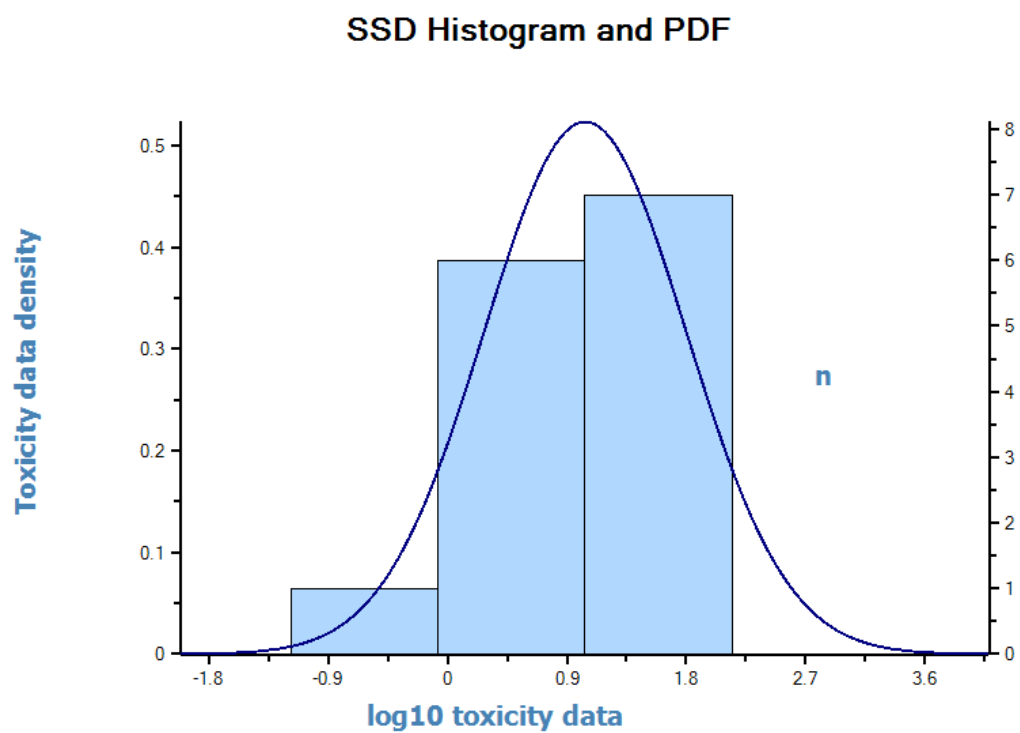
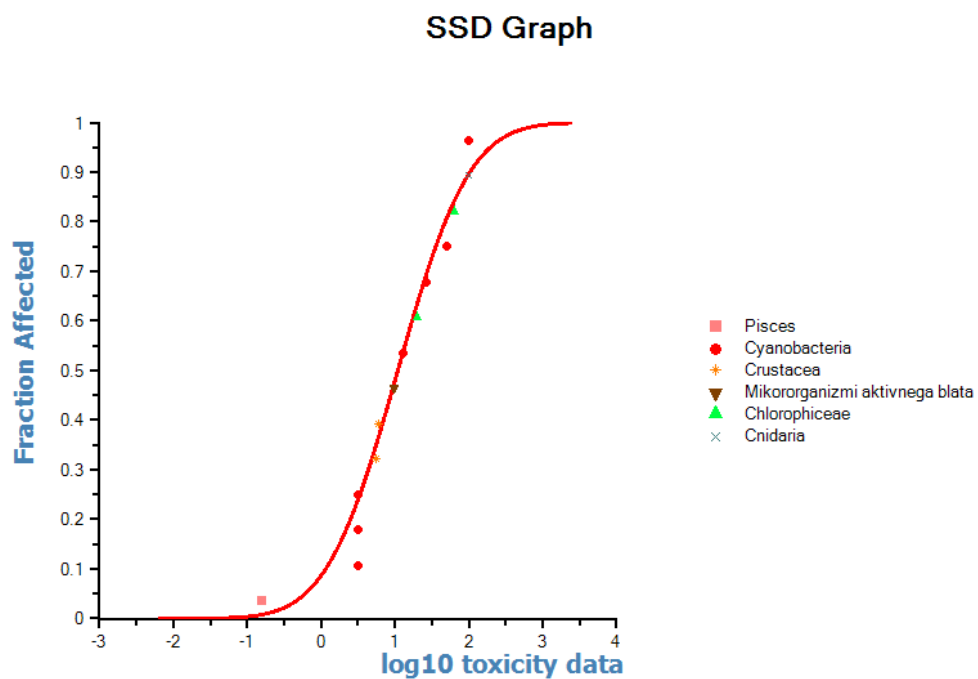
**Najnižji NOEC:** *Danio rerio*, **0,157 mg/L**. Razpoložljivi podatki so za 3 trofične nivoje (cianobakterje, rake in ribe); izbrani VF = 10

**HC5 = 0,569 mg/L; VF = 5**

Izračun SSD po dolgodobni izpostavljenosti OTC

Name	Value (mg/L)	log10 (Value)	Description
LL HC5	0,111	-0,954	lower estimate of the HC5
<b>HC5</b>	<b>0,569</b>	-0,245	median estimate of the HC5
UL HC5	1,588	0,201	upper estimate of the HC5
sprHC5	14,301	1,155	spread of the HC5 estimate

Grafični ponazoritvi SSD na osnovi dolgodobnih učinkov za TMP



### Določitev PNEC za TMP po navodilih VICH GL38

Test	Rezultat	Vrednost (mg/L)	Varnostni faktor	PNEC (mg/L)	Metoda	Referenca
Algal growth inhibition	EC <sub>50</sub>	40	100	0,4	OECD 201	(Yang in sod., 2008)
Cyanobacteria growth inhibition	EC <sub>50</sub>	112	100	1,12	OECD 201	(Holten Lutzhøft in sod., 1999)
<i>Daphnia</i> immobilization	EC <sub>50</sub>	100	1000	0,1	OECD 202	(Kolar in sod., 2014)
Fish acute toxicity	EC <sub>50</sub>	100	1000	0,1	OECD 203	(Kim in sod., 2007)
Algae growth inhibition	NOEC	16	10	1,6	OECD 201	(Yang in sod., 2008)
Cyanobacteria growth inhibition	EC <sub>10</sub>	26	10	2,6	OECD 201	(Kolar in sod., 2014)
<i>Daphnia magna</i> reproduction	NOEC	6	10	0,6	OECD 221	(Park in Choi, 2008)
Fish, early-life stage	NOEC	0,157	10	0,016	OECD 210	(Madureira in sod., 2012)