

BRUK AV FLUBENZURONER I LAKSEOPPDRETT: EN EVALUERING.

DIFLUBENZURON

Del 1 Farmakologi

Opptak og utskilling

Diflubenzuron absorberes lite i tarm hos laks og følgelig er biotilgjengeligheten moderat. Det er store forskjeller i resultatene mellom de farmakokinetiske studiene. Dette skyldes høyst sannsynlig ulike doser. Forsøkene for bestemmelse av tilbakeholdelsestid er noe uklare og en bør vurdere å gjenta forsøkene.

Metabolisme

Diflubenzuron metaboliseres lite og skilles for det meste ut i uforandret form. Diflubenzuron stod for 94.8 % i muskel og 72.3% i lever av total mengde diflubenzuron og metabolitter funnet i disse organene. Det ble funnet 4 metabolitter i laks, hvor en ble identifisert til 4-klorfenylurea mens de andre ble foreslått å være hydroksylerte varianter av diflubenzuron. Høyeste konsentrasjon av 4-klorfenylurea ble funnet i lever (0.23 µg/kg (ppb)). Metabolitten 4-kloranilin ble ikke påvist i laks (se neste side). Ingen av metabolittene kunne påvises 7 dager etter siste dosering med diflubenzuron. Dannelsen av 4-kloranilin er artsspesifikk, idet den kan påvises i gris, men ikke f eks i rotte. Metabolitten 4-kloranilin kunne påvises i små mengder ved basisk hydrolyse av vevsprøver fra laks som var behandlet med diflubenzuron. Det går ikke klart fram av dokumentene om det også ble funnet 4-kloranilin ved basisk hydrolyse av vev fra kontrollgruppen. Det er mulig at metabolitten 4-kloranilin ikke fantes i fisken, men ble dannet som en følge av prøveopparbeidelsen.

Presentasjonen av de farmakologiske studiene er noe uklar og det hadde vært ønskelig med en bedre redegjørelse for den vevsbundne fraksjonen av diflubenzuron/metabolitter. Allikevel er det ingen grunn til å endre konklusjonen om at diflubenzuron metaboliseres

lite og at konsentrasjonen av metabolitter er små. Det er derfor ingen grunn til å tro at diflubenzuron eller metabolittene vil utgjøre en helserisiko, spesielt ikke siden karantenetiden er på 60 dager etter behandling.

Accepted Daily Intake (ADI) er den mengden av et stoff som en kan konsumere hver dag uten at det gir skadelige virkninger. ADI fastsettes av myndigheten etter nøye vurderinger av dokumentasjon om stoffets virkninger. For diflubenzuron er det fastsatt en ADI verdi på 0.02 mg/kg per dag. Det er derfor ingen fare ved å spise kontrollert laks. Ingen farmakokinetiske forsøk er gjort på villfisk og en kan ikke utelukke at en kan overskride ADI ved å spise f.eks lever av sei som har fått i seg medisinfør (jfr side 6).

Del 2 Toksikologi

Toksisitet av diflubenzuron og ulike metabolitter

Ett av ankepunktene som har vært reist mot bruken av diflubenzuron er at metabolitter kan være toksiske/mutagene. Diflubenzuron har vært brukt i landbruket i mange år og der er gjort en lang rekke forsøk for å undersøke eventuelle skadevirkninger dette stoffet kan ha på pattedyr og om det er metabolitter som kan være skadelige. Dette omfatter også studier om det eventuelt finnes metabolitter som kan ha mutagene/karsinogene effekter. Langtidforsøk på rotter der rottene ble foret med høye konsentrasjoner med diflubenzuron viste ikke økte forekomster av misdanninger i de rottene som fikk diflubenzuron. Dette forsøket gikk over 2 år. Vidare fant en ingen effekter på kaninembryo, der kaninane hadde fått 1000 mg diflubenzuron pr. kg/dag. Det er videre utført flere forsøk der en har undersøkt om diflubenzuron kan ha mutagen effekt. Disse forsøkene, som er gjort på cellekulturer og bakterier, viste at diflubenzuron ikke er mutagent.

Det er hevdet at metabolitten 4-chloroanilin er skadelig, men som allerede nevnt har studier vist at denne metabolitten bare dannes i enkelte arter. 4-chloroanilin har blitt påvist i gris, men ikke i rotte og laks. Effekten av 4-chloroanilin er testet ut i *in vitro* forsøk. Med unntak av ett forsøk viser testene som er utført at 4-chloroanilin ikke har noen mutagen effekt. I ett forsøk fant en at bakterier som ble dyrket med 500 og 1000 µg

per ml 4-chloroanilin hadde en svak reduksjon i tallet på bakteriekolonier. I mutagenisitetstudier kunne en ikke påvise at 4-chloroanilin var mutagent. Det er også utført studier på de andre metabolittene fra diflubenzuron og en har ikke funnet noen som tyder på at disse har negative effekter.

Del 3 Miljøeffekter

Persistens og stabilitet i sediment (laboratorieforsøk)

I dokumentasjonen beskrives forsøk der en har studert metabolismen av diflubenzuron i sediment i både aerobt og anaerobt miljø og ved to ulike temperaturer. De finner at diflubenzuron metaboliseres av bakterier i sedimentet og at temperaturen er den faktor som betyr mest for nedbrytningshastigheten. Forsøkene ble gjort ved at sjøvann inneholdende diflubenzuron i små mengder ble tilsatt marint sediment. Diflubenzuron ble dermed adsorbent på sedimentpartikklenes overflate.

Resultater:

Degradation times (DT 50) ved 15 °C	aerobe forhold:	30 dager
	anaerobe forhold:	24 dager
Degradation times (DT 50) ved 5 °C	aerobe forhold:	100 dager
	anaerobe forhold:	99 dager

Havforskningsinstituttet har undersøkt stabilitet og persistens av diflubenzuron. I disse undersøkelsen ble skjellsand og marint mudder iblandet knust medisinfôr. Forsøkene ble gjennomført både i stagnerende miljø ved 5 og 15 °C og i mesokosmos med rennende vann (7°C) . Det var stor mikrobiologisk aktivitet (gassavgivelse) i begge sedimenttypene under forsøkene. Sedimentene ble ikke undersøkt for metabolitter av diflubenzuron. Resultatene viste at diflubenzuron er stabilt både i skjellsand og mudder uten signifikant reduksjon i konsentrasjonen etter 204 dager. Forsøkene viste også at det er ingen utlekking av diflubenzuron fra sediment til vannfasen. En nærmere beskrivelse av

forsøkene og resultatene vil foreligge i en hovedoppgave fra Universitetet i Bergen, i vårsemesteret 2001.

Resultatene står i kontrast til den foreliggende dokumentasjon fra Ewos, som viste halveringstider fra 24 til 100 dager. Forskjellene kan skyldes ulike eksperimentelle oppsett. Dette viser klart behovet for å utvikle standardiserte tester for stabilitet og persistens av legemidler i sediment.

Feltundersøkelser sediment

Dokumentasjonen var noe uoversiktlig, med blant annet ulike enheter for angivelse av konsentrasjon. Predicted Environmental Concentration (PEC) for diflubenzuron er beregnet til å være 88 mg/kg (ppm) våtvekt sediment. Ved undersøkelser i Norge og Irland ble sedimentkonsentrasjonen målt som gjennomsnittlige konsentrasjoner over og under 5 cm sedimentdybde. Konsentrasjonene i sedimentoverflaten var trolig høyere enn de gjennomsnittlige konsentrasjonene. Ved to norske matfiskanlegg ble det funnet mengder opp mot 20 mg/kg tørrvekt sediment. Prøvene ble tatt med grabb fra stor båt i periferien av anleggene, og viser trolig ikke høyeste konsentrasjon under merdene. Det tredje anlegget skiller seg ut med konsentrasjoner under 0.15 mg/kg. Konsentrasjonene avtok med økende avstand fra merdene og viste ingen eller kun små mengder i en avstand på 200 m fra anleggene. Konsentrasjonene viste også avtakende tendens de 170 dagene forsøkene varte, men økte ved gjentatt medisinerings (ett anlegg). Ved det ene anlegget i Irland der dykkere tok kjerneprøver langs en gradient fra midt under merdene og utover var høyeste konsentrasjon 49.5 mg/kg tørrvekt sediment.

Feltundersøkelser utført av Havforskningsinstituttet indikerer at spredningen er liten og at konsentrasjonene er mindre enn PEC. I Havforskningsinstituttets forsøk ble det brukt relativt lite diflubenzuron. Kun mindre mengder (0.1 – 5.4 mg/kg) ble funnet i sedimentet etter medisinerings og spredningen rundt anlegget var liten (< 20 m). Femten måneder etter medisinerings var det bare små mengder igjen i sedimentet (< 0.05 mg/kg). Siden diflubenzuron er funnet å være stabilt i marine sedimenter, er resuspensjon av diflubenzuronholdig sediment en mulig forklaring på denne reduksjonen.

Resultatene fra feltundersøkelsene støtter ikke opp om eller bekrefter halveringstidene for diflubenzuron i sediment (TD 50, se over) som ble funnet i laboratorieundersøkelsene.

Feltundersøkelser vannprøver

PEC for diflubenzuron i vannfasen er etter definerte betingelser beregnet til å være 7.8 µg/l (ppb) tilsvarende 0.0078 mg/l (ppm). Av totalt noe over 550 vannprøver som ble undersøkt i Norge under og etter medisinerings, var omkring 125 positive. Verdiene varierte mellom 0.026 og 0.242 µg/l (ppb). Verdiene var høyest på 5 meters dyp ved slutten av medisinkuren og på 40 m dyp 6 dager etter at kuren var avsluttet. I Irland, der 105 prøver ble analysert, var 38 positive. De inneholdt generelt under 0.094 µg/l og høyeste målte verdier var opp til 0.250 µg/l. Konsentrasjonene var høyest nedstrøms fra anlegget. I feltstudiet fra Irland ble det også funnet diflubenzuron i noen av vannprøvene tatt før medisinerings. De positive prøvene ble ikke verifisert vha masse-spektrometri. Det er derfor uklart om positive funn før medisinerings skyldes et analytisk problem med falske positive prøver, eller om anlegget er blitt behandlet med diflubenzuron tidligere. Diflubenzuron er lite vannløselig og har stor affinitet til organiske partikler. Det går ikke fram fra rapportene om vannprøvene ble filtrert for å fjerne partikulært materiale før ekstrahering. En kan derfor ikke avgjøre om stoffet har vært oppløst, eller om det har vært bundet til partikler. Dette har betydning for hvilken virkning diflubenzuronen har på omgivelsene, ettersom et dyr som spiser en partikkel som inneholder høye konsentrasjoner kan få i seg en stor dose, selv om den gjennomsnittlige konsentrasjonen av diflubenzuron i vannprøven der partikkelen finnes er lav. I Havforskningsinstituttets undersøkelse var konsentrasjonen av diflubenzuron i det organiske materialet som ble samlet i sedimentfeller under medisinerings fra 100 – 250 mg/kg. Frekvensen av positive prøver og konsentrasjonen i prøvene tatt i Norge var høyest på 40 m dyp 6 dager etter at behandlingen var avsluttet. Dette indikerer at stoffet fantes i resuspenderte partikler. Det samme synes å være tilfelle i Irland, der en også fant store forskjeller mellom replikate prøver.

Feltundersøkelser villfisk

I undersøkelsen foretatt av Havforskningsinstituttet viste vevsprøver av sei fanget samme dagen som medisinerings ble avsluttet svært små konsentrasjoner av diflubenzuron i lever (0.020 mg/kg). Det må nevnes at laksen i anlegget var på ca 100 g og gikk på

smoltfôr, mens seien som stod ved anlegget var stor, fra 2 til 4 kg. Smoltfôr vil følgelig ikke være foretrukket fødevalg for denne seien.

Effekter på ikke-target organismer:

Diflubenzuron hemmer virkningen av enzymet chitinase, som løser opp kitinet. Denne prosessen er en forutsetning for at krepsdyr kan skifte skall, og dyrene dør dersom skallskiftet hindres. Alle dyr som har en chitinaseaktivitet kan bli påvirket dersom de får i seg disse stoffene, men det er særleg krepsdyr som er i faresonen.

Det er utført en rekke tester med ulike organismer. I noen tilfeller gjør manglende standardisering det vanskelig å sammenligne resultatene. Ved noen av testene var dødeligheten i de ulike forsøksgruppene for stor til at det var mulig å vurdere giftigheten av stoffene.

Det er stor forskjell på hvor følsomme testorganismene var for diflubenzuron. Alger (*Chlamydomonas* og *Enteromorpha*) viste ingen reaksjon på konsentrasjoner opp til 10 mg/l, som ligger langt over det de kan antas å utsettes for. Sandmakk (*Arenicola marina*) viste ingen reaksjon på konsentrasjoner flere ganger høyere enn det en kan finne i sedimentene under merdene etter en behandling, det samme var tilfelle med børstemakken *Capitella capitata*.

På den andre siden viste krepsdyret *Daphnia magna* seg å være meget følsomt for diflubenzuron. I en test over 21 dager var laveste konsentrasjon som ikke påvirket reproduksjon 0.040 µg/l (ppb) og laveste konsentrasjon som ikke påvirket overlevelse av voksne dyr 0.014 µg/l (ppb). Disse konsentrasjonene er av samme størrelsesorden som de som ble målt i vannet ved behandlede matfiskanlegg. Som tidligere nevnt kan en ikke avgjøre om de mengdene som ble målt i vannet skyldes oppløst stoff eller om de var bundet til svevepartikler. Dersom det siste er tilfelle, kan krepsdyr som driver forbi anlegget under og etter medisinerings få i seg så store doser at det påvirker overlevelse og reproduksjon. Som allerede nevnt inneholder partikulært materiale samlet opp i feller under anlegget i løpet av medisinerings høye konsentrasjoner av diflubenzuron (100 – 250 mg/kg).

Forsøkene som er utført med hensyn på de effekter diflubenzuron har på ikke-target organismer har tildels lite relevans. Dersom forsøkene inkluderer krepsdyr, bør

forsøksperioden dekke minst ett skallskifte. I flere av testene er tidspunkt for skallskifte og skallskiftetfrekvens for forsøkedyrene ikke oppgitt. I noen tilfeller synest det klart at forsøket ikke har vart lenge nok til å kunne forvente at et skallskifte har funnet sted. Andre grupper som har kitin og som eventuelt kan bli påvirket er nematoder som har keratin i kutikula og polychaeter som har børster og kan ha kjeve av keratin.

TEFLUBENZURON

Del 1 Farmakologi

Metabolisme

I motsetning til diflubenzuron kan teflubenzuron ikke danne 4-kloranilin som metabolitt. Metabolitten difluordikloranilin ble påvist i lever etter endt medisineringsperiode, men ikke i muskel eller skinn. Åtte dager etter medisineringsperiode kunne metabolitten heller ikke påvises i lever. De gjennomførte dyreforsøkene gir ikke grunnlag for å hevde at teflubenzuron eller metabolitter er kreftfremkallende.

Som for diflubenzuron: Det er ingen grunn til å tro at teflubenzuron eller metabolittene vil utgjøre en helserisiko ved konsum av oppdrettslaks, spesielt ikke siden karantenetiden er på 60 dager etter behandling.

For teflubenzuron er det fastsatt en ADI verdi på 0.01 mg/kg dag. Det er derfor ingen fare ved å spise kontrollert laks. Ingen farmakokinetiske forsøk er gjort på villfisk der en relaterer ADI til forventet konsentrasjon av teflubenzuron i villfisk.

Del 2 Miljøeffekter

Persistens og stabilitet i sediment (laboratorieforsøk):

Nedbrytningen av TFB i sediment hevdes å være mikrobiell. Halveringstiden i sediment ble beregnet til 41-75 dager. Noen av kurvene som ble tegnet på bakgrunn av data i Rapport 96/1240 som igjen ble brukt for å beregne halveringstider var tvilsomme.

Feltforsøk:

For teflubenzuron fant en ikke stoff i vannet omkring behandlede anlegg, samtidig som en peker på at restkonsentrasjoner i muslinger indikerer resuspensjon og redistribusjon av bunnfelt stoff. Konsentrasjonene av teflubenzuron i sediment var i samsvar med simulerte verdier, og tilsvarte mengdene av diflubenzuron.

Forsøkene som er utført med hensyn på de effekter teflubenzuron har på ikke-target organismer har tildels lite relevans. Dersom forsøkene inkluderer krepsdyr, bør forsøksperioden dekke minst ett skallskifte. I flere av testene er tidspunkt for skallskifte og skallskiftfrekvens for forsøkydyrene ikke oppgitt. I noen tilfeller synest det klart at forsøket ikke har vart lenge nok til å kunne forvente at et skallskifte har funnet sted. Andre grupper som har kitin og som eventuelt kan bli påvirket er nematoder som har keratin i kutikula og polychaeter som har børster og kan ha kjever av keratin.

Ole Bent Samuelsen

Arne Ervik

Frank Nilsen