



Advies 16232A00 – indicatieve MKN's voor subtilisine

A. van Leeuwenhoeklaan 9
3721 MA Bilthoven
Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl

T 030 274 91 11
F 030 274 29 71
info@rivm.nl

Aanvrager	OD Groningen
Projectnummer RIVM	M/270103/24/AS
Dossiercode	16132
Rapportnummer	2024-1067
Datum aanvraag	23-05-2024
Datum rapportage	25-09-2024
Auteur(s)	Els Smit
Toetser (1), datum	Stan de Groot, 12-07-2024
Toetser (2), datum	Melvin Faber, 22-07-2024
Goedkeuring, datum	Maikel de Potter, 24-09-2024
Versie en status RIVM-advies	A00: Getoetst volgens interne RIVM-procedure, besproken in <i>Wetenschappelijke Klankbordgroep normstelling water en lucht</i> , nog niet vastgesteld door IenW.

Inhoud

1	Inleiding	2
1.1	Vraagstelling	2
1.2	Werkwijze	2
2	Informatie over de stof	2
2.1	Toepassing van de stof	2
2.2	Kenmerken van de stof	3
3	Indicatieve normen voor oppervlaktewaterkwaliteit	6
3.1	Voedselketenroute	6
3.2	Ecotoxiciteit	6
4	Discussie en conclusies	7
5	Status van dit advies/disclaimer	8
	Literatuur	8
	Bijlage 1. Afkortingen	10
	Bijlage 2. Rapportageformulier i-MKN subtilisine	11

1 Inleiding

1.1 Vraagstelling

Het RIVM heeft van een bevoegd gezag een aanvraag ontvangen voor normen voor oppervlaktewater voor de stof subtilisine (CAS-nummer 9014-01-1). De aanvraag betreft een indicatieve jaargemiddelde milieukwaliteitsnorm en maximaal aanvaardbare concentratie voor oppervlaktewater (i-JG-MKN en i-MAC-MKN_{eco}). In dit advies doet het RIVM een voorstel voor deze normen voor zoet en zout oppervlaktewater.

Per 1 januari 2024 is de Omgevingswet in werking getreden. Daarmee zijn de namen van normen gewijzigd in 'Omgevingswaarden'. Op de website Risico's van Stoffen blijven we gemakshalve de term 'MKN' en 'norm' gebruiken. Omwille van de leesbaarheid spreken we ook in dit advies over 'MKN's' en 'normen'. De hier afgeleide i-MKN's zijn echter advieswaarden en hebben geen formele status. In Nederland is het ministerie van IenW verantwoordelijk voor het vaststellen van waterkwaliteitsnormen (zie ook Hoofdstuk 5).

1.2 Werkwijze

De afleiding van de indicatieve risicogrenzen voor oppervlaktewater is beschreven in de online handleiding voor het afleiden van indicatieve risicogrenzen op de website Risico's van Stoffen¹. Deze handleiding is gebaseerd op de Europese en nationale werkwijze voor het afleiden van gedegen waterkwaliteitsnormen voor de Kaderrichtlijn water (KRW).

Voor afleiding van de indicatieve normen zijn de standaard bronnen geraadpleegd, dat wil zeggen het REACH-registratiedossier (ECHA, 2023) en de US EPA ECOTOX Knowledgebase (US EPA, 2024). Daarnaast is een rapport gebruikt dat is opgesteld in het kader van het project "Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products" (HERA, 2007). Het HERA-project is een initiatief van de fabrikanten van schoonmaakproducten en de chemische industrie².

2 Informatie over de stof

2.1 Toepassing van de stof

Subtilisines zijn enzymen die de hydrolyse van eiwitten versnellen, met een voorkeur voor grote ongeladen aminozuren. Ze worden geproduceerd met behulp van micro-organismen uit het geslacht *Bacillus*, al dan niet na genetische modificatie.

¹ <https://rvs.rivm.nl/onderwerpen/normen/milieu/handleiding-normafleiding>

² <https://www.heraproject.com/Index.cfm>

Subtilisines worden als vlekverwijderaar toegevoegd aan was- en vaatwasmiddelen. Ze worden ook gebruikt in industriële was- en schoonmaakproducten en in industriële toepassingen zoals leerbewerking en in de textielindustrie. In 2007 was het grootste deel van de enzymproductie bestemd voor het gebruik in schoonmaak- en wasmiddelen (HERA, 2007).

Subtilisines worden ook gebruikt als voedingsenzym (EFSA, 2024). Volgens de definitie in Verordening (EG) 1332/2008 is een voedingsenzym *“een product dat is verkregen uit planten, dieren of micro-organismen dan wel producten daarvan, waaronder een product dat is verkregen door een gistingsproces met behulp van micro-organismen: i) dat een of meer enzymen bevat die een specifieke biochemische reactie kunnen katalyseren; en ii) dat voor een technisch doel aan levensmiddelen wordt toegevoegd in eender welk stadium van de vervaardiging, de verwerking, de bereiding, de behandeling, de verpakking, het vervoer of de opslag van levensmiddelen”*. Een toepassing van subtilisine die is gerelateerd aan voeding, is bij de productie van eiwithydrolysaten. Dit zijn ‘voorverteerde’ eiwitten die sneller worden opgenomen dan onbehandelde eiwitten en worden toegepast in sport- en dieetvoeding.

2.2 Kenmerken van de stof

2.2.1 Identiteit

Tabel 1 geeft een samenvatting van de gegevens over identiteit en classificatie zoals overgenomen uit het REACH registratiedossier (ECHA, 2023) en uit de Classificatie en Labelling (C&L) inventaris op de ECHA website (geraadpleegd op 01-07-2024).

Tabel 1. Identiteit en Classificatie

Stofnaam	subtilisine
Synoniemen	Subtilisin, Enzyme Class No.: 3.4.21.62
CAS-nummer	9014-01-1
Geharmoniseerde classificatie	Skin Irrit. 2 H315 Eye Dam. 1 H318 STOT SE 3 H335 Resp. Sens. 1 H334
Classificatie/ trigger voedselketen	Geen relevante geharmoniseerde classificatie, afleiding van de i-JG-MKN _{water} , voedselketen niet getriggerd.
REACH / Zeer Zorgwekkende Stof	Subtilisine is geregistreerd onder REACH met een productie- en/of importvolume van ≥ 1000 - < 10000 ton/jaar. De stof is niet opgenomen op de lijst van (p)ZZS.

De volgende informatie is overgenomen uit HERA (2007): Subtilisines zijn serine-proteasen met een specifieke aminozuurvolgorde (histidine, aspartaanzuur en serine) en een driedimensionale structuur. De grootte varieert van 18 tot 90 kDa. Subtilisines zoals toegepast in wasmiddelen zijn gemiddeld 27 kDa en bestaan uit 269-275 aminozuren. De overeenkomst in aminozuurvolgorde tussen verschillende subtilisine-varianten is 60-99%. De variaties in de aminozuurvolgorde zijn vooral te vinden aan de buitenkant van de enzymen. Deze variatie zorgt voor verschillen in de mate van specificiteit van de immuunrespons tegen deze enzymen (HERA, 2007).

Enzymen worden doorgaans gekarakteriseerd op basis van enzymactiviteit. Deze kan op verschillende manieren worden bepaald, bijvoorbeeld door het meten van afbraakproducten van bekende eiwitten zoals hemoglobine, caseïne of dimethylcaseïne, of via chemoluminescentie waarbij een eiwitsubstraat wordt gebruikt dat licht uitstraalt na afbraak door het enzym. Om verschillende subtilisine preparaten met elkaar te vergelijken, wordt de hoeveelheid actieve stof uitgedrukt in 'active enzyme protein' (aep). De aep-waarde vertegenwoordigt de hoeveelheid puur actief enzym en wordt berekend op basis van de enzymactiviteit in combinatie met een eiwitbepaling via titratie en/of aminozuuranalyses (HERA, 2007).

2.2.2

Fysisch-chemische eigenschappen en gedrag in het milieu

HERA (2007) geeft een overzicht van fysisch-chemische eigenschappen dat hieronder is gekopieerd (Tabel 2). Het REACH-registratiedossier vermeldt voor de meeste fysisch-chemische eigenschappen geen studieresultaten, maar een samenvatting van literatuurgegevens. Alleen voor de dampdruk wordt een experimentele waarde vermeld van 0,007 Pa bij 25 °C (ECHA, 2023). Deze waarde lijkt niet aannemelijk.

Afbreekbaarheid

Subtilisine wordt geïnactiveerd onder basische omstandigheden en bij toenemende temperatuur. Studies naar de afname van protease-activiteit laten complete inactivatie zien tijdens wascycli bij temperaturen van 60 en 100 °C. Bij 40 °C was er 20 minuten na het wassen nog 15-30% activiteit. In studies met vaatwasmiddelen bij 55-65 °C werd subtilisine compleet geïnactiveerd (HERA, 2007).

Subtilisine is goed biologisch afbreekbaar onder aërobe omstandigheden. ECHA (2023) vermeldt 100% afbraak na 29 dagen in een OECD 301B test. HERA (2007) vermeldt resultaten van diverse OECD 301D en E testen met varianten van subtilisine die de afbreekbaarheid bevestigen (zie Bijlage 2). In een studie met rivierwater nam de protease activiteit binnen een dag af met 97% (HERA, 2007). Er moet worden opgemerkt dat in een aantal gevallen het criterium voor 'readily biodegradable' niet wordt gehaald. Voor een UVCB³ als subtilisine zijn de ready testen minder geschikt omdat de teststoffen variabel zijn. Ook kan het zijn dat sommige bestanddelen wel goed afbreken, maar andere niet.

³ UVCB = substance of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials

HERA (2007) vermeldt resultaten van metingen in afvalwater voor en na behandeling. In een studie werd in onbehandeld afvalwater een protease activiteit gemeten overeenkomend met 12-72 µg/L subtilisine. In het behandelde effluent was deze <1,6 µg/L (detectielimiet), overeenkomend met een verwijderingspercentage van 87-98%. Met een immunologische detectiemethode werden geen subtilisine-specifieke eiwitten aangetoond in het ng/L-bereik. In een andere studie werden de protease activiteit en aanwezigheid van subtilisine bepaald in in- en effluenten van twee rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi). Protease concentraties waren 45-600 µg/L in het influent en <0,1-8 µg/L in het effluent (85-99% verwijdering). De concentraties van subtilisine-specifieke eiwitten waren 11-20 µg/L in het influent en op of onder de detectielimiet in het effluent (HERA, 2007).

Tabel 2. Fysisch-chemische eigenschappen van subtilisine. Tabel overgenomen uit HERA (2007), onderliggende gegevens zijn niet beoordeeld door het RIVM.

Parameter	Value	Remark
Macromolecular Description Physical state /Particle size	White crystals or powder (pure enzyme)	In detergents added as 1-5% preparation: stabilized liquid, slurry or coated granulate
Bulk density (kg/m ³)	0.6 – 1.3 1	Granulates and Liquid Preparations Crystalline Enzyme
Melting point (°C)	Not relevant	Heating leads to destruction
Boiling point (°C)	<i>Not relevant</i>	Heating leads to destruction
Vapour pressure at 25 °C (Pa)	1 x 10⁻⁶	Minimum value acc. to TGD
Water solubility at 25 °C (g/l)	> 1 kg/l	Henkel (2005)
Octanol-water partition coefficient: logPow	- 3.1	Henkel (2005)
Koc (l/kg)	< 1.3	Calculated acc. to TGD
Henry coefficient (unitless): log H	-4	Minimum value acc. to TGD
pH*	7 – 10	

* pH of substance in solution (range of isoelectric points)

3 Indicatieve normen voor oppervlaktewaterkwaliteit

3.1 Voedselketenroute

Afhankelijk van de stofeigenschappen moeten de effecten op de voedselketen te worden meegenomen bij het afleiden van i-JG-MKN. Subtilisine heeft echter geen eigenschappen die aanleiding geven om de voedselketenroute te beoordelen.

3.2 Ecotoxiciteit

3.2.1 Beschikbare gegevens

Voor het afleiden van de i-MKN_{eco} is gebruik gemaakt van gegevens uit het REACH-registratiedossier (ECHA, 2023) en uit HERA (2007). De gegevens uit de US EPA ECOTOX Knowledgebase (US EPA, 2024) zijn opgenomen in HERA (2007). De geselecteerde gegevens staan in Bijlage 2. De effectconcentraties zijn uitgedrukt in mg/L active enzyme protein (aep). Resultaten waarvan niet zeker is of ze zijn uitgedrukt als aep, zijn niet meegenomen.

Er zijn acute en chronische studies met de drie basissoorten alg, kreeftachtige en vis. De laagste acute effectconcentratie is een 48-uurs EC₅₀ van 0,062 mg aep/L voor mobiliteit van de watervlo *Daphnia magna*. De laagste chronische ecotoxiciteitswaarde is een 21-daagse NOEC van 0,00079 mg aep/L (0,79 µg aep/L) voor reproductie van de *D. magna* uit een studie waarbij de testoplossingen om de dag werden ververs. De concentraties subtilisine in de verse oplossingen waren lager dan nominaal, de NOEC is gebaseerd op gemeten tijdgewogen gemiddelde concentraties.

De variatie in effectconcentraties is groot. Zo variëren de acute EC₅₀'s voor algen van 0,3 tot 200 mg aep/L en voor *Daphnia magna* van 0,062 tot 13 mg aep/L. De studies zijn uitgevoerd met verschillende producten, maar volgens HERA (2007) is er geen systematisch verschil in de uitkomsten tussen wild type (van natuurlijke origine) en 'engineered' (genetisch gemodificeerde origine) enzym.

Het is aannemelijk dat een deel van de variatie te maken heeft met de afbraak van het enzym tijdens de test. Effectconcentraties zouden daarom bij voorkeur gebaseerd moeten zijn op gemeten concentraties. Het is echter niet zeker dat de verschillen in effectconcentraties hiermee kunnen worden verklaard, want er is ook een groot verschil in uitkomsten tussen studies waarin wel is gemeten. Het REACH registratiedossier bevat twee chronische studies met *D. magna*, met NOEC's van respectievelijk 0,00079 en ≥0,324 mg aep/L. De tweede studie wordt beschouwd als 'key-study', maar de NOEC is hoger dan de acute 48-uurs EC₅₀ van 0,172 mg aep/L die ook als 'key' wordt beschouwd door de registrant. Het is niet aannemelijk dat acute effecten optreden bij lagere concentraties dan chronische en daarom wordt in dit advies de lagere NOEC gebruikt.

Volgens de REACH-samenvattingen wordt maar een klein deel van het toegevoegde eiwit teruggevonden, met name bij lage testconcentraties. Dit geldt ook in versbereide testoplossingen. De recovery is bovendien variabel. De samenvattingen in het REACH registratiedossier bevatten echter weinig details over de meetresultaten en geven geen informatie over de prestatiekenmerken van de gebruikte meetmethodes. Een gedegen evaluatie van de onderliggende studies en analyserapporten zou meer inzicht kunnen geven in de blootstelling en de beste maat voor het uitdrukken van effecten. Dit valt echter buiten de indicatieve methodiek.

Per soort is daarom de laagste waarde opgenomen in de tabel, ongeacht het product waarmee de test is uitgevoerd en of er wel of niet is gemeten.

3.2.2 Afleiding i-MKN

Het stappenschema voor de MKN-afleiding is uitgewerkt in Bijlage 2.

Bij de huidige combinatie van gegevens wordt de i-JG-MKN_{zoet, eco} afgeleid met een veiligheidsfactor van 10 op de laagste NOEC. De i-JG-MKN_{zoet, eco} is 0,079 µg aep/L (79 ng aep/L). De i-JG-MKN_{zout, eco} wordt volgens de standaardwerkwijze afgeleid met een extra veiligheidsfactor van 10 en is 7,9 ng aep/L.

De i-MAC-MKN_{zoet, eco} wordt afgeleid met een veiligheidsfactor van 100 op de laagste L(E)C₅₀ van 0,062 mg aep/L. De i-MAC-MKN_{zoet, eco} is 0,62 µg aep/L (620 ng aep/L). De i-JG-MKN_{zout, eco} wordt volgens de standaard werkwijze afgeleid met een extra veiligheidsfactor van 10 en is 62 ng aep/L.

4 Discussie en conclusies

In dit advies doet het RIVM een voorstel voor indicatieve waterkwaliteitsnormen voor het enzym subtilisine.

In onderstaande tabel zijn de voorgestelde indicatieve MKN-waarden samengevat. Omdat subtilisine naar verwachting niet sterk bindt aan zwevend stof gelden deze voor zowel opgeloste als totaalconcentraties.

De i-MKN's zijn uitgedrukt als concentratie 'active enzyme protein' (aep). De aep-waarde vertegenwoordigt de hoeveelheid puur actief enzym (zie paragraaf 2.2.1) en is de gebruikelijke manier om enzymen te karakteriseren. Om een emissie te kunnen toetsen aan de i-MKN's, moet bekend zijn wat de aep-concentratie van subtilisine in de lozing is.

Tabel 3. Overzicht van indicatieve milieukwaliteitsnormen voor subtilisine (CAS 9014-01-1. Alle waarden zijn in ng aep/L en gelden voor opgeloste en totaal concentraties.

Stof	Zoet oppervlaktewater [ng aep/L]		Zout oppervlaktewater [ng aep/L]	
	i-JG-MKN _{zoet}	i-MAC-MKN _{zoet}	i-JG-MKN _{zout}	i-MAC-MKN _{zout}
subtilisine	79	620	7,9	62

HERA (2007) vermeldt een PNEC van 0,1 µg aep/L (100 ng aep/L), dit is in lijn met de hier afgeleide i-JG-MKN_{zoet}. De HERA-PNEC is afgeleid op basis van een EC₅₀ voor *D. magna* van 0,1 mg aep/L en een veiligheidsfactor van 1000. In de HERA-beoordeling zijn geen chronische ecotoxiciteitsgegevens opgenomen. HERA (2007) stelt dat de EC₅₀ van 0,1 mg aep/L voor *D. magna* uitzonderlijk laag is in vergelijking met andere gegevens, maar het REACH registratiedossier vermeldt redelijk vergelijkbare EC₅₀'s van 0,062, 0,092 en 0,172 mg aep/L.

Het REACH registratiedossier vermeldt een PNEC van 1,7 µg aep/L, afgeleid met een veiligheidsfactor van 10. Waarschijnlijk is de NOEC van 0,017 mg aep/L voor de vis *Pimephales promelas* als basis gebruikt. Het REACH-registratiedossier bevat echter ook lagere effectconcentraties. Het is niet duidelijk waarom die niet zijn gebruikt, de lagere waarden moeten volgens de indicatieve methodiek wel worden meegenomen.

De resultaten van de ecotoxiciteitstesten zijn zeer variabel. Dit kan komen door snelle afbraak van het eiwit en/of beperkingen in de analyse van de testoplossingen. Een gedegen evaluatie van de onderliggende studies en analyserapporten zou meer inzicht kunnen geven in de blootstelling. Dit valt echter buiten de indicatieve methodiek.

5 Status van dit advies/disclaimer

Dit advies is opgesteld naar aanleiding van een vraag in de context van een vergunningverlening. Het advies is getoetst volgens de interne RIVM-kwaliteitsprocedures en extern getoetst door de *Wetenschappelijke Klankbordgroep normstelling water en lucht* (WK-nwl). Het voorstel wordt als advies aangeboden aan het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat. Het ministerie kan het RIVM-advies gebruiken om indicatieve waterkwaliteitsnormen vast te stellen. Deze vaststelling heeft nog niet plaatsgevonden.

Literatuur

- ECHA. 2023. Registratiedossier subtilisin. EC number 232-752-2. CAS number 9014-01-1. REACH registration. Dossier subtype article 10 – full. Lead (joint submission). Reference date 14-Sep-2010. Last updated on 21-Dec-2023. Geraadpleegd 14-Sep-2010. Beschikbaar via [Subtilisin 100.029.762 | c6e7378b-c3c9-4cef-bfb4-81d4fc812ea5 - ECHA CHEM \(europa.eu\)](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8873)
- EFSA. 2024. Safety evaluation of the food enzyme subtilisin from the non-genetically modified *Bacillus paralicheniformis* strain AP-01. EFSA Journal 22: e8873. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8873>
- HERA. 2007. Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of household cleaning products. Subtilisins (Protease). CAS No: 9014-01-1, 1395-21-7, 9073-77-2, 9001-92-7, 79986-26-8, 95979-76-3, 68909-17-1. Edition 2.0 February 2007. [HERA Human & Environmental Risk Assessment - Subtilisins \(Protease\) - \(heraproject.com\)](https://heraproject.com)

US EPA. 2024. ECOTOX Knowledgebase. United States Environmental Protection Agency. Beschikbaar via: <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>. Geraadpleegd 04-07-2024.

Bijlage 1. Afkortingen

aep	active enzyme protein
ECHA	European Chemicals Agency
ECx	Effect Concentration waarbij x% effect wordt waargenomen
JG-MKN	Jaargemiddelde
MAC-MKN	milieukwaliteitsnorm
MKN	Maximaal Aanvaardbare Concentratie
NOEC	Milieukwaliteitsnorm
REACH	No Observed Effect Concentration
	Registration, Evaluation and Authorisation of Chemical (Verordening EU 1907/2006)
US EPA	United States Environmental Protection Agency
WK-nwl	Wetenschappelijke Klankbordgroep
ZZS	normstelling water en lucht
	Zeer Zorgwekkende Stof

Bijlage 2. Rapportageformulier i-MKN subtilisine

1. Afbreekbaarheid

Onderstaande tabel geeft een samenvatting van gegevens over de biologische afbreekbaarheid van subtilisine. Tabel en betrouwbaarheidsscore zijn overgenomen uit HERA (2007), onderliggende gegevens zijn niet beoordeeld door het RIVM.

Test method	Enzyme preparation	Test result	Klimisch reliability code	Enzyme modification	Reference
OECD 301 D (Closed Bottle Test)	Subtilisin (BLAP F49)	56-68% BOD/COD (15 days)	2	protein-engineered	Henkel (1990a)
	Subtilisin (P300)	80-84% BOD/COD (15 days)	2	wild type	Henkel (1990a)
	Subtilisin (BLAP F49)	65-80% BOD/COD (28 days)	1	protein-engineered	Henkel (1995a)
	Subtilisin (PM 111)	79 % BOD/COD (28 days)	1	protein-engineered	Henkel (1992a)
	Subtilisin	62 – 73 % BOD/COD	4	n.i.	Schöberl & Huber (1988)
OECD 301 E (Modif. OECD Screening Test)	Savinase	85% DOC (22 days)	1	wild type	NICNAS (1993)
	Subtilisin	63 – 89 % DOC 56 – 69 % TOC	4	n.i.	Schöberl & Huber (1988)
	Subtilisin (Product C)	71 % DOC (28 days)	1	protein-engineered	Genencor (1996a)
	Subtilisin (Product H)	64 % DOC (28 days)	1	wild type	Genencor (1996a)
	Subtilisin (Product I)	55 % DOC (28 days)	1	protein-engineered	Genencor (1996a)
	Subtilisin (Product H)	79 % DOC (28 days)	1	wild type	Genencor (1996a)
	Alcalase®	93 % DOC (28 days)	1	wild type	Novo Nordisk (1992a), Ref. in: Bergman et al. (1997)
	Durazym™	88 % DOC (21 days)	1	protein-engineered	Novo Nordisk (1991a), Ref. in: Bergman et al. (1997)
	Esperase®	84 % (DOC, 28 days)	1	wild type	Novo Nordisk (1992b), Ref. in: Bergman et al. (1997)
	Savinase®	85 % DOC (28 days)	1	wild type	Novo Nordisk (1992c), Ref. in: Bergman et al. (1997)

n.i. = no information

2. TOXICITEIT

2.1 Ecotoxiciteit

De geselecteerde acute en chronische ecotoxiciteitsgegevens uit ECHA (2023) en HERA (2007) staan in de tabellen hieronder. De studies zijn uitgevoerd met verschillende producten. Volgens HERA (2007) is er geen systematisch verschil in de uitkomsten tussen wild type en 'engineered' enzym, zowel op basis van blootstellingsdata als effectdata. Per soort is de laagste waarde opgenomen in de tabel, ongeacht het product waarmee de test is uitgevoerd.

De effectconcentraties zijn uitgedrukt in mg/L active enzyme proteïne (aep). Resultaten waarvan niet zeker is of ze zijn uitgedrukt als aep, zijn niet meegenomen.

Met betrekking tot de algenstudies wordt opgemerkt dat de laagste EC₅₀'s afkomstig zijn uit HERA (2007). HERA (2007) vermeldt echter geen NOEC's of EC₁₀. De chronische NOEC en EC₁₀ zoals hieronder vermeld zijn afkomstig uit het REACH registratiedossier, dit zijn andere studies. Bijbehorende EC₅₀'s uit de REACH-studies zijn >10 keer hoger dan de EC₅₀'s uit HERA (2007). Van de EC₅₀'s in HERA (2007) is niet bekend of ze zijn gebaseerd op biomassa, berekend als de oppervlakte onder de groeicurve, of op het aanbevolen eindpunt groeisnelheid. De berekening voor biomassa levert doorgaans lagere effectwaarden maar het verschil tussen de acute waarden is dusdanig groot dat dit geen verklaring lijkt.

ACUUT					
Soort	Duur	Para-meter	Waarde [mg aep/L]	Opmerking	Ref.
Bacteriën					
<i>Pseudomonas putida</i>	0,5 u	EC ₅₀	>120		HERA, 2007
Algen					
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	72 u	EC ₅₀	0,3	eindpunt groeisnelheid of biomassa niet vermeld	HERA, 2007
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	72 u	EC ₅₀	0,39	idem	HERA, 2007
Kreeftachtigen					
<i>Daphnia magna</i>	48 u	EC ₅₀	0,062	nominaal	ECHA, 2023
Vissen					
<i>Danio rerio</i>	96 u	LC ₅₀	5		HERA, 2007
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96 u	LC ₅₀	8,2	gemeten	ECHA, 2023

CHRONISCH					
Soort	Duur	Para-meter	Waarde [mg aep/L]	Opmerking	Ref.
Algen					
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	72 u	NOEC	2,46	groeisnelheid; nominaal*; EC50 7,8 mg aep/L	ECHA, 2023

CHRONISCH					
Soort	Duur	Parameter	Waarde [mg aep/L]	Opmerking	Ref.
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	72 u	EC ₁₀	0,21	groeisnelheid; initieel gemeten*; EC ₅₀ 5,0 mg aep/L	ECHA, 2023
Kreeftachtigen					
<i>Daphnia magna</i>	21 d	NOEC	0,00079	reproductie; tijdgewogen gemiddelde concentraties (gemeten); recovery 4-41,6% van nominaal op t=0	ECH, 2023A
Vissen					
<i>Danio rerio</i>	33 d	NOEC	0,006	ELS; gemeten*	ECHA, 2023
<i>Pimephales promelas</i>	32 d	EC ₁₀	0,017	ELS; gemeten	ECHA, 2023

* De EC₁₀ is in de REACH-samenvatting gerapporteerd o.b.v. droge stof (zonder aep correctie), aep berekend o.b.v. ratio aep en droge stof zoals gerapporteerd voor andere effectparameters (EC₅₀, LOEC)

2. Afleiding i-risicogrenzen

i-JG-MKN_{zoet}

i-JG-MKN_{water, voedselketen}

Stap	Resultaat	Opmerking
1	Afleiding van de i-JG-MKN _{water, voedselketen} wordt niet getriggerd	

i-JG-MKN_{zoet, eco} en i-JG-MKN_{zout, eco}

Stap	Vraag/statement	Resultaat
1	gedegen JG-MKN aanwezig?	Ja → STOP Nee → 2
2	gedegen MTR _{zoet} aanwezig?	Ja → 3 Nee → 4
4	experimentele data beschikbaar?	Ja → 6 Nee → 5
6	data voor	

Stap	Vraag/statement	Resultaat
	acuut en chronisch	$i\text{-JG-MKN}_{\text{zoet, eco-acuut}} = L(E)C_{50,\text{min}} / AF = 0,062 \text{ mg aep/L} / 1000 = 0,062 \text{ } \mu\text{g aep/L}$ $i\text{-JG-MKN}_{\text{zoet, eco-chronisch}} = NOEC_{\text{min}} / AF = 0,79 \text{ } \mu\text{g aep/L} / 100 = 7,9 \text{ ng aep/L}$ → 7
7	data voor gehele acute basisset?	Ja → 8 Nee → 10
8	NOEC voor tenminste kreeftachtige of vis én NOEC beschikbaar voor dezelfde soort als $L(E)C_{50,\text{min}}$	Ja → kies $i\text{-JG-MKN}_{\text{zoet, eco-chronisch}}$ → 9
9	Potentieel gevoelige groep getest	Ja → $i\text{-JG-MKN}_{\text{zoet, eco}} = i\text{-JG-MKN}_{\text{zoet, eco-chronisch}} \times 10 = 79 \text{ ng aep/L}$ → 12
12	$i\text{-JG-MKN}_{\text{zoet, eco}} = 79 \text{ ng aep/L}$ $i\text{-JG-MKN}_{\text{zout, eco}} = 7,9 \text{ ng aep/L}$	$i\text{-JG-MKN}_{\text{zout, eco}} = i\text{-JG-MKN}_{\text{zoet, eco}} / 10$ → 13
13	Gebruik $i\text{-JG-MKN}_{\text{zoet, eco}}$ voor de selectie van de $i\text{-JG-MKN}_{\text{zoet}}$ Gebruik $i\text{-JG-MKN}_{\text{zout, eco}}$ voor de selectie van de $i\text{-JG-MKN}_{\text{zout}}$	

a: Als de $NOEC_{\text{min}}$ of $L(E)_{10}$ hoger is dan de $L(E)_{50,\text{min}}$, raadpleeg dan de guidance voor gedegen normen om een gemotiveerde keuze te maken voor de uiteindelijke AF.

selectie $i\text{-JG-MKN}_{\text{zoet}}$ en $i\text{-JG-MKN}_{\text{zout}}$

	Opmerking
$i\text{-JG-MKN}_{\text{water, voedselketen}} = \text{n.v.t.}$	
$i\text{-JG-MKN}_{\text{zoet}} = 79 \text{ ng aep/L}$	
$i\text{-JG-MKN}_{\text{zout}} = 7,9 \text{ ng aep/L}$	

$i\text{-MAC-MKN}_{\text{zoet, eco}}$ en $i\text{-MAC-MKN}_{\text{zout, eco}}$

Stap	Vraag/statement	Resultaat
1	gedegen norm aanwezig?	Ja → STOP Nee → 2
2	experimentele acute data voor water?	Ja → 4 Nee → 3
3	gebruik QSAR's mogelijk?	Ja → 4 Nee → STOP
4	Bereken $i\text{-MAC}_{\text{zoet, eco}}$	$i\text{-MAC-MKN}_{\text{zoet, eco}} = LC_{50,\text{min}} / AF = 0,062 \text{ mg aep/L} / 100 = 0,62 \text{ } \mu\text{g aep/L} = 620 \text{ ng aep/L}$ → 5

5	$i\text{-MAC-MKN}_{\text{zoet, eco}} = 620 \text{ ng aep/L}$ $i\text{-MAC-MKN}_{\text{zout, eco}} = 62 \text{ ng aep/L}$	$i\text{-MAC-MKN}_{\text{zout, eco}} = i\text{-MAC-MKN}_{\text{zoet, eco}}/10$
---	---	--

selectie $i\text{-MAC-MKN}_{\text{zoet, eco}}$ en $i\text{-MAC-MKN}_{\text{zout, eco}}$

	Opmerking
$i\text{-MAC-MKN}_{\text{zoet, eco}} = 620 \text{ ng aep/L}$	
$i\text{-MAC-MKN}_{\text{zout, eco}} = 62 \text{ ng aep/L}$	