

## **Workshop Persistentie, Bioaccumulatie en Toxiciteit - 19 maart 2015, RIVM, Bilthoven**

Theo Traas heet alle deelnemers welkom. Het voornaamste doel van de workshop is kennis delen. De laatste PBT-workshop dateert van december 2011 (3 jaar en 3 maanden geleden) en heeft in een discussiepuntenlijst geresulteerd, die o.a. in Europese kaders is ingebracht. Gedurende deze workshop zullen zowel de laatste ontwikkelingen in PBT-beoordeling in diverse stofbeoordelingskaders als m.b.t. discussiepunten toegelicht worden.

### Caroline Moermond: Kort overzicht ontwikkeling kaders

Uitgangspositie is veelal hetzelfde: alle PBT-stoffen reguleren, bij voorkeur op een vergelijkbare manier. Hoe de verschillende stoffenkaders omgaan met stoffen die geïdentificeerd zijn als PBT is zeker niet hetzelfde. De kaders OSPAR, IMO Ballast water, Food & feed additives, en GHS (classificatie & labelling) worden buiten beschouwing gelaten. Een aantal kaders hebben specifiek benoemd hoe om te gaan met PBTs en kennen daarvoor een wettelijke basis, een aantal andere niet.

#### *REACH:*

Nieuw is de Annex XIII update in 2011 (PBT/vPvB-criteria), met een meer prominente plaats voor weight-of-evidence. Indien een stof PBT/vPvB is dient emissie geminimaliseerd te worden, lidstaten maken SVHC dossiers voor PBT-stoffen, waarna stof wordt opgenomen in de kandidatenlijst, additionele regulering kan vervolgens via autorisatie dan wel restrictie incl. Sociaal-Economische Analyse plaats vinden.

#### *Stockholm conventie POPs:*

Nieuwe ontwikkelingen zijn het meenemen van afbraakproducten in de beoordeling, uitgebreidere beoordeling van alternatieven, aandacht voor uitzonderingen, het onderwerp recycling en labelling van producten met POPs.

#### *Biociden:*

Nieuwe verordening (2012) met daarin verwijzing naar Annex XIII van REACH, ook de REACH guidance wordt gevolgd. Indien een stof aan twee van drie PBT criteria voldoet, dan is het al een kandidaat voor substitutie. PBT stoffen worden in principe niet toegelaten, maar er zijn uitzonderingen mogelijk.

#### *Humane geneesmiddelen:*

Screening voor PBT-eigenschappen wordt wel benoemd in guidance met verwijzing in Q&A document naar Annex XIII van REACH. Er zijn echter geen consequenties voor de markttoelating wanneer er milieurisico's geconstateerd worden. PBT identificatie heeft daarmee geen gevolgen, maar kan wel vermeld worden op de bijsluiters.

#### *Gewasbeschermingsmiddelen:*

Er is nieuwe guidance, echter PBT-criteria lijken gekopieerd uit tekst van weleer en wijken daarmee iets af van huidige criteria. Als de stof PBT is wordt deze niet toegelaten, maar daar zijn (in navolging van biociden) uitzonderingen op mogelijk. Als stof voldoet aan twee van de drie criteria vormt het een kandidaat voor substitutie.

#### *KRW:*

Wanneer een stof een priority substance is moet deze gemonitord worden. Dit zijn standaard monitoringpunten, meestal in grote rivieren. PBT stoffen kunnen priority hazardous substance worden, en dan zijn er meer gevolgen als norm wordt overschreden.

#### *Diergeneesmiddelen:*

Er is een nieuwe verordening op komst, maar de wettelijke tekst bevat vooralsnog geen PBT-assessment. Momenteel ligt een 'Reflection paper on poorly extractable substances' ter consultatie, mogelijk kan dit ook opgepikt worden in andere stofbeoordelingskaders. Onlangs is de concept PBT guidance voor de tweede keer ter consultatie geweest. In deze guidance wordt veel verwezen REACH. PBT beoordeling volgt pas wanneer een stof in fase II van de beoordeling komt. Milieurisico is dan wel onderdeel van baten-risico analyse.

Het fictieve verhaal van Cindy wordt verteld (pitch break-out sessie I: Rechts inhalen via REACH):

Cindy ziet dat er watermonsters worden genomen en hoort dat Pipothrin als prioritaire stof in KRW

programma is opgenomen a. Daarna komt ze diverse toepassingen voor pipothrin als middel tegen kleine beestjes tegen. In verschillende kaders blijkt de stof toegelaten, maar met andere eindpunten uit de milieubeoordeling (toepassing als biocide, diergeneesmiddel, en gewasbeschermingsmiddel bij opslag van graan en koolzaad). Als diergeneesmiddel is de stof benoemd als mogelijk PBT, in de andere kaders niet. Stof is niet geregistreerd onder REACH, mag deze PBT-stof toch binnen REACH als SVHC aangemerkt worden? Helpt dat, is dat zinvol?

#### Eric Verbruggen: Overzicht voortgang discussiepunten

REACH guidance is geüpdate (i.v.m. aanpassing Annex XIII) in 2012. Output discussiepunten vorige workshop is juist de basis geweest voor deze revisie.

#### *Compartiment:*

1. Welk compartiment (zowel voor P, B als T relevant):  
P kent criteria voor alle compartimenten, B en T alleen criteria voor het aquatisch compartiment. T humaan (incl. doorvergiftiging) is niet compartiment-gerelateerd. Voor P is het duidelijk, daar waar de hoofdmoot of een significant deel van de stof in terecht komt. Dat is te bepalen a.d.h.v. multimedia modellen (zie REACH Guidance R11). Tip: EpiWIN draaien – geeft ook een voorspelling. Voor B & T zijn geen compartiment-specifieke criteria. Aquatische testen zijn lastig uit te voeren – hoe hou je de testconcentraties stabiel, wat voor bioaccumulatie nu een deel ondervangen is door 'dietary study'. Data van terrestrische en bentische testen zijn lastig interpreteerbaar in afwezigheid van criteria.

#### *Persistentie:*

2. P: Temperatuurcorrectie:  
Welke T is relevant of geldt voor de criteria, omgevingstemperatuur of bij 20°C? REACH is helder: relevante condities (hydrolyse bij 10°C). Simulatietesten: 12°C genoemd als gemiddelde EU T. Gewasbeschermingsmiddelen: stelt 20°C. Afstemming tussen kaders is wenselijk. Is T-correctie via Arrhenius-vergelijking conform REACH? Daarmee zijn halfwaardetijden om te rekenen wat mogelijk een factor 2 tot 3 scheelt.
3. Non-Extractable Residue (NER):  
Wat is NER en wat is bound residue? Welke extractiemethode pas je toe? Welke analyse pas je toe en hoe ga je uiteindelijk om met de data?  
Totaal residue: extraheerbaar + niet-extraheerbaar. Bound residue = covalent gebonden. ECETOC-definitie: niet extraheerbaar met milde extractiemiddelen. In expertgroep vindt men dat extractie wel wat rigouzeuzer mag. Alles wat extraheerbaar is, is te identificeren als moederstof, als metaboliet of betreft mineralisatie. Bound residue is niet te bepalen, alleen te kwantificeren met LSC. Bound residue vormt daarmee een black box – lastig om daar harde conclusies over te trekken. Uitkomst hangt sterk af van extractiemethode. Pragmatische aanpak: NER-extractie doen en moederstof analyseren. Reduceer NER zoveel als mogelijk, door een breed scala aan oplosmiddelen toe te passen. De uitvoerige uiteenzetting van NER-problematiek vormt de pitch voor break-out sessie II: Bound residues.
4. Hydrolyse & fotolyse:  
Dragen deze processen significant bij aan overall halfwaardetijd van PBT/vPvB-stoffen? Speelt alleen in opgeloste fase die een beperkte rol speelt voor stoffen die met name aan bodemdeeltjes en sediment binden. Rol van fotolyse is ook beperkt.
5. Veldstudies:  
Hoe worden data uit veldstudies gebruikt voor P-discussies? Daar gebeurt momenteel weinig aan en speelt dan ook nauwelijks een rol in de P-discussie.
6. Multimedia modelling:  
Wat versta je hieronder en hoe staat dat in verhouding tot experimentele data.

Dorien ten Hulscher: er zijn twee zaken die door elkaar lopen, hoe sluit het zo dicht mogelijk aan bij de werkelijkheid, terwijl testen gestandaardiseerd zijn. Eric Verbruggen: halfwaardetijd vormt eerder een harmonisatiediscussie dan locatiediscussie. Fraukje Balk: fotolyse wordt snel

weggeschreven, verbaast haar een beetje. Eric Verbruggen: verschil van mening wat toe te wijzen is aan verschil in parametrisering. Hoe wordt milieurelevante pH bepaald bij hydrolyse? Eric Verburggen: hydrolyse bij pH 4, 7 en 9. pH 7, 8 wordt gezien als meest relevant. Als stof sterk hydrolyseert bij pH 4 dan telt dat minder zwaar mee dan bij 7. Let wel, gaat wel om opgeloste fase.

#### *Bioaccumulatie:*

7. Dietary bioaccumulation test: testrichtlijn is 3 jaar oud, naast de testmogelijkheid met blootstelling via water is het nu mogelijk om vissen bloot te stellen via voedsel. Dit resulteert echter niet in een BCF-waarde, maar een halfwaardetijd  $-k_2$  (uitscheiding vis) en een biomagnificatiefactor (BMF). De BMF kan echter niet één-op- één vergeleken worden met veldstudies die in BMF's resulteren. Er zijn stoffen met BCF's van 5000 die een minimum BMF hebben van 0.3 (criterium  $>1$  lijkt dan ook niet toepasbaar). De opnameconstante vanuit water ( $k_1$ ) is nodig om de BCF te kunnen berekenen ( $k_1/k_2$ ).  $k_1$  is te schatten uit eigenschappen van vis en log Kow. UK heeft evaluatiestudie gedaan naar 13 methoden en concludeert dat schattingen variëren met een (kleine) standaard deviatie van 0.2. Dit vormt ook de pitch voor de derde break-out sessie: OECD 305.
8. Groeicorrectie: de bioaccumulatiestudies worden uitgevoerd met juveniele vissen, sommige soorten groeien heel hard, tot 3% toename in lichaamsgewicht per dag. Ook het vetgehalte kan gedurende het experiment verdubbelen, met als gevolg dat er een soort van verdunning optreedt. Door voor groei te corrigeren kan de resulterende BCF aanzienlijk hoger uitvallen.
9. Halfwaardetijden in vissen:  
Is dat een eindpunt wat universeel is voor alle bioaccumulatieprocessen (BCF, BMF, BAF)? Het is afhankelijk van grootte van de vis, en wordt verder bepaald door metabolische omzettingcapaciteit. Een *in vitro* test (OECD TG in ontwikkeling) a.d.h.v. hepatocyten of S9-fracties van de lever van vissen. Uitkomst dient weer terugvertaald te worden naar *in vivo* situatie.
10. Velddata: trofische magnificatiestudies, richtingscoëfficiënt van toename van concentratie per trofisch niveau (1, 2, 3, 4 etc.). TMF geeft een reflectie van biomagnificatie potentie, maar is variabel en hangt af van experimentele opzet (incl. warmbloedige dieren), rivier of meer, zoet of zout water, bentisch of pelagisch levende organismen. Het meenemen of weglaten van een soort kan meteen een factor 2 schelen qua uitkomst.
11. Veld- & monitoringdata: Hoe daarmee om te gaan? Veel van data is aquatisch, maar hoe dien je data voor andere compartimenten te interpreteren of mee te nemen in beoordeling van bioaccumulatie?

#### Emiel: Ontwikkelingen QSARs & Alternatieven in PBT/vPvB-beoordeling

P-, B- en T-criteria: er is een onderscheid te maken in screening & definitieve criteria.

Alternatieven voor P: structuur activiteits-relaties: BIOWIN modellen van USEPA. Extrapolatie van aquatische afbraak naar bodem en sediment. Overall persistentie als criterium blijft lastige discussie omdat het niet direct met de Annex XIII criteria vergeleken kan worden. B: Voor bioaccumulatie zijn ook diverse QSAR-modellen voor handen om op basis van log Kow de BCF in te schatten (o.a. USEPA BCFBAF modellen). T: ECOSAR (ook van USEPA), minimum toxiciteit (op basis van hydrofobiciteit) – stof gaat in celmembranen zitten. Humane toxicologische modellen door Deense EPA, QSAR database voor CMR-eigenschappen. C&L inventory ECHA als alternatief om te screenen op toxicologische eigenschappen. Hormoonverstoring a.d.h.v. *in vitro* screeningstesten.

Het RIVM heeft in 2011 de PB-score tool ontwikkeld om stoffen te screenen op hun potentiële PBT/vPvB-eigenschappen. Screening P op basis van overall persistentie (incl. fate-modelling). Metabolisme laat zich lastig voorspellen en is dan ook niet meegenomen bij deze screening. B ook gescreend, T nog niet aan boord genomen (wel mogelijk a.d.h.v. ECOSAR voorspellingen). Stoffen die B en P zijn, zullen ergens voor een organisme aan het T-criterium voldoen. Dit vormt ook de pitch voor break-out sessie IV: Alternatieven in T.

## Terugkoppeling Break-out cases:

### I: Rechts inhalen via REACH

Stelling 1: Afwegingen spelen een rol (RA, SEA, PBT), geneesmiddelen – cytostatica kunnen wel degelijk gereguleerd worden, niet alles kan en mag door het afvoerputje. Zwarte lijstwerking vanuit kandidatenlijst, stoffen worden dan al uitgefaseerd. CoRAP wordt voor een deel ook gezien als zwarte lijst- terwijl dat helemaal niet het geval hoeft te zijn. Grofstoffelijker gaan werken, clustering, zou kunnen helpen, de huidige wetgeving staat dat niet toe. Extra stelling: over een paar jaar zijn er veel meer PBT-stoffen, vanwege UVCB's. C&L voor PBT: nog een lange weg te gaan. Stelling 'safety-by-design' wordt behoorlijk omarmd. Groepsgewijze aanpak is goed, maar verschil in interpretaties, wat is een groep? Op basis van chemie of toepassing of PBT (daar gaat het om), herijking PBT-aanpak. Industrie richt portfolio in op categorisatie van stoffen, wordt door ECHA nog niet ervaren als goede aanpak. WoE moet? Screening zou goed zijn, voldoet stof aan criteria - dan PBT, zo niet dan parkeren en geen PBT. Er blijven altijd stoffen waarover gediscussieerd kan worden. Rechts inhalen? Toch een beetje in de file. Kracht van de lijsten: elke zwarte lijst heeft zijn witte kant. Grijs lijsten: 2 v/d 3 criteria. Veel rodenticiden zijn PBT maar blijven op de markt bij gebrek aan alternatieven. Gaat dus niet altijd op. Oproep om PBT-stoffen niet langer meer in een PBT-hokje te stoppen, omdat we al veel meer weten van PBT. Pitch Caro: geharmoniseerde aanpak is wel steun voor, geen strak pleidooi voor alle PBT-stoffen bij REACH in te brengen.

### II: Bound residue

Definitie voor BR is niet gelijk voor iedereen: nu benoemd als stof covalent gebonden aan matrix en niet als zodanig van los te krijgen. Mechanismen van BR vorming blijven onduidelijk. Eric Verbruggen vertelde over case triclosan, gespiked slib gebruiken in bodem studie geeft minder BR i.p.v. direct de stof opbrengen. BR vorming zorgt voor 'verdwijnen' van de moederstof, mag je het bij DT50 optellen? Industrie merkt op dat minimaal 80% van stof terug te meten moet zijn anders niet conform GLP. Helaas houdt niet iedereen zich hier aan. Er wordt gesproken over milde of uitputtende extractie van de stof. Testen wijzen uit dat slecht extraheerbare stoffen vaak niet toxisch zijn, door verlaagde biobeschikbaarheid. Er wordt opgemerkt dat chemische extraheerbaarheid ook anders kan zijn dan biologische extraheerbaarheid (in/door een organisme). Omdat slecht extraheerbare stoffen niet biobeschikbaar zullen zijn, is het belangrijk om de adsorptiecapaciteit van het dragermateriaal/ matrix (zoals slib) te bepalen. Meten bij verschillende milieumomstandigheden waaronder T en pH, aeroob/anaeroob is noodzakelijk. BR is feitelijk geen moederstof meer, omdat het covalent gebonden zit aan de matrix. Identificatie van het extraheerbare deel, metaboliet of moederstof is belangrijk om het proces beter te snappen en risicoanalyses te kunnen maken. Maak een duidelijk onderscheid tussen intrinsieke eigenschappen en locatie specifieke eigenschappen van een stof, beiden belangrijk. Korte conclusies:

- Indien BR is gedefinieerd als covalent gebonden, dan geeft BR een verlaagd milieurisico, mits milieurelevante condities zijn getest en BR is vast gesteld d.m.v. uitputtende extracties.
- Er moet overkoepelend worden vastgelegd wat BR is.
- Er moet vast gesteld worden welke extractiemethoden (wanneer) gebruikt moeten worden, zodat inderdaad intensief wordt geëxtraheerd. Hierbij moet het verschil tussen de BR en NER (door analytische beperkingen bepaald), zo klein mogelijk gemaakt worden (theoretisch probleem?).
- Een minimale fractie van 80% extractie (GLP norm) zou moeten worden nageleefd, massa balans moet gedurende het hele experiment min. 80% zijn.

### III: OECD 305

Slides Eric Bleeker. Alternatieven zijn nuttig in het sturen welke studies je nodig hebt, meer screenend dan vervangend. *In vitro* testen als screening (potentiometing) is prima als voorloper op test met vissen. Niet onmiddellijk overall test met vissen voor vragen.

Eric Verbruggen: k1 pleidooi gehouden, variatie mag geen excuus zijn. Twee verschillende BCF-testen geven ook verschil in uitkomsten. OECD ringtest dietary test, toont aan dat voorspellingen in nabijheid van daadwerkelijk bepaalde waarden liggen. Variatie is een fact-of-life. Gevoel is dat er meer uitvoerig naar de modellen gekeken dient te worden alvorens geconcludeerd kan worden of het bruikbaar kan worden, met name ook voor 'lastigere' stofgroepen (bv. ioniserende verbindingen of ionogenen). Eric Verbruggen licht toe als dietary test al gedaan is dan dient het resultaat meegenomen te worden in discussie van criteria. K1 kan daar een instrument zijn om die koppeling te maken. Werkt niet voor ionogene stoffen.

Waarom leverhomogenaten (S9), is het niet makkelijker om weefsels/cellen te pakken? Rattenlever behandeld met aroclor. In S9 zit ook al fase 2, in hoeverre is rattenlever toepasbaar extrapoleerbaar met vissen. Juiste co-factoren toevoegen is een must.

### IV: Alternatieven in T

Slides Emiel Rorije. Op de stelling dat T-criteria overbodig zouden zijn (omdat alle PB / vPvB stoffen toch wel chronisch T zijn) kwamen gemengde reacties; T criteria moeten er blijven, voor stoffen waar T ondergeschikt is hebben we tenslotte de vPvB criteria, vs. T-criteria zoals ze nu zijn kunnen inderdaad afgeschaft worden, of ze moeten veel scherper (conservatiever) want er worden nu (PB)T-stoffen toegelaten die feitelijk wel (chronische) T-effecten laten zien op lage niveaus, maar die met de huidige testvereisten helemaal niet opgepikt worden. Een suggestie die breed gedragen werd was om eens een retrospectieve studie te doen van stoffen die wel P en B zijn maar niet T volgens de huidige criteria, om te zien wat voor type stoffen dat zijn, en of daar "kwaaiere pieren" tussen zitten die toch chronisch T-effecten bij lage blootstelling veroorzaken. Hormoon verstorende stoffen misschien. Wat direct leidde tot de vervolgstelling dat er specifieke T-criteria op basis van *in vitro* assays voor EDC toegevoegd moeten worden aan de huidige T-criteria. Dit lijkt een aardige optie, maar screening (mbv *in vitro* assays) is slechts nuttig als je T-negatives (definitief) opzij kan zetten als niet T (en dus niet PBT). Stand-alone assays zullen dat nooit kunnen, omdat *in vitro* assays nooit het hele palet aan potentieel hormoonverstorende processen coveren. Er zouden dan dus batterijen van *in vitro* assays gedefinieerd moeten worden waarop evt. criteria gebaseerd zijn. Dit lijkt praktisch gezien niet haalbaar. Tot slot werd gediscussieerd over het nut en de mogelijkheid om T-criteria op basis van Species Sensitivity Distributions te definiëren ipv op basis van de (toevallig) meest sensitieve T-test die er gedaan is. Dit lijkt op papier een heel goed plan, omdat de SSD aanpak ingebakken heeft dat er een hogere (minder conservatieve) Hazardous Concentration (HCx) afgeleid wordt als er meer data beschikbaar is (en dus minder onzekerheid over of de sensitive species wel gecovered zijn). In de praktijk lijkt het lastig om een wetenschappelijk solide SSD analyse te doen met slechts 3 species informatie (de wettelijke vereisten), al is het wel mogelijk. De discussie over de voordelen van de SSD aanpak (ook voor PBT-criteria) wordt al jaren gevoerd en er is nooit veel ontwikkeling die kant op geweest, mogelijk vanwege de praktische implicatie dat een SSD op basis van slechts drie (chronische) tests leidt tot een heel conservatieve (lage) HC5 schatting, en daarmee tot veel stoffen die (onterecht?) als T geclassificeerd worden.