

Le Directeur général

Maisons-Alfort, le 28 janvier 2021

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à la « demande d'avis sur un projet de décret relatif aux critères de qualité agronomique et d'innocuité des matières fertilisantes et des supports de culture (MFSC) conformément à l'article L. 255-9-1 du code rural et de la pêche maritime (CRPM) »

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique et technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L. 1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 13 octobre 2020 par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) pour la réalisation de l'expertise suivante : demande d'avis sur un projet de décret relatif aux critères de qualité agronomique et d'innocuité des matières fertilisantes et des supports de culture (MFSC) conformément à l'article L. 255-9-1 du code rural et de la pêche maritime (CRPM).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La demande du ministère concerne un projet de décret relatif aux critères de qualité agronomique et d'innocuité des matières fertilisantes et des supports de culture (MFSC) dont l'objectif est d'assurer un niveau de protection homogène des sols agricoles vis-à-vis des contaminations quelle que soit la voie d'autorisation du fertilisant (autorisation de mise sur le marché, conformité à une norme française, conformité à un cahier des charges, plan d'épandage, etc.).

Le projet de décret faisant l'objet de cette saisine, appelé « socle commun des MFSC », résulte de plusieurs lois récentes, qui convergent sur la nécessité de fixer des teneurs maximales pour les contaminants les plus importants des MFSC, de toutes natures et origines.

La loi pour l'équilibre des relations commerciales dans le secteur agricole et alimentaire et une alimentation saine, durable et accessible à tous (dite « loi Egalim »), publiée le 30 octobre 2018, a notamment pour ambition de mettre en place des filières vertueuses de développement des MFSC issus de l'économie circulaire. Toutefois, cette valorisation sur les sols des matières fertilisantes d'origine résiduaire (MAFOR)¹ doit se faire en respectant toutes les conditions de qualité et de sécurité.

¹ Les MAFOR sont des sources de matières organiques renouvelables. Ce terme regroupe les effluents d'élevage, les déchets ou sous-produits de l'industrie agroalimentaire, les biodéchets (déchets alimentaires, déchets verts), les boues de station d'épuration urbaine, les boues de curage, les boues industrielles, la fraction fermentescible des ordures ménagères issue de traitement mécano-biologique, etc.

Ce projet de décret découle de l'article 125 de la loi n° 2020-105 du 10 février 2020 relative à la lutte contre le gaspillage et à l'économie circulaire (dite loi AGEC), qui donne habilitation au Gouvernement pour transposer en droit français des directives européennes relatives aux déchets.

Ainsi, l'article 14 de l'Ordonnance n° 2020-920 du 29 juillet 2020 relative à la prévention et la gestion des déchets constitue la base juridique du socle commun des MFSC en insérant dans le code rural et de la pêche maritime (CRPM) un nouvel article, le L. 255-9-1.

Conformément à cet article L. 255-9-1, « *un décret, pris après consultation de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, fixe les critères de qualité agronomique et d'innocuité selon les conditions d'usage pour les matières fertilisantes et les supports de culture, afin de s'assurer que leur mise sur le marché et leur utilisation ne porte pas atteinte à la santé publique, à la santé animale et à l'environnement.* »

Le projet de décret modifiera la partie réglementaire du code rural et de la pêche maritime en y introduisant trois sous sections : « critères d'innocuité », « critères de qualité agronomique » et « traçabilité et utilisation ».

Conformément à l'article L. 255-9-1 du code rural et de la pêche maritime, le ministère demande à l'Anses son avis sur ce projet de décret.

Par ailleurs, le ministère demande à l'Anses de préciser les contaminants à rechercher en autocontrôle sur chaque lot de MFSC en fonction de la nature de la matière.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise a été conduite par la Direction d'évaluation des produits réglementés (DEPR), en collaboration avec des experts du comité d'experts spécialisé « matières fertilisantes et supports de culture ».

Les travaux ont été présentés au comité d'experts spécialisé « matières fertilisantes et supports de culture » le 7 janvier 2021.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (<https://dpi.sante.gouv.fr>).

Après consultation et avec l'accord du comité d'experts spécialisé "matières fertilisantes et supports de culture", réuni le 7 janvier 2021, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet les conclusions, propositions et recommandations suivantes.

3. ANALYSE DU PROJET DE DECRET

Le projet de décret relatif aux critères de qualité agronomique et d'innocuité des matières fertilisantes et des supports de culture (MFSC) transmis par le ministère et annexé à cet avis (annexe 2) a été examiné.

Les commentaires qui conduisent aux propositions et recommandations émises par l'Agence sont présentés ci-dessous.

Les éléments du projet de décret non mentionnés ci-dessous ne font pas l'objet de commentaires de l'Anses.

I. COMMENTAIRES GENERAUX

Le projet de décret distingue 3 catégories de matières fertilisantes et supports de culture (A1, A2 et B) en fonction de critères communs d'innocuité et définit, pour chacune d'entre elles, les modalités de mise sur le marché et de distribution.

L'Anses souligne que le concept de ces catégories n'est pas intuitif et que l'appropriation n'est pas immédiate. Une lecture approfondie de l'ensemble du décret est nécessaire afin de comprendre la distinction entre ces 3 catégories. La catégorisation d'une matière fertilisante n'est pas en lien avec sa composition, elle est basée uniquement sur sa conformité aux critères d'innocuité. Aussi, l'identification de la catégorie pour une matière fertilisante donnée est complexe. Il est à noter notamment que certains types de produits pourront être classés à la fois en catégorie A1 et A2. En conséquence, il conviendrait de définir plus explicitement les 3 catégories A1, A2 et B.

Par ailleurs, le projet de décret, tel que rédigé, présente une certaine ambiguïté entre l'emploi des termes « matières fertilisantes » et/ou « supports de culture » qui porte à confusion selon les articles et les annexes et tableaux correspondants. Aussi, il conviendrait d'être précis sur l'utilisation de ces termes et de l'acronyme MFSC dans l'ensemble du projet de décret.

Afin de parfaire la lisibilité et la compréhension du décret, il conviendrait également de clarifier la nomenclature des annexes (2 niveaux d'annexe) et de citer explicitement les références des annexes et des tableaux dans chaque article du décret.

Les MFSC concernées par les dispositions du projet de décret sont celles soumises à autorisation de mise sur le marché (AMM) ou permis d'introduction, celles conformes à une norme rendue d'application obligatoire ou à un cahier des charges, ainsi que les déchets, résidus ou effluents disposant d'un plan d'épandage et relevant du règlement sanitaire départemental (RSD, code de la santé publique), de la législation des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE, code de l'environnement) ou des installations, ouvrages, travaux et activités (IOTA, loi sur l'eau). Il est à noter que les MFSC conformes à un règlement de l'Union européenne (article L. 255-5 2° du code rural et de la pêche maritime), ainsi que les substances naturelles à usage biostimulant (article L. 255-5 4° du code rural et de la pêche maritime) ne rentrent pas dans le cadre du présent projet de décret.

En conséquence, afin de faciliter la compréhension de l'articulation entre le projet de décret et les réglementations existantes relatives aux AMM (arrêté du 1^{er} avril 2020²), aux normes, aux cahiers des charges et aux plans d'épandage, il conviendrait notamment que soit précisé si l'arrêté du 1^{er} avril 2020 sera abrogé et si les normes rendues d'application obligatoire, le cahier des charges relatif aux digestats (CDC Dig³), les arrêtés ICPE, ..., feront l'objet d'une révision.

Dans ce contexte, l'application de ce décret pourrait nécessiter la révision des recommandations et procédures actuellement en place dans le cadre de l'évaluation des demandes d'AMM et retranscrites dans le « Guide relatif à l'évaluation des dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché et de permis des matières fertilisantes, des adjuvants pour les matières fertilisantes et des supports de cultures (version datée du 2 juillet 2020) », cité à l'article 2 de l'arrêté du 1^{er} avril 2020.

Sur la base de l'ensemble des remarques générales précédentes relatives à la compréhension du projet de décret et l'articulation de celui-ci avec les réglementations existantes, il serait souhaitable

² Arrêté du 1^{er} avril 2020 fixant la composition des dossiers de demandes relatives à des autorisations de mise sur le marché et permis de matières fertilisantes, d'adjuvants pour matières fertilisantes et de supports de culture et les critères à prendre en compte dans la préparation des éléments requis pour l'évaluation

³ Arrêté du 22 octobre 2020 approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de digestats de méthanisation d'intrants agricoles et/ou agro-alimentaires en tant que matières fertilisantes

que le projet de décret soit accompagné d'une instruction portant sur sa mise en œuvre et précisant les modalités pour son application.

Seuls les MFSC de catégorie A1 sont éligibles au statut de produit et peuvent disposer d'une AMM ou d'un permis d'introduction selon les conditions posées à l'article L. 255-7 du code rural et de la pêche maritime. Elles peuvent également être conformes à une norme rendue d'application obligatoire [à l'exclusion des normes portant sur des matières fertilisantes non éligibles à la sortie du statut de déchet, contenant notamment des boues (par exemple, norme NF U44-095⁴) ou la fraction fermentescible des ordures ménagères issue de traitement mécano-biologique (norme NF U44-051⁵)] ou à un cahier des charges approuvé par voie réglementaire. Ces MFSC A1 peuvent être utilisés sans plan d'épandage et le producteur n'est pas responsable de leur utilisation finale. Ce sont par exemple des engrais, des amendements, des supports de culture, des biostimulants, des digestats de méthanisation, des sous-produits animaux hygiénisés, etc.

Par ailleurs, les critères d'innocuité fixés par le décret pour les MFSC de catégorie A1 s'appliqueront également aux AMM délivrées par reconnaissance mutuelle (article 5 du projet de décret : « *Seuls les matières fertilisantes et les supports de culture de catégorie A1 peuvent être autorisés conformément à l'article R. 255-17* »). Afin de faciliter la compréhension de l'articulation entre ce projet de décret et les réglementations existantes au niveau européen notamment, il conviendrait de préciser si ces critères d'innocuité pourront être considérés comme des règles techniques et comme connus à l'avance au sens du nouveau règlement (UE) n° 2019/515 relatif aux reconnaissances mutuelles et sur lesquels l'autorisation préalable en France pourrait se baser.

Les MFSC de catégorie A2 sont éligibles aux normes rendues d'application obligatoire ou à un cahier des charges. Ces MFSC A2 peuvent être mis sur le marché, mais conservent le statut de déchet, sans nécessité de plan d'épandage. Le producteur des MFSC A2 est responsable de leur utilisation jusqu'à l'épandage. Ce sont par exemple des engrais ou amendements ou digestats qui ne respectent pas les critères A1, des boues compostées, lisiers ou effluents d'élevage, des sous-produits animaux non hygiénisés, des biodéchets⁶, etc.

Les matières fertilisantes de catégorie B ne sont pas éligibles à la sortie du statut de déchet et la seule voie de valorisation possible est le plan d'épandage, sous le statut de déchet. Ainsi, la mise sur le marché des matières fertilisantes de catégorie B n'est pas autorisée. Par ailleurs, les matières fertilisantes de catégorie B sont exclues des normes rendues d'application obligatoire. Ce sont par exemple des matières fertilisantes qui ne respectent pas les critères A1 et A2 comme certains effluents d'élevage ou sous-produits animaux, des boues de station d'épuration urbaines ou industrielles, les matières fertilisantes composées de la fraction fermentescible des ordures ménagères (FFOM) issue de traitement mécano-biologique (TMB), etc.

Par ailleurs, il convient de souligner que les effluents d'élevage sont des sous-produits animaux soumis aux règles sanitaires établies par le règlement (CE) n° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et au règlement (UE) n° 142/2011 portant application du règlement (CE) n° 1069/2009.

L'article 7 du projet de décret précise les modalités d'entrée en vigueur des dispositions du décret.

Les MFSC disposant d'une AMM ou d'un permis d'introduction à la date d'entrée en vigueur du présent décret et ne répondant pas aux exigences du présent décret pourront être mis sur le marché et utilisés jusqu'à l'expiration de l'autorisation ou du permis. Aussi, pour toute nouvelle

⁴ Composts de boues urbaines et de certaines boues industrielles, avec (classe B) ou sans (classe A) ajout d'engrais

⁵ Amendements organiques, issus des matières premières autorisées, avec ou sans engrais

⁶ l'article R.541-8 du code de l'environnement dans sa rédaction issue du décret n° 2011-828 du 11 juillet 2011 définit un biodéchet comme tout déchet non dangereux biodégradable de jardin ou de parc, tout déchet non dangereux alimentaire ou de cuisine issu notamment des ménages, des restaurants, des traiteurs ou des magasins de vente au détail, ainsi que tout déchet comparable provenant des établissements de production ou de transformation de denrées alimentaires.

demande d'AMM ou de permis d'introduction postérieure à la date d'entrée en vigueur du présent décret, les dispositions du présent décret s'appliqueront.

Un délai de 12 mois après la date de publication du décret est prévu pour les MFSC conformes à une norme rendue obligatoire ou répondant à un cahier des charges approuvé ou faisant l'objet d'un plan d'épandage en application respectivement des 1°, 3° et 5° de l'article L.255-5 du code rural et de la pêche maritime.

En revanche, les boues d'épuration, seules ou en mélanges, brutes ou transformées, devront répondre aux exigences du présent décret à compter du 1^{er} juillet 2021. Cette échéance permet de répondre aux dispositions de l'article 86 de la loi n° 2020-105 du 10 février 2020 relative à la lutte contre le gaspillage et à l'économie circulaire (loi AGECE), qui prévoit la révision des référentiels réglementaires d'innocuité environnementale et sanitaire relatifs aux boues d'épuration d'ici le 1^{er} juillet 2021.

II. CRITERES D'INNOCUITE (Annexe I de l'article D. 255-14-1 du projet de décret : annexes 1, 2 et 3)

Les critères d'innocuité proposés dans le projet de décret portent sur des teneurs maximales en éléments traces métalliques, inertes et impuretés, composés traces organiques et micro-organismes pathogènes. S'y ajoutent des tests écotoxicologiques et de mesure des effets perturbateurs endocriniens (tests « sentinelles ») à réaliser au moins lors de la caractérisation initiale de la matière fertilisante et lors de toute modification du procédé ou de la nature ou origine des intrants. Le niveau d'exigences relatif à certains critères d'innocuité diffère selon la catégorie à laquelle appartient la MFSC, mais l'ensemble des critères et tests précités est applicable, quelle que soit la catégorie A1, A2 ou B des MFSC.

Les critères d'innocuité proposés dans le projet de décret permettent de conduire une évaluation *a priori*, uniquement pour les contaminants chimiques et biologiques pour lesquels des valeurs seuils ont été déterminées. Ces informations sont également des indicateurs non exhaustifs relatifs à la contamination potentielle. Elles pourraient évoluer à la lumière de nouvelles données scientifiques.

Pour certains MFSC, l'ensemble des substances et micro-organismes contenus dans les matières premières n'est pas connu de manière exhaustive (effluents d'élevage, boues d'épuration, matières végétales agricoles et matières végétales brutes, matières issues d'industries agro-alimentaires, biodéchets, ...). Aussi, certaines de ces matières pourraient apporter des contaminants organiques, notamment des résidus d'antibiotiques, des polluants organiques, des micro-organismes, des bactéries antibio-résistantes⁷.

Par ailleurs, d'autres contaminants potentiellement présents dans les matières fertilisantes organiques d'origine résiduaire, tels que les médicaments vétérinaires dans les effluents d'élevage ou encore les substances pouvant présenter des effets perturbateurs endocriniens dans les boues, sont également à considérer pour la maîtrise des risques sanitaires et environnementaux associés au retour au sol de ces matières fertilisantes. Cependant, aucun encadrement réglementaire n'est actuellement mis en place pour ces contaminants dans le cadre de l'évaluation des MFSC.

Aussi, l'Anses souligne l'intérêt et la pertinence d'intégrer l'encadrement de ces contaminants dits « émergents » au socle commun des MFSC.

⁷ Évaluation des risques d'émergence d'antibiorésistances liées aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale ; <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT2011sa0071Ra.pdf>

1. ELEMENTS TRACES METALLIQUES

Les teneurs maximales en éléments traces métalliques (ETM) proposées dans le projet de décret pour les MFSC de catégorie A1 et A2 sont, pour la plupart d'entre elles, alignées sur celles du règlement européen n° 2019/1009⁸ pour les catégories fonctionnelles de produits équivalentes. S'y ajoutent des spécificités nationales issues notamment des normes nationales rendues d'application obligatoire NF U44-051⁹ et NF U44-095¹⁰.

Il est à noter que pour ce qui concerne l'arsenic (As), le règlement (UE) n° 2019/1009 précise qu'il s'agit d'As inorganique. Dans le cadre de l'harmonisation, il conviendrait de retenir le critère As inorganique.

Par ailleurs, des limites maximales de résidus (LMR) sont fixées pour le cuivre dans le règlement (CE) n° 396/2005¹¹. Aussi, si la matière fertilisante est destinée à être appliquée en pulvérisation foliaire et qu'elle contient du cuivre (sulfate de cuivre, etc.), les usages devront garantir le respect des LMR en vigueur. L'Anses propose d'ajouter cette disposition dans le cadre du projet de décret.

Pour ce qui concerne la catégorie B, les teneurs maximales en ETM proposées dans le projet de décret sont, pour la plupart, issues de la réglementation nationale (code de l'environnement) fixant les prescriptions techniques et les règles applicables à l'épandage des boues sur les sols agricoles (Décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997¹² ; arrêté du 8 janvier 1998¹³). Ces critères correspondent notamment aux arrêtés ICPE 2781-2 (installations de méthanisation sous régime d'autorisation).

Il convient de souligner que, pour mieux prendre en compte les effets potentiels sur la santé et l'environnement des ETM présents dans les MFSC, l'acquisition de connaissances supplémentaires est nécessaire dans l'objectif d'une meilleure maîtrise des risques associés.

Pour ce qui concerne le cas particulier du cadmium (Cd), une évaluation des risques a été réalisée par l'Agence dans le cadre de la question 3 de la saisine 2015-SA-0140¹⁴ (avis de l'Anses du 17 juin 2019) portant sur des propositions de niveaux en cadmium dans les matières fertilisantes permettant de maîtriser la pollution des sols agricoles et la contamination des productions végétales. Les résultats de cette évaluation indiquent qu'il conviendrait de réduire la teneur maximale en Cd à 1 mg/kg de matière sèche pour l'ensemble des MFSC. Cette valeur seuil, fondée sur une analyse approfondie et actualisée des risques d'exposition au cadmium, permet que le flux annuel d'apport en cadmium n'excède pas 2 g Cd.ha⁻¹.an⁻¹ quelles que soient la nature (engrais/amendement, origine organique/minérale...) et la quantité totale de matière(s) fertilisante(s) apportée(s) au sol agricole. Ce flux est recommandé dans le but de maîtriser la contamination des sols et des productions agricoles et, par conséquent, l'exposition alimentaire associée.

Il est à noter que cette teneur limite en Cd (1 mg/kg de matière sèche) est aussi celle retenue dans l'arrêté du 1^{er} avril 2020¹⁵.

⁸ Règlement (UE) 2019/1009 du Parlement européen et du Conseil du 5 juin 2019 établissant les règles relatives à la mise à disposition sur le marché des fertilisants UE, modifiant les règlements (CE) n° 1069/2009 et (CE) n° 1107/2009 et abrogeant le règlement (CE) n° 2003/2003

⁹ Amendements organiques, issus des matières premières autorisées, avec ou sans engrais

¹⁰ Composts de boues urbaines et de certaines boues industrielles, avec (classe B) ou sans (classe A) ajout d'engrais

¹¹ Règlement (CE) N° 396/2005 du Parlement européen et du Conseil du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil

¹² Décret n°97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées

¹³ Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées

¹⁴ Saisine n° 2015-SA-0140 : Exposition au cadmium – Propositions de valeurs toxicologiques de référence (VTR) par ingestion, de valeurs sanitaires repères dans les milieux biologiques (sang, urines, ...) et de niveaux en cadmium dans les matières fertilisantes et supports de culture permettant de maîtriser la pollution des sols agricoles et la contamination des productions végétales.

¹⁵ Arrêté du 1^{er} avril 2020 fixant la composition des dossiers de demandes relatives à des autorisations de mise sur le marché et permis de matières fertilisantes, d'adjuvants pour matières fertilisantes et de supports de culture et les critères à prendre en compte dans la préparation des éléments requis pour l'évaluation

Par ailleurs, une évaluation des risques sanitaires (ERS) des filières d'épandage des boues de station d'épuration a été conduite (Ineris *et al.*, 2007¹⁶). Les résultats de cette évaluation montrent que les quotients de dangers (QD) sont tous inférieurs à 1¹⁷ quand les effets des ETM considérés sont sommés par organe ou par fonction (ex : système immunitaire). Seuls les QD sur le rein sont à 1,1 et ce à cause du plomb et du cadmium. Pour les effets sans seuil, tous les excès de risque individuel (ERI) sont en deçà de 1,4 10⁻⁶. Un résultat marquant de cette étude est que le niveau de risque est engendré par les substances qui sont déjà présentes dans les sols français¹⁸. Ainsi, la caractérisation des sols avant les épandages est essentielle et une analyse des sols devrait être conduite dans le cadre de tous les plans d'épandage (catégorie B). Les teneurs des sols en ETM (obtenues sur un maillage 16 km/16 km) sont disponibles grâce au GIS Sol¹⁹.

Les concentrations prises en compte dans cette ERS sont présentées dans le tableau ci-après, où sont également présentées les concentrations rencontrées dans les boues selon deux sources : un extrait de la base de données SILLAGE²⁰ pour les années 2013 à 2018 et une étude de synthèse des analyses reçues par des laboratoires prestataires des producteurs de boues.

Paramètre (mg/kg MS)	Concentration utilisée dans le cadre de l'ERS (Ineris <i>et al.</i> , 2007)	Gamme de variation (SILLAGE 2013-2018)	Concentration médiane (SGS <i>et al.</i> , 2002 ²¹)	Concentration Centile 75 (SGS <i>et al.</i> , 2002)	MFSC Catégorie B (projet de décret socle commun)
Arsenic	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	60
Cadmium	2,6	1 -1,63	1,2	1,6	5
Chrome	49	25,96 - 53	27,1	39,2	800
Chrome VI	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2
Cuivre	293	268,64 - 527,07	239	348	800
Mercure	2,2	0,72 - 16,17	1,2	2,1	5
Nickel	28	20,18 - 41,68	19,6	25,9	200
Plomb	67,5	27,56 - 50,63	51,8	78	500
Zinc	813	665,21 - 896,41	523	727	2000

n.d. : non disponible

MS : matière sèche

2. INERTES ET IMPURETES MACROSCOPIQUES

Les seuils en inertes et impuretés introduits dans le projet de décret pour les inertes et les impuretés (plastique, verre et métal) sont les mêmes que soit la catégorie A1, A2 ou B.

Ceux-ci sont identiques à ceux retenus dans le cadre du règlement (UE) n° 2019/1009 pour les composts et digestats. Ils sont inférieurs à ceux existants actuellement dans les normes.

L'Anses est favorable à l'introduction de ces critères d'innocuité pour les inertes et impuretés afin de limiter leur accumulation dans les sols.

¹⁶ Ineris, ADEME, Syprea, FP2E. 2007. Evaluation des risques sanitaires des filières d'épandage des boues de station d'épuration : application de la méthodologie relative aux substances chimiques à une filière de boues issues d'une STEP urbaine. 172pp.

¹⁷ identifié comme seuil d'acceptabilité des risques

¹⁸ une analyse des sols est prévue dans le cadre d'un dossier préfectoral d'autorisation d'épandre les boues (avec des seuils d'interdiction d'épandre)

¹⁹ <https://www.gissol.fr/le-gis>

²⁰ L'application informatique SILLAGE (2015) est dédiée aux échanges d'informations relatives à l'épandage de boues urbaines entre les communes et l'Etat.

²¹ SGS, Laboratoire Wolff Environnement, SAS. 2002. Bilan entre micropolluants organiques, éléments traces métalliques, paramètre agronomiques, pH et matière sèche des boues de station d'épuration d'effluents urbains (données de janvier 1998 à avril 2000). 85pp. Rapport final rapport 0075011.

Par ailleurs, il est à noter que le règlement européen prévoit, à partir du 16 juillet 2026, l'abaissement de la teneur seuil en matières plastiques de taille supérieure à 2 mm à 2,5 g/kg de matière sèche et une réévaluation de cette dernière teneur au plus tard le 16 juillet 2029, afin de tenir compte des progrès accomplis en ce qui concerne la collecte séparée des biodéchets. Le projet de décret ne fait pas état de cette possibilité d'évolution. Il conviendrait toutefois d'ajouter ce point dans l'objectif de la préservation de la qualité des sols agricoles.

3. COMPOSES TRACES ORGANIQUES

Pour ce qui concerne les composés traces organiques (CTO), les exigences du présent décret sont également identiques quelle que soit la catégorie A1, A2 ou B.

Celles-ci sont cohérentes avec les critères d'innocuité spécifiés dans le règlement (UE) n° 2019/1009 pour certaines matières constitutives, notamment les composts, digestats, cendres et biochars.

L'Anses s'interroge sur la pertinence de l'établissement de teneurs maximales pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) fluoranthène, benzo(b)fluoranthène et benzo(a)pyrène. Ces critères d'innocuité sont absents du règlement européen n° 2019/1009 et ces 3 HAP sont redondants avec ceux de la liste des 16 HAP dont la somme de leurs teneurs ne doit pas dépasser 6 mg/kg de matière sèche. De plus, la somme des teneurs limites retenues pour ces 3 HAP [fluoranthène, benzo(b)fluoranthène et benzo(a)pyrène] atteint 8 mg/kg de matière sèche, ce qui est supérieur à ce qui est exigé pour la somme des 16 HAP²² à rechercher. Considérant la fixation d'une teneur limite pour les HAP₁₆, l'Anses considère que l'absence de fixation de teneurs maximales pour les 3 HAP fluoranthène, benzo(b)fluoranthène et benzo(a)pyrène ne remettrait pas en cause une maîtrise du risque sanitaire pour les MFSC et propose donc de supprimer ces critères.

Par ailleurs, le projet de décret introduit une valeur limite (0,8 mg/kg de matière sèche) pour la somme de 7 polychlorobiphényles²³ (PCB), ainsi que pour les dioxines PCDD/F²⁴ (20 ng TEQ/kg de matière sèche).

Il est à noter que la teneur limite en PCB retenue dans le cadre du règlement (UE) n° 2019/1009 pour les matières de type cendres ou biochars²⁵ (0,8 mg/kg de matière sèche) concerne la somme des 6 congénères PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180. Aussi, il conviendrait de se conformer à cette exigence du règlement européen.

La valeur retenue dans le projet de décret pour les dioxines PCDD/F est de de 20 ng TEQ/kg de matière sèche et correspond à la teneur limite retenue dans le cadre du règlement (UE) n° 2019/1009 pour les matières de type cendres ou biochars. Cette valeur se base sur l'évaluation conduite en 2005 par l'Organisation Mondiale de la Santé²⁶.

4. MICRO-ORGANISMES

4.1. Remarques générales

L'Anses souligne que, dans le cas de certains MFSC, quelle que soit leur catégorie, des mesures de gestion [notamment des restrictions d'usage et d'emploi, le port d'équipements de protection individuelle (EPI), ...] seraient nécessaires afin de gérer le danger microbiologique potentiellement

²² naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[a]pyrène, indéno[1,2,3-cd] pyrène, dibenzo[a, h]anthracène et benzo[ghi]perylène

²³ congénères 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180

²⁴ polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans

²⁵ Actes délégués en cours d'adoption par la Commission européenne, conformément à l'article 42(1) du règlement (UE) n° 2019-1009

²⁶ Van den Berg M., L.S. Birnbaum, M. Denison, M. De Vito, W. Farland, et al. (2006) The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology 93:223-241. doi:10.1093/toxsci/kfl055.

présent en lien avec le retour au sol d'un MFSC non hygiénisé. Ainsi, en l'absence de connaissance de la nature et de la concentration des micro-organismes pathogènes potentiellement présents dans les MFSC non hygiénisés, il n'est pas possible d'évaluer leurs effets sur la santé humaine et sur l'environnement. En conséquence, le port d'EPI est nécessaire et l'utilisation de ces matières non hygiénisées sur les cultures légumières, maraîchères et sur toute production végétale en contact avec la matière fertilisante, destinée à être consommée en l'état devrait être proscrite. Il serait en outre souhaitable que le décret spécifie, pour chaque catégorie, si les MFSC ont une obligation d'hygiénisation ou pas (élimination des micro-organismes pathogènes par un traitement thermique, chimique, physique).

Il est important de noter que certaines limites doivent être prises en compte en ce qui concerne les analyses de *Escherichia coli* et *Enterococcaceae*. La méthode d'analyse de *E. coli* est maîtrisée alors que la méthode actuelle de dénombrement des entérocoques (méthode NPP ISO 7899-1:1998) présente des incertitudes. Des comparaisons de méthodes d'analyse des entérocoques sont en cours (INRAE, institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement) afin d'optimiser le dénombrement de ces bactéries dans les matières fertilisantes. Les résultats de ces travaux et l'impact potentiel sur les exigences en ce qui concerne les méthodes d'analyse pourront être évalués ultérieurement.

Par ailleurs, pour ce qui concerne les entérovirus, il convient de souligner que l'Anses a été saisie (octobre 2020) dans le cadre d'une demande d'avis sur le projet d'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage de boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la crise de Covid-19. Les conclusions de l'avis de l'Agence relatif à cette saisine (2020-SA-0137), en cours d'instruction, devraient être prises en compte dans le cadre du présent décret.

4.2. Matières fertilisantes et supports de culture de catégorie A1

Pour ce qui concerne les critères microbiologiques, les limites proposées dans le projet de décret sont identiques à celles retenues dans le règlement (UE) n° 2019/1009 pour les catégories fonctionnelles équivalentes de produits. Ces critères microbiologiques proposés pour les MFSC de catégorie A1 autres que les biostimulants microbiens sont également alignés sur ceux du cahier des charges digestats²⁷. En revanche, ces critères sont allégés par rapport à l'arrêté du 1^{er} avril 2020 encadrant les produits soumis à AMM.

Il est à noter que le projet de décret ne précise pas si les biostimulants microbiens sont limités aux micro-organismes *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., champignons mycorrhiziens, comme c'est le cas dans le cadre du règlement (UE) n° 2019-1009.

4.3. Matières fertilisantes de catégorie A2

Les limites proposées dans le projet de décret pour les MFSC de catégorie A2, autres que les boues de station d'épuration conformes à une norme rendue d'application obligatoire, sont identiques à celles retenues pour la catégorie A1.

Pour ce qui concerne le cas particulier des boues d'épuration conformes à une norme rendue d'application obligatoire, les critères proposés dans le projet de décret sont alignés sur ceux de la norme NF U44-095. L'Anses propose que pour *E. coli*, les seuils soient abaissés à 10²/g de matière brute (MB) pour les cultures maraîchères et à 10³/g MB pour les cultures autres que maraîchères, afin d'être en accord avec l'arrêté du 1^{er} avril 2020 relatif aux produits soumis aux AMM.

²⁷ Arrêté du 22 octobre 2020 approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de digestats de méthanisation d'intrants agricoles et/ou agro-alimentaires en tant que matières fertilisantes

Par ailleurs, il est à noter l'absence de critère spécifique à la famille des virus. Il serait souhaitable que les conclusions et recommandations de l'Anses émises dans le cadre des saisines relatives à la gestion de l'épandage des boues pendant la pandémie de COVID-19 [Avis n° 2020-SA-0037, 2020-SA-0043, 2020-SA-0056, 2020-SA-0059, 2020-SA-0068, 2020-SA-0069, 2020-SA-0137 (en cours)] soient prises en considération dans le cadre du socle commun des MFSC.

4.4. Matières fertilisantes de catégorie B

Les critères retenus dans le projet de décret pour cette catégorie sont ceux de l'arrêté du 8 janvier 1998 relatif aux épandages de boues. Dans le cadre de cet arrêté, les micro-organismes pathogènes (salmonelles, entérovirus et œufs d'helminthes) sont recherchés dans les boues hygiénisées exclusivement, en sortie de la filière de traitement. La conformité de la boue aux teneurs définies pour ces 3 contaminants microbiologiques permet alors de considérer le caractère hygiénisant du traitement qui a été appliqué. Le dénombrement des coliformes thermotolérants est alors suivi afin de pouvoir démontrer un bon fonctionnement de l'installation de traitement et l'absence de recontamination.

L'Anses estime que l'application de ces critères à la totalité des matières de la catégorie B n'est pas adéquate car certaines d'entre elles ne subissent pas de traitement hygiénisant (selon la liste du tableau 2 de l'annexe II du projet de décret). Il existe alors un risque important que des matières de la catégorie B, telles que les effluents d'élevage bruts²⁸ ou les boues brutes d'épuration urbaine²⁹, ne puissent respecter ces critères et se retrouvent sans exutoire. Aussi, les critères microbiologiques proposés pour les matières fertilisantes de catégorie B dans le cadre du projet de décret sont à adapter en fonction du caractère hygiénisé ou non de la matière considérée.

Dans le cadre exclusif des MFSC de catégorie B ayant subi un traitement hygiénisant et afin de suivre le bon fonctionnement de l'installation de traitement, il serait pertinent de rajouter la recherche de *E. coli* et d'établir un seuil de 10²/g MB pour les cultures maraîchères et de 10³/g MB pour les cultures autres que maraîchères, à l'instar des boues considérées dans la catégorie A2.

5. AUTRES CONTAMINANTS

Les matières fertilisantes d'origine résiduaire (MAFOR) sont sources de contaminants organiques, résidus d'antibiotiques, bactéries antibio-résistantes, médicaments vétérinaires (effluents d'élevage), médicaments à usage humain (boues de station d'épuration), micropolluants aux effets perturbateurs endocriniens, etc.

Le présent projet de décret introduit un encadrement, inexistant à ce jour dans le cadre des MFSC, de ces contaminants dits « émergents » potentiellement présents dans les MAFOR et pour lesquels aucune valeur seuil n'a été fixée. En effet, la réalisation de tests écotoxicologiques et de mesures des effets perturbateurs endocriniens (PE) est proposée quelle que soit la catégorie A1, A2 ou B, afin de tracer les effets potentiels sur la santé et l'environnement de ces contaminants.

Il est à noter que le qualificatif « sentinelles » associé à ces tests dans le projet de décret n'est pas approprié, notamment au regard des recommandations de leur mise en œuvre. Il s'agit de la mesure de marqueurs biologiques (ou biomarqueurs) d'effet chez des espèces test qui permet, dans ce contexte, de mettre en évidence un effet perturbateur.

²⁸ A.M. Pourcher, C. Ziebal, M. Kervarrec, Thierry Bioteau, P. Dabert. Sanitary Status of 44 Hog Manures in Brittany: Comparison of the Effectiveness of Manure Treatments Based on the Levels of Indicator Bacteria and Two Pathogenic Bacteria. *Journal of Agricultural Science and Technology (JAST)*, University of Tarbiat Modares, 2012, 3 (A2), pp.303-313.

²⁹ Rapport final de l'ESCo "Matières fertilisantes d'origine résiduaire" – octobre 2014. Chapitre 2 : Caractéristiques physico-chimiques et biologiques des Mafor.

L'Anses souligne l'intérêt de la réalisation de ces tests afin d'investiguer les effets potentiels du retour au sol des MFSC, en particulier pour les MFSC dont l'ensemble des substances contenues dans les matières premières n'est pas connu de manière exhaustive.

Le projet de décret indique que « *les matières fertilisantes de catégorie A1/A2/B doivent présenter un résultat négatif aux tests sentinelles (...) lors de la caractérisation initiale de la matière fertilisante et lors de toute modification du procédé ou de la nature ou origines des intrants du procédé.* »

Il conviendra de clarifier si seules les matières fertilisantes sont concernées ou si ces tests s'appliquent aussi aux supports de culture. Par ailleurs, le terme « caractérisation initiale » devrait être précisé, notamment en lien avec la définition d'un lot selon la matière fertilisante considérée et le type de production (continue *versus* discontinue). Il est également important de noter qu'il n'est fait aucune distinction en ce qui concerne l'acceptabilité ou le rejet des MFSC sur la base des tests écotoxicologiques et de mesures des effets PE entre les différentes catégories A1, A2 et B. Le projet de décret ne précise pas si des mesures de gestion sont possibles en fonction des résultats obtenus sur un test donné. Dans ce cas, des tests complémentaires et des mesures de gestion pourraient, par exemple, être proposés par le demandeur.

5.1. Tests écotoxicologiques

Les tests proposés dans le projet de décret concernent l'inhibition de la reproduction des vers de terre selon la norme NF EN ISO 11268-2³⁰ et l'émergence et la croissance des plantes terrestres selon les normes FD U44-167³¹ ou NF EN ISO 11269-2³².

L'Anses s'est appuyée sur les évaluations réalisées dans le cadre des dossiers de demande d'AMM, ainsi que sur les conclusions de la convention recherche et développement (CRD) 2015-CRD-01 intitulée « Pertinence d'une batterie de tests d'écotoxicité dédiée à l'évaluation du risque des matières fertilisantes et supports de culture » (Avril 2019) pour fonder ses commentaires, recommandations et propositions déclinées ci-après. Le rapport de la CRD est présenté en annexe 3 du présent avis.

Les tests proposés dans le projet de décret sont cohérents avec les éléments demandés dans les dossiers AMM et les résultats de la CRD.

Le seuil d'effet biologique de 40% proposé pour les vers de terre est en accord avec la proposition de seuil révisée dans la CRD.

Pour les plantes terrestres, l'Anses propose de retenir un seuil d'effet biologique de 25% défini sur la base d'études précédentes à la CRD et des propositions de la norme NF ISO 17616³³, au lieu de 20% comme indiqué dans le projet de décret.

Pour réaliser et interpréter les tests écotoxicologiques proposés, une attention particulière doit être portée au choix des doses à considérer. Ces doses sont dépendantes du mode d'apport des matières fertilisantes. De plus, il devrait être précisé si la dose recommandée correspond à la dose annuelle (dans le cas de plusieurs applications).

Ainsi, pour déterminer la concentration à tester, la dose d'apport à l'hectare, il convient de raisonner en concentrations attendues dans le sol. Ainsi, deux approches sont appliquées

³⁰ NF EN ISO 11268-2:2015 Qualité du sol - Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre - Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction de *Eisenia fetida/Eisenia andrei*

³¹ FD U44-167 Avril 2016 Amendements organiques - Essai d'évaluation de l'émergence et de la croissance de plantes supérieures dans les conditions d'utilisation des amendements organiques

³² NF EN ISO 11269-2 Mai 2013 Qualité du sol - Détermination des effets des polluants sur la flore du sol - Partie 2 : effets des sols contaminés sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs

³³ NF ISO 17616 Août 2020 Qualité du sol - Lignes directrices relatives aux choix et à l'évaluation des essais appliqués pour la caractérisation écotoxicologique des sols et des matériaux de type sol - Qualité du sol - Lignes directrices pour l'évaluation des essais appliqués dans le domaine de la caractérisation biologique des sols et des matériaux du sol

actuellement : en cas d'incorporation, la prise en compte de 3000 T de sol/ha ou, en cas de non incorporation, 750 T de sol/ha³⁴. Cette conversion est nécessaire pour s'assurer que les conditions de réalisation des tests écotoxicologiques sont représentatives des conditions d'emploi envisagées.

Les tableaux 1 et 2, présentés en annexe 4 du présent avis, détaillent la détermination des doses présentant des effets significatifs aux tests réalisés dans le cadre de la CRD. Le tableau 1 présente les résultats obtenus dans le cadre de la CRD avec des tests réalisés sans tenir compte de l'incorporation (concentration testée dans 750 T sol/ha). Le tableau 2 extrapole ces résultats pour tenir compte d'une incorporation (concentration estimée dans 3000 T sol/ha). Ils montrent un spectre de réponse large selon le type de matière fertilisante testé avec des effets dès la dose recommandée (en considérant 750 T de sol/ha), jusqu'à une absence d'effets à 10 fois la dose agronomique. Ainsi, ces résultats ne permettent pas d'identifier une valeur seuil unique pouvant servir de critère décisionnel en termes d'innocuité.

Ainsi, la recommandation d'une absence d'effet biologique pour les tests terrestres à 3 fois la dose d'épandage revendiquée comme critère décisionnel, sans définir les modalités d'application associées, ne semble pas suffisante pour assurer une extrapolation entre les différents modes d'applications et entre les différentes catégories de produits. Les tableaux 1 et 2 de l'annexe 4 du présent avis mettent clairement en évidence cette nécessité de modifier la proposition actuelle et pourraient être utilisés comme base pour identifier un critère décisionnel répondant aux exigences en termes d'innocuité pour les organismes de l'environnement.

En conclusion, au moins un test sur la reproduction des vers de terre et un test sur l'émergence et la croissance des plantes terrestres devraient être soumis pour chaque MFSC de catégorie A1, A2 et B. Cependant, certaines modalités des tests devront être précisées, telle que l'incorporation du produit au sol ou non. Par ailleurs, il convient de raisonner la sélection dans les tests d'espèces représentatives des cultures revendiquées selon la norme NF EN ISO 11269-2.

De plus, l'Agence considère que la question de la pertinence de certains tests peut se poser pour les produits à base de micro-organismes. En effet, dans la CRD, les différents tests ne mettent pas en évidence d'effets adverses jusqu'à une dose testée correspondant à 10 fois la dose agronomique.

Pour certains MFSC dont les matières premières présentent des effets phytopharmaceutiques (activité nématocide par exemple, etc.), des tests complémentaires pourraient être nécessaires afin de documenter les effets potentiels.

Sur la base de la CRD ANSES et d'études ADEME précédentes (conventions ADEME 09 75 C0061 et 10 06 C0122), il ne semble pas nécessaire d'inclure en première intention des tests sur les organismes aquatiques. Dans le cas de la CRD, le test sur algues n'a pas mis en évidence une sensibilité différente aux différentes matières fertilisantes testées par rapport aux tests réalisés sur les organismes terrestres. Ainsi, les tests réalisés sur les organismes terrestres permettent d'appréhender l'innocuité des matières fertilisantes de manière satisfaisante.

³⁴ pour 750 T/ha : une profondeur de sol de 5 cm est considérée et les correspondances suivantes sont appliquées (1 ha = 10 000 m² = 500 m³ de sol ; densité = 1,5 ; soit 750 T de sol par hectare) ; pour 3000 T/ha : une profondeur de sol de 20 cm est considérée et les correspondances suivantes sont appliquées (1 ha = 10 000 m² = 2000 m³ de sol ; densité = 1,5 ; soit 3 000 T de sol par hectare)

5.2 Tests sur les effets perturbateurs endocriniens

L'évaluation des effets perturbateurs endocriniens (PE) est pertinente, notamment sur les matières fertilisantes résiduelles, les effluents d'élevage ou les produits susceptibles d'en contenir au regard de la nature des matières premières et/ou du procédé de fabrication.

Les tests proposés sont ceux de la norme ISO 19040-1-2-3³⁵. Cette norme comporte 3 parties décrivant des méthodes et « end points » différents et, pour ce qui concerne plus spécifiquement la partie 3, plusieurs lignées cellulaires.

La question de l'applicabilité de ces tests PE aux MFSC se pose. Les méthodes de la norme ISO 19040 sont appropriées pour tester des échantillons liquides, alors que les MFSC représentent divers types de matrices (solide, liquide, poudre, pâteux etc...). La seule possibilité pour tester les échantillons solides est, théoriquement, de réaliser un intermédiaire sous forme d'un extrait aqueux ou organique. Dans tous les cas, il serait nécessaire d'établir un protocole harmonisé pour la mise en place de ce(s) test(s) en prenant en compte l'existence d'autres lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE).

De plus, l'Agence identifie un manque de précisions sur l'utilisation des données des tests PE requis dans le cadre du projet de décret. Il conviendrait notamment de clarifier si les résultats d'un seul essai ou ceux des essais correspondant aux trois parties de la norme sont nécessaires pour conclure sur le caractère potentiellement PE des MFSC. L'Agence considère que les critères décisionnels nécessiteraient d'être explicités et les modalités de mise en œuvre détaillées, notamment en fonction des éléments signalés dans le paragraphe précédent sur l'applicabilité des méthodes.

En conséquence, les tests sur les effets perturbateurs endocriniens proposés dans le projet de décret ne sont pas mobilisables en l'état, des adaptations méthodologiques en relation avec la nature des MFSC sont notamment nécessaires. Toutefois, l'Anses souligne qu'il est pertinent d'intégrer l'encadrement des contaminants dits « émergents » et plus spécifiquement la présence de composés aux effets perturbateurs endocriniens au socle commun des MFSC. Il pourrait être indiqué que les critères à prendre en compte dans l'évaluation des effets perturbateurs endocriniens seront définis et précisés dans un arrêté du ministre chargé de l'agriculture, pris après avis du directeur général de l'Agence.

5.3 Cas des MFSC constitués de polymères

L'Anses recommande l'ajout d'autres tests complémentaires pour les MFSC constitués tout ou partie de polymères (les rétenteurs d'eau par exemple), autres que les polymères naturels non modifiés chimiquement, afin de renseigner la toxicité et l'écotoxicité du/des (co)polymère(s) et de ses différents monomères et produits de dégradation potentiels. Il est à noter que les MFSC issus de procédés mettant en œuvre des floculants dans le cadre du traitement des matières premières ne sont pas concernés.

Des tests d'écotoxicité sont notamment identifiés pour certains polymères dans le cadre du règlement (EU) n° 2019/1009. Parmi ceux-ci, le test sur l'inhibition à la nitrification des sols permettrait de compléter le jeu de données des tests proposés dans le projet de décret.

Aussi, pour les MFSC constitués tout ou partie de polymères, autres que les polymères naturels non modifiés chimiquement, il conviendrait de fournir des informations sur la vitesse de dégradation et la nature des éventuels produits de dégradation pouvant se former dans les sols à l'aide de méthodes de détermination validées. Dans un premier temps, la dégradation du produit dans un milieu simple (aqueux) et en conditions accélérées (température, lumière, présence de

³⁵ ISO 19040 : 2018 Qualité de l'eau - Détermination du potentiel oestrogénique de l'eau et des eaux résiduelles
Partie 1: Essai d'oestrogénicité sur levures (*Saccharomyces cerevisiae*)
Partie 2: Test d'oestrogénicité (A-YES, *Arxula adenivorans*)
Partie 3: Essai in vitro sur cellules humaines avec gène rapporteur

micro-organismes...) permettra de vérifier la dégradation du polymère et d'identifier les éventuels produits de dégradation. Ensuite, des tests de dégradation du polymère dans différents types de sols agricoles permettront de caractériser la vitesse de dégradation et la nature des éventuels produits de dégradation.

En ce qui concerne les monomères résiduels préoccupants (acrylamide, acide acrylique, etc.), il convient de conduire une évaluation des effets potentiels pour la santé humaine et l'environnement en prenant en compte la teneur en monomères résiduels dans le produit fini et les conditions d'emploi. Les teneurs en monomères résiduels potentiellement présents dans les parties consommables des cultures revendiquées et dans les cultures pouvant entrer en rotation avec celles-ci ainsi que le risque pour le consommateur lié à cette présence doivent être évalués (études de transfert dans les plantes).

Pour ce qui concerne les polymères susceptibles de s'accumuler dans le sol et/ou de former des produits de dégradation, l'écotoxicité à long terme dans les conditions d'application du produit fini devrait également être renseignée (essais conduits après une phase de vieillissement du mélange sol /MFSC).

Les organismes et essais retenus pour l'identification des dangers potentiels pourraient être les suivants :

- pour les organismes du sol : essais de toxicité chronique sur les vers de terre (norme NF EN ISO 11268-2) et les collemboles (norme NF EN ISO 11267) ;

- pour les organismes aquatiques :

✓des études de toxicité directe sur les organismes vivant dans la colonne d'eau : daphnies (norme NF EN ISO 6341 / OCDE 202), cériodaphnies (norme NF ISO 20665), algues (norme NF EN ISO 8692 / OCDE 201) et si nécessaire sur poissons (norme NF EN ISO 7346-1 / OCDE 203) ;

✓des essais effectués sur des éluats des échantillons de sol utilisés pour les essais terrestres. Ces essais pourraient être réalisés sur daphnies (norme NF EN ISO 6341), cériodaphnies (norme NF ISO 20665) et algues (norme NF EN ISO 8692). L'exposition aiguë et à long terme des organismes à ces éluats permettrait d'évaluer l'impact à court et long terme des substances et de leurs produits de dégradation potentiellement mobiles et transférées vers le milieu aquatique par des phénomènes de lixiviation.

Des études additionnelles pourraient également être effectuées si nécessaire afin de connaître l'impact des mêmes échantillons sur l'activité microbiologique des sols exposés et/ou de leur structure.

Par ailleurs, en fonction de la nature des produits de dégradation identifiés dans l'étude sur le devenir du polymère, l'impact sur la santé humaine via une exposition à des eaux superficielles et souterraines potentiellement contaminées mériterait également d'être évalué.

5.4 Cas des MFSC composés tout ou partie de micro-organismes

Les MFSC concernés sont ceux constitués par ou dans lesquels a(ont) été incorporé(s) intentionnellement un (ou des) micro-organisme(s) (bactéries) pour le(s)quel(s) un effet fertilisant est revendiqué.

Des informations devraient être soumises sur la résistance ou la sensibilité du micro-organisme aux antibiotiques. Aussi, pour chaque micro-organisme entrant dans la composition du produit, il conviendrait d'établir un antibiogramme en se référant au guide de l'EFSA³⁶ et aux classes d'antibiotiques définies par l'OMS³⁷.

³⁶ Guidance on microorganisms used as feed additives or as production organisms, Table 2 (EFSA)

³⁷ WHO model List of Essential Medicines (OMS)

Il est à noter que cette disposition est notamment retenue dans l'arrêté du 1^{er} avril 2020³⁸.

III. EXIGENCES DE CONTROLE SELON LA CATEGORIE DES MATIERES FERTILISANTES (Annexe II de l'article D. 255-14-3 du projet de décret)

Le ministère demande à l'Anses de préciser les contaminants à rechercher en autocontrôle sur chaque lot de MFSC en fonction de la nature de la matière.

Il est à noter que le terme « d'autocontrôle » est utilisé dans la demande du ministère alors que le terme de « contrôle » est mentionné dans le texte du décret. La finalité du contrôle et de l'autocontrôle étant différente, il serait nécessaire de préciser ce qui est attendu afin que les recommandations soient adaptées.

Il convient de souligner une contradiction dans le projet de décret tel que rédigé. En effet, l'article D. 255-14-3 indique que les contrôles devront être conduits par le metteur en marché des MFSC de catégorie A1 et A2, sur chaque lot et selon une fréquence définie dans l'AMM, la norme ou le cahier des charges, ou selon une périodicité trimestrielle en l'absence d'exigences spécifiées. Si chaque lot doit être analysé, il n'y a alors pas de fréquence à définir. Le permis d'expérimentation est également cité dans cet article. Il conviendrait de vérifier si celui-ci est concerné par les exigences du présent décret. En conséquence, il conviendra d'éclaircir ces points.

Pour ce qui concerne les matières fertilisantes de catégorie B, chaque lot devra être analysé par le producteur et les modalités de contrôle restent celles établies dans le cadre des arrêtés ICPE. Il est à noter que, contrairement aux catégories A1 et A2, aucune disposition n'est prévue en l'absence d'exigences spécifiées.

L'Anses souligne que la notion de lot devra être clairement explicitée selon le type de matière fertilisante et de production (continue *versus* discontinue, définition d'un pas de temps ou d'un temps de séjour, etc.) considérées.

Par ailleurs, la fréquence des analyses devrait notamment être établie en fonction des quantités produites et du statut des MFSC.

A titre d'exemples, des contrôles sont prévus pour les digestats et les composts afin de vérifier leur conformité aux critères définis dans le règlement (UE) n° 2019-1009 pour ces 2 catégories de matières constitutives. La fréquence de ces contrôles est définie en fonction du tonnage de matières produites annuellement.

Les propositions de l'Anses relatives aux contaminants à rechercher en fonction de la nature des MFSC dans le cadre des autocontrôles sont reportées dans les tableaux des points 1 et 2 suivants. Elles se basent, pour ce qui concerne les contaminants réglementés, sur le type de matières considérées, sur les évaluations conduites par l'Agence dans le cadre des demandes d'AMM et sur les réglementations existantes.

L'Anses souligne que la demande du ministère pose question car préciser les contaminants à rechercher en autocontrôle sur chaque lot de MFSC en fonction de la nature de la matière conduit à prioriser les différents contaminants entre eux et à laisser penser que certains critères sont peu pertinents alors qu'ils sont exigés pour s'assurer de l'innocuité des MFSC avant utilisation.

Par ailleurs, cette question est dépendante du type de MFSC. Aussi, le suivi de tel ou tel critère d'innocuité peut être pertinent ou pas selon la nature des matières constitutives des MFSC.

Toutefois, selon la composition des MFSC, l'autocontrôle de certains critères est peu pertinent (MFSC minéral *versus* MFSC organique par exemple).

Pour ce qui concerne les tests écotoxicologiques et de mesures des effets PE, les autocontrôles seraient plus appropriés pour les matières fertilisantes dont les matières premières sont de

³⁸ Arrêté du 1^{er} avril 2020 fixant la composition des dossiers de demandes relatives à des autorisations de mise sur le marché et permis de matières fertilisantes, d'adjuvants pour matières fertilisantes et de supports de culture et les critères à prendre en compte dans la préparation des éléments requis pour l'évaluation

composition variable et non précisément définie (type boues, effluents d'élevages ou certains biodéchets, etc.). Ainsi, la recommandation de réaliser les tests complémentaires dans le cadre des autocontrôles pourrait être faite afin de s'assurer de la constance de la MFSC. Néanmoins, en fonction de la matière fertilisante considérée, le délai prévu pour les autocontrôles pourrait ne pas être compatible avec le délai nécessaire pour la réalisation des tests et leur analyse (par exemple, un test sur la reproduction des vers de terre dure 2 mois).

En revanche, lorsque la composition de la matière évolue peu (dans une limite quantitative acceptable à définir et paramètres à suivre pour confirmer qu'elle évolue peu à préciser) au cours du temps et que les mêmes matières premières constitutives sont considérées dans le procédé, il ne semble pas nécessaire de demander la réalisation de tests complémentaires à une fréquence importante. Ceci serait en adéquation avec les AMM pour lesquelles un tel suivi n'est pas demandé sur une période de 10 ans.

1. MATIERES FERTILISANTES DE CATEGORIE A1 ET A2

Dénomination	Caractéristiques des matières premières	Eléments traces métalliques	Inertes et impuretés	Composés traces organiques	Pathogènes	Tests complémentaires
Engrais organique	Lisier ou à base d'effluents d'élevage bruts	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
	autre	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Engrais organo-minéral	A base de biodéchets	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
	autre	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Engrais inorganique à macroéléments		Oui	Non	Non	Non	Non
Engrais inorganique à oligo-éléments		Oui	Non	Non	Non	Non
Amendement minéral basique		Oui	Oui	Oui	Non	Non
Amendement organique	Lisier ou à base d'effluents d'élevage bruts	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
	à base de MIATE	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
	A base de biodéchets	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
	autre	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Amendement organique - engrais	à base de MIATE	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
	A base de biodéchets	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
	Autre	Oui	Oui	Oui	Oui	Non

Dénomination	Caractéristiques des matières premières	Eléments traces métalliques	Inertes et impuretés	Composés traces organiques	Pathogènes	Tests complémentaires
Amendement inorganique		Oui	Oui	Oui	Non	Non
Support de culture		Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Biostimulant microbien		Non	Non	Non	Oui	Tests écotox. non nécessaires sur la base des résultats du CRD 2015-CRD-01 « Pertinence d'une batterie de tests d'écotoxicité dédiée à l'évaluation du risque des matières fertilisantes et supports de culture » (Avril 2019)
Biostimulant non microbien		Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Digestat de méthanisation		Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
Autres matières fertilisantes et supports de culture		Oui	Oui	Oui	Oui	dépend de la MFSC

2. MATIERES FERTILISANTES DE CATEGORIE B

Matière fertilisante	Eléments traces métalliques	Inertes et impuretés	Composés traces organiques	Pathogènes	Tests complémentaires
Effluents d'élevage bruts	Oui	Oui	Non	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
Effluents d'élevage ou autre biomasse agricole compostés ou méthanisés seuls ou transformés via un autre traitement	Oui	Oui	Non	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
Effluents d'élevages ou autre biomasse agricole compostés ou méthanisés avec des biodéchets	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
Biodéchets transformés seuls ou en mélange avec d'autres sous-produits animaux (autres que lisiers)	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)

Matière fertilisante	Eléments traces métalliques	Inertes et impuretés	Composés traces organiques	Pathogènes	Tests complémentaires
Autres sous-produits animaux transformés seuls ou en mélange	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
Boues brutes d'épuration urbaines	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
Boues brutes d'épuration industrielles	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
Effluents industriels	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
Boues seules ayant subies un traitement hygiénisant	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
Boues seules ayant subies un traitement autre qu'un traitement hygiénisant	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
Fraction fermentescible des ordures ménagères issues du Tri Mécano Biologique	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
Cendres, biochars, struvites	Oui	Non	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)
Autres déchets	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (tests écotox. et PE)

IV. METHODES D'ANALYSES

Le projet de décret fait référence aux méthodes spécifiées dans le guide relatif à l'évaluation des dossiers de demande relative à une autorisation de mise sur le marché (AMM) ou à un permis pour des matières fertilisantes, des adjuvants pour matières fertilisantes et des supports de culture, disponible sur le site de l'Anses.

Les normes européennes, en cours de développement dans le cadre du règlement (UE) n° 2019-1009, ne sont pas citées.

Il convient toutefois de souligner que certaines méthodes d'analyses ne sont pas spécifiquement adaptées aux matrices MFSC ou ne permettent pas la vérification des critères d'innocuité proposées dans le projet de décret. C'est le cas par exemple de la norme NF U44-164 indiquée pour l'analyse des inertes et indésirables qui ne permet de valider les valeurs limites issues du règlement européen.

V. CRITERES DE QUALITE AGRONOMIQUE (Annexe III de l'article D. 255-14-4 du projet de décret)

Le projet de décret prévoit un encadrement de la valeur agronomique des matières fertilisantes et supports de culture quels que soient leur statut de produit ou déchet et la voie réglementaire suivie pour un usage au sol.

L'Anses souligne l'importance de considérer la valeur agronomique des matières et déchets organiques épandus sur les sols agricoles afin de s'assurer de leur intérêt et de leur efficacité agronomique dans l'objectif de ne pas considérer le sol comme un exutoire et de préserver la qualité des terres et productions agricoles.

1. MATIERES FERTILISANTES DE CATEGORIE A1 ET A2

« Les critères de qualité agronomique des matières fertilisantes et des supports de culture de catégories A1 et A2 sont décrits, selon leurs dénominations, dans les autorisations de mises sur le marché ou la norme ou le cahier des charges sans préjudice des dispositions réglementaires relatives à relatif à l'étiquetage des matières fertilisantes, des adjuvants pour matière fertilisante et des supports de culture. »

Des spécifications agronomiques sont définies par la réglementation actuelle.

Par ailleurs, les travaux de révision du Décret 80-478 relatif à l'étiquetage des matières fertilisantes et supports de culture sont toujours en cours. Dans l'attente des nouvelles dispositions qui seront mises en place dans le cadre de ce nouveau décret étiquetage, il est difficile pour l'Anses de se prononcer sur ce sujet.

2. MATIERES FERTILISANTES DE CATEGORIE B

Les critères d'efficacité agronomique proposés pour la catégorie B sont définis dans le tableau 1 de l'annexe III. Ceux-ci sont notamment basés sur les spécifications du règlement (UE) n° 2019-1009.

Il est à noter qu'il conviendrait de préciser si les seuils proposés sont exprimés en % de matière brute ou en % de matière sèche.

L'Anses s'interroge sur les différentes classes de matières fertilisantes citées et se demande si l'ensemble des matières fertilisantes de catégorie B est couverte par ce classement. Par ailleurs, un certain nombre de cases du tableau est vide. Il conviendrait de préciser si aucune exigence n'est attendue ou si ces cases ne sont pas complétées faute de données suffisantes.

Pour ce qui concerne les « matières organiques à effet amendement », le seuil proposé pour la teneur en matières organiques (15%) est inférieur au regard de ceux spécifiés dans les normes NF U44-051 et NF U44-095 (15% de matière brute pour les composts de champignonnière sinon 20% à 25%).

Il est à noter que la définition d'une valeur neutralisante pour un amendement organique n'est pas considérée pertinente.

Considérant le temps imparti pour l'évaluation de la présente saisine, l'Anses n'a pas été en mesure de vérifier si les critères proposés sont pertinents pour définir la valeur agronomique des matières fertilisantes de catégorie B et en adéquation avec les données disponibles. Cependant, l'Agence souligne qu'il est essentiel d'approfondir ces questions, par exemple en se rapprochant des instituts techniques, afin de définir des valeurs agronomiques pertinentes et qui corroborent les données analytiques disponibles au risque d'exclure l'épandage d'un certain nombre de matières fertilisantes.

VI. TRAÇABILITE ET UTILISATION

L'article 4 du projet de décret relatif à la traçabilité et à la distribution des matières fertilisantes porte uniquement sur la catégorie A2, il ne précise aucune spécification pour les catégories A1 et B.

Il est indiqué que la distribution des matières fertilisantes de catégorie A2 devra se faire entre le producteur de la matière fertilisante et l'utilisateur. De plus, ce dernier devra être un professionnel.

Afin de mieux protéger la santé des utilisateurs, l'Agence souligne l'intérêt d'une prise en compte de l'utilisateur final, non-professionnel ou professionnel, pour l'ensemble des MFSC.

En effet, considérant d'une part les dangers et les risques liés aux caractéristiques de certaines MFSC, notamment la valeur du pH, la granulométrie du produit, le classement pour la santé humaine, qui nécessitent le port d'équipements de protection individuelle (EPI) et, d'autre part, en l'absence de garantie sur le port effectif et la gestion de ces EPI par les utilisateurs non-professionnels, il conviendrait que les MFSC destinés aux utilisateurs non-professionnels ne présentent pas certaines caractéristiques ou classement selon le règlement (CE) n° 1272/2008.

Il est à noter que d'autres réglementations nationales ou européennes intègrent cette spécificité afin de garantir la sécurité de l'utilisation. Ainsi, l'Anses propose que des dispositions pour les MFSC destinés aux non-professionnels soient ajoutées dans le projet de décret. Une cohérence avec les autres réglementations, notamment la réglementation biocide³⁹, est souhaitable.

Le projet de décret propose un socle commun en termes de flux (annuel et décennal) de contaminants cumulables dans les sols à appliquer à tout type d'usage au sol de matières fertilisantes (Annexe IV de l'article D. 255-14-7 du projet de décret). Les flux proposés sont ceux du guide relatif à l'évaluation des dossiers de demande relative à une autorisation de mise sur le marché (AMM) ou à un permis pour des matières fertilisantes, des adjuvants pour matières fertilisantes et des supports de culture, disponible sur le site de l'Anses. Il est à noter que dans la colonne 2 du tableau 1, il s'agit d'une quantité maximale par apport et non par année.

L'Anses considère qu'il est essentiel que l'aspect cumulatif des apports en contaminants (ETM, HAP et PCB) par les matières fertilisantes soit pris en compte pour limiter l'accumulation de ces éléments dans les sols. Leur contrôle est toutefois complexe et nécessite la mise à disposition de l'ensemble des acteurs (producteurs et utilisateurs) d'outils nationaux opérationnels afin d'assurer la traçabilité d'utilisation des matières fertilisantes, de la production jusqu'à la parcelle.

Le projet de décret prévoit que les apports de matières fertilisantes soient enregistrés et que les modalités d'enregistrement de ces apports, les modalités d'information de l'utilisateur sur la teneur en contaminants des matières fertilisantes et la date d'entrée en application de ces dispositions soient précisées dans un arrêté du ministre chargé de l'agriculture. Il conviendrait notamment que l'échelle de mesure des flux (parcelle, exploitation...) soit précisée. De plus, « *afin de limiter la contamination des sols et des cultures, un arrêté du ministre chargé de l'agriculture peut préciser les règles d'utilisation des matières fertilisantes selon leurs matières constitutives et selon les procédés de leur fabrication.* »

Par ailleurs, afin d'assurer une harmonisation des revendications des produits mis sur le marché et de faciliter les bonnes pratiques d'utilisation de ces produits, l'Anses estime qu'il serait essentiel de développer, notamment à destination des metteurs sur le marché et des utilisateurs, une liste de cultures ou groupes de cultures et d'effets pouvant être revendiqués.

³⁹ Règlement (UE) n° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

En se fondant sur le projet de décret transmis par le ministère et annexé à cet avis (annexe 2), ainsi que sur l'ensemble des éléments disponibles, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail estime que :

- La rédaction actuelle du projet de décret est susceptible de poser certains problèmes de compréhension et d'interprétation, dans le cadre de la mise en œuvre opérationnelle par les acteurs de terrain concernés (producteurs et utilisateurs notamment). Des ambiguïtés sont identifiées qui mériteraient d'être éclaircies. Par ailleurs, l'Anses recommande que le projet de décret soit accompagné d'une instruction portant sur sa mise en œuvre et précisant ses modalités d'application.
- Cette future réglementation devra pouvoir s'appliquer sans préjudice des réglementations européennes et nationales existantes en matières de protection des travailleurs, résidents, consommateurs et de l'environnement. À ce titre, les réglementations suivantes sont à prendre en compte :
 - en ce qui concerne les utilisateurs et les travailleurs, selon les principes généraux du code du travail, les mesures prioritaires de prévention consistent en la suppression du danger à la source ou la substitution des produits dangereux (en particulier les produits cancérogènes, mutagènes, reprotoxiques CMR) ;
 - en ce qui concerne la protection des consommateurs, le règlement (CE) n° 852/2004 et associés relatifs à l'hygiène des denrées alimentaires et le règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires ;
 - en ce qui concerne les risques potentiels pour la santé publique et animale et pour l'environnement, le règlement (CE) n° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et le règlement (UE) n° 142/2011 portant application du règlement (CE) n° 1069/2009 ;
 - en ce qui concerne l'environnement, la directive (UE) 2016/2284 relative à la réduction des émissions nationales de certains polluants atmosphériques instaure un cadre communautaire pour parvenir à une réduction des émissions en particulier d'ammoniac, et les réglementations et conditions d'utilisation afin de limiter la contamination des milieux.
- Les critères d'innocuité proposés dans le projet de décret (éléments traces métalliques, inertes et impuretés, composés traces organiques et micro-organismes pathogènes) permettent de conduire une évaluation *a priori*, uniquement pour les contaminants chimiques et biologiques pour lesquels des valeurs seuils ont été déterminées. Ces informations sont également des indicateurs non exhaustifs relatifs à la contamination potentielle. Elles pourraient évoluer à la lumière de nouvelles données scientifiques.
- Afin de limiter les risques pour la santé humaine et l'environnement, le respect des conditions d'emploi définies dans le cadre des autorisations de mise sur le marché, normes, cahiers des charges ou plans d'épandage est essentiel. La mise à jour de certains textes réglementaires existants pourrait être nécessaire.
- Sur la base des résultats de l'évaluation des risques réalisée par l'Agence (avis n° 2015-SA-0140⁴⁰ du 17 juin 2019), une teneur maximale réduite à 1 mg/kg de matière sèche devrait être

⁴⁰ Saisine n° 2015-SA-0140 : Exposition au cadmium – Propositions de valeurs toxicologiques de référence (VTR) par ingestion, de valeurs sanitaires repères dans les milieux biologiques (sang, urines, ...) et de niveaux en cadmium dans les matières fertilisantes et supports de culture permettant de maîtriser la pollution des sols agricoles et la contamination des productions végétales.

retenue pour ce qui concerne le cadmium dans toutes les matières fertilisantes et les supports de culture et la teneur de cet élément devrait être spécifiée sur l'étiquetage.

- Pour certains MFSC, l'ensemble des substances et micro-organismes contenus dans les matières premières n'est pas connu de manière exhaustive (effluents d'élevage, boues d'épuration, matières végétales agricoles et matières végétales brutes, matières issues d'industries agro-alimentaires, biodéchets, ...). Certaines de ces matières pourraient apporter des contaminants organiques, notamment des résidus d'antibiotiques, des polluants organiques, des micro-organismes, des bactéries antibio-résistantes, des champignons phytopathogènes, etc. Des restrictions d'usages et des conditions d'emploi spécifiques peuvent être nécessaires afin de limiter les expositions.
- Pour ce qui concerne les contaminants potentiellement présents dans les matières fertilisantes d'origine résiduaire pour lesquels aucune valeur seuil n'a été fixée, tels que les médicaments vétérinaires dans les effluents d'élevage ou encore les substances pouvant présenter des effets perturbateurs endocriniens, une amélioration des connaissances est nécessaire.
- Dans le cas de certains MFSC, quelle que soit leur catégorie, des mesures de gestion (notamment des restrictions d'usage et d'emploi, le port d'équipements de protection individuelle, ...) seraient nécessaires afin de gérer le danger microbiologique potentiellement présent en lien avec le retour au sol d'un MFSC non hygiénisé. Ainsi, l'utilisation de ces matières non hygiénisées sur les cultures légumières, maraîchères et sur toute production végétale en contact avec la matière fertilisante, destinée à être consommée en l'état devrait être proscrite. Il serait en outre souhaitable que le décret spécifie, pour chaque catégorie, si les MFSC ont une obligation d'hygiénisation ou pas (élimination des micro-organismes pathogènes par un traitement thermique, chimique, physique).
- Certaines limites doivent être prises en compte en ce qui concerne les analyses d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcaceae*. La méthode d'analyse de *E. coli* est maîtrisée alors que la méthode actuelle de dénombrement des entérocoques (méthode NPP ISO 7899-1:1998) présente des incertitudes. Des comparaisons de méthodes d'analyse des entérocoques sont en cours (INRAE) afin d'optimiser le dénombrement de ces bactéries dans les matières fertilisantes. Les résultats de ces travaux et l'impact potentiel sur les exigences en ce qui concerne les méthodes d'analyse pourront être évalués ultérieurement.
- Pour ce qui concerne les entérovirus, il convient de souligner que l'Anses a été saisie (octobre 2020) dans le cadre d'une demande d'avis sur le projet d'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage de boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la crise de Covid-19. Les conclusions de l'avis de l'Agence relatif à cette saisine (2020-SA-0137), en cours d'instruction, devraient être prises en compte dans le cadre du présent décret.
- Les critères microbiologiques proposés pour les matières fertilisantes de catégorie B dans le cadre du projet de décret sont à adapter en fonction du caractère hygiénisé ou non de la matière considérée.
- Dans le cas des boues de station d'épuration conformes à une norme rendue d'application obligatoire (catégorie A2) et des MFSC de catégorie B soumis à un traitement hygiénisant, il serait pertinent d'établir un seuil en *E. coli* de 10^2 /g MB pour les cultures maraîchères et de 10^3 /g MB pour les cultures autres que maraîchères.
- L'aspect cumulatif des apports en contaminants (ETM, HAP et PCB) par les matières fertilisantes devrait impérativement être pris en compte pour limiter l'accumulation de ces éléments dans les sols. Leur contrôle est toutefois complexe et nécessite la mise à disposition de l'ensemble des acteurs (producteurs et utilisateurs) d'outils nationaux opérationnels afin d'assurer la traçabilité d'utilisation des matières fertilisantes, de la production jusqu'à la parcelle.

- L'Anses souligne l'intérêt d'intégrer l'encadrement des contaminants dits « émergents » au socle commun, en particulier pour les MFSC dont l'ensemble des substances contenues dans les matières premières n'est pas connu de manière exhaustive.
- Au moins un test sur la reproduction des vers de terre (NF EN ISO 11268-2) et un test sur l'émergence et la croissance des plantes terrestres (NF EN ISO 11269-2, FD U44-167) devraient être soumis pour chaque MFSC de catégorie A1, A2 et B. Cependant, certaines modalités de réalisation et d'interprétation des tests devront être précisées.
- Les tests sur les effets perturbateurs endocriniens (PE) proposés dans le projet de décret ne sont pas mobilisables en l'état, des adaptations méthodologiques en relation avec la nature des MFSC sont nécessaires. Toutefois, l'Anses souligne qu'il est pertinent d'évaluer les effets PE des MFSC, notamment sur les matières fertilisantes résiduelles, les effluents d'élevage ou les produits susceptibles de contenir des substances aux effets PE au regard de la nature des matières premières et/ou du procédé de fabrication. Les lignes directrices définissant les critères à prendre en compte dans l'évaluation des effets perturbateurs endocriniens pourront être précisées dans un arrêté du ministre chargé de l'agriculture, pris après avis du directeur général de l'Agence.
- Par ailleurs, des tests complémentaires pour les MFSC constitués de polymères (exemple : rétenteurs d'eau), ainsi que pour les MFSC composés tout ou partie de micro-organismes, devraient être ajoutés au socle commun.
- Le projet de décret ne précise pas si des mesures de gestion sont possibles en fonction des résultats obtenus sur les tests écotoxicologiques et de mesures des effets perturbateurs endocriniens proposés dans le projet de décret. Les possibilités de réalisation d'autres tests complémentaires ainsi que des propositions de mesures de gestion par le demandeur pourraient être introduites.
- La prise en compte de l'utilisateur final, non-professionnel ou professionnel, pour l'ensemble des MFSC, est primordiale afin de mieux protéger la santé des utilisateurs. Aussi, l'Anses propose que des dispositions pour les MFSC destinés aux non-professionnels soient ajoutées dans le projet de décret. Une cohérence avec les autres réglementations, notamment la réglementation biocide, est souhaitable.
- Afin d'assurer une harmonisation des revendications des produits mis sur le marché et de faciliter les bonnes pratiques d'utilisation de ces produits, il serait essentiel de développer, notamment à destination des metteurs sur le marché et des utilisateurs, une liste de cultures ou groupes de cultures et d'effets pouvant être revendiqués.
- La valeur agronomique des matières et déchets organiques épandus sur les sols agricoles doit être bien prise en compte afin de s'assurer de leur intérêt et de leur efficacité agronomique dans l'objectif de ne pas considérer le sol comme un exutoire et de préserver la qualité des terres et productions agricoles.
- Les spécifications agronomiques des MFSC de catégorie A1 et A2 sont définies par la réglementation actuelle. Par ailleurs, les travaux de révision du Décret 80-478 relatif à l'étiquetage des matières fertilisantes et supports de culture sont toujours en cours. Dans l'attente des nouvelles dispositions qui seront mises en place dans le cadre de ce nouveau décret étiquetage, il est difficile pour l'Anses de se prononcer sur ce sujet.
- Pour ce qui concerne les matières fertilisantes de catégorie B, considérant le temps imparti pour l'évaluation de la présente saisine, l'Anses n'a pas été en mesure de vérifier si les critères proposés sont pertinents pour définir leur valeur agronomique et en adéquation avec les données disponibles. Cependant, l'Agence souligne qu'il est essentiel d'approfondir ces questions, par exemple en se rapprochant des instituts techniques, afin de définir des valeurs

agronomiques pertinentes et qui corroborent les données analytiques disponibles au risque d'exclure l'épandage d'un certain nombre de matières fertilisantes.

- Les nouvelles dispositions communes introduites dans le projet de décret pour l'ensemble des matières fertilisantes et supports de culture, quel que soit leur statut de produit ou déchet, s'inscrivent dans le cadre des programmes nationaux de réduction des émissions de polluants dans l'environnement (plantes, sols, eaux, air).

Par ailleurs, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail recommande que les éléments suivants soient pris en compte :

- Il conviendrait de clarifier le concept des catégories A1, A2 et B ainsi que la nomenclature des annexes et de citer explicitement les références des annexes et des tableaux dans chaque article du décret afin de faciliter la lisibilité et la compréhension du décret. Une attention particulière devra également être portée à l'utilisation des termes « matières fertilisantes » et/ou « matières fertilisantes et supports de culture ».
- Il conviendrait de clarifier l'articulation du présent décret avec les autres textes réglementaires nationaux et européens en vigueur (dont certains ont été révisés récemment) pour une meilleure compréhension des exigences réglementaires applicables.
- Afin d'assurer la pérennité de l'usage au sol des matières fertilisantes et supports de culture, l'acquisition de connaissances supplémentaires est nécessaire dans l'objectif d'une meilleure maîtrise des risques associés. Les matières fertilisantes d'origine résiduaire sont notamment sources de contaminants organiques, résidus d'antibiotiques, bactéries antibio-résistantes, médicaments vétérinaires (effluents d'élevage), médicaments à usage humain (boues de station d'épuration), micropolluants aux effets perturbateurs endocriniens, etc. L'évaluation des effets potentiels sanitaires et environnementaux du retour au sol de ces MAFOR reste encore peu documentée. Dans ce contexte, une analyse plus approfondie de la nature et des teneurs des micropolluants et polluants « émergents » potentiellement présents dans les matières fertilisantes en fonction de leur nature ou des traitements associés, ainsi que l'acquisition de connaissances supplémentaires sur leur impact sanitaire et environnemental, sont nécessaires.

Dr Roger GENET

MOTS-CLES

Décret - matières fertilisantes et supports de culture - matières fertilisantes d'origine résiduaire (MAFOR) - socle commun d'innocuité et d'efficacité - produit - déchet - autorisation de mise sur le marché - norme - cahier des charges - plan d'épandage - contaminants émergents - valorisation agricole - économie circulaire - traçabilité

ANNEXE 1

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

EXPERTS RAPPORTEURS

Mme DEPORTES Isabelle – Ingénieur impacts sanitaires et environnementaux de la gestion des déchets à l'ADEME – Traitement des déchets – Membre du CES matières fertilisantes et supports de culture de l'Anses

M. PANDARD Pascal – Ingénieur au sein de l'Unité Expertise et Essais en Ecotoxicologie – INERIS – Ecotoxicité - Evaluation des risques environnementaux – Membre du CES matières fertilisantes et supports de culture de l'Anses

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Le présent avis a été adopté par le CES « matières fertilisantes et supports de culture » le 7 janvier 2021.

Président

M. Abraham ESCOBAR-GUTIÉRREZ

Vice-président

M. Pascal PANDARD

Membres

Mme Isabelle DEPORTES

Mme Céline DRUILHE

M. François LAURENT

Mme Isabelle QUILLERE

Mme Cécile REVELLIN

M. Christian STEINBERG

M. Diederik VAN TUINEN

M. Franck VANDENBULCKE

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique : unité de coordination des intrants du végétal - Direction d'évaluation des produits réglementés

Mme MERIGOUT Patricia - Coordinatrice scientifique - Pôle Matières Fertilisantes et Supports de Culture

M. DUMENIL Jean-Rémi - Coordinateur scientifique - Pôle Matières Fertilisantes et Supports de Culture

Evaluation scientifique : unités d'évaluation de la Direction d'évaluation des produits réglementés

ANNEXE 2

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Décret du
relatif aux critères de qualité agronomique et d'innocuité selon les conditions d'usage pour les
matières fertilisantes et les supports de culture

NOR : [...]

Le Premier ministre,

Sur le rapport du ministre de l'agriculture et de l'alimentation,

Vu le règlement (CE) N° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le règlement (CE) N° 1774/2002 (règlement relatif aux sous-produits animaux) ;

Vu le règlement (UE) 2019/1009 du Parlement européen et du Conseil du 5 juin 2019 établissant les règles relatives à la mise à disposition sur le marché des fertilisants UE, modifiant les règlements (CE) N° 1069/2009 et (CE) N° 1107/2009 et abrogeant le règlement (CE) no 2003/2003 ;

Vu la directive (UE) 2015/1535 du Parlement européen et du Conseil du 9 septembre 2015 prévoyant une procédure d'information dans le domaine des réglementations techniques et des règles relatives aux services de la société de l'information (texte codifié) ;

Vu le code de l'environnement, notamment son article L. 541-4-3 ;

Vu le code rural et de la pêche maritime, notamment la section 2 (partie législative) et la section 1 (partie réglementaire) du chapitre V du titre V du livre II ;

Vu l'avis de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail du ... ;

Vu la notification N° .../.../F adressée le ... à la Commission européenne,

Décète :

Article 1^{er}

Le code rural et de la pêche maritime est modifié conformément aux articles 2 à 5.

Article 2

Après l'article R. 255-14, il est inséré une sous-section 1-1 ainsi rédigée :

« Sous-section 1-1 : critères d'innocuité

« Art. D. 255-14-1 - Les matières fertilisantes et supports de cultures cités dans la présente sous-section sont les matières visées aux articles L. 255-2, L. 255-3, L.255-5 1°, L 255-5 3° et L 255-5 5° du code rural et de la pêche maritime. Elles relèvent de la catégorie A1, A2 ou B pour lesquelles les critères d'innocuité sont définis respectivement aux annexes 1, 2 et 3 du présent article.

Les matières fertilisantes de catégorie A1 sont mises sur le marché et utilisées dans les conditions prévues par les articles L. 255-2, L. 255-3, L.255-5 1° et L 255-5 3°.

Les matières fertilisantes de catégorie A2 sont mises sur le marché et utilisées dans les conditions prévues par l'article L 255-5 1° et L 255-5 3°.

Les matières fertilisantes de catégorie B sont utilisées dans les conditions prévues par l'article L.255-5 5°.

« Art. D. 255-14-2 – Pour l'application de l'article L. 255-12, seuls les matières fertilisantes et supports de culture de catégorie A1 peuvent répondre aux conditions prévues au L. 541-4-3 du code de l'environnement.

« Art. D. 255-14-3 – Les matières fertilisantes et supports de culture des catégories A1 et A2 font l'objet, de la part du metteur en marché, de contrôles sur le respect des critères d'innocuité mentionnés au tableau 1 de l'annexe du présent article. Ces contrôles sont réalisés pour chaque lot selon la fréquence et les modalités précisées par l'autorisation de mise sur le marché, le permis d'expérimentation, la norme ou le cahier des charges. En l'absence d'exigences spécifiées, il procède à des analyses trimestrielles de chaque critères d'innocuité mentionnés au tableau 1 de l'annexe du présent article sur des échantillons représentatifs du produit tel qu'il est mis sur le marché.

« Les méthodes d'analyses nécessaires à la réalisation des contrôles sont fiables et reproductibles. Les méthodes mentionnées dans le guide de référence relatif à la constitution des dossiers de demande d'homologation des matières fertilisantes et supports de cultures en vigueur et mis à disposition sur le site internet de l'agence nationale de sécurité de l'alimentation, de l'environnement et du travail sont reconnues comme respectant ces critères.

« Les matières fertilisantes de catégorie B font l'objet, de la part du producteur, de contrôles sur le respect des critères d'innocuité mentionnés au tableau 2 de l'annexe du présent article. Cette vérification intervient pour chaque lot selon les modalités fixées par les arrêtés de prescriptions

relevant du statut de leurs installations de production définies à l'article L.214-1 ou L.511-1 du code de l'environnement.

Toute matière listée au tableau 2 de l'annexe du présent article et destinée à être incorporée dans une matière fertilisante visée à l'article D 255-14-1 respecte les teneurs maximales définies à l'annexes 3 de l'article D. 255-14-1 pour les contaminants mentionnés dans ce tableau. A cette fin des analyses sont réalisées selon la fréquence et les modalités précisées par l'autorisation de mise sur le marché, le permis d'expérimentation, la norme ou le cahier des charges. En l'absence d'exigences spécifiées, des analyses sont réalisées lors de la première utilisation de la matière ou lors de toute modification d'approvisionnement.

Article 3

Il est inséré après la sous-section 1-1 créée par l'article 2 du présent décret une sous-section 1-2 ainsi rédigée :

« Sous-section 1-2 : critères de qualité agronomique

« Art. D. 255-14-4 – Les matières fertilisantes de catégorie B autres que les sous-produits animaux répondant à la définition de l'article 3, point 22 du règlement (CE) N° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le règlement (CE) N° 1774/2002 répondent aux critères de qualité agronomique définis à l'annexe 1 du présent article. »

« Les critères de qualité agronomique des matières fertilisantes et des supports de culture de catégories A1 et A2 sont décrits, selon leurs dénominations, dans les autorisations de mises sur le marché ou la norme ou le cahier des charges sans préjudice des dispositions réglementaires relatives à relatif à l'étiquetage des matières fertilisantes, des adjuvants pour matière fertilisante et des supports de culture.

Article 4

Il est inséré après la sous-section 1-2 créée par l'article 3 du présent décret une sous-section 1-3 ainsi rédigée :

« Sous-section 1-3 : Traçabilité et utilisation

« Art. D. 255-14-5 – La distribution des matières fertilisantes de catégorie A2 se fait directement du producteur à l'utilisateur final, à l'exception des sous-produits animaux relevant du champ d'application du règlement (CE) N° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le règlement (CE) N° 1774/2002 (règlement relatif aux sous-produits animaux), pour lesquels les établissements pratiquant une activité intermédiaire doivent bénéficier d'un agrément.

« L'utilisation des matières fertilisantes de catégorie A2 est réservée aux utilisateurs professionnels.

« Le producteur de matières fertilisantes de catégorie A2 en assure la traçabilité jusqu'à la parcelle où elles sont épandues. A cette fin l'utilisateur tient à disposition du producteur l'enregistrement mentionné à l'article D. 255-14-6.

« Art. D. 255-14-6 – L'utilisation de matières fertilisantes mentionnées aux articles L. 255-1, L. 255-2, L. 255-3 et L. 255-5 dans le cadre d'une activité agricole définie à l'article L. 311-1 fait l'objet d'un enregistrement selon les modalités fixées par l'arrêté mentionné au 3° de l'article R. 257-1.

« Art. D. 255-14-7 – Les quantités de contaminants apportées par la fertilisation ne doivent pas dépasser les valeurs indiquées dans les tableaux 1 et 2 de l'annexe du présent article.

« Un arrêté du ministre chargé de l'agriculture précise les modalités d'enregistrement de ces apports, les modalités d'information de l'utilisateur sur la teneur en contaminants des matières fertilisantes et la date d'entrée en application de ces dispositions.

« Les préconisations de dose maximale d'emploi d'une matière fertilisante visée à l'article D 255-14-1 respectent les flux maximaux annuels moyens sur 10 ans mentionnés aux tableaux 1 et 2 de l'annexe du présent article.

« Afin de limiter la contamination des sols et des cultures, un arrêté du ministre chargé de l'agriculture peut préciser les règles d'utilisation des matières fertilisantes selon leurs matières constituantes et selon les procédés de leur fabrication. »

Article 5

I. – Il est inséré après l'article R. 255-16 un article D. 255-16-1 ainsi rédigé :

« Art. D. 255-16-1 – Seuls les matières fertilisantes et les supports de culture de catégorie A1 peuvent obtenir une autorisation de mise sur le marché conformément à l'article L. 255-2.

II. – Il est inséré après l'article R. 255-17 un article D. 255-17-1 ainsi rédigé :

« Art. D. 255-17-1 – Seuls les matières fertilisantes et les supports de culture de catégorie A1 peuvent être autorisés conformément à l'article R. 255-17.

III. – Il est inséré après l'article R. 255-26 un article D. 255-26-1 ainsi rédigé :

« Art. D. 255-26-1 – Seuls les matières fertilisantes et les supports de culture de catégorie A1 peuvent faire l'objet d'un permis prévu à l'article L. 255-3.

IV. – Il est inséré après l'article R. 255-29 un article D. 255-29-1 ainsi rédigé :

« Art. D. 255-29-1 – Seuls les cahiers des charges intégrant les critères d'innocuité des catégories A1 et A2 peuvent être approuvés dans les conditions prévues au 3° de l'article L. 255-5.

V. – Il est inséré après l'article R. 255-30 un article D. 255-30-1 ainsi rédigé :

« Art. D. 255-30-1 – Seuls les matières fertilisantes et les supports de culture de catégorie A1 et A2 peuvent être autorisées conformément au 1° de l'article L. 255-5.

Article 6

Les annexes I, II, III et IV du présent décret constituent respectivement les annexes des articles D. 255-14-1, D. 255-14-3, D. 255-14-4 et D. 255-14-7 du code rural et de la pêche maritime, tels que créés par son article 2 et 3.

Article 7

Les matières fertilisantes et supports de culture disposant à la date d'entrée en vigueur du présent décret d'une autorisation de mise sur le marché ou d'un permis délivré en application de l'article L. 255-3 du code rural et de la pêche maritime et ne répondant pas aux exigences du présent décret peuvent être mis sur le marché et utilisés jusqu'à l'expiration de l'autorisation ou du permis.

Les matières fertilisantes et supports de culture conformes à une norme rendue obligatoire ou répondant à un cahier des charges approuvé en application des 1° et 3° de l'article L. 255-5 du code rural et de la pêche maritime et ne répondant pas aux exigences du présent décret peuvent être mis sur le marché et utilisés pendant une durée de 12 mois à compter de la date de son entrée en vigueur, à l'exception des boues d'épuration, seules ou en mélanges, brutes ou transformées, qui doivent répondre aux exigences du présent décret à compter du 1^{er} juillet 2021.

Les matières fertilisantes faisant l'objet d'un plan d'épandage en application du 5° de l'article L. 255-5 du code rural et de la pêche maritime et ne répondant pas aux exigences du présent décret peuvent être épandues pendant une durée de 12 mois à compter de la date de son entrée en vigueur, à l'exception des boues d'épuration, seules ou en mélanges, brutes ou transformées, qui doivent répondre aux exigences du présent décret à compter du 1^{er} juillet 2021.

Article 8

La ministre de la transition écologique, le ministre de l'économie, des finances et de la relance et le ministre de l'agriculture et de l'alimentation sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent décret, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait le

Par le Premier ministre :

L[] ministre de [],

[Prénom NOM]

[L[] ministre de [],]

[Prénom NOM]

Annexe I : annexes de l'article D. 255-14-1

Annexe 1 : Critères d'innocuité des matières fertilisantes et supports de culture
de catégorie A1

Les matières fertilisantes et supports de culture de catégorie A1 doivent respecter les teneurs maximales indiquées aux tableaux ci-dessous. Les matières fertilisantes à base de cendres ou de biochars doivent également respecter les teneurs maximales en Chrome total, Thallium, Chlore et Vanadium du règlement (CE) N° 2019/1009 du Parlement européen et du Conseil du 5 juin 2019 établissant les règles relatives à la mise à disposition sur le marché des fertilisants UE, modifiant les règlements (CE) no 1069/2009 et (CE) no 1107/2009 et abrogeant le règlement (CE) no 2003/2003.

Tableau 1 – Teneurs maximales en éléments traces métalliques (en mg/kg de matière sèche)

	Engrais minéraux (ou inorganiques)	Engrais organiques	Engrais organo-minéraux	Amendements organiques	Amendements minéraux basiques	Amendements minéraux (ou inorganiques)	Supports de culture	Biostimulants	Autres matières fertilisantes
As	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Cd	3 ⁽¹⁾	1.5	3 ⁽¹⁾	2	2	1.5	1.5	1.5	1.5
Cr Total	120 ⁽²⁾	120 ⁽²⁾	120 ⁽²⁾	120 ⁽²⁾	120 ⁽²⁾	120 ⁽²⁾	120 ⁽²⁾	120 ⁽²⁾	120 ⁽²⁾
Cr VI	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
Cu	300 ⁽³⁾	300	300 ⁽³⁾	300	300	300	200	600	300
Hg	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ni	100	50	50	50	90	100	50	50	50
Pb	120	120	120	120	120	120	120	120	120
Zn	800 ⁽³⁾	800	800 ⁽³⁾	800	800	800	500	1500	800

(1) Si P₂O₅ < 5%. Sinon 60 exprimé en mg/kg de P₂O₅

(2) Analyser le Cr Total et si Cr Total > 2, analyser le Cr VI pour s'assurer de sa conformité

(3) Sauf si Cu ou Zn sont ajoutés comme oligoéléments déclarés : seuils à déterminer

Tableau 2 – Teneurs maximales en inertes et impuretés (en g/kg de matière sèche)

Inertes et impuretés	Valeurs limites
Plastique > 2 mm	3
Verre > 2 mm	3
Métaux > 2 mm	3
Plastique+ Verre+ Métaux > 2 mm	5

Tableau 3 - Teneurs maximales en composés traces organiques (en mg/kg de matière sèche)

Composés traces organiques	Valeurs limites
fluoranthène	4
benzo[b]fluoranthène	2,5
benzo[a]pyrène	1.5
PCB ⁽⁶⁾	0.8
Dioxines PCDD/F (ng TEQ/kg MS)	20
HAP ₁₆ ⁽⁵⁾	6

⁽⁵⁾ Somme de naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[a]pyrène, indéno[1,2,3-cd]pyrène, dibenzo[a,h]anthracène et benzo[ghi]perylène.

⁽⁶⁾ Total de 7 principaux (28+52+101+118+138+153+180)

Tableau 4-1 – Teneurs maximales en micro-organismes pathogènes

	Taille de la prise d'échantillon représentatif du produit	n	m	M	c
Échantillons représentatifs du produit					
<i>Escherichia coli</i> ou <i>nterococcaceae</i>	1 g	5	1000	5000	1
<i>Salmonella</i>	25 g	5	0	0	0

Avec :

n = nombre d'échantillons à tester;

m = valeur-seuil pour le nombre de bactéries. Le résultat est considéré comme satisfaisant si le nombre de bactéries dans la totalité des échantillons n'excède pas m;

M = valeur maximale du nombre de bactéries. Le résultat est considéré comme non satisfaisant dès lors que le nombre de bactéries dans au moins un échantillon est supérieur ou égal à M;

c = le nombre d'échantillons dans lesquels le nombre de bactéries peut se situer entre m et M, l'échantillon étant toujours considéré comme acceptable si le nombre de bactéries dans les autres échantillons est inférieur ou égal à m.

Tableau 4-2 – Teneurs maximales en micro-organismes pathogènes pour les biostimulants microbiens

	Plan d'échantillonnage		Limite
	n	c	
<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g ou 25 ml
<i>Escherichia coli</i>	5	0	Absence dans 1 g ou 1 ml
<i>Listeria Monocytogène</i>	5	0	Absence dans 25 g ou 25 ml
<i>Vibrio</i>	5	0	Absence dans 25 g ou 25 ml
<i>Shigella</i>	5	0	Absence dans 25 g ou 25 ml
<i>Staphylococcus Aureus</i>	5	0	Absence dans 25 g ou 25 ml
<i>Enterococcaceae</i>	5	2	10 UFC/g
Dénombrement sur plaque des germes anaérobies, sauf si le biostimulant microbien des végétaux est une bactérie aérobie	5	2	105 UFC/g ou ml
Dénombrement des levures et moisissures, sauf si le biostimulant microbien des végétaux est un champignon	5	2	1 000 UFC/g ou ml

Avec :

n = nombre d'échantillons à tester;

c = le nombre d'unités de l'échantillon présentant des valeurs supérieures à la limite définie.

Les matières fertilisantes de catégorie A1 doivent présenter un résultat négatif aux tests sentinelles tel que précisé dans le tableau suivant lors de la caractérisation initiale de la matière fertilisante et lors de toute modification du procédé ou de la nature ou origines des intrants du procédé.

Tableau 5 : Tests sentinelles

Contaminants émergents	Test éco toxicologique sur les vers de terre (test de reproduction) (selon la norme ISO 11268-1)	Effet biologique significatif à 40% à 3 fois la dose d'épandage recommandée	Résultat négatif si les 3 tests sont négatifs à la fois
	Test éco-toxicologique sur les plantes (émergence et croissance) (selon le FD U44-167 ou NF EN ISO 11269-2)	Effet biologique significatif à 20% à 3 fois la dose d'épandage recommandée	
	Test perturbateurs endocriniens à activité oestrogénique ou androgénique norme ISO 19040-1-2-3	négatif	

Annexe 2 : Critères d'innocuité des matières fertilisantes
de catégorie A2

Les matières fertilisantes de catégorie A2 doivent respecter les teneurs maximales indiquées aux tableaux ci-dessous, à l'exception des sous-produits animaux répondant à la définition de l'article 3, point 22 du règlement (CE) N° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le règlement (CE) N° 1774/2002 en ce qui concerne le tableau 4-1.

Les matières fertilisantes à base de cendres ou de biocharbons doivent également respecter les teneurs maximales en Chrome total, Thallium, Chlore et Vanadium du règlement (CE) N° 2019/1009 du Parlement européen et du Conseil du 5 juin 2019 établissant les règles relatives à la mise à disposition sur le marché des fertilisants UE, modifiant les règlements (CE) no 1069/2009 et (CE) no 1107/2009 et abrogeant le règlement (CE) no 2003/2003.

Tableau 1 – Teneurs maximales en éléments traces métalliques (en mg/kg de matière sèche)

	Teneurs maximales
As	40
Cd	3 ⁽¹⁾
Cr _{Total}	120 ⁽²⁾
Cr _{VI}	2 ⁽²⁾
Cu	600 ⁽⁴⁾
Hg	2
Ni	100
Pb	180
Zn	1500 ⁽³⁾ ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Si P₂O₅ < 5%. Sinon 60 exprimé en mg/kg de P₂O₅

⁽²⁾ Analyser le Cr_{Total} et si Cr_{Total} > 2, analyser le Cr_{VI} pour s'assurer de sa conformité

⁽³⁾ Etiquetage spécifique pour les produits ayant des valeurs comprises entre 800 et 1500 ppm

⁽⁴⁾ Sauf si Cu ou Zn sont ajoutés comme oligoéléments déclarés

Tableau 2 – Teneurs maximales en inertes et impuretés (en g/kg de matière sèche)

Inertes et impuretés	Teneurs maximales
Plastique > 2 mm	3
Verre > 2 mm	3
Métaux > 2 mm	3
Plastique+ Verre+ Métaux > 2 mm	5

Tableau 3 - Teneurs maximales en composés traces organiques (en mg/kg de matière sèche

Composés traces organiques	Teneurs maximales
fluoranthène	4
benzo[b]fluoranthène	2,5
benzo[a]pyrène	1.5
PCB⁽⁶⁾	0.8
Dioxines PCDD/F (ng TEQ/kg MS)	20
HAP₁₆⁽⁵⁾	6

⁽⁵⁾ Somme de naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[a]pyrène, indéno[1,2,3-cd]pyrène, dibenzo[a,h]anthracène et benzo[ghi]perylène.

⁽⁶⁾ Total de 7 principaux (28+52+101+118+138+153+180)

Tableau 4-1 – Teneurs maximales en micro-organismes pathogènes

	Taille de la prise d'échantillon représentatif du produit	n	m	M	c
Échantillons représentatifs du produit					
<i>Escherichia coli</i> ou <i>Enterococcaceae</i>	1 g ou 1mL	5	1000	5000	1
<i>Salmonella</i>	25 g ou 25mL	5	0	0	0

Avec :

n = nombre d'échantillons à tester;

m = valeur-seuil pour le nombre de bactéries. Le résultat est considéré comme satisfaisant si le nombre de bactéries dans la totalité des échantillons n'excède pas m;

M = valeur maximale du nombre de bactéries. Le résultat est considéré comme non satisfaisant dès lors que le nombre de bactéries dans au moins un échantillon est supérieur ou égal à M;

c = le nombre d'échantillons dans lesquels le nombre de bactéries peut se situer entre m et M, l'échantillon étant toujours considéré comme acceptable si le nombre de bactéries dans les autres échantillons est inférieur ou égal à m.

Tableau 4-2 – Teneurs maximales en micro-organismes pathogènes pour les boues d'épuration conformes à une norme rendue d'application obligatoire

	Toutes cultures sauf cultures maraîchères	Cultures maraîchers	Méthodes d'analyses normalisées
Agents indicateurs de traitement			
Escherichia coli	10 ⁴ /g MB	10 ³ /g MB	NF V 08-053
Clostridium perfringens	10 ³ /g MB	10 ² /gMB	NF V 08-056
Entérocoques	10 ⁵ /gMB	10 ⁵ /g MB	NF T 90-432

Agents pathogènes			
Oeufs d'helminthes viables	Absence dans 1 g de MB	Absence dans 25 g de MB	En cours ?
Listéria monocytogenes	Absence dans 1 g de MB	Absence dans 25 g de MB	NF V 08-055
Salmonelles	Absence dans 1 g de MB	Absence dans 25 g de MB	NF ISO 6579 NF V 08-052

Les matières fertilisantes de catégorie A2 doivent présenter un résultat négatif aux tests sentinelles tel que précisé dans le tableau suivant lors de la caractérisation initiale de la matière fertilisante et lors de toute modification du procédé ou de la nature ou origines des intrants du procédé.

Tableau 5 : Tests sentinelles

Contaminants émergents	Test éco toxicologique sur les vers de terre (test de reproduction) (selon la norme ISO 11268-1)	Effet biologique significatif à 40% à 3 fois la dose d'épandage recommandée	Résultat négatif si les 3 tests sont négatifs à la fois
	Test éco-toxicologique sur les plantes (émergence et croissance) (selon le FD U44-167 ou NF EN ISO 11269-2)	Effet biologique significatif à 20% à 3 fois la dose d'épandage recommandée	
	Test perturbateurs endocriniens à activité oestrogénique ou androgénique norme ISO 19040-1-2-3	négatif	

Annexe 3 : Critères d'innocuité des matières fertilisantes et support de culture de catégorie B

Les matières fertilisantes de catégorie B doivent respecter les teneurs maximales indiquées aux tableaux ci-dessous.

Tableau 1 – Teneurs maximales en éléments traces métalliques (en mg/kg de matière sèche)

	Teneurs maximales
As	60
Cd	5
Cr Total	800 ⁽²⁾
Cr VI	2 ⁽²⁾
Cu	800
Hg	5
Ni	200
Pb	500
Zn	2000

⁽²⁾ Analyser le Cr Total et si Cr Total > 2, analyser le Cr VI pour s'assurer de sa conformité

Tableau 2 – Teneurs maximales en inertes et impuretés (en g/kg de matière sèche)

Inertes et impuretés	Teneurs maximales
Plastique > 2 mm	3
Verre > 2 mm	3
Métaux > 2 mm	3
Plastique+ Verre+ Métaux > 2 mm	5

Tableau 3 - Valeurs seuils maximales en composés traces organiques (en mg/kg de matière sèche)

Composés traces organiques	Teneurs maximales
fluoranthène	4
benzo[b]fluoranthène	2,5
benzo[a]pyrène	1.5
PCB⁽⁶⁾	0.8
Dioxines PCDD/F (ng TEQ/kg MS)	20
HAP₁₆⁽⁵⁾	6

⁽⁵⁾ Somme de naphthalène, acénaphthylène, acénaphène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[a]pyrène, indéno[1,2,3-cd]pyrène, dibenzo[a,h]anthracène et benzo[ghi]perylène.

⁽⁶⁾ Total de 7 principaux (28+52+101+118+138+153+180)

Tableau 4 – Teneurs maximales en micro-organismes pathogènes

	Taille de la prise d'échantillon représentatif du produit	n	m	M	c
Échantillons représentatifs du produit					
<i>Salmonella</i>	10 g	5	8 npp	8 npp	0
<i>Entérovirus</i>	10 g	5	3 npp	3 npp	0
<i>Oeuf d'helminthes</i>	10 g	5	3	3	0

Avec :

n = nombre d'échantillons à tester;

m = valeur-seuil pour le nombre de bactéries. Le résultat est considéré comme satisfaisant si le nombre de bactéries dans la totalité des échantillons n'excède pas m;

M = valeur maximale du nombre de bactéries. Le résultat est considéré comme non satisfaisant dès lors que le nombre de bactéries dans au moins un échantillon est supérieur ou égal à M;

c = le nombre d'échantillons dans lesquels le nombre de bactéries peut se situer entre m et M, l'échantillon étant toujours considéré comme acceptable si le nombre de bactéries dans les autres échantillons est inférieur ou égal à m.

Les matières fertilisantes de catégorie C doivent présenter un résultat négatif aux tests sentinelles tel que précisé dans le tableau suivant lors de la caractérisation initiale de la matière fertilisante et lors de toute modification du procédé ou de la nature ou origines des intrants du procédé.

Tableau 5 : Tests sentinelles

Contaminants émergents	Test éco toxicologique sur les vers de terre (test de reproduction) (selon la norme ISO 11268-1)	Effet biologique significatif à 40% à 3 fois la dose d'épandage recommandée	Résultat négatif si les 3 tests sont négatifs à la fois
	Test éco-toxicologique sur les plantes (émergence et croissance) (selon le FD U44-167 ou NF EN ISO 11269-2)	Effet biologique significatif à 20% à 3 fois la dose d'épandage recommandée	
	Test perturbateurs endocriniens à activité oestrogénique ou androgénique norme ISO 19040-1-2-3	négatif	

Annexe II : annexe de l'article D. 255-14-3

Annexe : Critères d'innocuité à contrôler par type de matières fertilisantes

Tableau 1 – Critères d'innocuité à contrôler par type de matières fertilisantes de catégories A1 et A2

Dénomination	Caractéristique	Eléments traces métalliques	Inertes et impuretés	Composés traces organiques	Pathogènes	Tests sentinelles (préciser lequel/lesquels)
Engrais organique						
	Lisier ou à base d'effluents d'élevage bruts				OUI	
	autre					
Engrais organo-minéral						
	A base de biodéchets					
	autre					
Engrais inorganique à macroéléments						
Engrais inorganique à oligo-éléments						
Amendement minéral basique						
Amendement organique						
	Lisier ou à base d'effluents d'élevage				OUI	

Dénomination	Caractéristique	Eléments traces métalliques	Inertes et impuretés	Composés traces organiques	Pathogènes	Tests sentinelles (préciser lequel/lesquels)
	bruts					
	à base de MIATE					
	A base de biodéchets					
	autre					
Amendement organique - engrais						
	à base de MIATE					
	A base de biodéchets					
	Autre					
Amendement inorganique						
Support de culture						
Biostimulant microbien						
Biostimulant non microbien						
Digestats de méthanisation						
Autres matières fertilisantes et supports de culture		OUI	OUI	OUI	OUI	OUI

Tableau 2 – Critères d'innocuité à contrôler par type de matières fertilisantes de catégories B

Matière fertilisante	Éléments traces métalliques	Inertes et impuretés	Composés traces organiques	Pathogènes	Tests sentinelles (préciser lequel/lesquels)
Effluents d'élevage bruts					
Effluents d'élevage ou autre biomasse agricole compostés ou méthanisés seuls ou transformés via un autre traitement					
Effluents d'élevages ou autre biomasse agricole compostés ou méthanisés avec des biodéchets					
Biodéchets transformés seuls ou en mélange avec d'autres sous-produits animaux (autres que lisiers)					
Autres sous-produits animaux transformés seuls ou en mélange					
Boues brutes d'épuration urbaine					
Boues brutes d'épuration industrielles					
Effluents industriels					
Boues seules ayant subies un traitement hygiénisant					
Boues seules ayant subi un traitement autre qu'un traitement hygiénisant					
Fraction fermentescible des ordures ménagères issues du Tri Mécano Biologique					
Cendres, biochars, struvites					
Autres déchets					

Annexe III: annexe de l'article D. 255-14-4

Annexe : Critères d'efficacité agronomique des matières fertilisantes de catégorie B

Les matières fertilisantes de catégorie B doivent respecter les teneurs indiquées aux tableaux ci-dessous

Tableau 1 – Valeurs pour les critères d'efficacité agronomique

	Matière organique à effet amendement	Matière organique solide à effet engrais	Matière organique liquide à effet engrais	Digestat à effet fertilisant azoté	Digestat à effet mixte (engrais-amendement)
Teneur en matière organiques (MO)	MO > 15% Ou MO > 5 % si VN > 15 (équivalent CaO) ou si VN > 9 (équivalent HO-)				3% < MO < 10 %
Teneur en matière sèche (MS)	MS > 20%				
Élément nutritif majeur (N, P ₂ O ₅ ou K ₂ O)		Un élément > 2% Ou Somme des trois > 4 %	Un élément > 1% Ou Somme des trois > 3 %		
Ratio N _{tot}				C _{org} / N _{tot} < 3 Ou N _{minéral} / N _{tot} > 90%	0,5% < N _{tot} < 1%, et N _{minéral} / N _{tot} > 60%

Annexe IV: annexe de l'article D. 255-14-7

Annexe : Apports maximaux admissibles en contaminants

Tableau 1 – Apports maximaux admissibles en éléments traces métalliques

	Flux maximaux annuels moyens sur 10 ans g/ha/an	Quantité maximale par année g/ha/an
As	90	270
Cd	2	6
Cr	600	1 800
Cu	1 000	3 000
Hg	10	30
Ni	300	900
Pb	900	2 700
Zn	3 000	6 000*

*Sauf en cas de besoin reconnu en accord avec la réglementation en vigueur sur les oligo-éléments

Tableau 2 – Apports maximaux admissibles en Composés Traces Organiques

Composés trace organiques CTO		Flux maximaux annuels moyens sur 10 ans g/ha/an
Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	fluoranthène	6
	benzo[b]fluoranthène	4
	benzo[a]pyrène	2
Polychlorobiphényles	congénère 28 ou 52 ou 101 ou 118 ou 138 ou 153 ou 180	0.3
	total des 7 principaux congénères : 28 + 52 + 101 + 118 + 138 + 153 + 180	1.2



**PERTINENCE D'UNE BATTERIE DE TESTS D'ÉCOTOXICITÉ
DÉDIÉE À L'ÉVALUATION DES RISQUES DES MATIÈRES
FERTILISANTES ET SUPPORTS DE CULTURE (MFSC)**

Convention de Recherche et Développement

ANSES / INERIS / RITMO

2015-CRD-01

RAPPORT FINAL

Laure CHABOT, Cléo TEBBY, Pascal PANDARD - INERIS
Najat NASSR - RITMO

Responsable ANSES : Vanessa MAZEROLLES

RESUME

Dans le cadre de sa mission d'évaluation des risques et des bénéfices liés à l'utilisation des Matières Fertilisantes et des Supports de Culture (MFSC), l'Anses a souhaité disposer d'une batterie d'essais d'écotoxicologie pertinente et sensible, permettant d'évaluer l'innocuité environnementale de ces produits, avant la délivrance de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

Une batterie d'essais, élaborée sur la base de travaux précédents a été testée sur 20 produits, sélectionnés parmi ceux disposant d'une Autorisation de Mise sur le Marché et représentatifs des différentes familles (classes) de produits MFSC et des différents types au sein d'une même famille.

Les essais suivants ont été mis en place dans ce cadre :

- Inhibition de l'émergence et de la croissance de *Brassica rapa* (NF EN ISO 11269 2),
- Inhibition de la croissance des racines de *Avena sativa* (NF EN ISO 11269-1),
- Inhibition de la reproduction de *Eisenia fetida* (NF EN ISO 11268-2),
- Inhibition de la germination des spores de *Funneliformis mosseae* (XP ISO/TS 10832),
- Minéralisation de l'azote et de la nitrification dans les sols (NF EN ISO 14238),
- Inhibition de la croissance de l'algue verte unicellulaire *Pseudokirchneriella subcapitata* (NF EN ISO 8692).

La réalisation des essais sur ces produits de nature, de composition et de texture diverses a permis de démontrer que la batterie d'essais sélectionnée avait la capacité à discriminer les différents produits en ce qui concerne leur innocuité environnementale. En effet, une forte diversité de réponses a été constatée en fonction des essais et des produits considérés.

De même, cette démarche expérimentale a conduit à identifier ou confirmer les essais pour lesquels la question de l'applicabilité s'est posée pour certains des produits testés. En ce qui concerne les essais d'inhibition de la croissance des racines de *A. sativa* et d'inhibition de la reproduction de *E. fetida*, aucune contrainte à leur mise en œuvre n'a été constatée. En revanche, certaines limitations ont été observées pour les essais de germination des spores de *F. mosseae* et de nitrification des sols, pouvant conduire à des difficultés d'interprétation des effets toxiques observés du fait, soit de la sensibilité de l'indicateur biologique à certains paramètres physico chimique (taux de P, pH...), soit à la présence d'interférences dans la mesure des paramètres (relargage de NH_4^+ au cours de l'incubation...).

GLOSSAIRE

ACP : Analyse en Composantes Principales : Méthode d'analyse des données qui consiste à transformer des variables liées entre elles (dites « corrélées » en statistique) en nouvelles variables décorréélées les unes des autres. Ces nouvelles variables sont nommées « composantes principales », ou axes principaux.

CE_x : Concentration modélisée entraînant un effet sur X % des organismes testé (CE₁₀ – CE₂₀).

CRE : Capacité de Rétention en Eau.

LOEC : « Lowest Observed Effect Concentration » : Plus faible concentration testée induisant un effet statistiquement significatif.

NOEC : « No Observed Effect Concentration » : Concentration d'essai inférieure à la concentration la plus faible ayant entraîné un effet significatif. La NOEC est la concentration testée immédiatement inférieure à la LOEC.

SOMMAIRE

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	6
2. METHODOLOGIE	8
2.1 Bioessais retenus pour le projet	8
2.2 Sélection des MFSC.....	9
2.3 Préparation des mélanges d'essai	12
2.3.1 Calcul des doses testées.....	12
2.3.2 Conditions de préparation des mélanges substrat/produit.....	13
2.4 Traitement des résultats d'essai.....	16
2.4.1 Significativité des effets adverses.....	16
2.4.2 Approches statistiques :.....	16
2.4.3 Approche « seuils biologiques » :.....	17
2.5 Analyse des réponses de la batterie d'essais	18
3. RESULTATS	19
3.1 Effets mesurés pour les 20 produits testés	19
3.2 Lecture des résultats en regard des domaines d'applicabilité des essais ...	21
3.2.1 Essais de germination des spores.....	22
3.2.2 Essais d'inhibition de la nitrification	22
3.2.3 Choix de la nature du témoin pour l'essai d'émergence et de croissance du navet.....	23
3.3 Comparaison des méthodes d'évaluation de la significativité des effets adverses.....	24
4. ANALYSE GLOBALE DES REPONSES DE LA BATTERIE D'ESSAI	30
5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	35
Liste des Annexes	42

TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif des différents essais d'écotoxicité utilisés dans le cadre de la convention	8
Tableau 2 : Récapitulatif des familles et des produits testés dans la liste finale...	11
Tableau 3 : Synthèse des doses d'application préconisées et des modalités d'application pour les produits considérées.....	13
Tableau 4 : Préparations spécifiques réalisées pour l'intégration des produits dans les substrats d'essai	14
Tableau 5 : Conditions de préparation des mélanges d'essai	15
Tableau 6 : Seuils de significativité biologiques retenus ^a	18
Tableau 7 : Valeurs moyennes des effets mesurés pour les différents produits testés (exprimées en % par rapport au témoin).....	20
Tableau 8 : Détermination des doses présentant des effets significatifs selon les approches « statistiques » (ANOVA, modèle dose-réponse) et l'approche « seuils biologiques »	25
Tableau 9 : Comparaisons des doses présentant des effets significatifs en fonction des seuils biologiques choisis et de l'approche statistique	29
Tableau 10 : Cartographie des produits testés.....	36
Tableau 11 : Récapitulatif des limitations expérimentales constatées et questionnements associés	37
Tableau 12 : Seuils de significativité biologiques révisés	41
Tableau 13 : Concentration d'azote déclarée et concentration de NH ₄ ⁺ mesurées dans les préparations	45
Tableau 14 : Apport de P ₂ O ₅ dans les préparations, calculé sur la base des déclarations CERFA	50

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

De nombreux matériaux sont actuellement proposés pour favoriser la croissance et la vigueur des végétaux, ainsi que pour amender les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols. Ces matériaux sont aujourd'hui largement utilisés en agriculture et participent à la valorisation d'une partie des matières résiduelles, telles que les boues issues des stations d'épuration ou certaines déjections animales. Il s'agit, le plus souvent, de matériaux complexes et divers, susceptibles d'intégrer des contaminants de nature organique et/ou inorganique. Il apparaît donc important de vérifier les impacts potentiels sur les écosystèmes terrestre et aquatique liés à leur utilisation.

Dans le cadre de sa mission d'évaluation des risques et des bénéfices liés à l'utilisation des Matières Fertilisantes et des Supports de Culture (MFSC), l'Anses a souhaité disposer d'une batterie standardisée d'essais d'écotoxicité pertinente et sensible, permettant d'évaluer l'innocuité environnementale de ces matériaux, avant la délivrance de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

Afin de répondre à cet objectif, un premier projet, financé par l'ADEME sous la convention 09 75 C0061, a été réalisé afin de tester l'applicabilité de 14 essais de laboratoire standardisés, couvrant différents niveaux trophiques et critères d'effets, sur 6 matrices considérées comme représentatives (texture et/ou quantité épanchée) des matières fertilisantes organiques couramment utilisées sur les parcelles agricoles. Ce projet a permis, d'une part, de confirmer l'applicabilité de ces 14 tests de toxicité, couvrant les compartiments terrestre et aquatique, pour des doses comprises entre 1 et 100 fois la dose agronomique et, d'autre part, de dégager une batterie d'essais minimale. Une seconde étude, conduite sur des boues de station d'épuration (programme SYPREA, convention ADEME 10 06 C0122), a permis de compléter ces résultats. Elle a notamment mis en évidence une plus grande sensibilité de l'essai de reproduction des vers de terre par rapport à l'essai d'évitement, venant ainsi modifier la sélection initiale de cet essai comportemental. A l'issue de ces travaux, les recommandations avaient conduit à retenir les essais suivants :

- Inhibition de l'émergence et de la croissance de *Brassica rapa* (NF EN ISO 11269 2),
- Inhibition de la croissance des racines de *Avena sativa* (NF EN ISO 11269-1),
- Inhibition de la reproduction de *Eisenia fetida* (NF EN ISO 11268-2),
- Inhibition de la germination des spores de *Funneliformis mosseae* (XP ISO/TS 10832),
- Minéralisation de l'azote et de la nitrification dans les sols (NF EN ISO 14238),
- Inhibition de la croissance de l'algue verte unicellulaire *Pseudokirchneriella subcapitata* (NF EN ISO 8692).

Il est apparu nécessaire de tester la pertinence de cette batterie d'essais d'écotoxicité sur un nombre satisfaisant de produits, représentatifs de ceux disposant d'une AMM, afin de permettre un traitement statistique robuste et ainsi discriminer les résultats de ces tests en matière de sensibilité respective des

organismes. Pour ce faire, vingt produits actuellement commercialisés ont été sélectionnés dans le cadre de cette étude, tels que des boues de stations d'épuration, des rétenteurs d'eau, des conditionneurs de sol, des engrais enrobés, des amendements (basiques et organiques), des digestats de méthanisation, des additifs agronomiques...

Les objectifs spécifiques de la présente Convention de Recherche et de Développement (2015-CRD-01) contractualisée avec RITTMO et l'INERIS étaient les suivants :

- Identifier les contraintes techniques éventuelles à la réalisation des différents essais sélectionnés,
- Optimiser éventuellement les protocoles expérimentaux pour limiter les facteurs confondants liés à ce type de produits,
- Evaluer la pertinence de différentes approches pour conclure sur la significativité des essais (approches statistiques ou utilisation de seuils de significativité biologique),
- Proposer une optimisation de la batterie d'essais d'écotoxicité,
- Générer des données quantitatives auxquelles se référer pour réaliser l'évaluation des risques des MFSC dans le cadre des demandes d'AMM,
- Permettre à l'Anses de faire des recommandations appropriées lors de la mise à jour du document guide sur l'homologation des MFSC pour la partie consacrée à l'innocuité environnementale.

2. METHODOLOGIE

2.1 BIOESSAIS RETENUS POUR LE PROJET

Lors des travaux précédents, cinq essais d'écotoxicité terrestre et un essai d'écotoxicité aquatique ont été identifiés comme pertinents pour l'évaluation de l'impact environnemental des MFSC. Ceux-ci sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Récapitulatif des différents essais d'écotoxicité utilisés dans le cadre de la convention

Essai	Référence Normative	Substrat d'essai	Durée de l'essai	Nombre d'organismes / réplicats par condition	Paramètres mesurés
Inhibition de l'émergence et de la croissance du navet (<i>Brassica rapa</i>)	NF EN ISO 11269-2	Sol artificiel ISO à 5 % de tourbe	18 j	40 graines – 20 pousses / 4	Germination des graines ; Biomasse sèche des parties aériennes
Inhibition de la croissance des racines d'avoine (<i>Avena sativa</i>)	NF EN ISO 11269-1	Sol artificiel ISO à 5 % de tourbe	4 j	18 / 3	Elongation des racines prégermées
Inhibition de la reproduction du ver de terreau (<i>Eisenia fetida</i>)	NF EN ISO 11268-2	Sol artificiel ISO à 5 % de tourbe	56 j	40 / 4	Mortalité des adultes ; Biomasse des adultes ; Nombre de jeunes
Inhibition de la germination des spores de champignons mycorhizogènes (<i>Funneliformis mosseae</i>)	XP ISO/TS 10832	Sable de Fontainebleau	14 j	150 / 5	Germination des spores
Minéralisation de l'azote et de la nitrification dans les sols	NF EN ISO 14238	Sol LUFA 2.3	21 j ^a	-	Concentrations d'ammonium et de nitrates libérés au cours de la minéralisation de l'azote contenu dans le sol et au cours de la minéralisation d'un composé organique azoté ajouté.
Inhibition de la croissance des algues vertes unicellulaires (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	NF EN ISO 8692	Eluat d'un mélange Sol artificiel / produit à 10 fois la dose agronomique	3 j	10 ⁴ cell/mL ^b / 6	Taux de croissance de la population d'algues

a : Adaptation de la durée d'exposition par rapport aux préconisations de la norme.

b : Au début de l'essai

Les essais terrestres ont été réalisés selon un dispositif expérimental prédéfini à 1, 3, 5 et 10 fois la dose maximale revendiquée par apport. A la différence des études menées précédemment (conventions ADEME 09 75 C0061 et 10 06 C0122), une dose complémentaire a été ajoutée entre 1 et 5 fois la dose, du fait du nombre de produits pour lesquels des effets significatifs avaient été observés à la dose 5 et de la difficulté de discriminer ces différents produits.

Le test d'inhibition de la croissance algale a été conduit uniquement sur l'éluat du mélange sol artificiel / MFSC, préparé à 10 fois la dose maximale revendiquée par apport.

2.2 SELECTION DES MFSC

La sélection des produits a été établie par l'Anses, en considérant les principales familles (classes) de produits MFSC et les différents types au sein d'une même famille. Les produits les plus récents en termes de date d'autorisation ont été privilégiés afin de s'assurer de leur disponibilité sur le marché.

N.B. : Le détail des actions menées dans ce cadre sont détaillées dans le rapport intermédiaire et ne sont reportées que succinctement dans cette section.

Cette action de sélection des produits a fait l'objet de nombreux échanges entre l'Anses, RITTMO et l'INERIS. Une première liste, établie sur la base du tableau des produits MFSC autorisés au 1^{er} juillet 2015, a été proposée à l'issue de la réunion de démarrage du projet. Pour chaque famille type, un nombre de produits par ordre de priorité a été sélectionné, reflétant la part de chaque famille dans le tableau des produits autorisés.

Sur la base de cette première liste, une étape de prospection a été entreprise au cours du mois de novembre 2015 auprès des revendeurs et des fournisseurs. Pour cette étape de prospection, il avait été décidé de ne pas mentionner les objectifs de l'étude.

Un bilan des premiers contacts téléphoniques a permis de mettre en évidence les points suivants :

- seuls 3 des produits sélectionnés en « choix 1 » étaient disponibles à la vente au particulier ;
- 2 des produits n'étaient plus commercialisés ;
- aucun des produits mixtes proposés n'était disponible ;
- un certain nombre de fabricants étaient réticents à mettre à disposition leurs produits sans information complémentaire sur le cadre de la réalisation des essais.

Lors du second point d'avancement, la difficulté d'obtenir les produits auprès de fournisseurs sans mentionner le cadre du projet a de nouveau été soulevée. Il a donc été décidé que l'Anses rédigerait une lettre d'engagement, précisant le cadre de l'étude ainsi que la mise à disposition pour les fabricants d'une synthèse des résultats obtenus pour leur produit spécifiquement.

Ce courrier, accompagnant un e-mail de l'INERIS, a alors permis d'obtenir les engagements des fabricants pour leur participation à cette étude et l'envoi d'un certain nombre de produits entre mai et septembre 2016. A la fin du mois d'octobre 2016, une liste définitive de 19 produits a été établie, en considérant, lorsque nécessaire, les produits homologués très récemment (entre le 1^{er} juillet 2015 et le 31 août 2016).

La liste définitive des vingt produits, reflétant la part de chaque famille dans le tableau des produits autorisés, est présentée dans le Tableau 2. Ceux-ci ont été codifiés pour des raisons de confidentialité.

Tableau 2 : Récapitulatif des familles et des produits testés dans la liste finale

Famille	Nombre de produit	Code produit	Nature du Produit	Revendications
Additifs agronomiques	2	Add.Agr.1	Extraits végétaux	Stimulateur de croissance et/ou de développement des plantes
		Add.Agr.2	NBPT composant principal	Inhibiteur d'uréase
Amendements basiques	2	Am.Bas.1	Sous-produit animal	Amendement basique à action lente
		Am.Bas.2	Carbonate de calcium, dolomie, chlorure sodium	Augmentation de la quantité, de la diversité et de l'activité de la faune et de la flore du sol Amélioration de la qualité du sol Amélioration du rendement des cultures.
Conditionneurs de sol	1	Cond.Sol.1	Agent mouillant non ionique à base de polyéthylène glycol	Amélioration de la pénétration de l'eau dans le sol
Digestats	2	Dig.1	Digestats de méthanisation	Amélioration des propriétés physique du sol et nutrition des plantes
		Dig.2	Digestats de méthanisation	Nutrition minérale azotée, phosphatée et potassique des cultures
Engrais	5	EngR.1	Azoté soufré	Nutrition azotée et soufrée, inhibition de l'uréase et inhibition de la nitrification
		EngR.2	Organique NPK	Augmentation de la biomasse et l'amélioration de la nutrition minérale
		EngR.3	Azoté-engrais enrobé	-
		EngR.4	Organo-minéral NP	Apport d'azote organique, de phosphore et d'oligo-éléments
		EngR.5	Organo-minéral NP microgranulé	Stimulation de l'enracinement et du développement des plantes Amélioration et la stimulation de la croissance racinaire, Amélioration de l'activité chlorophyllienne, Activation du métabolisme azoté et l'homogénéité de la levée
Matières Fertilisantes	2	MF.1	Roche volcanique + engrais enrobé	Amélioration de la CEC du sol, aération, favorise la croissance racinaire
		MF.2	Acides humiques et fulviques microgranulés	Amélioration de la CEC du sol, Fertilisation du sol
Micro-organismes	3	Myc.1	Micro-organismes fixés pour enrobage de semences	Fixation symbiotique de l'azote de l'air par nodulation
		Myc.2	Micro-organismes	Biostimulation de la croissance des plantes Amélioration de l'implantation des cultures et de la résistance des cultures aux stress d'origine abiotique
		Myc.3	Micro-organismes	Amélioration de la fertilité des sols et de l'implantation des cultures.
Rétenteurs d'eau	2	Ret.1	Rétenteur d'eau de synthèse	Stockage et restitution de l'eau à la plante en période sèche
		Ret.2	Rétenteur d'eau d'origine végétale	Augmentation de la capacité de rétention en eau du sol
Produits Mixtes	1	Mixt.1	Mixte herbicide - engrais	Engrais dés herbant gazon - Fertilisation longue durée

2.3 PREPARATION DES MELANGES D'ESSAI

2.3.1 CALCUL DES DOSES TESTEES

Pour la préparation des mélanges d'essai à 1 fois (X1), 3 fois (X3), 5 fois (X5) et 10 fois (X10) la dose d'application recommandée, les paramètres suivants ont été appliqués sur la base des consignes de l'Anses¹ :

- la dose maximale par application, en tonne de matière brute/hectare, précisée dans la décision d'homologation a été retenue comme dose (X1),
- une profondeur de sol de 5 cm a été considérée, conduisant à utiliser les correspondances suivantes : 1 ha = 10 000 m² = 500 m³ de sol = 750 T de sol²,
- en ce qui concerne les produits liquides, pour lesquels la dose d'application était exprimée en volume/hectare, les doses ont été converties en masse/hectare en considérant la densité du produit.

Les doses d'applications considérées pour l'ensemble des produits sont récapitulées dans le Tableau 3.

¹ Il est important de rappeler que la correspondance des doses pour la réalisation des essais d'écotoxicité a été établie en se basant sur les recommandations relatives à l'utilisation des techniques cultures simplifiées ou à l'application de produits par pulvérisation (soit 750 T/ha pour une profondeur de 5 cm au lieu des 3000 T/ha utilisées en considérant une incorporation des produits dans 20 cm de sol). Ce choix de l'Anses a été fait afin d'assurer la comparabilité des données générées pour les différents types de produits.

² Densité de sol de 1,5 g/cm³

Tableau 3 : Synthèse des doses d'application préconisées et des modalités d'application pour les produits considérées

Famille	Code produit	Dose d'application (en Tonne de Matière Brute à l'Hectare)	Mode d'application
Additifs agronomiques	Add.Agr.1	0,03	Incorporation au support de culture
	Add.Agr.2	0,0003	Ajout en solution azotée/Pulvérisation après ajout solution azotée
Amendements basiques	Am.Bas.1	4,0	Epandage en plein
	Am.Bas.2	0,5	Epandage en plein
Conditionneurs de sol	Cond.Sol.1	0,01028	Pulvérisation
Digestats	Dig.1	5,0	Epandage au sol et incorporation (enfouissement recommandé par le pétitionnaire)
	Dig.2	40	Epandage au sol
Engrais	EngR.1	0,075	Ajout en solution azotée/épandage en plein et localisé
	EngR.2	21,3	Epandage en plein
	EngR.3	0,5	Epandage en plein ou localisé
	EngR.4	4,0	Epandage en plein
	EngR.5	0,06	Epandage localisé
Matières Fertilisantes	MF.1	1,5	Incorporation dans le sol
	MF.2	0,012	Epandage en plein et localisé : mélange avec le sol : goutte à goutte/pulvérisation
Micro-organismes	Myc.1	0,0002	Trempage des semences
	Myc.2	0,0005	Pulvérisation/ épandage en plein ou localisé
	Myc.3	0,001	Pulvérisation/épandage en plein et localisé/semis
Rétenteurs d'eau	Ret.1	2,0	Incorporation dans le sol
	Ret.2	8,8	Epandage localisé/ Incorporation par mélange massique
Produits Mixtes	Mixt.1	0,4	Application en surface

2.3.2 CONDITIONS DE PREPARATION DES MELANGES SUBSTRAT/PRODUIT

Différentes modalités de préparation des mélanges d'essai (substrat/produit) ont été appliquées dans le cadre de cette convention du fait des caractéristiques spécifiques de chaque produit. Le détail de ces modalités est récapitulé dans le Tableau 4.

Il convient de mentionner la forte hétérogénéité du produit Dig.2, produit pâteux qui présentait à la fois des débris végétaux et métalliques et un taux d'humidité incompatible avec la préparation des mélanges. Après séchage et élimination des

débris grossiers, l'incorporation a été effectuée directement dans le substrat d'essai.

Tableau 4 : Préparations spécifiques réalisées pour l'intégration des produits dans les substrats d'essai

	Modalités de préparation pour l'incorporation du produit dans le substrat	Produits concernés
Produits liquides	Incorporation directe dans le substrat	Add.Agr.1 EngR.1 EngR.2
Produits solides de taille inférieure à 4 mm (avec ou sans broyage préalable)	Incorporation directe dans le substrat	Am.Bas.1 Am.Bas.2 Dig.1 Ret.2 Mixt.1
Produits avec des doses d'application très faibles (inférieure à 30 mg/ kg de sol)	Solubilisation (ou mise en suspension) dans l'eau d'hydratation du sol	Add.Agr.2 Cond.Sol.1 MF.2 Myc.1 Myc.2 Myc.3
Produits solides de taille supérieure à 4 mm, solubles ou non broyables	Solubilisation dans l'eau d'hydratation du sol	EngR.4 EngR.5
Produits solides de taille supérieure à 4 mm non solubles	Broyage manuel au mortier Incorporation directe dans le substrat	EngR.3 MF.1 Ret.1
Produits « solides » présentant un taux d'humidité incompatible avec la préparation des mélanges	Tamissage à 4 mm, Séchage à température ambiante Incorporation directe dans le substrat	Dig.2

Le Tableau 5 ci-dessous présente les conditions de préparation des mélanges (substrat ; hydratation...) et de conservation préalable appliquées pour chaque essai.

Tableau 5 : Conditions de préparation des mélanges d'essai

	Substrat d'essai	Préparation	Humidité des mélanges	Conservation des mélanges avant essai
Emergence et croissance de <i>B. rapa</i>	Sol artificiel ISO 5% de tourbe	24h avant essai	70% de la CRE du mélange	Identique aux conditions d'essai
Croissance racinaire de <i>A. sativa</i>	Sol artificiel ISO 5% de tourbe	24h avant essai	70% de la CRE du mélange	Identique aux conditions d'essai
Reproduction des vers de terre <i>E. fetida</i>	Sol artificiel ISO 5% de tourbe	24h avant essai	55% de la CRE du mélange	Identique aux conditions d'essai
Minéralisation de l'azote et nitrification dans les sols	Sol naturel LUFA 2.3	Jour de l'essai	50% de la CRE du sol	Aucune (préparation extemporanée)
Germination des spores de <i>F. mosseae</i>	Sable de Fontainebleau	Jour de l'essai	75% de la CRE du substrat	Aucune (préparation extemporanée)
Inhibition de la croissance des algues vertes unicellulaires (<i>P. subcapitata</i>)	Etape 1 : Préparation du mélange à 10 fois la dose d'application			
	Sol artificiel ISO 5% de tourbe	72 h avant lixiviation	Taux d'humidité environ 20%	20 ± 2°C
	<u>Etape 2</u> : Préparation de l'éluat conformément à la norme EN 14735 : - Prise d'essai de 90 g ± 5 g de mélange exprimé en masse sèche, - Ajout d'un volume d'eau MilliQ suffisant pour obtenir un ratio Liquide / Solide = 10 ± 2% au cours de l'extraction, - Agitation 24 h ± 0,5h, sur une table à rouleaux à 10 tours par minute à une température comprise entre 15°C et 25°C, - Centrifugation à 2500g pendant 30 min, - Filtration, sous pression, de l'éluat à 0,45 µm ou 0,20 µm. <u>Etape 3</u> : Lancement de l'essai sans conservation de l'éluat			

Ces conditions de préparations ont été appliquées à 18 des 20 produits testés.

Pour 2 produits (EngR.3 et Ret.2), des conditions spécifiques détaillées ci-après ont été mises en œuvre.

Pour EngR.3 un très fort dégagement d'ammoniac a été constaté au cours des premiers essais conduisant à une nécrose des pousses de navet et une absence de la croissance des algues en conditions témoin. Les essais ont donc été renouvelés en préparant les mélanges 7 jours à l'avance et en réalisant une aération des préparations par agitations manuelles régulières. Si une odeur résiduelle d'ammoniac a été perçue au cours des essais, les valeurs obtenues en condition témoins ont permis de valider les résultats des essais sur végétaux (émergence et croissance de *B. rapa* et croissance racinaire de *A. sativa*) et sur

vers de terre. Pour les essais d'inhibition de la croissance des algues ainsi que de minéralisation de l'azote et de nitrification dans les sols, les conditions témoin ont été physiquement isolées pour éviter une contamination croisée par dégagement gazeux.

Pour Ret.2, la capacité de rétention en eau du produit étant extrêmement importante (de l'ordre de 2 000%), les mélanges ont été réalisés à 25% de la CRE du produit. Ceci a permis d'obtenir des sols dont la texture était compatible avec le bon déroulement des essais. La méthode d'hydratation au cours de l'essai d'émergence et croissance du navet a toutefois été adaptée sur la base des recommandations de la norme NF EN ISO 22030, en utilisant des mèches de coton tressé, afin de permettre une hydratation homogène de l'ensemble des plants au sein d'un même pot.

Pour les produits susceptibles de présenter une croissance de microorganismes lors de l'essai d'inhibition de la croissance des algues, (Myc – Dig – EngR.2), les éluats ont été filtrés à 0,20 µm pour limiter leur développement et les interférences associées.

2.4 TRAITEMENT DES RESULTATS D'ESSAI

2.4.1 SIGNIFICATIVITE DES EFFETS ADVERSES

Du fait du dispositif expérimental appliqué (doses prédéfinies : 1, 3, 5 et 10 fois la dose maximale revendiquée par apport), les données obtenues à chaque dose ont été comparées à celle du témoin correspondant. La conclusion relative à la significativité d'un effet adverse peut alors se faire :

- soit par un traitement statistique des données conduisant à identifier la dose pour laquelle l'effet mesuré est significativement différent de la condition témoin,
- soit par la comparaison de l'effet à un seuil d'inhibition par rapport à la condition témoin, préétabli en fonction de la connaissance des niveaux de réponse de l'essai, et traduisant une perturbation avérée du critère mesuré (seuil de significativité biologique).

Dans le cadre de cette convention, les données générées ont été analysées en utilisant ces deux approches et leurs conclusions ont également fait l'objet d'une étude comparative.

2.4.2 APPROCHES STATISTIQUES :

2.4.2.1 ANALYSE DE VARIANCE

Une analyse de variance, suivie d'un test post hoc de Dunnett ($\alpha = 0,05$) a été effectuée pour l'ensemble des essais afin de déterminer les doses pour lesquelles les résultats étaient significativement différents de ceux obtenus pour la condition

témoin. Cette analyse permet de déterminer la dose la plus faible pour laquelle des effets significatifs ont été observés (équivalent d'une LOEC).

2.4.2.2 MODELE DOSE – REPONSE

La relation dose-réponse de chaque essai a été modélisée avec l'équation de Hill à 4 paramètres, ajustée par la méthode des moindres carrés :

$$\Phi(c) = Min + \frac{Max - Min}{1 + \left(\frac{d}{EC50}\right)^\beta} \quad (1)$$

avec :

Min la réponse minimale,

Max la réponse maximale,

d la dose,

EC50 la dose correspondant à 50% d'effet et

β la pente de Hill.

Les paramètres *Min* et *Max* ont été contraints à être positifs.

Cette approche a permis de prendre en compte l'allure de la relation dose-réponse, contrairement à une analyse de variance suivie de tests post-hoc qui peut mettre en évidence des différences de réponses observées uniquement à certaines doses.

Afin de déterminer si les réponses étaient statistiquement significatives, chaque dose-réponse a été comparée à un modèle correspondant à une absence d'effet. La qualité d'ajustement des données aux deux modèles a été évaluée en utilisant un test F, avec un seuil de probabilité critique fixé à 5%.

Lorsque la qualité d'ajustement des données au modèle de Hill n'était pas significativement meilleure par rapport au modèle constant (probabilité critique < au seuil de 5%), ou que la dose-réponse mettait en évidence un effet de type hormétique (dose-réponse croissante), la réponse a été considérée non significative et la dose effective (CE₁₀) a été fixée à 20 (deux fois la valeur maximale testée).

Dans le cas contraire, lorsqu'une relation dose-réponse a été identifiée, les CE₁₀ et CE₂₀ rapportées correspondent à une diminution de respectivement 10% et 20% de la valeur estimée par le modèle de Hill pour les témoins. Une borne inférieure a été fixée à la plus petite dose testée divisée par deux, afin d'éviter qu'en l'absence d'information aux faibles doses, une valeur extrêmement faible ne perturbe les analyses statistiques réalisées par la suite.

2.4.3 APPROCHE « SEUILS BIOLOGIQUES » :

Sur la base des études précédentes (conventions ADEME 09 75 C0061 et 10 06 C0122) et des propositions de la norme NF ISO 17616, les seuils biologiques

suivants ont été retenus pour juger de la significativité des effets mesurés (Cf. Tableau 6).

Tableau 6 : Seuils de significativité biologiques retenus^a

Essai	Seuil de significativité biologique choisi* (% d'inhibition par rapport à la condition témoin)
Emergence et croissance <i>B. rapa</i>	25% ^b
Croissance racinaire <i>A. sativa</i>	20%
Reproduction des vers de terre <i>E. fetida</i>	50% ^c
Nitrification dans les sols	25%
Germination des spores de <i>F. mosseae</i>	20%
Inhibition de la croissance de l'algue verte <i>P. subcapitata</i>	15%

a source : conventions ADEME (09 75 C0061 et 10 06 C0122) et NF ISO 17616

b pour les paramètres émergence et croissance

c pour le paramètre reproduction

2.5 ANALYSE DES REPONSES DE LA BATTERIE D'ESSAIS

Une analyse en composantes principales (ACP) non normée des CE₁₀ obtenues (exprimées en log) a été effectuée afin de visualiser les profils de toxicité des différentes classes de produits. Celle-ci permet de regrouper ensemble sur le graphique les produits induisant une réponse aux mêmes tests. La comparaison avec le graphique des variables (représentées par des flèches) permet d'identifier les tests qui discriminent les produits voire les classes de produits. L'ACP permet également d'étudier les concordances entre tests d'écotoxicité. Ainsi les produits induisant une réponse aux mêmes tests sont regroupés ensemble sur le graphique.

L'ensemble des calculs a été effectué avec R 3.3.1 (R Core Team, 2016). L'ajustement des doses réponses a été réalisée à l'aide du package drc (Ritz and Streibig, 2005)³ et les analyses factorielles (ACP) ont été réalisées avec le package FactoMineR (Husson et al., 2014)⁴.

³ Ritz C. and Streibig J. C. (2005). Bioassay analysis using R. Journal of Statistical Software, 12, Issue 5,1–22.

⁴ Francois Husson, Julie Josse, Sebastien Le, Jeremy Mazet (2014) FactoMineR-package: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining with R

3. RESULTATS

3.1 EFFETS MESURES POUR LES 20 PRODUITS TESTES

L'ensemble des résultats obtenus pour les essais terrestres et d'inhibition de la croissance des algues est présenté dans le Tableau 7. Ces résultats sont exprimés en pourcentage d'effet par rapport au témoin : les valeurs négatives correspondent à un effet inhibiteur, les valeurs positives à une mesure supérieure du paramètre considéré par rapport à celle enregistrée pour la condition témoin.

Pour l'essai d'émergence et croissance du navet, les données d'émergence et de croissance étant corrélées pour l'ensemble des essais, seules les données de croissance, en grande majorité les plus sensibles, ont été reportées et utilisées pour la suite.

Les résultats présentés dans le Tableau 7 font apparaître une diversité importante de réponses en fonction des essais et des produits considérés. En effet, selon la nature du produit ; on peut observer des effets inhibiteurs significatifs à la dose 1 ou une absence d'effet à la dose 10 pour l'ensemble des essais Cette amplitude de réponse, obtenue sur le panel sélectionné de produits commercialisés, confirme la pertinence de la batterie d'essais proposée et sa capacité à discriminer ces différents produits en ce qui concerne leur innocuité environnementale.

Tableau 7 : Valeurs moyennes des effets mesurés pour les différents produits testés (exprimées en % par rapport au témoin)

Code produit	Croissance <i>B. rapa</i>				Croissance racinaire <i>A. sativa</i>				Reproduction des vers de terre <i>E. fetida</i>				Nitrification dans les sols				Germination des spores de <i>F. mosseae</i>				Croissance des algues Eluat 10
	1	3	5	10	1	3	5	10	1	3	5	10	1	3	5	10	1	3	5	10	
Add.Agr1	0	16	20	6	1	-1	1	-5	6	3	-9	-16	-23	-6	-32	-18	8	0	-19	-46	-3
Add.Agr2	-2	24	24	36	8	5	5	14	8	29	3	23	28	20	11	28	1	-17	-9	-36	3
Am.Bas1	39	57	60	35	-4	-7	-6	-8	13	-4	1	-13	-34	-27	4	26	6	-14	-8	-80	3
Am.Bas2	-6	-1	7	25	3	-6	-10	-19	10	8	6	-1	8	9	17	10	-39	-48	-73	-70	1
Cond.Sol1	-16	-18	-20	-18	-9	2	4	-1	3	-7	-5	20	5	8	10	5	-76	-96	-100	-100	4
Dig.1	13	20	41	42	4	-13	-8	-14	74	47	44	30	16	-14	-30	-62	10	12	12	2	-1
Dig.2	-31	-36	-53	-100	-10	-29	-34	-65	-42	-100	-100	-100 ^c	39	38	28	9	-100	-100	-100	-100	-15 ^d
EngR.1	46	5	-44	-81	-7	-14	-9	-24	46	-8	-46	-99	-21	-50	-48	-46	-8	-91	-100	-100	0
EngR.2	-90	-96	-100 ^a	-100 ^a	-43	-100	-100 ^b	-100 ^b	-36	-100	-100 ^c	-100 ^c	-39	-100	-100	/	-100	-100	-100	-100	-23 ^d
EngR.3	-90	-100 ^a	-100 ^a	-100 ^a	-19	-45	-75	-100	-100 ^c	-100 ^c	-100 ^c	-100 ^c	-10	-39	-61	-83	-91	-92	-100	-100	-100
EngR.4	4	-65	-89	-100 ^a	-28	-31	-56	-88	67	-36	-100 ^c	-100 ^c	119	65	48	-74	-100	-100	-100	-100	-40
EngR.5	34	49	39	16	-10	-13	-13	-17	5	28	-17	-35	46	-8	-4	-24	-98	-100	-100	-100	-29
MF.1	56	106	82	84	-9	-15	-20	-25	10	-10	-16	-50	-12	-10	-12	-48	-13	-5	-70	-91	-3
MF.2	27	13	21	12	-2	-7	-14	-2	17	20	14	38	-31	-4	6	-24	-6	-10	-3	-9	20
Myc.1	15	4	1	2	-2	-2	-7	-4	-28	-22	-51	-12	-15	-15	-6	-24	-17	4	-17	7	4 ^d
Myc.2	3	7	-2	-4	-1	-6	-2	-1	4	-22	-11	13	6	-4	0	-8	14	-9	12	14	21 ^d
Myc.3	2	-3	2	-6	-4	4	-1	-2	6	10	13	20	-15	1	-18	8	-2	-16	7	1	-3 ^d
Ret.1	-20	-21	-89	-100 ^a	5	-16	-39	-74	2	90	47	31	10	-36	-36	-77	-60	-36	-79	-54	-14
Ret.2	1	6	-10	-30	12	17	16	14	1	-29	-16	-77	-21	-28	-24	-45	-100	-99	-99	-99	-2
Mixt.1	-100 ^a	-100 ^a	-100 ^a	-100 ^a	-98	-98	-98	-100	-19	-74	-93	-100	40	63	36	-52	-7	-92	-100	-100	5

^a : Absence d'émergence - ^b : Absence de pousse - ^c : Mortalité importante observée pour les vers adultes (>30%)% à 28j - ^d filtration à 0,20 µm - Cases hachurée : résultats pour lesquels l'applicabilité de l'essai est discutée plus bas.

L'analyse plus spécifique de ces données fait ressortir :

- globalement, une moindre sensibilité de l'essai d'inhibition de la croissance de *P. subcapitata* avec seulement 5 éluats sur les 20 pour lesquels l'inhibition du taux de croissance est supérieure ou égale à 15 %.
- pour les produits à base de microorganismes (Myc.1, Myc.2, Myc.3) et pour MF.2, une absence d'effet à la dose 10 ;
- pour les 2 additifs agronomiques (Add.Agr1, Add.Agr2) une absence d'effet à la dose 10 pour tous les essais à l'exception de l'inhibition de la germination des spores de *F. mosseae* (dose 10) ;
- une forte toxicité de EngR.2 et EngR.3 dès la dose 1 pour l'ensemble des essais ;
- une mortalité des vers adultes supérieure à 30% mesurée, pour EngR.3 dès la dose 1, EngR.2 et EngR.4 (aux doses de 5 et 10) et Dig.2 à la dose 10, associée à une inhibition totale de la reproduction pour ces produits.
- une forte toxicité du produit Mixt.1 dès la dose 1 pour les essais végétaux⁵ et à la dose 3 pour les autres essais considérés ;
- une spécificité de réponse de l'essai d'inhibition de la germination des spores pour les produits : Am.Bas2 et Cond.Sol1 ;
- une forte sensibilité de l'essai d'inhibition de la germination des spores avec des pourcentages d'inhibition élevés dès la dose 1 pour 9 produits sur 20 ;

3.2 LECTURE DES RESULTATS EN REGARD DES DOMAINES D'APPLICABILITE DES ESSAIS

Pour certains résultats, la question des facteurs confondants et de l'applicabilité des essais s'est posée. Les éléments de réponse sont présentés dans les paragraphes suivants.

Les résultats, pour lesquels la question de l'applicabilité de l'essai a été identifiée, ont été matérialisés par des cases hachurées dans le Tableau 7 et le Tableau 8.

⁵ : L'herbicide contenu dans le produit mixte est reconnu pour avoir une action plus spécifique sur les dicotylédones ce qui peut expliquer assez logiquement les résultats observés sur *B. rapa*. En revanche, l'effet sur *A. sativa* était moins attendu.

3.2.1 ESSAIS DE GERMINATION DES SPORES

Il convient de considérer avec précaution les effets des produits sur la germination des spores dès la dose 1, du fait de la sensibilité de *Funneliformis mosseae* au pH et à la teneur en phosphore soluble des mélanges. La norme ISO XP ISO/TS 10832 préconise en effet la réalisation de l'essai sur un mélange dont le pH ne doit pas être inférieur à 5,5 et pour lequel la concentration en phosphore soluble ne doit pas être supérieure à 100 mg/kg. Concernant ce dernier point, un essai réalisé dans le cadre de cette convention, a mis en évidence un effet significatif sur la germination à une valeur inférieure soit dès 50 mg/kg. Il conviendrait toutefois de renouveler les essais sur plusieurs lots de spores afin de quantifier la variabilité des réponses et d'affiner la valeur retenue à terme comme seuil pour la réalisation des essais et l'interprétation des résultats.

Sur la base de ce constat, la question de la pertinence des résultats obtenus pour certains produits se pose, à savoir :

- EngR.2 : toxicité à la dose 1 due à un pH acide ;
- Dig.2, et EngR.4 : toxicité à la dose 1 due à la forte concentration en P à cette dose.
- Am.Bas.1, MF.1 : effets toxiques constatés à partir des doses X10 et X5 respectivement pour ces deux produits, possiblement en lien avec des concentrations en P dépassant les 100 mg/kg (Cf. ANNEXE 2).

Il est à noter que pour certains produits tels que Dig.1 la concentration en P selon les éléments déclaratifs est très élevée, cependant aucune toxicité n'a été observée. Il apparaît ainsi que ce critère d'interprétation des résultats doit être considéré avec des données analytiques issues du lot sur lequel est réalisé le test d'écotoxicité et la connaissance des différentes formes de phosphore (minéral et organique) présentes dans le produit testé. Des mesures de pH doivent également être réalisées sur les mélanges sable / produits afin de vérifier ce second critère d'interprétation des résultats.

3.2.2 ESSAIS D'INHIBITION DE LA NITRIFICATION

De même, l'applicabilité de l'essai d'inhibition de la nitrification doit être considérée avec attention pour certains produits. En effet, parmi les 20 produits testés, 9 ont été identifiés comme source d'azote (NH_4^+) en début ou au cours de l'essai. Cette libération d'azote minéral par le produit peut conduire à une saturation des sols et un ralentissement de l'activité microbienne pour des concentrations dans le sol à partir de 200 mg/kg, ainsi qu'à des difficultés d'interprétation du calcul du taux d'inhibition (Cf. ANNEXE 3).

En considérant l'ensemble des paramètres (conversion, inhibition, saturation initiale, comportement en absence d'apport de NH_4^+), il est possible de conclure à un effet écotoxique pour Dig.1, Dig.2, EngR.2, EngR.4. En revanche, pour EngR.3, MF.1 et Mxt.1, il n'est pas possible de distinguer les effets écotoxiques des effets liés aux facteurs limitants ; l'information n'est alors que qualitative.

3.2.3 CHOIX DE LA NATURE DU TEMOIN POUR L'ESSAI D'EMERGENCE ET DE CROISSANCE DU NAVET

Lors de l'essai d'émergence et croissance du navet, une augmentation de la masse végétale par rapport à la condition témoin a été observée pour les engrais EngR.1 et EngR.5 (respectivement à la dose 1 et à la dose 1 à 5) et pour les matières fertilisantes MF.1 (pour toutes les doses) et MF.2 (pour la dose 1). Cet effet positif est lié à l'apport, par ces produits, d'éléments fertilisants, non présents pour la condition témoin.

Pour les 2 engrais, une condition « témoin fertilisé » a été réalisée en parallèle, en ajoutant une solution de Flory 9 à 1 g/L (5% N, 7% P₂O₅, 22% K₂O, 6% MgO + Se < 10 µg/kg) à 3 reprises au cours de l'essai, dans l'eau de réhydratation. Cette fertilisation a conduit, dans les deux cas, à un doublement de la biomasse sèche du navet et la comparaison des résultats obtenus pour chaque condition à ce témoin fertilisé aurait conduit à la conclusion d'un effet adverse des produits. Ces essais mettent en évidence la difficulté de disposer d'une condition « témoin fertilisé » cohérent avec chaque produit. Il conviendrait, dans l'idéal, de prévoir un témoin spécifique à chaque produit et/ou dose testée, rendant alors difficile une approche commune pour l'ensemble des produits. Le choix a donc été fait de comparer les données obtenues pour les produits à celles d'un témoin non fertilisé, ce qui a pu entraîner une sous-estimation de l'écotoxicité pour certains produits (effet écotoxique éventuellement masqué par l'effet fertilisation), mais a présenté l'avantage de conserver l'homogénéité de l'approche pour l'ensemble des produits.

3.3 COMPARAISON DES METHODES D'EVALUATION DE LA SIGNIFICATIVITE DES EFFETS ADVERSEES

Afin de conclure sur la significativité des effets mesurés aux différentes doses testées, les approches décrites au chapitre 2.4 et rappelées ci-dessous ont été appliquées :

- L'approche statistique (ANOVA + test post hoc de Dunnett) (courbes en annexe 3) ;
- L'approche basée sur la modélisation de la réponse effet – dose, en considérant soit la valeur de CE₁₀ ou celle de CE₂₀ (courbes en ANNEXE 3) ;
- L'approche par comparaison à des valeurs considérées comme significatives d'un point de vue biologique.

Pour l'analyse de ces résultats, les conditions suivantes ont été appliquées :

- Pour l'approche statistique, lorsqu'une réponse statistiquement significative était observée à une dose et non confirmée à la dose supérieure, seule la plus forte dose présentant une réponse significative a été considérée comme dose d'effet, selon la démarche habituellement appliquée pour la détermination des NOEC et des LOEC. Ainsi, pour Add.Agr.2, lors de l'essai de germination des spores, des effets statistiquement significatifs à la dose 3 et à la dose 10 ont été déterminés. En revanche, pour la dose 5 ces effets n'étaient pas significatifs ; la dose 10 a alors été considérée comme dose d'effet.
- Pour l'approche « seuils biologiques », lorsqu'un effet supérieur au seuil identifié pour une dose n'était pas confirmé par les doses supérieures, il n'a pas été considéré comme pertinent. Par exemple, pour l'essai de reproduction des vers de terre pour Myc.1, l'effet de 51 % d'inhibition à la dose 5 n'étant pas confirmé pour la dose 10, il a été indiqué dans le Tableau 8 : effet supérieur à la dose 10.

Tableau 8 : Détermination des doses présentant des effets significatifs selon les approches « statistiques » (ANOVA, modèle dose-réponse) et l'approche « seuils biologiques »

Essais	Significativité	Add. Agr		Am. Bas		Cond. Sol	Dig.		EngR.					MF.		Myc.			Ret.		Mxt
		1	2	1	2	1	1	2	1	2	3	4	5	1	2	1	2	3	1	2	1
Croissance <i>B. rapa</i>	Statistique Dunnett	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1	5	1	1	3	>10	>10	>10	>10	>10	5	10	1	
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	>10	>10	>10	>10	1	>10	3	3	1	1	3	>10	>10	>10	>10	>10	5	5	1	
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	>10	>10	>10	>10	10	>10	5	5	1	1	3	>10	>10	>10	>10	>10	5	10	1	
	Seuil Biologique (25%)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1	5	1	1	3	>10	>10	>10	>10	>10	5	10	1	
Croissance racinaire <i>A. sativa</i>	Statistique Dunnett	>10	>10	>10	10	>10	3	1	1	1	1	1	1	1	>10	>10	>10	>10	3	>10	1
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	>10	>10	>10	5	>10	3	3	3	1	3	3	3	3	>10	>10	>10	>10	3	>10	1
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	>10	>10	>10	10	>10	>10	3	10	1	3	3	>10	10	>10	>10	>10	>10	5	>10	1
	Seuil Biologique (20%)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	3	10	1	3	1	>10	5	>10	>10	>10	>10	5	>10	1
Reproduction des vers de terre <i>E. fetida</i>	Statistique Dunnett	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1	5	3	1	3	10	10	>10	>10	>10	>10	>10	10	3
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1	3	1	1	3	5	5	>10	>10	>10	>10	>10	5	1
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1	5	1	1	3	5	5	>10	>10	>10	>10	>10	5	3
	Seuil Biologique (50%)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	3	10	3	1	5	>10	10	>10	>10	>10	>10	>10	10	3

Essais	Significativité	Add. Agr		Am. Bas		Cond. Sol	Dig.		EngR.					MF.		Myc.			Ret.		Mxt
		1	2	1	2	1	1	2	1	2	3	4	5	1	2	1	2	3	1	2	1
Nitrification des sols	Statistique Dunnett	>10	>10	>10	>10	>10	10	>10	>10	1		10	>10		>10	>10	>10	>10	3	10	
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	>10	>10	>10	>10	>10	3	>10	>10	1		10	>10		>10	>10	>10	>10	3	1	
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	>10	>10	>10	>10	>10	5	>10	>10	1		10	>10		>10	>10	>10	>10	3	3	
	Seuil Biologique (25%)	>10	>10	>10	>10	>10	5	>10	3	1		10	>10		>10	>10	>10	>10	3	3	
Germination des spores de <i>F. mosseae</i>	Statistique Dunnett	5	10	10	1	1	>10		3		1		1	5	>10	>10	>10	>10	1	1	3
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	5	5	10	1	1	>10		3		1		1	5	>10	>10	>10	>10	1	1	3
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	5	10	10	1	1	>10		3		1		1	5	>10	>10	>10	>10	1	1	3
	Seuil Biologique (20%)	10	10	10	1	1	>10		3		1		1	5	>10	>10	>10	>10	1	1	3
Inhibition de la croissance des algues	Statistique Dunnett	>10	>10	10	>10	>10	>10	10	>10	10	10	10	10	10	>10	>10	>10	>10	10	>10	>10
	Seuil Biologique (15%)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	10	>10	10	10	10	10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

- 1 Effet statistiquement significatif à la dose d'application (dose maximale revendiquée)
- 3 Effet statistiquement significatif à 3 X la dose d'application
- 5 Effet statistiquement significatif à 5 X la dose d'application
- 10 Effet statistiquement significatif à 10 X la dose d'application
- >10 Pas d'effet statistiquement significatif à 10 X la dose d'application
- Effet mesuré pour lequel il subsiste une interrogation du fait des limitations possibles de l'essai pour ce type de produit

Le Tableau 8 fait apparaître une cohérence des conclusions selon les quatre approches considérées pour un grand nombre de produits et d'essais :

- Croissance du navet : 16 cas sur 20 (11 en l'absence d'effet (dose >10), 1 à la dose 5, 1 à la dose 3 et 3 à la dose 1) ;
- Croissance racinaire de l'avoine : 11 cas sur 20 (9 en l'absence d'effet (dose >10), et 2 à la dose 1) ;
- Reproduction des vers de terre : 11 cas sur 20 (tous en l'absence d'effet (dose >10)) ;
- Nitrification dans les sols : 14 cas sur 17 (dont 11 en l'absence d'effet, 1 à la dose 10, 1 à la dose 3 et 1 à la dose 1) ;
- Germination des spores : 15 cas sur 17 (dont 5 en l'absence d'effet, 1 à la dose 10, 1 à la dose 5, 2 à la dose 3 et 6 à la dose 1).

En revanche, certains couples essais / produits ont conduit à des conclusions très différentes en fonction du choix de l'approche retenue, principalement :

- Croissance navet / Cond.Sol1 ; croissance navet / Dig.2 ;
- Croissance racinaire avoine / EngR.5 ; croissance racinaire avoine / MF.1 ;
- Reproduction vers de terre / EngR.1 ; reproduction vers de terre ; EngR.5 ;
- Nitrification dans les sols / Dig.1 ; nitrification dans les sols / EngR.1 ; nitrification dans les sols / Ret.2.

Dans les cas où les réponses n'étaient pas identiques pour les différentes approches :

- En ce qui concerne la croissance du navet, l'approche statistique et la comparaison au seuil biologique ont donné des conclusions identiques pour l'ensemble des produits et le plus souvent en cohérence avec la CE₂₀ obtenue par la modélisation dose-réponse. La CE₁₀ est apparue quelque fois plus sélective. Toutefois, pour le produit Cond.Sol1, la significativité déterminée à la dose 1 est questionnable du fait de l'absence de relation effet dose entre les doses 1 et 10 et le pourcentage d'inhibition constant.
- Pour la croissance racinaire, l'approche statistique s'est révélée systématiquement la plus discriminante (à l'exception de Am.Bas.2). Ceci peut s'expliquer par la très faible variabilité des valeurs mesurées dans les conditions témoins, permettant de conclure à une significativité statistique pour une inhibition de quelques pourcents par rapport au témoin (de l'ordre de 5%). Ces constatations viennent renforcer les connaissances déjà acquises sur cet essai et confirment la nécessité d'abaisser le seuil de significativité biologique si cette approche est privilégiée.

- Dans le cas de l'essai d'inhibition de la reproduction vers de terre, la modélisation dose réponse (CE_{10} et CE_{20}) est apparue plus sélective que les approches statistiques et de comparaison au seuil biologique. Ce constat semble assez logique du fait de la valeur élevée de ce seuil. La comparaison entre l'analyse statistique (ANOVA) et le seuil biologique a mis en évidence une cohérence pour 5 produits sur 9 et une moindre sensibilité du seuil biologique pour les 4 autres produits. Il est important de mentionner que, pour 3 de ces produits, les effets mesurés aux doses statistiquement significatives sont compris entre 35 et 46%. Une réduction du seuil de significativité biologique à une valeur de 40% permettrait d'améliorer l'adéquation de ces deux approches.
- Pour la nitrification dans les sols, l'approche statistique s'est révélée comme la moins discriminante du fait de la variabilité importante des valeurs pour les mêmes conditions d'essai.
- L'essai d'inhibition de la croissance des algues, ayant été réalisé à une seule dose, seule la comparaison entre l'approche statistiques et la référence à un seuil biologique a été possible. Celle-ci a mis en évidence une plus grande sélectivité de l'analyse statistique, liée à la faible variabilité des mesures pour une même condition d'essai et à l'utilisation du taux de croissance. Ainsi, l'analyse statistique a conduit à conclure, dans certains cas, à des effets significatifs pour une inhibition du taux de croissance de 3%.

Si le traitement des résultats par une approche statistique permet de prendre en compte la variabilité des données dans la détermination de la dose présentant un effet significatif, il peut aussi conduire à conclure positivement pour des effets de faible intensité dans le cas des essais pour lesquels la variabilité intrinsèque peut être très faible (croissance racinaire et essai algues par exemple) ou à l'inverse être peu discriminant (nitrification).

Lorsque la relation effet dose est établie, l'approche modélisation avec la détermination d'une CE_{10} ou d'une CE_{20} semble appropriée, cette approche permettant à la fois de considérer la variabilité intrinsèque et de pondérer la réponse en fonction de l'ensemble des effets aux différentes doses et pas seulement par une comparaison individuelle de chaque dose au témoin.

Enfin, l'approche consistant à comparer le pourcentage d'effet mesuré à un seuil biologique a mis en évidence un manque d'adéquation de certaines des valeurs proposées. Il apparaît nécessaire de réviser ces seuils pour augmenter la cohérence avec les autres approches. Ainsi, les adaptations suivantes pourraient être envisagées :

- Croissance racinaire d'*Avena sativa* : abaissement du seuil de 20 à 10% ;
- Reproduction vers de terre : abaissement du seuil d'effets sur la reproduction de 50 à 40% ;
- Nitrification dans les sols : augmentation du seuil de 25 à 30 – 35% ;
- Croissance algale : abaissement du seuil de 15 à 8% de façon à se trouver au-delà des seuils définis dans les normes de référence pour la variation maximale acceptée dans les témoins (coefficient de variation $\leq 5\%$ pour la norme NF EN ISO 8692 ; $\leq 7\%$ pour la ligne directrice OCDE 201).

Les résultats de l'utilisation de ces nouveaux seuils biologiques sont présentés dans le Tableau 9. Pour une lecture plus aisée, les produits pour lesquels la modification du seuil ne changeait pas la conclusion ont été retirés du tableau.

Tableau 9 : Comparaisons des doses présentant des effets significatifs en fonction des seuils biologiques choisis et de l'approche statistique

Essais	Significativité	Am. Bas	Dig.		EngR.			MF.	Ret.		
		2	1	2	1	4	5	1	1	2	
Croissance racinaire <i>A. sativa</i>	Statistique Dunnett	10	3	1	1	1	1	1	3	>10	
	Seuil Biologique	Revu 10%	5	10	1	10	1	1	3	3	>10
		Actuel 20%	>10	>10	1	5	3	>10	>10	5	10
Reproduction des vers de terre <i>E. fetida</i>	Statistique Dunnett	>10	>10	1	5	3	10	10	>10	10	
	Seuil Biologique	Revu 40%	>10	>10	1	5	5	>10	10	>10	10
		Actuel 50%	>10	>10	3	10	5	>10	10	>10	10
Nitrification des sols	Statistique Dunnett	>10	10	>10	>10	10	>10		3	10	
	Seuil Biologique	Revu 30-35%	>10	10	>10	3	10	>10		3	10
		Actuel 25%	>10	5	>10	3	10	>10		3	3
Inhibition de la croissance des algues	Statistique Dunnett	>10	>10	10	>10	10	10	10	10	>10	
	Seuil Biologique	Revu 8%	>10	>10	10	>10	10	10	>10	10	>10
		Actuel 15%	>10	>10	10	>10	10	10	>10	>10	>10

Cette comparaison montre que l'utilisation des nouveaux seuils permettrait d'améliorer la corrélation entre l'approche statistique et l'approche « seuil biologique » pour :

- 6 produits sur les 8 divergents pour l'essai de croissance racinaire avec :
 - o 4 produits pour lesquels la dose d'effet devient identique entre les deux approches (EngR.4, EngR.5 ; Ret.1, Ret.2) ;
 - o 2 pour lesquels l'écart entre les doses d'effet, déterminées par chaque approche, est réduit (MF.1 et dans une moindre mesure Dig.1) ;
- 2 produits pour l'essai vers de terre (Dig.2 et EngR .1) sur les 4 présentant des valeurs différentes ;
- 2 produits (Dig.1 et Ret.2) sur les 3 divergents pour la nitrification des sols.

Pour l'essai d'inhibition des algues, au vu du faible niveau de réponse à la dose unique testée, la modification de la valeur seuil n'entraîne pas de modifications importantes sur les conclusions du niveau de toxicité.

4. ANALYSE GLOBALE DES REPONSES DE LA BATTERIE D'ESSAI

Une analyse en composantes principales a été réalisée en utilisant les valeurs de CE₁₀. Du fait des limitations d'interprétations pour les essais de nitrification des sols (3 produits : EngR.3, MF.1, Mxt.1) et de germination des spores de champignons (3 produits : Dig ;2, EngR.2, EngR.4), deux ACP ont été réalisées :

- l'une sans les 6 produits pour lesquels la question de l'applicabilité d'un des essais s'est posée (Figure 1 et Figure 2),
- l'autre avec tous les produits mais sans les données des essais de nitrification des sols et de germination des spores (Figure 3).

Les classes auxquelles les produits appartiennent ont été représentées par des couleurs différentes permettant de les caractériser.

Analyse des résultats de 6 essais avec 14 produits :

Dans le premier cas les 3 premiers axes peuvent présenter une information intéressante, avec toutefois l'axe 1 plus explicatif (53,7%) que les deux autres (19,2 et 14,3%). Le premier axe de variabilité correspond au niveau de toxicité des produits, puisque les résultats des tests d'écotoxicité sont tous corrélés de la même façon avec cet axe, que l'on considère la carte de facteurs individuel (Individual Factor Map) pour la projection Axe 1 et 2 ou Axe 1 et 3.

On observe une corrélation entre les réponses des essais

- Reproduction des vers de terre/ Croissance du navet (Axe 1 et 2),
- Croissance racinaire et algues (Axe 1 et 3)

et dans une moindre mesure, pour la projection Axe 1 et 2

- Germination des spores/ Croissance racinaire/Reproduction des vers de terre
- Nitrification / Croissance du navet.

L'axe 2 met toutefois en évidence la singularité de l'essai de nitrification.

Globalement, les différents tests apportent une information cohérente : certains produits induisant des effets sur plusieurs essais terrestres à des doses relativement faibles (Ret 1 et 2, Engrais 1 et 5), notamment au niveau de la germination des spores et d'autres n'induisent aucune réponse (MF.2, Myc 1, 2 et 3). Les produits les plus toxiques mis en évidence par cette première analyse ont des profils de toxicité légèrement différents, ce qui se traduit par une distance élevée entre les points sur le graphique : les engrais se démarquent par leur toxicité faible en nitrification bien que présentant de la toxicité par ailleurs.

L'augmentation de la distance entre les deux rétenteurs, en considérant la projection Axe 1-3 par rapport à la projection Axe 1-2, peut être expliquée par la différence de réponse pour l'essai de croissance racinaire.

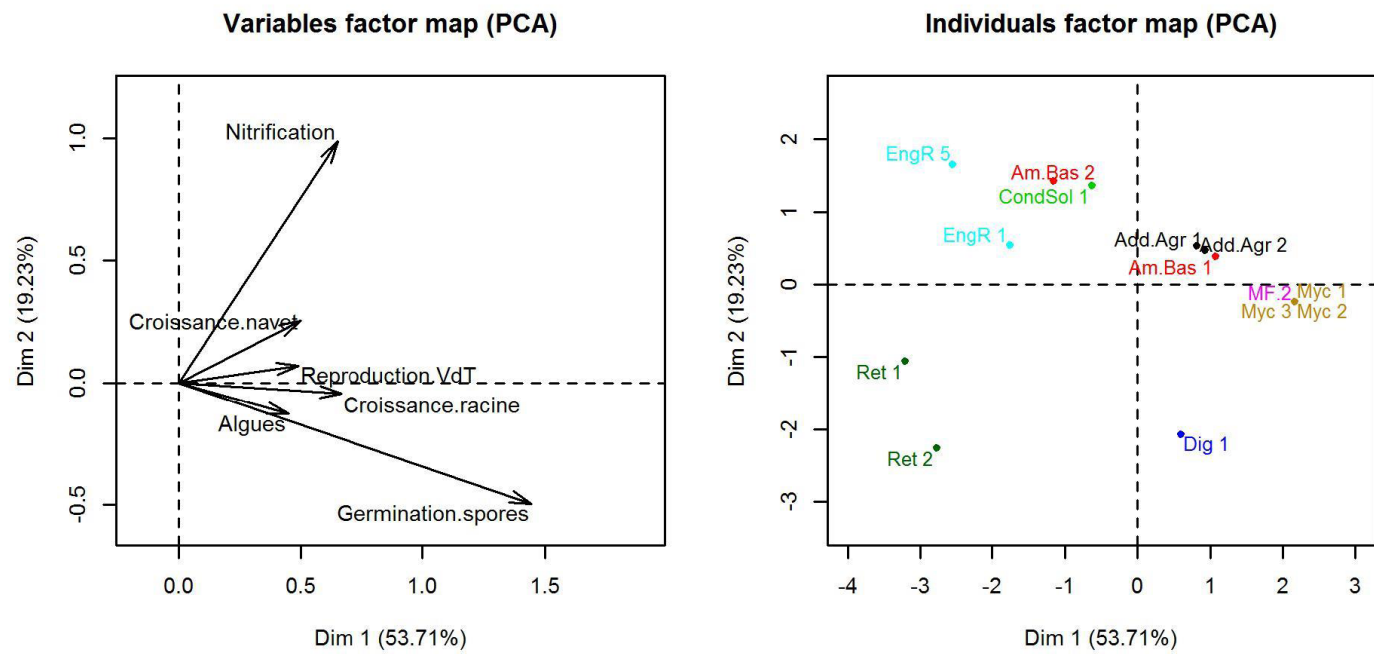


Figure 1 : Analyse en composantes principales des données (CE_{10}) mesurées pour 14 produits et pour l'ensemble des essais, axes 1 et 2

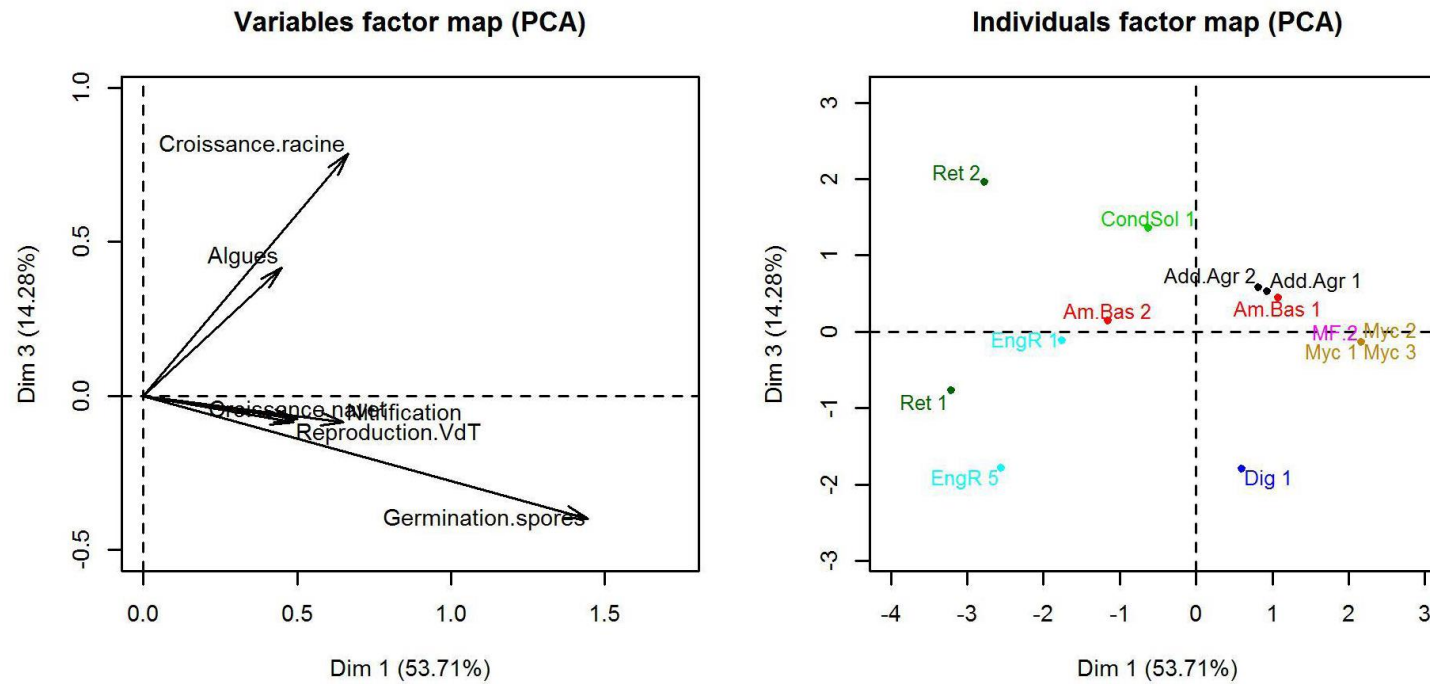


Figure 2 : Analyse en composantes principales des données (CE₁₀) mesurées pour 14 produits et pour l'ensemble des essais, axes 1 et 3

Analyse des résultats de 4 essais avec 20 produits :

Dans l'analyse de tous les produits (Figure 3), en excluant les essais de nitrification et de germination des spores, le premier axe est le plus explicatif (79,26%) de la variabilité des données.

Le premier axe de variabilité correspond ici aussi au niveau de toxicité des produits. Globalement, les différents tests apportent une information cohérente : certains produits induisant des effets sur la plupart des essais terrestres à faible dose (EngR.2, 3 et 4, Dig.2, Mxt.1) et d'autres n'induisent aucune réponse (MF.2, Myc.1, 2 et 3).

Cette analyse se démarque de l'analyse avec les 14 produits par le fait que 5 parmi les 6 produits ajoutés sont ceux induisant le plus de toxicité sur l'ensemble des essais. Ceci explique en partie la modification de l'inertie de l'axe 1 (de 53.71% à 79.26%). Le retrait des tests de nitrification des sols et de germination des spores conduit également à modifier l'inertie de l'axe 1. En effet la concordance est plus forte entre les essais de croissance racinaire, de croissance du navet, des algues et de la reproduction des vers de terre par rapport aux tests de nitrification et de germination des spores. L'essai de nitrification discrimine moins de produits alors que l'essai de germination des spores met en évidence une toxicité pour des produits qui induisent peu de réponses par ailleurs (additifs agronomiques, amendements basiques, conditionneur de sol).

Par ailleurs, le retrait des essais de nitrification des sols et de germination des spores et la prise en compte de 6 produits précédemment écartés de l'analyse (EngR.2, EngR.3, EngR.4, Dig.2, Mxt1) conduit à :

- « recentrer » Ret.1 et 2 caractérisés par des effets toxiques à la dose X1 et/ou X3 pour les deux essais non considérés mais qui se révèlent moins toxiques sur les 4 essais restants que les 6 produits ajoutés à l'analyse. En effet, Ret.1 et Ret.2 se démarquent par leurs réponses à faibles doses pour l'inhibition de la nitrification.
- « recentrer » Dig.1 qui se démarque par son absence de réponse sur la germination des spores malgré des réponses sur d'autres tests. ;
- regrouper les deux additifs agronomiques (Add.Agr1, Add.Agr2), l'amendement basique (Am.Bas.1, Am.Bas.2) et le conditionneur de sol (Cond.Sol1) avec les produits à base de microorganismes (Myc.1, Myc.2, Myc.3) et MF.2 car une fois que l'essai de germination des spores n'est plus pris en compte, ces substances apparaissent toutes comme étant très peu toxiques ;

Enfin l'essai de croissance algale n'ayant été réalisé qu'à une seule dose (Dose 10), même si des effets significatifs ont été identifiés pour 8 des 20 produits, ceux-ci restent relativement faibles, sauf pour les 4 engrais. Ainsi, même si cet essai présente un poids dans l'analyse ACP, celui-ci doit être considéré avec prudence.

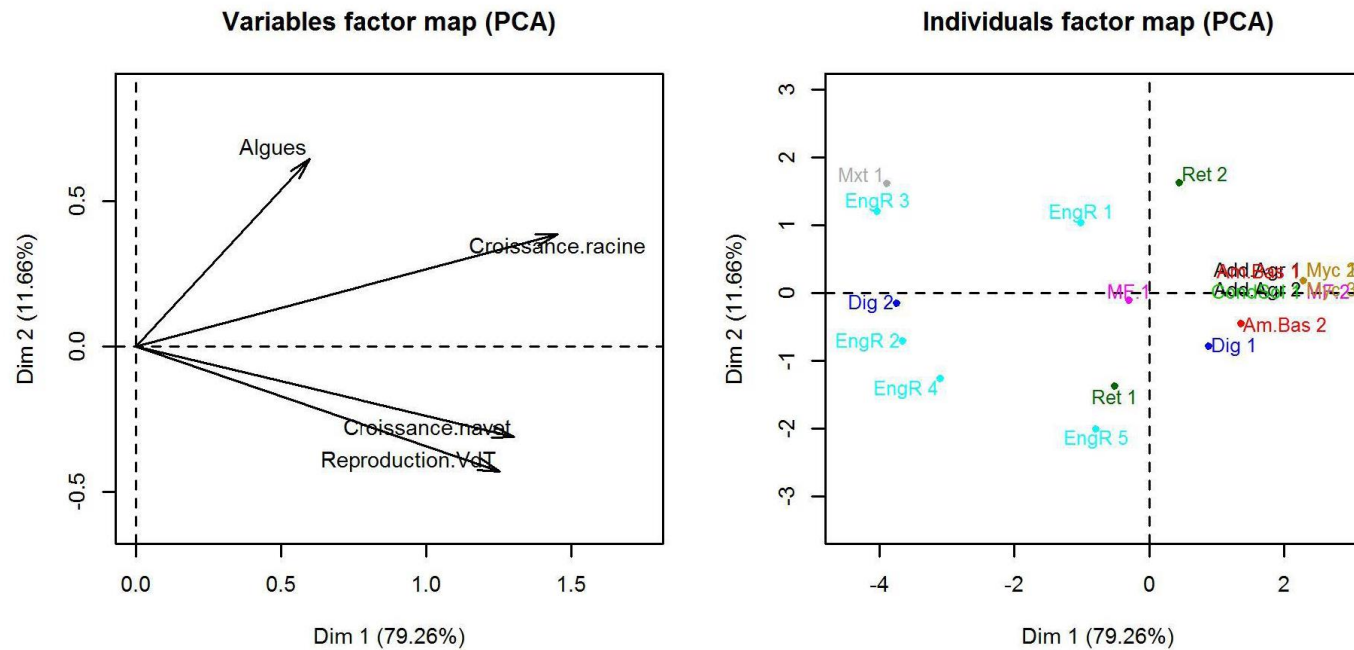


Figure 3 : Analyse en composantes principales des données (CE₁₀) mesurées pour l'ensemble des produits, sans les essais de nitrification des sols et de germination des spores.

Dans certains cas, le niveau de réponse maximal observé, parfois avec un plateau, est à peine supérieur au seuil de 10% (CE₁₀). C'est le cas par exemple pour Cond.Sol1 sur la croissance de navet, où la comparaison des deux modèles conduit à une probabilité critique de 4.8% (inférieur à 5%). Ce phénomène explique les différences de dose seuil mises en évidence dans le Tableau 8. Toutefois, lorsque la CE₂₀ est utilisée, le tableau général, illustré par l'ACP, est le même.

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Cette convention de recherche avait pour objectif d'évaluer la pertinence d'une batterie d'essais d'écotoxicité (cinq essais d'écotoxicité terrestre et un essai d'écotoxicité aquatique) permettant d'identifier le danger potentiel pour l'environnement des MFSC avant la délivrance de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). A cette fin, un échantillon de vingt produits actuellement commercialisés, représentatifs de l'ensemble de ceux disposant d'une AMM, ont été sélectionnés.

La réalisation des essais sur ces produits de nature, de composition et de texture diverses a permis de démontrer que la batterie d'essais sélectionnée avait la capacité à discriminer les différents produits en ce qui concerne leur innocuité environnementale. En effet, une forte diversité de réponse a été constatée en fonction des essais et des produits considérés : d'une absence d'effet à la dose 10 pour l'ensemble des essais à la constatation d'effets inhibiteurs importants dès la dose 1 (dose maximale revendiquée) pour la totalité des tests. A l'issue de cette phase expérimentale, il a été possible de proposer une cartographie des produits à une échelle macro ; les produits les plus préoccupants appartenant au groupe 5 et dans une moindre mesure au groupe 4 (Cf. Tableau 10). Il convient de rappeler que cette cartographie des produits a été établie en considérant 750 tonnes de sol pour un hectare. La prise en compte de la conversion appliquée pour des produits incorporés dans le sol (3000 T/ha) pourrait conduire à une répartition différente des produits.

Tableau 10 : Cartographie des produits testés

<u>Groupe 1</u> (absence d'effet à la dose 10)	MF2, Myc.1, Myc.2, Myc.3
<u>Groupe 2</u> (effets significatifs à la dose 5 ou 10 en fonction de l'approche de significativité retenue)	Add.Agr1, Add.Agr.2, Am.Bas.1, Dig.1
<u>Groupe 3</u> (effets significatifs à la dose 1 pour un seul essai et absence d'effet pour les autres tests)	Am.Bas.2, Cond.Sol1
<u>Groupe 4</u> (effets significatifs sur plusieurs tests au moins à la dose 3)	Ret.1, Ret.2, EngR.1, EngR.4, EngR.5, MF.1
<u>Groupe 5</u> (effets significatifs à la dose 1 pour plusieurs essais)	Mixt.1, EngR.2, EngR.3, Dig.2.

Par ailleurs, l'interprétation détaillée de ces résultats a permis d'identifier des corrélations entre les essais : notamment croissance du navet, croissance racinaire et reproduction vers de terre.

De même, cette démarche expérimentale a conduit à identifier ou confirmer les essais pour lesquels la question de l'applicabilité s'est posée pour certains des produits testés. En ce qui concerne les essais d'inhibition de la croissance des racines de *A. sativa* et d'inhibition de la reproduction de *E. fetida*, aucune contrainte à leur mise en œuvre n'a été constatée sous réserve du respect des modes de préparation des mélanges d'essai décrits dans le chapitre 2.3.2.

En revanche, certaines limitations ont été observées pour les autres essais pouvant conduire à des difficultés d'interprétation des effets toxiques observés du fait, soit de la sensibilité de l'indicateur biologique à certains paramètres physico-chimique (taux de P, pH...), soit à la présence d'interférences dans la mesure des paramètres (relargage de NH_4^+ au cours de l'incubation...) (Cf. chapitres 3.1 et 3.2). Pour l'essai d'inhibition de la germination des spores de *F. mosseae* ainsi que pour celui de la mesure de la minéralisation de l'azote et de la nitrification dans les sols, il apparaît nécessaire de définir les limites d'interprétation des tests et de préconiser leur réalisation en fonction des caractéristiques des produits à tester. Les analyses de P, NH_4^+ et NO_3^- et pH devront être recommandées en amont de ces tests afin de pouvoir juger de leur domaine d'applicabilité.

Le Tableau 11 reprend l'ensemble des limitations expérimentales et questionnements associés et considère la pertinence des adaptations possibles proposées.

Tableau 11 : Récapitulatif des limitations expérimentales constatées et questionnements associés

Essais	Limitations observées	Impact sur l'interprétation des résultats	Alternative/ Adaptation possible	Conséquence des adaptations	
				Positive	Négative
Emergence et croissance du navet	Témoin fertilisant cohérent (quantité et caractéristiques) pour l'ensemble des doses.	Ecotoxicité potentiellement partiellement masquée par l'apport d'éléments fertilisants présents dans le produit testé.	Réalisation d'une condition témoin supplémentaire avec fertilisation du sol par ajout de substances fertilisantes identiques en quantité et caractéristiques à celles apportées par le produit (sur la base de la déclaration CERFA).	Identification d'un effet écotoxique potentiel masqué	*Complexité du protocole expérimental qui va nécessiter un témoin spécifique à chaque dose testée. Difficulté de prise en compte pour une analyse harmonisée *Nécessité de s'assurer de la disponibilité des éléments fertilisants sous une forme « identique ».
	Produit contenant un herbicide.	Effet inhibiteur de la croissance du navet dès la première dose d'essai sur la base de 1ha = 750 T sol.	*Utilisation éventuelle d'une autre espèce non ciblée par le produit. *Non-considération de cet essai.	/	*Espèce moins fréquemment utilisée. *Difficulté de prise en compte pour une analyse harmonisée
Minéralisation de l'azote et nitrification dans les sols	Pertinence du témoin dans le cas où le produit apporte de l'azote sous forme ammoniacale.	Difficulté d'interprétation des résultats et de détermination du pourcentage d'inhibition du fait d'une valeur apportée supérieure à celle du témoin (données qualitatives plutôt que quantitatives en prenant en compte le taux de conversion de NH_4^+ en NO_3^-).	Réalisation d'une condition témoin supplémentaire avec ajout d'une quantité d'azote cohérente avec celle apportée par le produit.	Meilleure interprétation possible des effets potentiels.	Complexité du protocole expérimental qui va nécessiter un témoin spécifique à chaque dose testée.
	Apport d'azote ammoniacal > 200 mg/kg.	Saturation de l'activité de la flore microbienne du sol.	Aucune	/	/

Essais	Limitations observées	Impact sur l'interprétation des résultats	Alternative/ Adaptation possible	Conséquence des adaptations	
				Positive	Négative
Germination des spores de <i>F. mossae</i>	Apport de Phosphore soluble supérieur à 50 et < 100 mg/kg.	Impact potentiel sur la survie et la germination des spores pouvant se traduire par une difficulté d'interprétation	Aucune	/	/
	Apport de Phosphore soluble supérieur à 100 mg/kg.	Pas d'interprétation possible.	Aucune	/	/
	pH du produit inférieur à 5,5.	Impact potentiel sur la survie et la germination des spores pouvant se traduire par une impossibilité d'interprétation.	*Mesure systématique des pH des mélanges sable/produit en début et/ou en fin d'incubation de l'essai. *Ajustement du pH des mélanges.	Possibilité de réaliser l'essai sans effet lié au pH	Difficulté de prise en compte pour une analyse harmonisée
Inhibition de la croissance des algues unicellulaires	Développement bactérien.	Impact potentiel sur la croissance des algues.	Filtration de l'éluat à 0,20 µm.	/	/
Tous les essais	Produits présentant une Capacité de Rétention en Eau importante.	Incidence négative de la texture des mélanges sur les organismes testés.	Adaptation des conditions des préparations et d'hydratation des mélanges (essais de faisabilité au cas par cas, mèches de coton pour les essais végétaux...).	/	/
	Produits contenant des substances enrobées : essais conduits sur les produits broyés.	Surestimation possible des effets écotoxique par la libération totale des substances Pas de prise en compte des revendications de libération lente.	Réalisation de mélanges « maturés » plusieurs semaines en parallèle des essais sur mélanges frais.	Meilleure interprétation des effets potentiels.	Difficulté de prise en compte pour une analyse harmonisée.
	Produits présentant des dégagements d'ammoniac.	Contamination des conditions témoins par le dégagement d'ammoniac.	*Phase préalable d'aération des mélanges produits/ substrats. *Isolement des conditions dégageant de l'azote pour éviter une éventuelle contamination croisée.	/	/

Le Tableau 12 reprend ces limitations en considérant leur impact et leur fréquence pour chaque famille de produit testée. Il est toutefois à noter que pour certaines familles, le faible nombre de produits restreint la généralisation des limitations identifiées.

Tableau 12 : Cartographie des limitations aux familles de produits testées.

Famille (nombre de produits testés)	Limitations avec impact potentiel- interprétation des résultats possible (nombre de produits « impactés »)	Limitations sans interprétation des résultats possible (nombre de produits « impactés »)
Additif Agronomique (2)	Emergence et croissance : Action fertilisante (2)	/
Amendement Basique (2)	Emergence et croissance : Action fertilisante (1)	/
	Germination des spores : Apport de P entre 50 et 100 mg/kg (1)	
Conditionneur de sol (1)	Aucune limitation	
Digestats (2)	Emergence et croissance : Action fertilisante (1)	Germination des spores : apport de P > 100 mg/kg (1)
	Nitrification des sols : Apport d'azote sous forme ammoniacale par le produit (2)	
Engrais (5)	Emergence et croissance : Action fertilisante (2)	/
	Nitrification des sols : Apport d'azote sous forme ammoniacale par le produit (2)	Nitrification des sols : Apport d'azote sous forme ammoniacale par le produit (>200 mg/kg) (1)
	Germination des spores : pH non compatible (1)	Germination des spores : P > 100 mg/kg (1)
Matières Fertilisantes (2)	Emergence et croissance : Action fertilisante (2)	Nitrification des sols : Apport d'azote sous forme ammoniacale par le produit (>200 mg/kg) (1)
	Germination des spores : P entre 50 et 100 mg/kg (1)	/
Micro-organismes (3)	Aucune limitation	
Réteneur d'eau (2)	Aucune limitation	
Produit Mixte (1)		Emergence et croissance : Action herbicide, absence d'émergence (1)
		Nitrification des sols : Apport d'azote sous forme ammoniacale par le produit (>200 mg/kg) (1)

En combinant les informations sur l'applicabilité des essais pour l'ensemble des produits, leur sensibilité et les corrélations observées, il serait possible de proposer une réduction du nombre d'essais et éventuellement une démarche par étapes avec une étape de confirmation, mise en œuvre uniquement si les essais menés à l'étape précédente conduisaient à des conclusions contradictoires.

De façon logique, l'essai d'inhibition de la croissance des algues pourrait être éliminé de la batterie du fait de son absence de sensibilité.

Sur la base des corrélations observées, il pourrait être envisagé de préconiser prioritairement les essais d'inhibition de la croissance racinaire, non sensible à la présence de composés fertilisant dans le produit (à l'inverse de l'essai d'inhibition de la croissance de *B. rapa*), et l'essai d'inhibition de la reproduction des vers de terre ; l'essai d'inhibition de la croissance de *B. rapa* n'étant requis que dans le cas de résultats divergents sur les deux autres essais. En ce qui concerne l'essai d'inhibition de la germination des spores de *F. mosseae* ainsi que de celui de mesure de la minéralisation de l'azote et de la nitrification dans les sols, il conviendrait au préalable de s'assurer par le calcul ou par des essais préliminaires de l'absence de facteurs confondants (respectivement, teneur en phosphore > 50 mg/kg et pH des mélanges d'essais < 6,2 ; apport d'azote minéral \geq 200 mg/kg et libération de NH_4^+ ou NO_3^- par le produit au cours de l'essai).

Enfin, un des volets de cette convention concernait la pertinence de différentes approches pour conclure sur la significativité des essais (approches statistiques ou utilisation de seuils de significativité biologique). Ainsi, ont été appliquées une approche statistique (ANOVA + test post hoc de Dunnett), une approche basée sur la modélisation de la réponse effet – dose, en considérant soit la valeur de CE_{10} ou celle de CE_{20} et une approche par comparaison à des valeurs considérées comme significatives d'un point de vue biologique.

Cet exercice de comparaison des méthodes a mis en évidence une cohérence des conclusions selon les approches considérées pour un grand nombre de produits et d'essais. Dans les cas pour lesquels les conclusions ont divergé, aucune approche n'est apparue plus appropriée qu'une autre. Le traitement des résultats par une approche statistique a conduit dans certains cas à conclure positivement pour des effets de faible intensité dans le cas d'essais pour lesquels la variabilité intrinsèque pouvait être très faible (croissance racinaire et essai algues par exemple) ou à l'inverse être peu discriminant (nitrification). Lorsqu'une relation effet dose était établie, l'approche modélisation avec la détermination d'une CE_{10} ou d'une CE_{20} semblait adéquate, cette approche permettant à la fois de considérer la variabilité intrinsèque et de pondérer la réponse en fonction de l'ensemble des effets aux différentes doses et pas seulement par une comparaison individuelle de chaque dose au témoin. Toutefois, le jeu de données pour lequel ce type de relation a été observé étant réduit, il apparaît difficile de recommander cette approche de façon prioritaire. Pour l'approche consistant à comparer le pourcentage d'effet mesuré à un seuil biologique, un manque d'adéquation de certaines des valeurs proposées a clairement été mis en évidence. Ainsi, les adaptations suivantes ont été proposées (Cf. Tableau 13) et permettent d'améliorer les corrélations entre les différentes approches.

Tableau 13 : Seuils de significativité biologiques révisés

Essai	Seuil de significativité biologique choisi (% d'inhibition par rapport à la condition témoin)
Emergence et croissance <i>B. rapa</i>	25%
Croissance racinaire <i>A. sativa</i>	10%
Reproduction des vers de terre <i>E. fetida</i>	40%
Nitrification dans les sols	30-35%
Germination des spores de <i>F. mosseae</i>	20%
Inhibition de la croissance de l'algue verte <i>P. subcapitata</i>	8%

LISTE DES ANNEXES

Repère	Désignation	Nb de pages
Annexe 1	Résultat des essais par produit (CONFIDENTIEL)	40 Rapport joint
Annexe 2	Limite d'interprétation des résultats des tests	7
Annexe 3	Détermination des doses présentant un effet statistiquement significatif (ANOVA + Dunnett)	2
Annexe 4	Courbes de modélisation effet - dose	4

ANNEXE 1

VOIR RAPPORT CONFIDENTIEL JOINT

ANNEXE 2

LIMITE D'INTERPRETATION DES RESULTATS DES TESTS

ESSAI DE NITRIFICATION

Rappel du principe de l'essai de nitrification

L'effet des produits testés sur la nitrification est déterminé en amendant le sol à l'aide d'une source d'azote minéral facilement dégradable (100 mg/kg d'azote ammoniacal NH_4^+) et en mesurant le pourcentage d'inhibition de la formation d'azote nitrique NO_3^- dans les prises d'essai traitées, par rapport à un échantillon témoin non traité après 21 jours d'exposition.

Une étude de l'impact de la concentration initiale de NH_4^+ sur la nitrification, dans un sol modèle, a mis en évidence une forte diminution du taux de conversion (rapport concentration de NO_3^- finale/ concentration en NH_4^+ initiale) à partir de 200 mg de NH_4^+ par kg de sol (Cf. Figure 4), liée à une saturation de l'activité bactérienne : le sol est alors à son maximum d'activité et ne peut convertir l'ensemble de l'ammonium apporté.

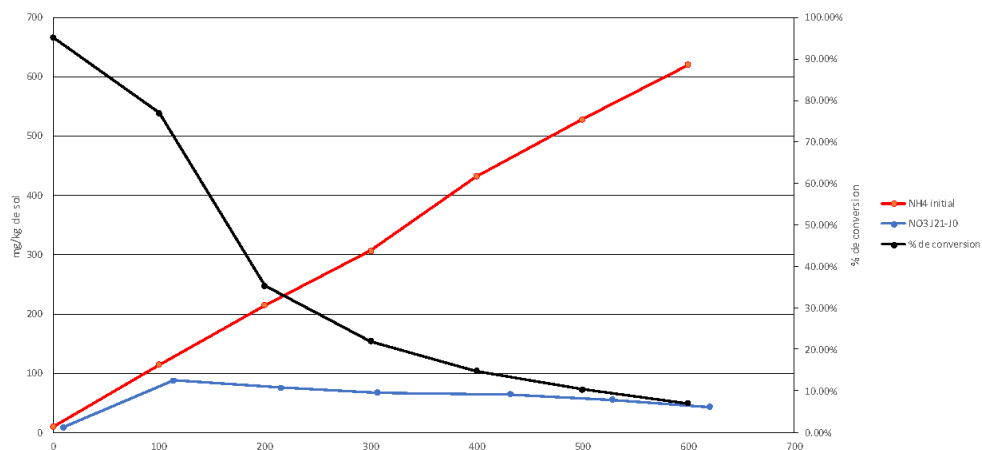


Figure 4 : Effet de l'ajout de différentes concentration d'azote sur la minéralisation dans les sols.

Apport d'azote par les produits testés

La concentration en NH_4^+ dans les mélanges, à chaque dose préparée a été mesurée en début d'essai (Cf. Tableau 14).

La mesure de la concentration en ammonium, pour toutes les conditions d'essai à T0, a permis d'identifier 9 produits source d'azote (surlignées en bleu), et pour certaines à des concentrations supérieures à 200 mg/kg.

Tableau 14 : Concentration d'azote déclarée et concentration de NH₄⁺ mesurées dans les préparations

	Concentration mesurée de NH ₄ ⁺ apportée par le produit à T0 (mg/kg de sol) Moyenne sur 3 réplicats			
	1X	3X	5X	10X
Add.Agr 1	0	1	0	3
Add.Agr 2	0	0	0	0
Am.Bas 1	0	0	2	0
Am.Bas 2	0	0	0	2
CondSol 1	0	0	0	2
Dig 1	4	6	10	14
Dig 2	45	128	227	418
EngR 1	14	43	76	144
EngR 2	7	7	14	Non testé
EngR 3	11	15	20	25
EngR 4	21	63	83	154
EngR 5	23	64	42	85
MF.1	10	32	57	113
MF.2	0	0	0	0
Myc 1	3	0	0	0
Myc 2	0	0	0	0
Myc 3	0	0	0	0
Ret 1	2	2	1	1
Ret 2	0	1	0	0
Mxt 1	47	138	235	471

Les courbes détaillées de la concentration de NH₄⁺ mesurée au cours de l'essai, pour la condition « sans ajout d'azote » (Figure 5) permettent d'identifier plusieurs types d'apport de NH₄⁺ par le produit :

- Un apport initial lié à la dose testée pour EngR. 1 – EngR. 4 – EngR. 5 - Dig. 2 et MF. 1,
- Une augmentation de la concentration en NH₄⁺ au cours ou en fin d'essai pour EngR. 3 – EngR. 4 - EngR. 5 (aux doses X5 et X10) et Mixt. 1, correspondant à une minéralisation de l'azote organique sous forme d'ammonium durant l'essai,
- Pour EngR. 2 et Dig. 1, la concentration en NH₄⁺ liée à l'apport du produit reste minimale au cours de l'essai (inférieure à 20 mg/ kg).

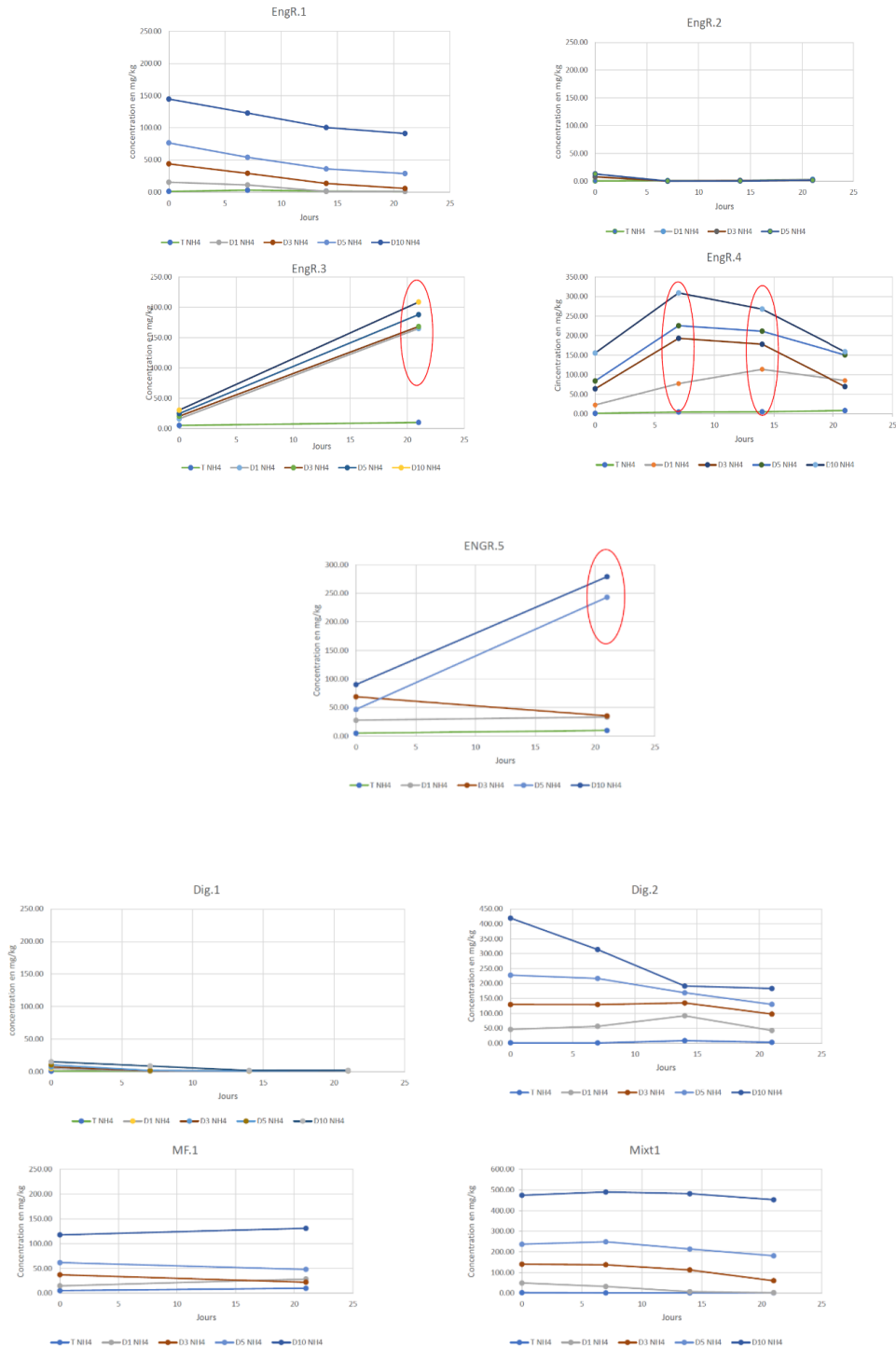


Figure 5: Courbes de dosage du NH_4^+ (en mg/kg) au cours de l'essai de nitrification (condition sans ajout d'azote)

En plus du calcul du pourcentage d'inhibition de l'activité nitrifiante, comparaison de la concentration en NO_3^- finale pour la condition d'essai à la concentration en NO_3^- finale pour la condition « témoin avec ajout d'azote », préconisé par la norme, l'effet des produits sur l'activité microbienne peut être identifié en calculant le taux de conversion de NH_4^+ (initial) en NO_3^- (final)

Dans le cas d'un produit n'apportant pas d'azote, ces paramètres sont généralement corrélés (l'augmentation du taux d'inhibition correspond à une diminution du taux de conversion (Cf Figure 6)).

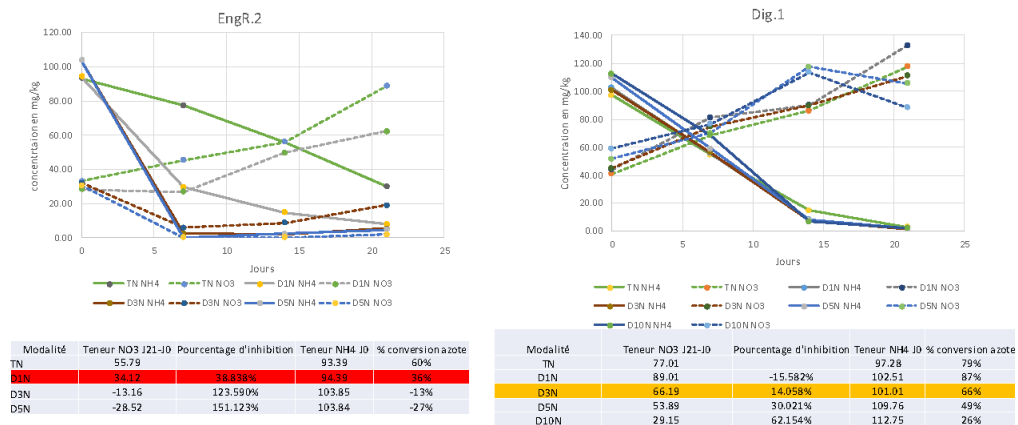
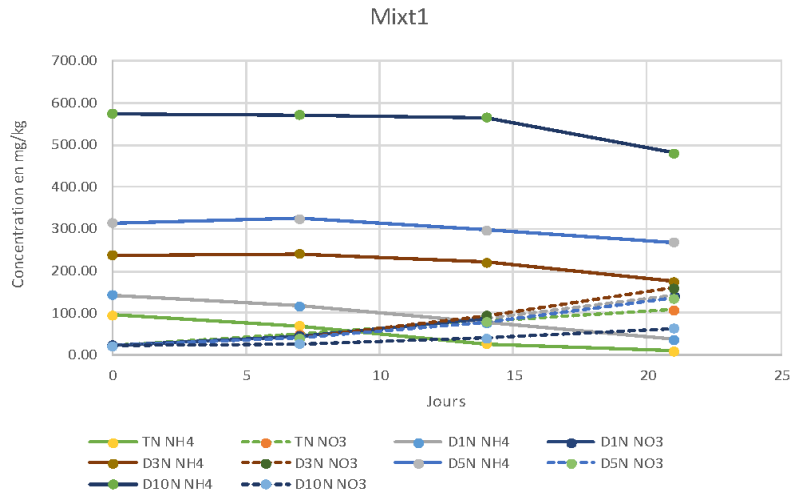


Figure 6 : Transformation du NH_4^+ en NO_3^- durant l'essai de nitrification

Ces deux paramètres sont en revanche peu corrélés et plus difficilement interprétables dans les cas suivants

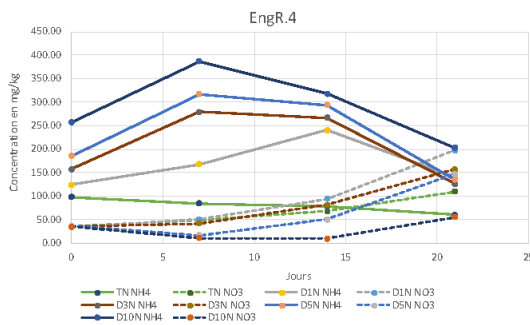
1/ Concentration initiale en NH_4^+ supérieure au témoin, liée à un apport d'azote par le produit testé : la concentration finale en NO_3^- dans les conditions d'essai peut être supérieure à la concentration mesurée dans le témoin. Dans ce cas, le taux d'inhibition indique une absence d'effet, alors que le taux de conversion permet d'identifier un ralentissement de l'activité, lié à une saturation dans le cas où les concentrations en NH_4^+ atteignent des valeurs supérieures à 200 mg/kg (Cf. Figure 7).

2/ Concentration en NH_4^+ augmentant au cours de l'essai (correspondant à une minéralisation de l'azote organique sous forme d'ammonium durant l'essai) : le calcul du pourcentage d'inhibition est affecté de la même façon que pour les produits modifiant la teneur initiale en NH_4^+ : (NO_3^- final > NO_3^- final Témoin). Le taux de conversion, calculé sur la base du NH_4^+ initial n'est pas pertinent dans ce cas, puisque ne tenant pas compte de cette production de NH_4^+ par minéralisation de l'azote organique au cours de l'incubation. Il devrait alors être calculé sur la base de la concentration maximale de NH_4^+ mesurée au cours de l'essai (Figure 8).

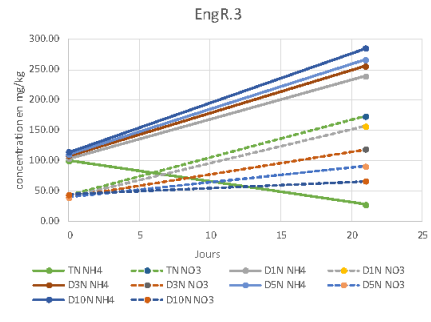


Modalité	Teneur NO3 J21-J0	Pourcentage d'inhibition	Teneur NH4 J0	% conversion azote
TN	84.12		95.84	88%
D1N	117.51	-39.689%	143.07	82%
D3N	137.03	-62.894%	238.33	57%
D5N	114.05	-35.584%	314.00	36%
D10N	40.24	52.164%	574.53	7%

Figure 7 : Exemple de transformation du NH_4^+ en NO_3^- durant l'essai de nitrification pour des produits présentant un apport initial de NH_4^+



Modalité	Teneur NO3 J21-J0	Pourcentage d'inhibition	Teneur NH4 J0	% conversion azote	Teneur NH4 J7	% conversion azote
TN	74.52		98.48	76%		
D1N	163.32	-119.163%	123.75	132%	D1N 167.77	97%
D3N	122.89	-64.913%	157.51	78%	D3N 279.20	44%
D5N	110.33	-48.059%	185.60	59%	D5N 316.53	35%
D10N	19.72	73.537%	256.53	8%	D10N 986.40	5%



Modalité	Teneur NO3 J21-J0	Pourcentage d'inhibition	Teneur NH4 J0	% conversion azote	Teneur NH4 J21	% conversion azote
TN	130.07		100.08	130%		
D1N	116.76	10.231%	103.81	112%	D1N 229.64	49%
D3N	78.84	39.385%	108.53	73%	D3N 256.17	31%
D5N	51.16	60.666%	110.12	46%	D5N 266.79	19%
D10N	21.77	83.260%	114.11	19%	D10N 285.44	8%

Figure 8 : Exemple de transformation du NH_4^+ en NO_3^- durant l'essai de nitrification pour des produits présentant un dégagement de NH_4^+ au cours de l'essai

Ces différents cas permettent de conclure que, pour les produits sources d'azote, les résultats de l'essai de minéralisation de l'azote et de nitrification dans les sols doivent faire l'objet d'une expertise et il est important d'utiliser à la fois les résultats quantitatifs (teneurs en NH_4^+ et NO_3^- au cours du temps) et qualitatifs (% de conversion) pour l'interprétation.

La comparaison des résultats en conditions avec et sans ajout d'azote peuvent aussi parfois permettre d'affiner ou de confirmer les conclusions. S'il n'est pas possible de calculer un taux d'inhibition pour les modalités sans ajout d'azote du fait de l'absence d'un témoin représentatif, il est cependant possible d'utiliser ces modalités pour confirmer des observations effectuées pour les modalités avec ajout d'azote :

- pour EngR. 1 une diminution du taux de conversion pour les doses 5 et 10 qui n'est pas liée à un effet de saturation (concentration initiale en NH_4^+ < 200 mg/kg).
- pour Mxt. 1 un taux de conversion meilleur pour la dose 3 que celui observé avec apport d'azote (lié à la diminution du taux de NH_4 initial à un niveau inférieur au niveau de saturation) et une confirmation de l'effet inhibiteur aux doses 5 et 10.

En considérant l'ensemble des paramètres (conversion, inhibition, saturation initiale, comportement en absence d'apport de NH_4^+), il est possible de conclure à un effet écotoxique pour Dig.1, Dig.2, EngR.2, EngR.4. En revanche, pour EngR.3, MF.1 et Mxt.1, il n'est pas possible de distinguer les effets écotoxiques des effets liés aux facteurs limitants. L'information n'est alors que qualitative.

ESSAI DE GERMINATION DES SPORES

Pour l'essai de germination des spores, les domaines d'applicabilité précisés dans la norme sont les suivants :

- pH des mélanges supérieurs à 5,5
- Concentration en phosphore soluble inférieure à 100 mg/kg dans les mélanges d'essai

L'apport de P_2O_5 dans les préparations, calculé sur la base des déclarations CERFA, est présenté dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Apport de P₂O₅ dans les préparations, calculé sur la base des déclarations CERFA

	Concentration de P ₂ O ₅ dans la produit en mg/kg	Concentration calculée de P ₂ O ₅ dans le sol en mg/kg			
		1X	3X	5X	10X
	Déclaration CERFA				
Add.Agr 1	4000	0,16	0,48	0,80	1,60
Add.Agr 2	344200	0,14	0,41	0,69	1,38
Am.Bas 1	2800	14,93	44,80	74,67	149,33
Am.Bas 2	300	0,20	0,60	1,00	2,00
CondSol 1	2400	0,03	0,10	0,16	0,33
Dig 1	3000 - 13000	20,00 – 86,67	60,00 – 260,00	100,00 – 433,33	200,00 – 866,67
Dig 2	1000 - 4000	53,33 – 213,33	160,00 – 640,00	266,67 – 1066,67	533,33 – 2133,33
EngR 1	715	0,07	0,21	0,36	0,72
EngR 2	290	8,24	24,71	41,18	82,36
EngR 3	1200	0,80	2,40	4,00	8,00
EngR 4	68000	362,67	1088,00	1813,33	3626,67
EngR 5	509000	40,72	122,16	203,60	407,20
MF.1	10000	20,00	60,00	100,00	200,00
MF.2	13400	0,21	0,64	1,07	2,14
Myc 1	330	8,8E-05	2,6E-04	4,4E-04	8,8E-04
Myc 2	5500	0,00	0,01	0,02	0,04
Myc 3	17000	0,02	0,07	0,11	0,23
Ret 1	500	1,33	4,00	6,67	13,33
Ret 2	700	8,21	24,64	41,07	82,13
Mxt 1	50000	26,67	80,00	133,33	266,67

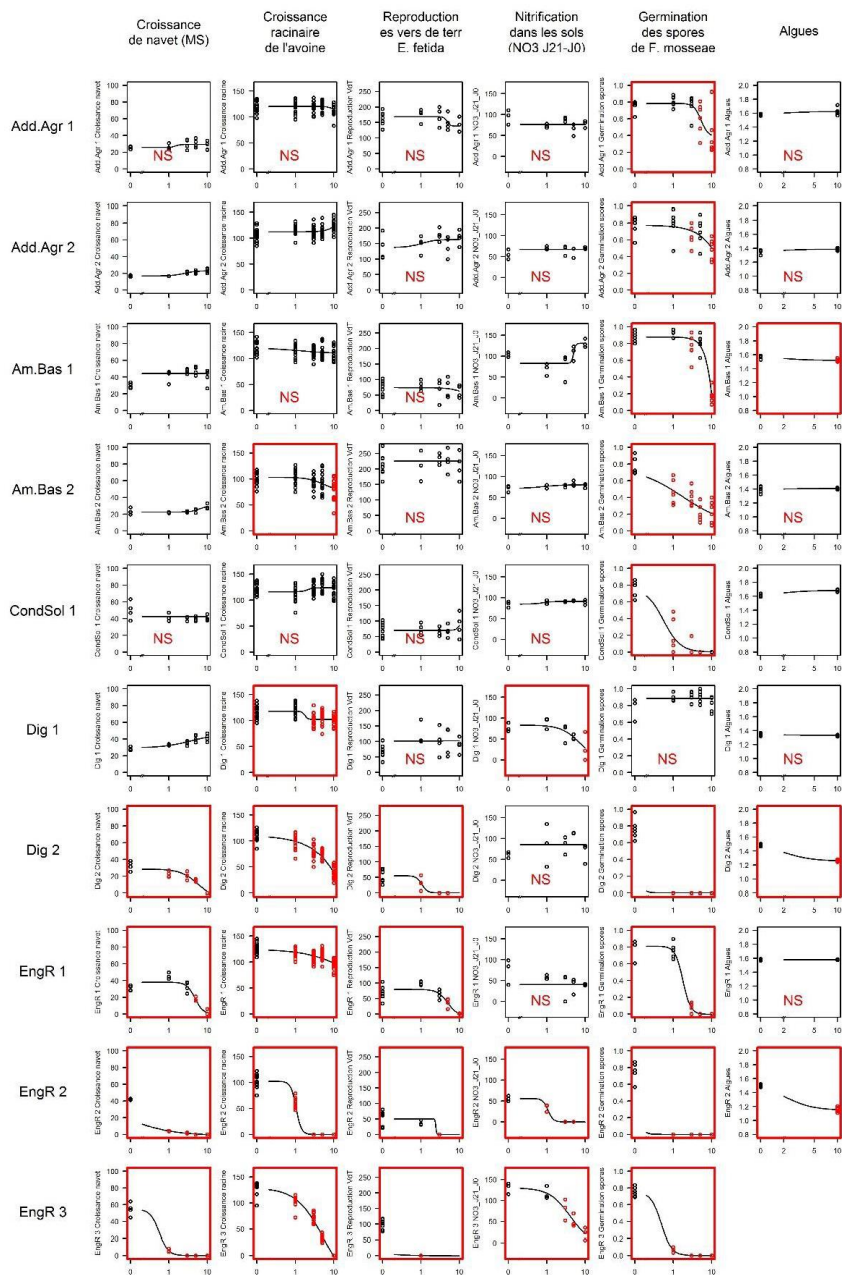
La concentration en P₂O₅ (calculée sur la base des déclarations CERFA) permet de s'interroger sur les effets du P₂O₅ dans le cadre d'effets écotoxiques, compte tenu du niveau précisé dans la norme, et de l'applicabilité de cet essai pour les produits suivants : Dig.2, EngR.4, EngR.5, Mxt1 et dans une moindre mesure pour Am.Bas.1 et MF.1 (seuil de 100 mg/kg dépassé seulement pour la dose 10).

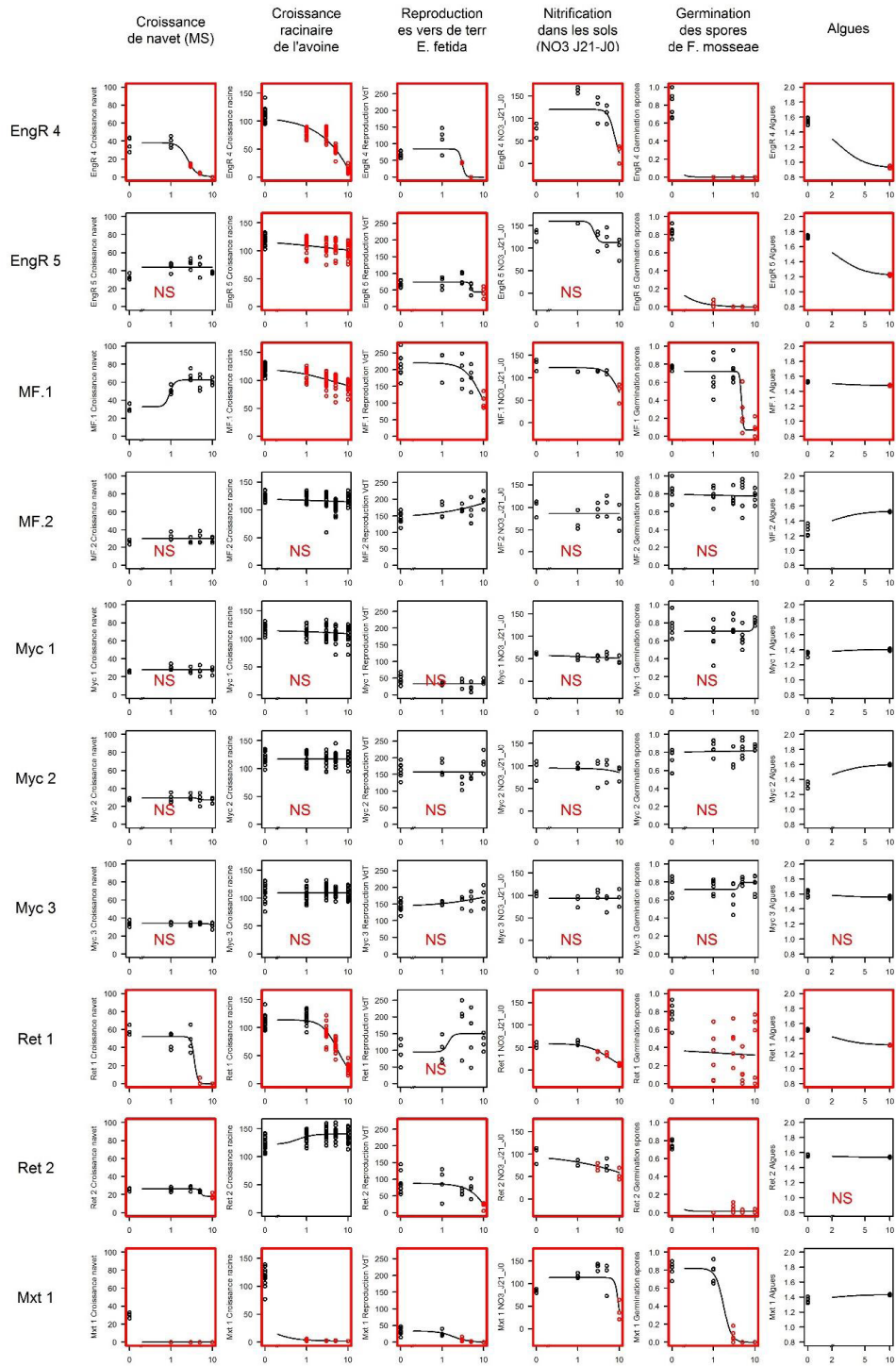
Pour EngR.2, l'effet mesuré dès la dose d'application peut être lié au pH du produit testé : 3,6.

Pour cet essai, pour 3 des 20 produits testés (Dig.2, EngR.2 et EngR.4), il n'est pas possible de distinguer les effets écotoxiques des effets liés aux facteurs limitants (pH et taux de P).

ANNEXE 3

DETERMINATION DES DOSES PRESENTANT UN EFFET STATISTIQUEMENT SIGNIFICATIFS (ANOVA + DUNETT)

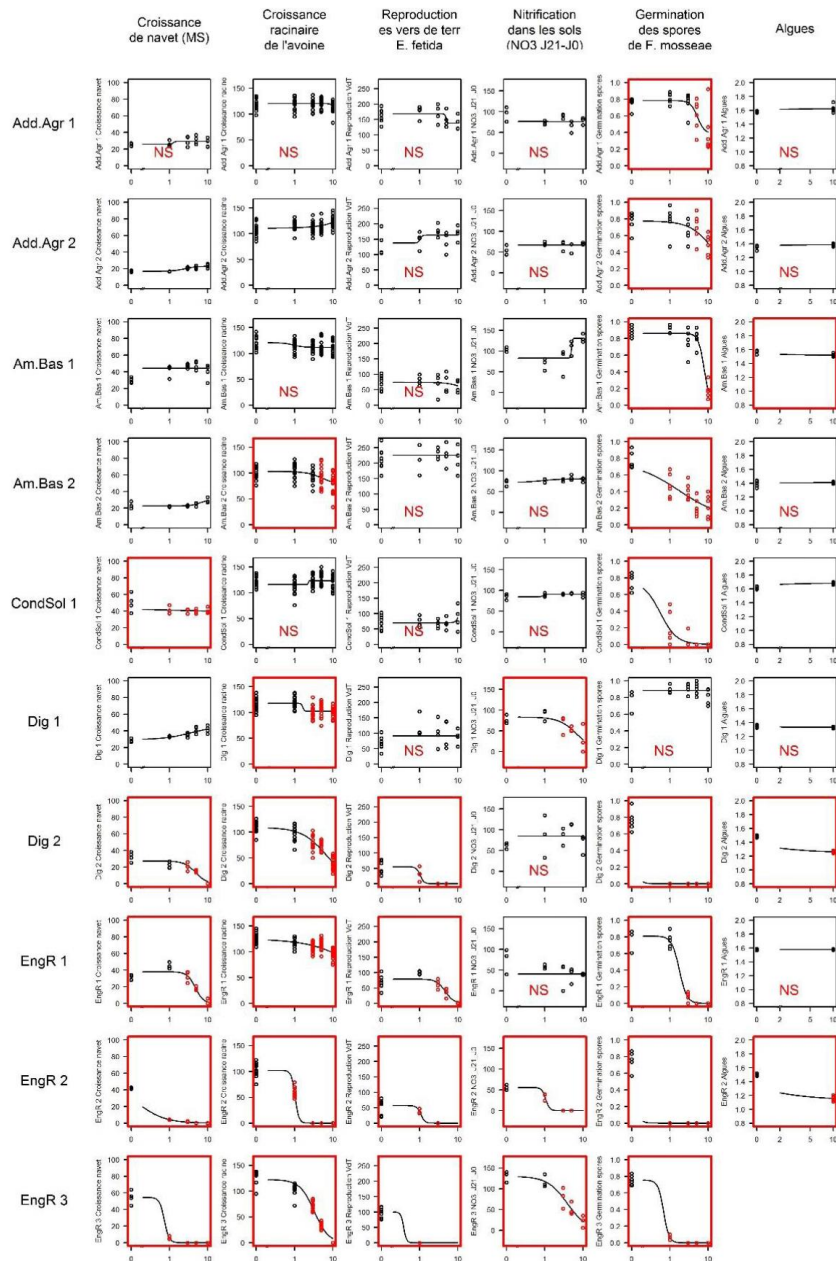


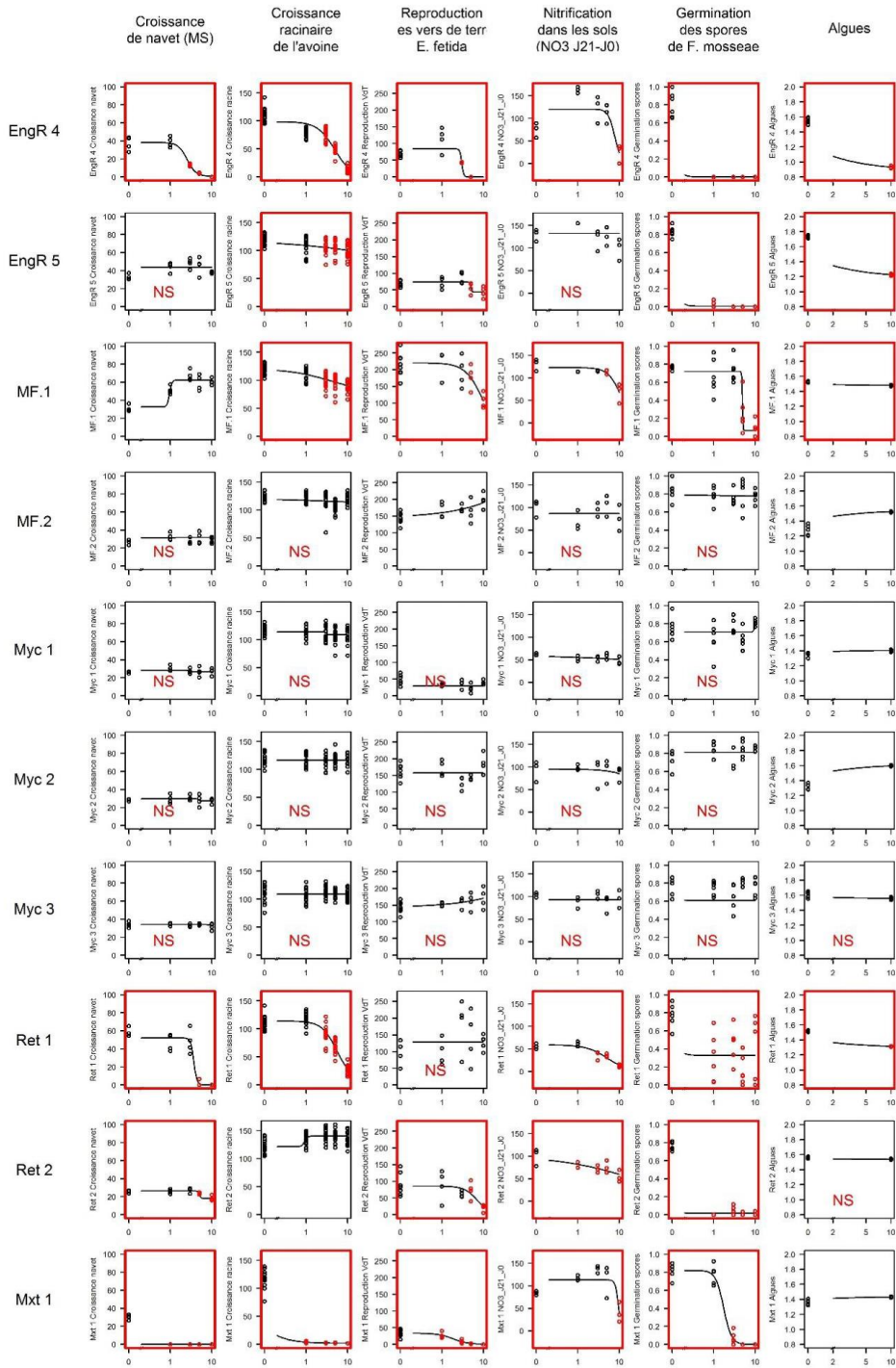


ANNEXE 4

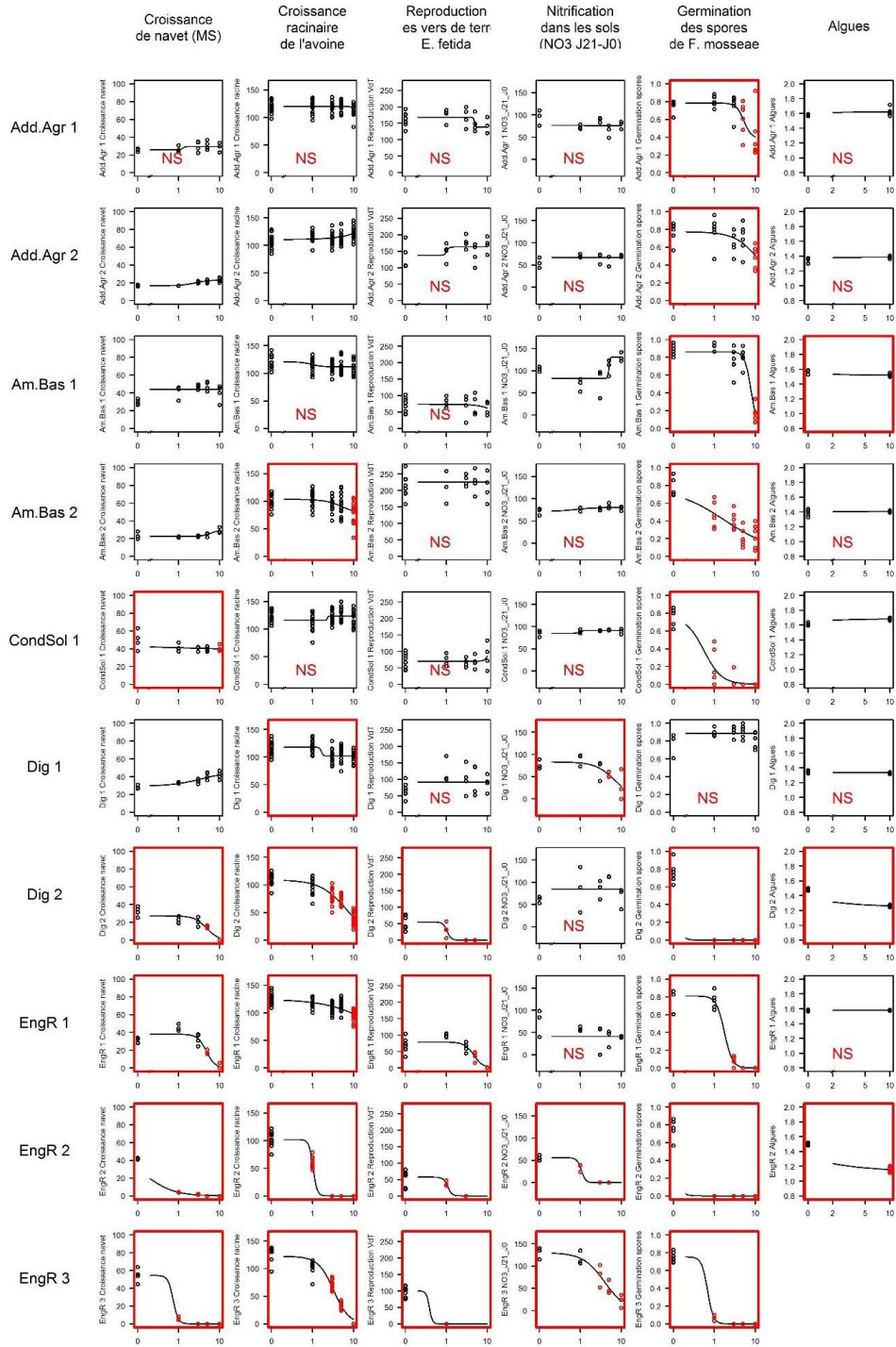
COURBES DE MODELISATION EFFET-DOSE

Détermination des CE₁₀

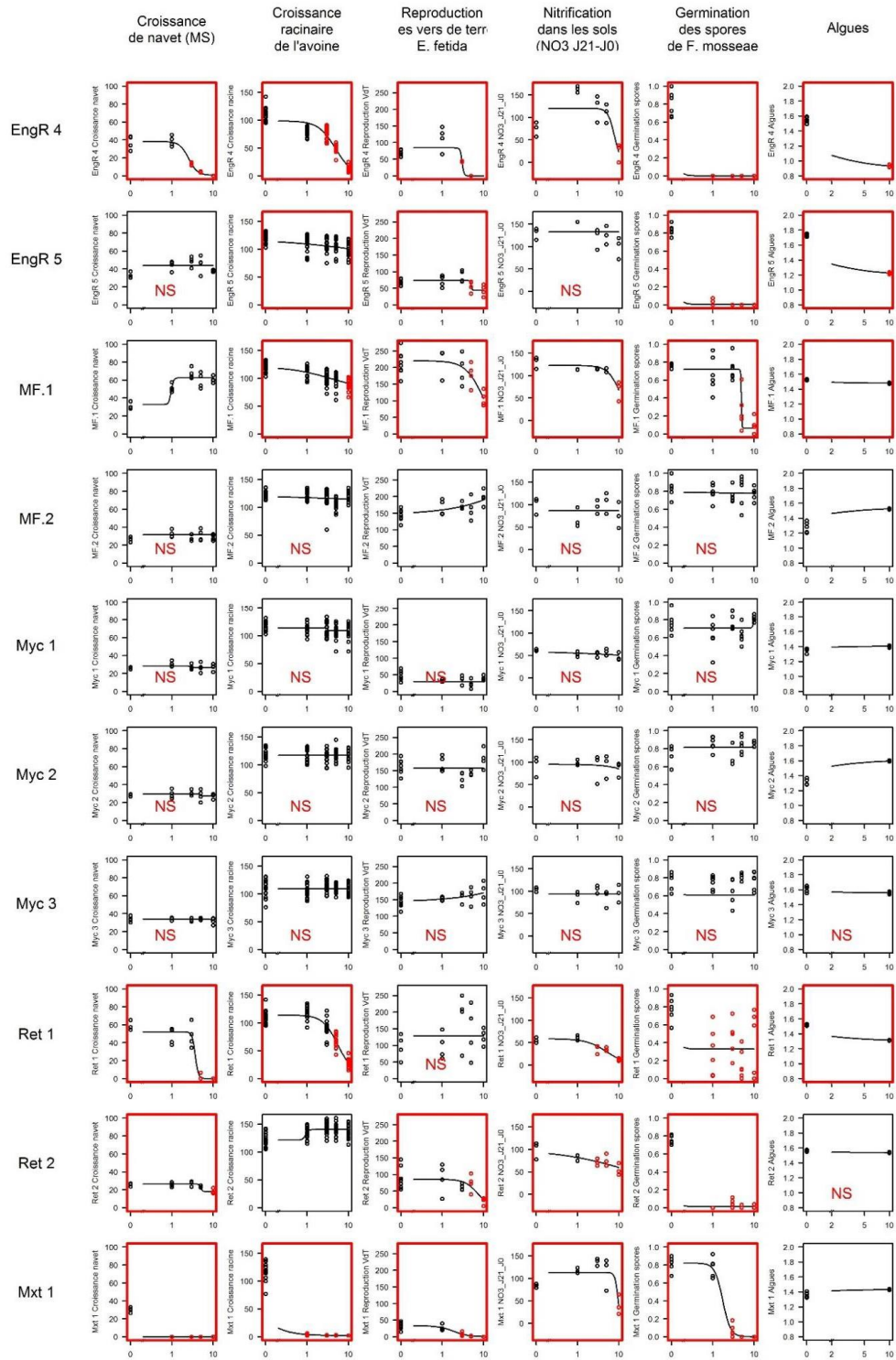




Détermination des CE₂₀



Avis de l'Anses
Saisine n° « 2020-SA-0146 »



ANNEXE 4

Tableau 1 : Détermination des doses présentant des effets significatifs selon les approches « statistiques » (ANOVA, modèle dose-réponse) et l'approche « seuils biologiques » (dose calculée sur la base de 750 T/ha)

Essais	Significativité	Add. Agr		Am. Bas		Cond. Sol	Dig.		EngR.					MF.		Myc.			Ret.		Mxt
		1	2	1	2	1	1	2	1	2	3	4	5	1	2	1	2	3	1	2	1
Croissance <i>B. rapa</i>	Statistique Dunnett	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1	5	1	1	3	>10	>10	>10	>10	>10	>10	5	10	1
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	>10	>10	>10	>10	1	>10	3	3	1	1	3	>10	>10	>10	>10	>10	>10	5	5	1
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	>10	>10	>10	>10	10	>10	5	5	1	1	3	>10	>10	>10	>10	>10	>10	5	10	1
	Seuil Biologique (25%)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1	5	1	1	3	>10	>10	>10	>10	>10	>10	5	10	1
Croissance racinaire <i>A. sativa</i>	Statistique Dunnett	>10	>10	>10	10	>10	3	1	1	1	1	1	1	1	>10	>10	>10	>10	3	>10	1
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	>10	>10	>10	5	>10	3	3	3	1	3	3	3	3	>10	>10	>10	>10	3	>10	1
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	>10	>10	>10	10	>10	>10	3	10	1	3	3	>10	10	>10	>10	>10	>10	5	>10	1

Essais	Significativité	Add. Agr		Am. Bas		Cond. Sol	Dig.			EngR.					MF.		Myc.			Ret.		Mxt
		1	2	1	2	1	1	2	1	2	3	4	5	1	2	1	2	3	1	2	1	
Seuil biologique (10 %)	>10	>10	>10	5	>10	10 ^a	1	10 ^a	1	1	1	1	3	>10 ^a	>10	>10	>10	3	>10	1		
	>10	>10	>10	>10	>10	>10	3	10	1	3	1	>10	5	>10	>10	>10	>10	5	>10	1		
Reproduction des vers de terre <i>E. fetida</i>	Statistique Dunnett	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1	5	3	1	3	10	10	>10	>10	>10	>10	>10	10	3	
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1	3	1	1	3	5	5	>10	>10	>10	>10	>10	5	1	
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1	5	1	1	3	5	5	>10	>10	>10	>10	>10	5	3	
	Seuil Biologique (40%)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1	5	3	1	5	>10	10	>10	>10 ^b	>10	>10	>10	>10	10	3
	Seuil Biologique (50%)	>10	>10	>10	>10	>10	>10	3	10	3	1	5	>10	10	>10	>10 ^b	>10	>10	>10	>10	10	3

Essais	Significativité	Add. Agr		Am. Bas		Cond. Sol	Dig.		EngR.					MF.		Myc.			Ret.		Mxt
		1	2	1	2	1	1	2	1	2	3	4	5	1	2	1	2	3	1	2	1
Nitrification des sols	Statistique Dunnett	>10	>10	>10	>10	>10	10	>10	>10	1		10	>10		>10	>10	>10	>10	3	10	
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	>10	>10	>10	>10	>10	3	>10	>10	1		10	>10		>10	>10	>10	>10	3	1	
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	>10	>10	>10	>10	>10	5	>10	>10	1		10	>10		>10	>10	>10	>10	3	3	
	Seuil Biologique (25%)	>10	>10	>10	>10	>10	5	>10	3	1		10	>10		>10	>10	>10	>10	3	3	
Germination des spores de <i>F. mosseae</i>	Statistique Dunnett	5	10	10	1	1	>10		3		1		1	5	>10	>10	>10	>10	1	1	3
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	5	5	10	1	1	>10		3		1		1	5	>10	>10	>10	>10	1	1	3
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	5	10	10	1	1	>10		3		1		1	5	>10	>10	>10	>10	1	1	3
	Seuil Biologique (20%)	10	10	10	1	1	>10		3		1		1	5	>10	>10	>10	>10	1	1	3

a : effet supérieur au seuil mais non confirmé à la dose immédiatement supérieure. Choix de la dose la plus forte comme significative

b : effet supérieur à 50% à 10 fois la dose mais non confirmé à 10 fois la dose (12% inhibition)


1	Effet statistiquement significatif à la dose d'application (dose maximale revendiquée)
3	Effet statistiquement significatif à 3 X la dose d'application
5	Effet statistiquement significatif à 5 X la dose d'application
10	Effet statistiquement significatif à 10 X la dose d'application
>10	Pas d'effet statistiquement significatif à 10 X la dose d'application
	Effet mesuré pour lequel il subsiste une interrogation du fait des limitations possibles de l'essai pour ce type de produit

Tableau 2 : Détermination des doses présentant des effets significatifs selon les approches « statistiques » (ANOVA, modèle dose-réponse) et l'approche « seuils biologiques » (dose calculée sur la base de 3000 T de sol/ha)

Essais	Significativité	Add. Agr		Am. Bas		Cond. Sol	Dig.		EngR.					MF.		Myc.			Ret.		Mxt
		1	2	1	2	1	1	2	1	2	3	4	5	1	2	1	2	3	1	2	1
Croissance <i>B. rapa</i>	Statistique Dunnett	>40	>40	>40	>40	>10	>40	4	20	4	4	12	>40	>40	>40	>40	>40	>40	20	40	4
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	>40	>40	>40	>40	4	>40	12	12	4	4	12	>40	>40	>40	>40	>40	>40	20	20	4
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	>40	>40	>40	>40	40	>40	20	20	4	4	12	>40	>40	>40	>40	>40	>40	20	20	4
	Seuil Biologique (25%)	>40	>40	>40	>40	>40	>40	4	20	4	4	12	>40	>40	>40	>40	>40	>40	20	20	4
Croissance racinaire <i>A. sativa</i>	Statistique Dunnett	>40	>40	>40	40	>40	12	4	4	4	4	4	4	4	>40	>40	>40	>40	12	>40	4
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	>40	>40	>40	20	>40	12	12	12	4	12	12	12	12	>40	>40	>40	>40	12	>40	4

Essais	Significativité	Add. Agr		Am. Bas		Cond. Sol	Dig.		EngR.					MF.		Myc.			Ret.		Mxt
		1	2	1	2	1	1	2	1	2	3	4	5	1	2	1	2	3	1	2	1
Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	>40	>40	>40	40	>40	>40	12	40	4	12	12	>40	40	>40	>40	>40	>40	20	>40	4
	Seuil biologique (10 %)	>40	>40	>40	20	>10	40 ^a	4	40 ^a	4	4	4	4	12	>40 ^a	>40	>40	>40	12	>40	4
	Seuil Biologique (20%)	>40	>40	>40	>40	>40	>40	12	40	4	12	4	>40	20	>40	>40	>40	>40	20	>40	4
	Statistique Dunnett	>40	>40	>40	>40	>40	>40	4	20	12	4	12	40	40	>40	>40	>40	>40	>40	40	12
Reproduction des vers de terre <i>E. fetida</i>	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	>40	>40	>40	>40	>40	>40	4	12	4	4	12	20	20	>40	>40	>40	>40	>40	20	4
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	>40	>40	>40	>40	>40	>40	4	20	4	4	12	20	20	>40	>40	>40	>40	>40	20	12
	Seuil biologique (40 %)	>40	>40	>40	>40	>40	>40	4	20	12	4	20	>40	40	>40	>40 ^b	>40	>40	>40	40	12
	Seuil Biologique (50%)	>40	>40	>40	>40	>40	>40	12	40	12	4	20	>40	40	>40	>40	>40	>40	>40	40	12

Essais	Significativité	Add. Agr		Am. Bas		Cond. Sol	Dig.		EngR.					MF.		Myc.			Ret.		Mxt
		1	2	1	2	1	1	2	1	2	3	4	5	1	2	1	2	3	1	2	1
Nitrification des sols	Statistique Dunnett	>40	>40	>40	>40	>40	40	>40	>40	4		40	>40		>40	>40	>40	>40	12	40	
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	>40	>40	>40	>40	>40	12	>40	>40	4		40	>40		>40	>40	>40	>40	12	4	
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	>40	>40	>40	>40	>40	20	>40	>40	4		40	>40		>40	>40	>40	>40	12	12	
	Seuil Biologique (25%)	>40	>40	>40	>40	>40	20	>40	12	4		40	>40		>40	>40	>40	>40	12	12	
Germination des spores de <i>F. mosseae</i>	Statistique Dunnett	20	40	40	4	4	>40		12		4		4	20	>40	>40	>40	>40	4	4	12
	Modélisation Dose réponse (CE ₁₀)	20	20	40	4	4	>40		12		4		4	20	>40	>40	>40	>40	4	4	12
	Modélisation Dose réponse (CE ₂₀)	20	40	40	4	4	>40		12		4		4	20	>40	>40	>40	>40	4	4	12
	Seuil Biologique (20%)	40	40	40	4	4	>40		12		4		4	20	>40	>40	>40	>40	4	4	12

4	Effet statistiquement significatif à la dose d'application (dose maximale revendiquée)
12	Effet statistiquement significatif à 3 X la dose d'application
20	Effet statistiquement significatif à 5 X la dose d'application
40	Effet statistiquement significatif à 10 X la dose d'application
>40	Pas d'effet statistiquement significatif à 10 X la dose d'application
	Effet mesuré pour lequel il subsiste une interrogation du fait des limitations possibles de l'essai pour ce type de produit