

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 15 février 2024

Avis
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
relatif à une demande d'évaluation
de 4 substances naturelles à usage biostimulant : le saule, la prêle des champs, l'huile essentielle de menthe des champs et la léonardite.

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 à 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 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 publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 16 décembre 2021 par la Direction générale de l'Alimentation du Ministère chargé de l'Agriculture pour la réalisation de l'expertise suivante : demande d'avis relatif à une demande d'évaluation de 4 substances naturelles à usage biostimulant (Annexe 1) : le saule, la prêle des champs, l'huile essentielle de menthe des champs et la léonardite.

Un premier avis relatif au saule et à la prêle des champs a été émis par l'Agence¹ en juillet 2022.

Ce nouvel avis présente l'évaluation de la léonardite.

L'huile essentielle de menthe des champs fera l'objet d'un avis qui sera publié ultérieurement.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Les substances naturelles à usage biostimulant (SNUB) sont définies dans le cadre de la réglementation applicable au niveau national. Conformément au point 4° de l'article L. 255-5 du code rural et de la pêche maritime, les SNUB sont dispensées d'une autorisation de mise sur le marché. Toutefois, elles sont soumises à une procédure d'autorisation et d'évaluation, dont les modalités sont fixées par voie réglementaire et codifiées à l'article D. 255-30-1² du code rural et de la pêche maritime.

¹ Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'évaluation de 4 substances naturelles à usage biostimulant : le saule, la prêle des champs, l'huile essentielle de menthe des champs et la léonardite du 21 juillet 2022 (saisine 2021-SA-0233).

² Décret n° 2019-329 du 16 avril 2019 relatif aux substances naturelles à usage biostimulant et aux préparations naturelles peu préoccupantes en contenant.

Ainsi, une SNUB est autorisée, le cas échéant avec des prescriptions particulières d'utilisation, par son inscription sur une liste annexée à l'arrêté du 27 avril 2016³ et publiée par arrêté du ministre chargé de l'agriculture lorsque :

- elle est d'origine végétale, animale ou minérale, à l'exclusion des micro-organismes, et n'est pas génétiquement modifiée ;
- elle est obtenue par un procédé accessible à tout utilisateur final correspondant à une absence de traitement ou à un traitement reposant exclusivement sur des moyens manuels, mécaniques ou gravitationnels, la dissolution dans l'eau ou dans l'alcool, la flottation, l'extraction par l'eau ou par l'alcool, la distillation à la vapeur ou le chauffage uniquement pour éliminer l'eau ;
- à l'exception des cas où la substance est mentionnée à l'article D. 4211-11 du code de la santé publique (listant les plantes ou parties de plantes médicinales inscrites à la pharmacopée pouvant, être vendues par des personnes autres que les pharmaciens, sous la forme précisée dans cette liste).

Cette inscription intervient à l'issue d'une évaluation individuelle conduite par l'Anses, qui révèle l'absence d'effet nocif sur la santé humaine, sur la santé animale et sur l'environnement. Il est à noter qu'aucune évaluation de l'efficacité n'est requise dans ce cadre réglementaire.

Par ailleurs, les SNUB issues de parties consommables de plantes utilisées en alimentation animale ou humaine sont dispensées de cette évaluation individuelle lorsqu'elles entrent dans la composition d'une PNPP⁴ conforme à un cahier des charges. Ainsi, conformément à l'arrêté le 14 juin 2021⁵ visant notamment l'avis de l'Agence du 28 juillet 2020⁶, les parties consommables de plantes utilisées en alimentation animale ou humaine, qui sont préparées selon le cahier des charges "CDC PLANTES CONSOMMABLES", sont autorisées en tant que SNUB en dispense d'évaluation individuelle.

Dans ce cadre de cette saisine, il est demandé à l'Anses de donner son avis sur la possibilité d'inscrire à la liste annexée à l'arrêté du 27 avril 2016, les 4 substances suivantes :

- la prêle des champs ;
- le saule ;
- l'huile essentielle de menthe des champs ;
- la léonardite.

A l'appui de cette demande 4 dossiers (1 dossier par substance) préparés par l'ITAB⁷ ont été mis à disposition de l'Anses. Aucun autre document n'a été mis à disposition de l'Anses.

Cet avis présente l'évaluation de la léonardite. Le saule et la prêle des champs ont été précédemment évalués par l'Agence (2021-SA-0233, avis du 21 juillet 2022). L'huile essentielle de menthe des champs fera l'objet d'un avis ultérieur de l'Agence.

³ Arrêté du 27 avril 2016 établissant la liste des substances naturelles à usage biostimulant

⁴ Les préparations naturelles peu préoccupantes (PNPP) sont définies à l'article L. 253-1 du code rural et de la pêche maritime. Une PNPP est composée exclusivement soit de substances de base, au sens de l'article 23 du règlement (CE) n° 1107/2009, soit de substances naturelles à usage biostimulant (SNUB). Les PNPP sont obtenues par un procédé accessible à tout utilisateur final.

⁵ Arrêté du 14 juin 2021 approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de préparations naturelles peu préoccupantes composées de substances naturelles à usage biostimulant issues de parties consommables de plantes utilisées en alimentation animale ou humaine, et autorisant ces substances

⁶ Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif au projet d'arrêté approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de préparations naturelles peu préoccupantes composées de substances naturelles à usage biostimulant issues des parties consommables de plantes utilisables en alimentation animale ou humaine du 28 juillet 2020 (Saisine n° 2019-SA-0207)

⁷ Institut technique de l'agriculture biologique

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 les unités concernées de la Direction d'évaluation des produits réglementés (DEPR) en collaboration d'experts du Comité d'Experts Spécialisé « Matières Fertilisantes et Supports de Culture » (CES MFSC).

Conformément à la saisine, l'expertise demandée s'est appuyée sur le contenu du dossier préparé et soumis par l'ITAB au ministère chargé de l'agriculture (le dossier soumis par l'ITAB et pris en compte pour l'évaluation figure en annexe 2) ;

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Aucun conflit d'intérêts n'a été identifié par l'Agence dans le cadre de la présente saisine.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques via le site internet dédié du Ministère des Solidarités et de la Santé (<https://dpi.sante.gouv.fr/dpi-public-webapp/app/consultation/accueil>).

Après consultation et avec l'accord du Comité d'experts spécialisé "Matières fertilisantes et supports de culture", réuni le 30 novembre 2023, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet les conclusions, propositions et recommandations suivantes.

3. EVALUATION

Cadre et méthodologie d'évaluation

La présente évaluation, conduite par l'Agence, vise à estimer la possibilité d'inscrire la léonardite en tant que SNUB à la liste annexée à l'arrêté du 27 avril 2016.

Le dossier soumis par l'ITAB pour la léonardite figure en annexe 2.

Dans le cadre de cette demande l'Agence s'est tout d'abord attachée à commenter le dossier déposé par l'ITAB. La table de commentaires est présentée en annexe 3.

Une synthèse des points clés de l'évaluation, réalisée par l'Agence, est présentée ci-dessous.

LEONARDITE

Mode de préparation (recette) et usages proposés dans le dossier soumis par l'ITAB

Avant toute utilisation, la léonardite pure doit être réduite à l'état de poudre via des procédés mécaniques. Si la léonardite n'est pas achetée sous forme de poudre, il est nécessaire de la moudre.

Modes de préparation	
Préparation solide : extrait poudreux	Préparation liquide
<ol style="list-style-type: none">1. Moudre2. Tamiser3. Incorporer/épandre au sol	<ol style="list-style-type: none">1. Incorporer la léonardite sous forme de poudre (maximum 10 grammes de léonardite/litre)2. Agiter3. Pulvériser au sol

Cultures	Formulation	Application				Délai avant récolte (DAR)	Remarques
		Modes	Doses	Nombre	Stades		
Cultures maraichères Grandes cultures	Liquide (suspension aqueuse) (10 g/L)	Pulvérisation au sol	150 à 400 L/ha (soit 1,5 à 4,5 kg de léonardite/ha)	1	Avant semis/ plantation	Non pertinent	-
Arboriculture Vigne	Solide (poudre) (1kg/kg)	Incorporation au sol	1 à 3 g/kg de sol (soit 1,5 à 4.5 kg/ha)	1	Avant semis/ plantation	Non pertinent	La dose dépend du type de sol

Synthèse des points clés de l'évaluation

Analyse bibliographique

Les informations présentées par l'ITAB s'appuient sur une analyse bibliographique. Celle-ci n'a pas été conduite selon une méthodologie recommandée par l'EFSA, 2011⁸, les informations qui en découlent ne suffisent pas à s'assurer pleinement que l'état des connaissances actuelles a été raisonnablement considéré⁹. Une recherche complémentaire a été conduite par l'Anses en utilisant la base de données Scopus (publications antérieures à septembre 2023) et restreinte aux dangers et risques pour la santé humaine et pour l'environnement (annexe 4).

Les éléments présentés par l'ITAB complétés par la recherche conduite par l'Anses montrent qu'il n'existe aucune définition officielle, ni même scientifique, de la léonardite. Le terme désigne des roches sédimentaires organiques brutes, riches en acides humiques. Elle se caractérise ainsi par une composition variable (argile, silice, matières organiques) dépendante de la localisation géographique des sites d'extraction et de l'historique des sols.

Compte tenu des substances constitutives, une contamination de la léonardite par complexation est possible notamment avec des contaminants cationiques dont des éléments traces métalliques (ETM) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Par ailleurs, le corpus des connaissances recueillies montre qu'une recherche centrée exclusivement sur la léonardite ne permet pas de couvrir l'intégralité de l'évaluation de l'innocuité. Elles demandent à être complétées par des informations sur les substances humiques, constituant majeur de la léonardite.

Il est à noter que la synthèse des points clés de l'évaluation présentée ci-dessous a été réalisée à partir du dossier, notamment des éléments bibliographique soumis par l'ITAB (Dossier ITAB - Annexe I: « *liste de sources sur lequel s'appuie le dossier* » (Annexe 2), complétés par des éléments tirés de la recherche bibliographique réalisée par l'Anses (Annexe 4).

⁸ European Food Safety Authority; Submission of scientific peer-reviewed open literature for the approval of pesticide active substances under Regulation (EC) No 1107/2009 (OJ L 309, 24.11.2009, p. 1-50). EFSA Journal 2011;9(2):2092. [49 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2011.2092. Available online: www.efsa.europa.eu

⁹ Les principaux manques identifiés concernent : (1) l'absence d'indication sur les champs sélectionnés dans le moteur de recherche WebOfScience (e.g. abstract, title), (2) le caractère manifestement trop large de certaines requêtes (e.g. 11300 résultats pour la requête "humic acid ecotoxicity" sur Google Scholar, desquels sont sélectionnés 21 résultats) soulevant la question du caractère réalisable de l'étape de sélection, (3) le caractère flou ou insuffisant des critères de sélection (exemple : "mesure de la teneur en élément toxique de la leonardite" et "évaluation de l'effet de la leonardite sur une fonction physiologique d'un vertébré" pour la section toxicologie) ou leur inexistence dans le cas de la recherche sur Google Scholar et, enfin, (4) l'absence de fichier librairie listant les résultats obtenus pour chacune des requêtes.

Matière première (SNUB) et procédé d'obtention de la préparation

La léonardite est riche en substances humiques (acides humiques et acides fulviques). Les acides humiques et fulviques extraits des léonardites sont des matières organiques à haut poids moléculaire issues de la dégradation de composés d'origine animale et végétale. La léonardite est retrouvée de manière naturelle dans l'écosystème terrestre. Elle est extraite du sol peu profond et ne subit aucune transformation après extraction.

Trois sites de production de léonardite (situés en Belgique, Italie et Ukraine) sont cités dans le dossier soumis. Toutefois, la léonardite étant une substance naturelle extraite des sols, la variabilité de composition notamment les teneurs en contaminants est très dépendante de l'origine de l'extraction. Par conséquent, un profil commun de composition ne peut être établi.

Il est précisé dans le dossier soumis que la léonardite peut être achetée dans le commerce sous forme de poudre et doit contenir une forte proportion de carbone organique issu de substances humiques. Néanmoins, aucune teneur minimale n'a été définie. Il n'est pas non plus précisé si la léonardite doit répondre à certaines exigences (granulométrie, proportion de carbone humique ou % acide humique) et respecter des teneurs maximales en certains contaminants, notamment en éléments traces métalliques comme l'arsenic.

Ainsi, en absence d'information suffisante sur la composition de la léonardite et en particulier sur la présence de contaminants ou des teneurs maximales en contaminants à ne pas dépasser, il n'est pas possible de caractériser les sources de léonardite revendiquées et de s'assurer de leur représentativité.

Dans le dossier soumis, deux modes de préparation sont proposés : préparation sous forme de poudre et préparation sous forme liquide (suspension de léonardite dans l'eau). Ces deux types de préparation sont destinés à être appliqués au sol (pulvérisation ou incorporation au sol).

La nature de l'eau utilisée pour préparer la formulation liquide de léonardite ou pour la dilution avant application par pulvérisation au sol n'est pas précisée (eau du robinet, eau de source, eau de pluie, ...). Dans son avis du 28 juillet 2020¹⁰, l'Agence indiquait que, dans le cadre de l'utilisation de l'eau de pluie dans les préparations de SNUB, il était « *de la responsabilité du préparateur/fabricant de s'assurer que l'eau utilisée dans le cadre de la préparation des « produits objet de ce cahier des charges ne soit pas contaminée (éléments traces métalliques, polluants organiques, hydrocarbures, micro-organismes pathogènes, ...) et ne présente donc pas de risques pour la santé humaine* ». Dans le cadre de la préparation, il conviendra de s'assurer du respect des règles définies dans le règlement (CE) n° 852/2004¹¹

Le mode de préparation devrait préciser si un tamisage après réduction à l'état de poudre est nécessaire également avant la mise en suspension dans l'eau pour préparer la formulation liquide.

Aucune vérification de la stabilité du produit au stockage n'est proposée dans le dossier. Ainsi, en l'absence d'analyse microbiologique et afin de limiter les risques de contamination microbiologique, il conviendrait que la préparation liquide ainsi réalisée soit obligatoirement appliquée au plus tard dans les 24 heures suivant la fin de sa préparation.

Pour rappel, il est de la responsabilité de celui qui prépare le produit de s'assurer de son innocuité jusqu'à la date d'utilisation recommandée (soit après stockage éventuel). Et conformément à l'article 1 du règlement (CE) n° 852/2004, la responsabilité première en matière de sécurité des aliments incombe à l'exploitant du secteur alimentaire (utilisateur du « produit »). L'utilisateur final de « produits » est responsable de l'innocuité des denrées traitées qu'il met sur le marché, y compris à titre gratuit.

¹⁰ Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif au projet d'arrêté approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de préparations naturelles peu préoccupantes composées de substances naturelles à usage biostimulant issues des parties consommables de plantes utilisables en alimentation animale ou humaine du 28 juillet 2020 (Saisine n° 2019-SA-0207)

¹¹ Règlement (CE) n° 852/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires.

Innocuité

Toxicologie

La léonardite étant majoritairement composée d'acides humiques (50 à 90% en fonction de sa localisation géographique), une partie des études présentées a été réalisée sur les acides humiques. Les acides humiques sont autorisés et utilisés comme produits vétérinaires. Ils permettent, notamment chez les animaux d'élevage, des gains de poids, la diminution des diarrhées et problèmes de santé qui en découlent, la réduction des mauvaises odeurs des matières fécales, l'atténuation du stress chez les animaux.

Aux Etats-Unis, un type d'acide humique (tourbe hongroise) a été autorisé comme nouvel ingrédient par la Food and Drug Administration (FDA)^{12,13}, en tant que complément alimentaire.

Les résultats des éléments toxicologiques sont résumés ci-dessous :

Dans un rapport de l'European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA, 1999), une DL₅₀¹⁴ supérieure à 11500 mg/kg pc par voie orale a été retenue pour les acides humiques.

Une étude de toxicité court terme (90 jours) par voie orale chez le rat (Murbach *et al.*, 2020) réalisée avec une poudre contenant des acides humiques et fulviques (préparation spécifique d'acide humique et fulvique dérivé d'un dépôt de lignite à Alberta au Canada : blk 333) a été soumise. Une coloration noire des selles a été le seul effet observé en comparaison au groupe non traité. Pour cette étude, la dose de référence sans effet toxicologique (NOAEL¹⁵) a été fixée à la dose maximale utilisée de 2000 mg/kg pc/jour. Dans une autre étude, évaluée par l'EFSA 2009¹⁶, après administration pendant 28 jours par voie orale chez le rat d'un mélange d'acides humiques/fulviques chélatés chrome(III), fer(II) et supplémenté en humifultate, une NOAEL de 50 mg/kg pc/jour a été proposée.

Une étude (Ferrara *et al.*, 2006) de mutagenèse suggère que la léonardite, dont la composition et les teneurs en potentiels contaminants n'ont pas été renseignées, peut avoir des effets anti-cytotoxiques pour des doses de 2,5 et 10 µg/L.

Des études de génotoxicité réalisées soit avec différents types d'acides humiques : Humin-s 775, l'humate de sodium, l'humate de potassium, l'humate de sodium régénéré, l'humate de potassium régénéré et l'humate de sodium à 250°C (Marova *et al.*, 2011), soit avec de la léonardite (Ferrara *et al.*, 2006) pour des doses de 2,5 et 10 µg/L et se basant sur des tests de mutation réverse, d'aberration chromosomique et de micronoyau *in vivo* ont été publiées. Ces tests permettent de conclure que la léonardite sous forme non chélatée est non génotoxique, non mutagène et non clastogène.

En revanche, d'autres études réalisées avec des acides humiques naturels soumis à une chloration (Bernacchi *et al.*, 1996); ou synthétisés à partir de monomère d'acide protocatéchique et donc exempt de tout autre contaminant inorganique (Hseu *et al.*, 2008) ; ou encore de trois différentes sources : une purifiée à partir d'une source isolée d'une tourbière de Pennsylvanie, et une isolée à partir de l'effluent d'une usine de traitement des eaux usées avec un processus de boues activées, et une isolée de la moisissure des feuilles prélevées sur les flancs du Mt. Ikoma au Japon (Ueno *et al.*, 1989) indiquent que certaines sources peuvent présenter un potentiel génotoxique. Il a été montré que l'utilisation de désinfectants chlorés lors de la production d'eau potable, à partir d'eaux brutes contenant de la léonardite ou des acides humiques, génère des composés halogénés à la suite d'interactions entre les acides humiques et le chlore (Gustavino *et al.*, 2005). Il a été montré que ces sous-produits chlorés peuvent induire des effets génotoxiques.

¹² FDA : Food and Drug Administration (Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux).

¹³ FDA-2004-S-0571-0007

¹⁴ DL₅₀ : dose létal 50 soit dose d'une substance entraînant la mort de 50 % des animaux.

¹⁵ NOAEL : No observed adverse effect level (dose sans effet néfaste observée).

¹⁶ EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Chromium(III)-, iron(II)- and selenium-humic acid/fulvic acid chelate and supplemented humifultate added for nutritional purposes to food supplements, Efsa J. 1147 (2009) 1-12036.

Le potentiel génotoxique de la léonardite dépend de sa composition liée à sa provenance géographique et de son éventuelle complexation avec d'autres composés.

Sur la base des données fournies, il n'est pas possible de conclure sur les potentiels effets reprotoxiques et neurotoxiques de la léonardite.

Des cas de maladie du pied noir ont été reportés au sud-ouest de Taïwan. Cette maladie provoque des gangrènes du pied. Dans ces mêmes régions, une augmentation de la fréquence de maladies comme les cancers, anomalies cardiovasculaires, hypertension, diabète etc., est observée. Des études (Hseu *et al* 2008 et Lu, 1990) ont permis de montrer que cela est probablement lié à la consommation par les habitants d'eau de puits artésiens et mettent en cause les acides humiques contenus dans cette eau. Il est à noter que la présence potentielle de contaminants dans les acides humiques n'a pas été renseignée.

Les données toxicologiques soumises par l'ITAB pour la léonardite sont limitées et ne permettent donc pas de faire une évaluation exhaustive permettant d'écartier tout risque associé à son utilisation d'un point de vue toxicologique.

Par ailleurs, une estimation de l'exposition de l'opérateur a été proposée mais elle n'a pas été réalisée selon la méthodologie en vigueur de l'EFSA (EFSA, 2014)¹⁷ et l'AOEL¹⁸ utilisée ainsi que les valeurs d'absorption cutanées retenues se sont pas justifiées.

Les études fournies ne permettent pas de conduire une évaluation exhaustive des dangers et des risques des léonardites pour la santé humaine. De plus, la composition des léonardites varie d'une zone géographique à une autre et elles peuvent contenir des contaminants. Ainsi, l'évaluation des dangers et des risques pour la santé humaine liés à l'utilisation de la léonardite comme SNUB, dans les conditions d'emploi revendiquées, ne peut être finalisée.

L'Anses ne dispose pas d'éléments suffisants et pertinents pour vérifier l'absence d'effet nocif sur la santé humaine, notamment en l'absence des analyses démontrant que les teneurs en ETM et hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les critères microbiologiques relatifs aux micro-organismes pathogènes sont conformes à ceux définis en annexe de l'arrêté du 1^{er} avril 2020¹⁹.

Risques pour le consommateur

La composition des léonardites notamment les teneurs en contaminants, étant dépendante de l'origine géographique de leur extraction, il n'est pas possible de s'assurer que l'ensemble des léonardites ne présentent pas de danger lié à leur potentielle contamination.

En conséquence, les données soumises ne permettent pas de finaliser l'évaluation des risques pour le consommateur lié à l'utilisation de la léonardite comme SNUB dans les conditions d'emploi revendiquées.

L'Anses ne dispose pas d'éléments suffisants et pertinents pour vérifier l'absence d'effet nocif pour le consommateur, notamment en l'absence des analyses démontrant que les teneurs en ETM et HAP et les critères microbiologiques relatifs aux micro-organismes pathogènes sont conformes à celles définies en annexe de l'arrêté du 1^{er} avril 2020.

¹⁷ EFSA Journal 2014;12 (10):3874

¹⁸ AOEL : (Acceptable Operator Exposure Level ou niveau acceptable d'exposition pour l'opérateur) est la quantité maximale de substance active à laquelle l'opérateur peut être exposé quotidiennement, sans effet dangereux pour sa santé.

¹⁹ 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.

Environnement et écotoxicologie

Les informations présentées dans la section sur le devenir et le comportement dans l'environnement du dossier soumis font référence à un rapport d'évaluation de l'EGTOP²⁰ (2011) et à des articles scientifiques. Celles-ci permettent de renseigner en partie le devenir et le comportement dans l'environnement de la léonardite. La léonardite et ses principaux constituants (lignite ; CAS n° 129521-66-0, acide fulvique ; CAS n° 479-66-3 et acide humique ; CAS n° 1415-93-6) sont naturellement présents dans l'environnement. La léonardite et les substances humiques sont persistantes dans le sol où elles peuvent s'accumuler. Toutefois, aucune information n'est disponible sur leur persistance dans l'eau.

Une estimation de l'exposition dans l'environnement à la léonardite est proposée par le demandeur dans le dossier technique soumis. Cependant, le niveau estimé d'exposition pour le sol n'a pas été retenu car des paramètres d'entrée utilisés par le demandeur dans les calculs ne peuvent être validés (comme par exemple, l'interception par la culture; la densité et la profondeur de sol). Une accumulation dans le sol de la léonardite ne peut être exclue, mais sa persistance n'a pas été prise en compte par le demandeur pour l'estimation du niveau d'exposition. Le niveau d'exposition pour les organismes aquatiques lié à la dérive de pulvérisation est correctement estimé. Cependant, les voies de contamination du compartiment aquatique liées au ruissellement et au drainage auraient dû être incluses pour estimer le niveau d'exposition des organismes aquatiques en accord avec l'étude de Lipczynska-Kochany *et al.* (2018). Par ailleurs, la présence de substances humiques dans les eaux peut affecter la qualité des eaux traitées destinées à la consommation (Lipczynska-Kochany *et al.*, 2018).

Les informations présentées par le demandeur dans la section écotoxicologie font référence à des études bibliographiques conduites avec la léonardite (Dell'Anno *et al.*, 2020 ; Akimbekov *et al.*, 2020), des acides humiques (EGTOP, 2011 ; El-Zahi *et al.*, 2018 ; Puglisi *et al.*, 2009), un extrait de substances humiques dont la composition n'est pas renseignée (référence citée dans Murbach *et al.*, 2020), des substances humiques (Liekiet *et al.*, 2020 ; Suhett *et al.*, 2011 ; Yamin *et al.*, 2017 ; Akimbekov *et al.*, 2020), des substances humiques de synthèse (Steinberg *et al.*, 2004), des substances humiques dissoutes (Meinelt *et al.*, 2008) et solubles (Tunç *et al.*, 2020), des acides fulviques (Fierro-Coronado *et al.*, 2018 ; Gao *et al.*, 2017 ; El-Zahi *et al.*, 2018), et d'un extrait d'humus (Kodama *et al.*, 2007).

Dans la revue bibliographique de Lieke *et al.* (2020), les auteurs concluent que les substances humiques peuvent provoquer des effets contrastés du fait de leur structure chimique très variable et de la présence potentielle de contaminants. De plus, la composition en acides humiques et fulviques de la léonardite dépend de l'origine de son site de prélèvement. Aussi, il est considéré que les informations proposées par le demandeur sont insuffisantes pour confirmer que les données fournies sont extrapolables à l'ensemble des léonardites.

Par ailleurs, il convient de noter que la majorité des études renseignant les effets de la léonardite et ses principaux constituants (acides humiques et fulviques) sur les organismes aquatiques et terrestres peuvent venir alimenter les connaissances générales, mais font référence à des utilisations vétérinaires ou pharmacologiques.

Les résultats présentés dans les études issues de la recherche bibliographique ne montrent pas d'effet néfaste des acides humiques par gavage à la dose de (i) 0,25% de la ration alimentaire pour les oiseaux (Dominguez-Negrete *et al.*, 2019), (ii) 2000 mg/jour de la ration alimentaire pour les mammifères (Murbach *et al.*, 2020). De plus, aucun effet néfaste (Dell'Anno *et al.*, 2020) pour la léonardite n'est observé à la dose de 0,25% de la ration alimentaire pour les mammifères. Toutefois, une évaluation du risque pour les oiseaux et les mammifères n'a pas été conduite par le demandeur pour les conditions d'emplois revendiquées. Aussi, l'évaluation de l'innocuité de la léonardite pour les oiseaux et les mammifères ne peut être finalisée aux doses d'apport revendiquées.

Dans une étude (Meinelt *et al.*, 2004), des effets néfastes sont observés sur le poisson exposé pendant 21 semaines à des substances humiques de synthèse et à la concentration de 180 mg/L.

²⁰ EGTOP: Expert Group for Technical Advice on Organic Production (groupe d'experts appelé à formuler des avis techniques sur la production biologique. Ce groupe fournit des conseils aux institutions européennes).

Dans ces conditions de laboratoire, une augmentation de la masse corporelle, de la longueur des poissons et du nombre de poissons femelles est observée après 21 jours d'exposition. La mortalité observée est du même ordre de grandeur pour l'ensemble des modalités testées y compris le contrôle. Les auteurs mentionnent également que les alkylphénols présents dans les substances humiques sont connus pour causer de la féminisation chez les jeunes poissons mâles et les amphibiens *via* un mode d'action estrogenique. Ils concluent que des études supplémentaires devraient être conduites afin d'évaluer si ces effets peuvent être observés chez d'autres espèces de poissons et chez les amphibiens.

Par ailleurs, d'autres études (Fierro-Coronado *et al.*, 2018 ; Gao *et al.*, 2017 ; Kodama *et al.*, 2007 ; Suhett *et al.*, 2011 ; Yamin *et al.*, 2017) conduites avec des substances humiques, des acides fulviques, de la léonardite, ne montrent pas d'effets néfastes chez les poissons d'autres organismes aquatiques, mais les effets recherchés dans ces études concernaient la réduction du parasitisme et du taux d'infection de bactéries pathogènes, une réduction du stress, un effet sur le système immunitaire, et la croissance.

Les données soumises ne sont pas considérées suffisantes pour exclure une absence d'effets néfastes sur les organismes aquatiques aux doses d'apport revendiquées.

Les auteurs Tunç *et al.* (2020) montrent que pour les abeilles domestiques, l'addition de substances humiques à une source alimentaire (sucrose) jusqu'à la dose de 20 cm³/L augmente la production du couvain et la production de miel, en revanche des effets néfastes sur les propriétés physiologiques des abeilles (production du couvain) sont observés à la dose de 50 cm³/L. Des informations complémentaires seraient nécessaires pour conclure sur les effets observés dans les conditions d'emploi revendiquées. Une évaluation du risque pour les abeilles n'a pas été conduite par le demandeur. Un effet sur les abeilles ne peut être exclu dans les conditions d'emploi revendiquées. A défaut, une mesure de gestion de type « *Ne pas appliquer en présence d'insectes pollinisateurs (abeilles, bourdons...)* », visant à limiter l'exposition des abeilles ou autres insectes pollinisateurs à la préparation à base de léonardite pourrait être recommandée.

Les auteurs El-Zahl *et al.* (2018) montrent un effet néfaste suite à l'application foliaire au champ d'acides humiques et fulviques sur le puceron (*Aphis gossypii* Glover) à la concentration de 2000 mg d'acides humiques/L et sur l'aleurode (*Bemisia tabaci*) à la concentration de 3496 mg/L d'acides fulviques. Un effet sur les arthropodes ne peut être exclu dans les conditions d'emploi revendiquées (soit une concentration de la bouillie en léonardite de 10 000 mg/L).

Les données soumises ne sont pas considérées suffisantes pour exclure une absence d'effets néfastes sur les arthropodes aux doses d'apport revendiquées.

Les études soumises (Akimbekov *et al.*, 2020 ; Puglisi *et al.*, 2009) ne montrent aucun effet néfaste sur la structure des communautés microbiennes du sol à la concentration estimée dans le sol lié aux usages revendiqués.

Pour les vers de terre et la macro et méso-faune du sol ainsi que les plantes terrestres, aucune étude n'a été fournie pour la léonardite et/ou ses principaux constituants.

Pour l'apport sous serre permanente en culture hors-sol, une exposition des organismes aquatiques et terrestres n'est pas attendue dans les conditions d'emploi précisées ci-dessous. Aucune estimation du niveau d'exposition n'est nécessaire pour cette condition d'emploi.

Enfin, sur la base des informations transmises, la léonardite n'est pas classée selon le règlement (CE) n° 1272/2008 pour la toxicité aiguë pour l'environnement. Les informations disponibles sont insuffisantes et ne permettent pas de conduire une analyse au regard de la nécessité ou non de proposer un classement chronique de la léonardite et des constituants majeurs (lignite ; CAS n°129521-66-0, acide fulvique ; CAS n°479-66-3 et acide humique ; CAS n°115-93-6) en l'absence, pour les organismes aquatiques, de données de toxicité pour trois niveaux trophiques et de données de toxicité chronique.

En conséquence, les données soumises ne permettent pas de réaliser une évaluation exhaustive des dangers, ni de finaliser l'évaluation des effets néfastes sur l'environnement

et les organismes terrestres ou aquatiques liés à l'utilisation de la léonardite comme SNUB pour les usages plein champs et sous-abri à l'exception des usages sous serres permanentes en culture hors-sol.

L'Anses ne dispose pas d'éléments suffisants et pertinents pour vérifier l'absence d'effet nocif sur l'environnement, notamment en l'absence des analyses démontrant que les teneurs en ETM et HAP et les critères microbiologiques relatifs aux micro-organismes pathogènes sont conformes à celles définies en annexe de l'arrêté du 1^{er} avril 2020.

Conclusions de l'évaluation

Les éléments présentés par l'ITAB complétés par la recherche bibliographique conduite par l'Anses montrent que la léonardite a une composition variable en fonction de la localisation des sites d'extraction et de l'historique des sols ainsi que des modes de production. Compte tenu des substances constitutives, une contamination de la léonardite par complexation est possible notamment avec des contaminants cationiques dont des éléments traces métalliques (ETM) ou les HAP. Par ailleurs le corpus de connaissances recueillies montre qu'une recherche centrée exclusivement sur la léonardite ne permet pas de couvrir l'intégralité de l'évaluation de l'innocuité. Elles demandent à être complétées par des informations sur les substances humiques, constituant majeur de la léonardite.

Les études fournies ne permettent pas de conduire une évaluation exhaustive des dangers et des risques des léonardites pour la santé humaine. De plus, la composition des léonardites varie d'une zone géographique à une autre et elles peuvent contenir des contaminants. Ainsi, l'évaluation des dangers et des risques pour la santé humaine liés à l'utilisation de la léonardite comme SNUB, dans les conditions d'emploi revendiquées, ne peut être finalisée.

L'Anses ne dispose pas d'éléments suffisants et pertinents pour vérifier l'absence d'effet nocif sur la santé humaine, notamment en l'absence des analyses démontrant que les teneurs en ETM et hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les critères microbiologiques relatifs aux micro-organismes pathogènes sont conformes à ceux définis en annexe de l'arrêté du 1^{er} avril 2020²¹.

La composition des léonardites, notamment les teneurs en contaminants, étant dépendante de l'origine géographique de leur extraction, il n'est pas possible de s'assurer que l'ensemble des léonardites ne présentent pas de danger lié à leur potentielle contamination. En conséquence, les données soumises ne permettent pas finaliser l'évaluation des risques pour le consommateur lié à l'utilisation de la léonardite comme SNUB.

Pour les usages plein champ et sous tunnels et sous-serres en culture pleine terre, les données présentées ne sont pas suffisamment exhaustives ou spécifiques à la léonardite pour caractériser l'ensemble des dangers pour les organismes aquatiques et terrestres liés aux composés potentiellement présents dans la léonardite et ne permettent pas de conclure en ce qui concerne le risque toxicologique associé à son utilisation sous forme de SNUB, en particulier pour les organismes aquatiques, les abeilles et autres pollinisateurs, les amphibiens et les arthropodes.

L'Anses ne dispose pas d'éléments suffisants et pertinents pour vérifier l'absence d'effet nocif sur la santé humaine et sur l'environnement, notamment en l'absence des analyses démontrant que les teneurs en ETM et HAP et les critères microbiologiques relatifs aux micro-organismes pathogènes sont conformes à celles définies en annexe de l'arrêté du 1^{er} avril 2020.

²¹ 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.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Anses a été saisie le 16 décembre 2021 par le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation pour la réalisation de l'expertise suivante : « demande d'avis relatif à une demande d'évaluation de 4 substances naturelles à usage biostimulant (SNUB): le saule, la prêle des champs, l'huile essentielle de menthe des champs et la léonardite ».

Au titre du III de l'article D.255-30-1 du code rural et de la pêche maritime une évaluation de l'Anses relative aux effets sur la santé humaine, sur la santé animale et sur l'environnement est requise préalablement à l'inscription sur la liste annexée à l'arrêté du 27 avril 2016 en tant que SNUB.

Un premier avis relatif au saule et à la prêle des champs a été émis par l'Agence en juillet 2022. Le présent avis présente l'évaluation de la léonardite et les recettes associées.

Les éléments présentés par l'ITAB complétés par la recherche bibliographique conduite par l'Anses (annexe 4) montrent que la léonardite a une composition variable dépendant de la localisation de l'historique des sites d'extraction et des modes de production. Compte tenu des substances constitutives, une contamination de la léonardite par complexation est possible notamment avec des contaminants cationiques dont des éléments traces métalliques (ETM) ou les HAP.

Les données présentées ne sont pas considérées suffisamment exhaustives pour caractériser l'ensemble des dangers liés à la léonardite, en prenant en compte les différentes compositions et la présence potentielle de contaminants. Elles ne permettent donc pas de finaliser l'évaluation quantitative des risques pour la santé humaine et l'environnement.

L'Anses ne dispose pas d'éléments suffisants et pertinents pour caractériser la variabilité de composition de la léonardite et vérifier l'absence d'effet nocif sur la santé humaine, et sur l'environnement, notamment en l'absence des analyses démontrant que les teneurs en ETM et HAP et les critères microbiologiques relatifs aux micro-organismes pathogènes sont conformes à celles définies en annexe de l'arrêté du 1^{er} avril 2020.

Compte tenu de ces incertitudes, l'Anses ne recommande pas l'ajout de la léonardite à l'annexe de l'arrêté du 27 avril 2016 établissant à liste des substances naturelles à usage biostimulant (SNUB)

Par ailleurs, il convient de souligner que les gisements de léonardite, ressource par définition non renouvelable, constituent des sites naturels de stockage de carbone. Compte tenu des processus de minéralisation de la matière organique des sols, leur exploitation conduira à un transfert de carbone vers l'atmosphère par émission de CO₂.

Pr Benoit Vallet

MOTS-CLÉS

SNUB, PNPP, léonardite, poudre, solution.

CITATION SUGGÉRÉE²

Anses. (2022). Avis de l'Anses relatif à la demande d'avis relatif à une demande d'évaluation de 4 substances naturelles à usage biostimulant (saisine 2021-SA-0233). Maisons-Alfort : Anses.

PRESENTATION 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.

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :
CES Matières Fertilisantes et supports de cultures (MFSC) – (2023 – 2027)

Président

M. Abraham ESCOBAR-GUTIÉRREZ

Vice-président

M. Pascal PANDARD

Membres

Mme Isabelle DEPORTES

Mme Céline DRUILHE

M. Frédéric FEDER

M. François LAURENT

M. Doan Trung LUU

Mme Isabelle QUILLERE

Mme Cécile REVELLIN

M. Laurent THURIES

M. Diederik VAN TUINEN

M. Franck VANDENBULCKE

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. DUMENIL Jean-Rémi - Coordinateur scientifique - Pôle Matières Fertilisantes et Supports de Culture - Unité de Coordination des Intrants du Végétal – Anses

M. DUBOISSET Arnaud – Cellule Veille et Développement Scientifique (CVDS) – Anses

ANNEXE 1

Texte de la saisine 2021-SA-0233

2021-SA-0233



Direction générale
de l'alimentation

Paris, le 16/12/2021

Service des actions sanitaires

**Sous-direction de la santé et de la
protection des végétaux**

Bureau des intrants et du biocontrôle

Dossier suivi par : Bruno PRINTZ
Tél. : 01 49 55 43 99
Mél. : bruno.printz@agriculture.gouv.fr
Réf. : 2021-292X

Le Directeur Général de l'Alimentation

à

Monsieur le Directeur Général
Agence nationale de sécurité sanitaire de
l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS ALFORT CEDEX

Objet : Demande d'évaluation de 4 substances naturelles à usage biostimulant.

Par la présente, je sollicite l'expertise de l'Anses pour évaluer 4 demandes d'autorisation de substances naturelles à usage biostimulant (SNUB) qui ont été préparées par l'Institut Technique de l'Agriculture Biologique.

Les SNUB sont des préparations naturelles peu-préoccupantes, définies au II de l'article D.255-30-1 du code rural et de la pêche maritime (CRPM) comme des matières fertilisantes d'origine végétale, animale ou minérale, à l'exclusion des micro-organismes, qui ne sont pas génétiquement modifiées et qui sont obtenues par un procédé accessible à tout utilisateur final.

Conformément à l'arrêté le 14 juin 2021¹, les parties consommables de plantes utilisées en alimentation animale ou humaine, qui sont préparées selon le cahier des charges "CDC PLANTES CONSOMMABLES", sont autorisées en tant que SNUB en dispense d'évaluation individuelle.

De plus, les SNUB peuvent être autorisées individuellement par inscription sur une liste annexée à l'arrêté du 27 avril 2016².

Selon le III de l'article D. 255-30-1 du CRPM, cette inscription intervient à l'issue d'une évaluation individuelle par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, qui révèle l'absence d'effet nocif sur la santé humaine, sur la santé animale et sur l'environnement.

C'est dans ce cadre que je vous sollicite afin d'évaluer les 4 dossiers annexés à cette saisine, qui sont les premiers de la sorte :

- la prêle des champs ;
- le saule ;
- l'huile essentielle de menthe des champs ;
- la léonardite.

1. Arrêté du 14 juin 2021 approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de préparations naturelles peu préoccupantes composées de substances naturelles à usage biostimulant issues de parties consommables de plantes utilisées en alimentation animale ou humaine, et autorisant ces substances.

2. Arrêté du 27 avril 2016 établissant la liste des substances naturelles à usage biostimulant.

En l'absence de lignes directrices relatives au contenu des dossiers de demande d'autorisation individuelle en tant que SNUB, le format de dossier retenu pour la demande est celui établi à l'échelle européenne pour les substances de base.

Je vous remercie de bien vouloir me faire part de vos conclusions sur les dossiers soumis :

- pour les dossiers relatifs à la prêle des champs et au saule, d'ici au 30/06/2022 ;
- pour les dossiers relatifs à l'huile essentielle de menthe des champs et à la léonardite, d'ici au 31/12/2022.

Mes services se tiennent à votre disposition pour toute information complémentaire.

La directrice générale adjointe de l'alimentation
CVO
Emmanuelle SOUBEYRAN

Annexe


Biostimulant Prêle
Equisetum a.pdf


Biostimulant saule
osier.pdf


Dossier SNUB Huile
essentielle de menth


Dossier SNUB
Léonardite .pdf

**Dossier SNUB soumis par l'ITAB
pour la léonardite**

**Application pour l'approbation en tant que biostimulant SNUB, dans
le contexte du L253-6**

Léonardite

**SUBSTANCE NATURELLE à USAGE BIOSTIMULANT
SNUB
DOSSIER DE CANDIDATURE**

Date : Mai 2021

Mise à jour 2022

Mise à jour 2023

Sommaire

1.	OBJET DE LA CANDIDATURE	4
1.1	Contact du porteur de la candidature.....	4
2.	IDENTITE DE LA SUBSTANCE/PRODUIT DISPONIBLE SUR LE MARCHE ET PRINCIPAUX USAGES	5
2.1	Principaux usages en dehors de la biostimulation végétale.....	5
2.2	Identité et propriétés chimiques de la substance et du produit destiné à l'usage	6
2.2.1.	Nom commun de la substance et du produit, ainsi que leurs synonymes et nomenclature.....	6
2.2.2.	Nom chimique et numéro CAS, EC et CIPAC	6
2.2.3.	Formule et structure moléculaire, masse moléculaire	8
2.2.4.	Méthode de fabrication de la substance et du produit.....	9
2.2.5.	Description et spécifications de pureté de la substance et du produit.....	9
2.2.6.	Identité d'isomères inactifs, d'impuretés et d'additifs.....	10
2.2.7.	Méthodes d'analyses	10
2.3	Nom de la substance, du produit, tel qu'elle se trouve sur le marché	11
2.4	Producteur de la substance, du produit	11
2.5	Type de préparation de la substance, du produit	12
2.6	Description de la préparation du produit destiné à l'usage biostimulant	12
3.	USAGES BIOSTIMULANTS DE LA SUBSTANCE ET DE SES PRODUITS	14
3.1	Domaine d'utilisation.....	14
3.2	Biostimulation au niveau de la plantes (incluant le mode d'action)	16
3.3	Utilité dans le cadre de la biostimulation végétale	20
3.4	Sommaire des intentions d'usages	21
3.4.1.	Tableau d'usages.....	21
4.	CLASSIFICATION ET ETIQUETAGE DE LA SUBSTANCE.....	23
5.	IMPACTE SUR LA SANTE HUMAINE ET ANIMALE	27
5.1	Toxicité.....	27
5.1.1.	Toxicocinétique et métabolisation chez l'Homme	28
5.1.2.	Toxicité aiguë	28
5.1.3.	Toxicité à court-terme	28
5.1.4.	Toxicité chronique	28
5.1.5.	Genotoxicité	29
5.1.6.	Toxicité reproductive	33
5.1.7.	Neurotoxicité	34
5.1.8.	Toxicité des métabolites et impuretés.....	36

5.1.9. Données médicales : effets indésirables signalés chez l'humain.....	38
5.2 Valeurs de références : Dose journalière acceptable, dose aiguë de référence, niveau acceptable d'exposition de l'opérateur.....	39
5.3 Exposition à la substance et ses impuretés.....	39
5.3.1. Exposition liées à l'usage biostimulant.....	39
5.3.2. Exposition de fond à la substance, dues à d'autres raisons.....	39
5.3.3. Comparaison de l'exposition liée à l'usage et l'exposition de fond.....	41
5.4 Impacte sur la santé humaine et animale provenant de la substance ou de ses impuretés ..	41
5.5 Autres informations au sujet des propriétés thérapeutiques ou allégations liées à la santé ..	44
5.6 Autres informations au sujet des usages liées à l'alimentation	46
6. RESIDUS	48
7. DEVENIR ET COMPORTEMENT DANS L'ENVIRONNEMENT.....	49
7.1 Devenir et comportement dans l'environnement	49
7.2 Estimation de l'exposition aiguë et à long terme des substrats environnementaux d'intérêt (sol, nappes phréatiques, eaux de surfaces)	49
7.2.1. Exposition liée à l'usage biostimulant	50
7.2.2. Exposition de fond à la substance, dues à d'autres raisons)	50
7.2.3. Comparaison de l'exposition liée à l'usage et l'exposition de fond.....	53
8. EFFETS SUR LES ORGANISMES NON-CIBLES	55
8.1 Effets sur les vertébrés terrestres	55
8.2 Effets sur les organismes aquatiques	58
8.3 Effets sur abeilles et autres espèces d'arthropodes	63
8.4 Effets sur lombrics et autres macro-organismes du sol.....	65
8.5 Effets sur les micro-organismes du sol.....	65
8.6 Effets sur les autres organismes non-cibles (faune et flore).....	66
8.7 Effets sur les méthodes biologiques de traitements des eaux usées.....	67
9. CONCLUSION GENERALE SUR LE RESPECT DE L'ELIGIBILITE DE LA SUBSTANCE POUR L'APPROBATION EN TANT QUE SUBSTANCE NATURELLE A USAGE BIOSTIMULANT.....	71
10. BIBLIOGRAPHIE	72
11. ANNEXE I – LISTE DES SOURCES SUR LEQUEL S'APPUIE LE DOSSIER	73

1. Objet de la candidature

1.1 Contact du porteur de la candidature

Contact principal :

Nom :	Dr Patrice A. MARCHAND
Institution :	 Institut de l'Agriculture et l'Alimentation Biologiques
Téléphone :	+ 33 1 40 04 50 75 (FAX: + 33 1 40 04 50 64)
Email :	patrice.marchand@itab.asso.fr
Adresse :	149 rue de Bercy F-75595 Paris cedex 12 FRANCE

Rédacteur	
Nom :	Yann DAVILLERD, Patrice A. MARCHAND
Institution :	 Institut de l'Agriculture et l'Alimentation Biologiques
Téléphone :	+336 43 36 33 08
Email :	yann.davillerd@itab.asso.fr
Adresse :	149 rue de Bercy F-75595 Paris cedex 12 FRANCE

2. Identité de la substance/PRODUIT disponible sur le marché et principaux usages

2.1 Principaux usages en dehors de la biostimulation végétale

La léonardite est utilisée en tant que dissolvant dans le cadre de forage où la température est importante.

Ryen Caenn, H.C.H. Darley, George R. Gray, 2017, Chapter 13 - Drilling Fluid Components, Composition and Properties of Drilling and Completion Fluids (Seventh Edition), Gulf Professional Publishing

Lignite (Leonardite) and Derivatives in Drilling Muds. Humic acid was cited as a mud thinner in an early patent but extensive use of leonardite came only with restrictions on quebraco in World War II. Lignite is less acidic than quebraco. Therefore, less caustic soda, often in the ratio of 1:5, is used with lignite than with quebraco. Soluble dry reaction products are made by evaporating a solution of lignite in caustic soda and by grinding lignite and caustic soda together. Causticized lignite in most cases is not as effective as quebracho in thinning fresh water muds on a weight basis, but may be more economical because of its lowest cost. Lignite is not a satisfactory thinner for calcium-contaminated muds, although it can be used to counteract the effect of cement by removing the calcium as a precipitate and lowering the pH by its acidic groups. Lignite is not a thinner for salty muds. Leonardite has greater temperature stability than other thinners. It shows exceptional performance in preventing solidification of lime muds at temperature near 300°F(150°C). Lignite maintains stable filtration rates in drilling hot hole.

La léonardite peut aussi être utilisée en tant que chélatant de métaux lourds dans le cadre de la détoxification des sols.

Damian, Gianina Elena, Valer Micle, and Ioana Monica Sur. 2019. Mobilization of Cu and Pb from Multi-Metal Contaminated Soils by Dissolved Humic Substances Extracted from Leonardite and Factors Affecting the Process. *Journal of Soils and Sediments* 19 (7): 2869–81.

Purpose

The aim of the research was to determine the potential of dissolved humic substances extracted from leonardite to mobilize Cu and Pb from multi-metal contaminated soils with the scope of finding an efficient washing solution as a possible substitute for conventional washing agents used to extract heavy metals from polluted soils around mining areas.

Materials and methods

The efficiency of dissolved humic substances extracted from leonardite to extract Cu and Pb from multi-metal contaminated soil collected from "Larga de Sus" mine (Romania) was determined under batch conditions by single-step extraction. All extraction experiments were conducted in a stirrer with orbital rotation-oscillation and thermostat cupola at 100 oscillations/min and oscillation amplitude of 32 mm. The influence of stirring time (120, 240, 360, 720, 1440, 2400 min), concentration of humic solution (2% and 5%), and soil:solution ratio (mass:volume (m/V)) of 1:8, 1:10, and 1:16 on the Cu and Pb removal efficiency was investigated. The heavy metal concentration from soil and extractant solution was determined through atomic absorption spectrometry.

Results and discussion

The Cu and Pb removal process from soil using dissolved humic substances proceeded relatively quickly. In investigated experimental conditions, the best Cu and Pb removal efficiencies were observed after 360 min of stirring when 60.3% of Cu and 48% of Pb were extracted from soil (2% humic washing solution). The removal efficiency of Cu increased with increasing the soil:solution ratio and humic solution concentration, at shorter stirring times. In the case of Pb, an important improvement of the mobilization with an increasing soil:solution ratio or humic solution concentration was not observed, along with investigated stirring time. A soil:solution ratio of 1:8 was sufficient to reduce the Cu concentration in the studied soil below the intervention threshold established by Romanian legislation, after 360 min of stirring.

Conclusions

The mobilization of Cu and Pb from multi-metal contaminated soil using dissolved humic substances is strongly dependent on stirring time, soil:solution ratio, and concentration of humic washing solution. Nevertheless, the results of the present study demonstrate that dissolved humic substances extracted from leonardite are fairly effective washing agents for soils polluted with Cu, Pb, multiple heavy metals, and other pollutants in high concentrations.

2.2 Identité et propriétés chimiques de la substance et du produit destiné à l'usage

2.2.1. Nom commun de la substance et du produit, ainsi que leurs synonymes et nomenclature

Nom proposé : Léonardite

Nom commun ISO (approuvé or proposé) : Ne s'applique pas

Synonyme : brown coal ; lignite ; leonardite (Anglais) ; leonardit (Allemand) ; leonardita (Espagnol) ; leonardyt (Polonais) ; leonardiet (Néerlandais) ;

2.2.2. Nom chimique et numéro CAS, EC et CIPAC

N° CAS :

N° EINECS :

Nom alternatif

Nom du produit : Lignite

N° CAS : 129521-66-0

N° EINECS 603-338-2

Principaux constituants actifs d'intérêt

1)Acide humique

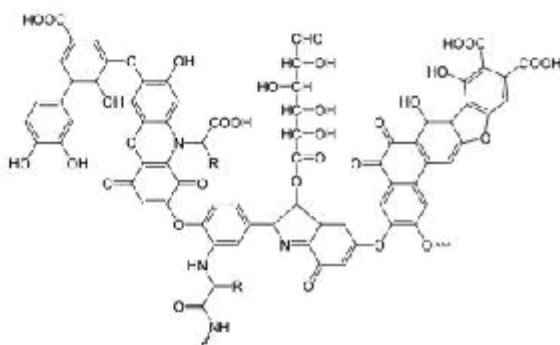
IUPAC Name: Humic acid

CAS Number: 1415-93-6

EINECS: 215-809-6

Structure moléculaire:

Murbach, Timothy S., Róbert Glávits, John R. Endres, Amy E. Clewell, Gábor Hirka, Adél Vértési, Erzsébet Béres, and Ilona Pasics Szakonyiné. 2020. A Toxicological Evaluation of a Fulvic and Humic Acids Preparation. *Toxicology Reports* 7 : 1242–54.



2)Acide fulvique

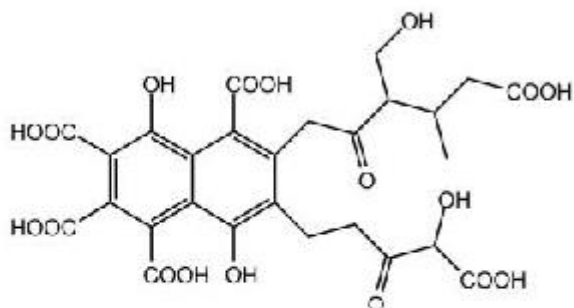
IUPAC Name: 3,7,8-trihydroxy-3-methyl-10-oxo-1,4-dihydropyrano[4,3-b]chromene-9-carboxylic acid

CAS Number: 479-66-3

EINECS:

Structure moléculaire:

Murbach, Timothy S., Róbert Glávits, John R. Endres, Amy E. Clewell, Gábor Hirka, Adél Vértési, Erzsébet Béres, and Ilona Pasics Szakonyiné. 2020. A Toxicological Evaluation of a Fulvic and Humic Acids Preparation. *Toxicology Reports* 7 : 1242–54.

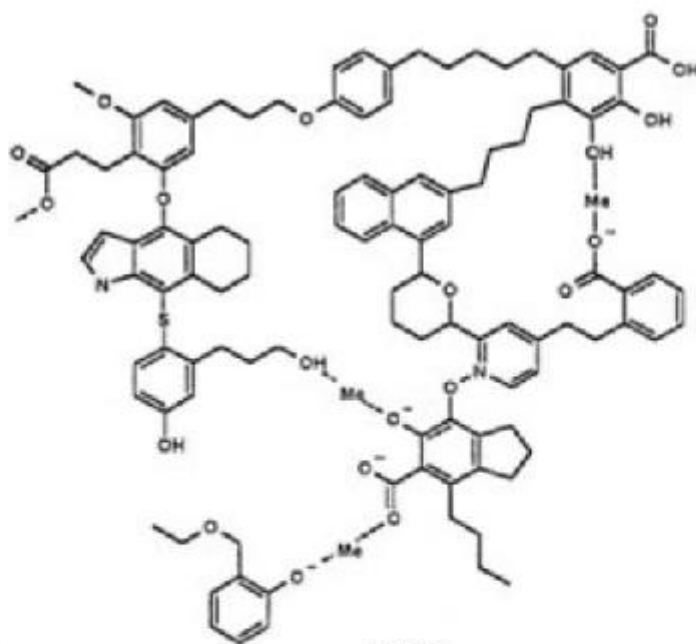


2.2.3. Formule et structure moléculaire, masse moléculaire

Nom du composé : Lignite

Formule moléculaire : $C_{180}H_{145}O_{31}N_5S$

Weimin Cheng, Jiao Xue, Jun Xie, Orcid, Gang Zhou, and Wen Nie, 2017, A Model of Lignite Macromolecular Structures and Its Effect on the Wettability of Coal: A Case Study; *Energy Fuels*, 31, 12, 13834–13841



Formule structurelle :

Masse moléculaire : 2906.1572 g/mol

Fakoussa, R. & Hofrichter, Martin. 1999. *Biotechnology and microbiology of coal degradation. Applied microbiology and biotechnology.*

2.2.4. Méthode de fabrication de la substance et du produit

La léonardite est extraite du sol peu profond, elle ne subit aucune transformation après extraction.

Products, Leonardite. Services. Accessed 27 May 2021.

<https://www.leonarditeproducts.com/Mining>.

Leonardite is dried and sized in a processing plant using a natural gas air heater regulated to a maximum temperature of 145° Fahrenheit (62.7° Celsius) for agricultural grade material. Sizing is accomplished with a Williams hammer mill and spinner separator. The material is packaged directly from this system. No other materials enter or are processed on this equipment. An extensive upgrade in 2019 included a new air heater, spinner separator, PLC system and relocated the electrical room.

This equipment is used to process Source X® and LenOX®. No other materials enter or are processed on this equipment. No processing aids or additives, including but not limited to grinding aids or dust suppressants, are ever used when mining, processing or packaging Source X® or LenOX®.

Source Coarse™ and Source 11, Leonardite Products' specialty humates are processed on a retrofitted sand and gravel drum dryer and a multi-deck vibrating screener.

This drum dryer using natural gas is regulated to a maximum of 188° Fahrenheit (75° Celsius). The sizing of Source Coarse™ and Source 11 is accomplished on three decks of vibrating stainless steel screens.

No other materials are dried or screened on this equipment. No other materials enter or are processed on this equipment. No processing aids or additives, including but not limited to grinding aids or dust suppressants, are ever used when mining, processing or packaging Source 11 or Source Coarse™.

2.2.5. Description et spécifications de pureté de la substance et du produit

La léonardite doit contenir une forte proportion de carbone humique.

Conselvan, Giovanni & Pizzeghello, Diego & Francioso, Ornella & Foggia, Michele & Nardi, Serenella & Carletti, Paolo. 2017. Biostimulant activity of humic substances extracted from leonardites. *Plant and Soil*. 420.

Leonardite is an oxidized form of lignite with a medium-brown coal-like appearance. It is found at shallow depth over more compact coal in various coal mines (Stevenson 1979) around the world, mainly in the USA (Fernandez et al. 1998). This brown coal, particularly enriched in humic C (30–80%), is used to manufacture a wide range of commercial HS products.

Canieren, Omer, Cengiz Karaguzel, and Ahmet Aydin. 2017. Effect of Physical Pre-Enrichment on Humic Substance Recovery from Leonardite. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*; ISSN 2084-4735.

Leonardite mineraloid is known as a highly oxidized ore formed during carbonisation process of lignite containing humic substance. Humic substance is an organic material containing fulvic acid, humic acid, and humin, and that is mostly used as soil conditioner. Extraction of humic substances from leonardite

ores that contain high amounts of humic acid (>50%) has become a prominent area of study in recent years. While humic substance extraction from leonardite is generally carried out by chemical dissolution technique (leaching) in alkali medium, physical enrichment methods were also used in limited number of studies. However, removing inorganics found in leonardites would decrease dissolving reactive consumption and would also prevent unnecessary capacity use. This study investigates the effect of physical pre-enrichment processes on humic substance leaching. This research was carried out in two stages. In the first stage, operational parameters such as amount of reactive, stirring time, temperature, and solid ratio for the leach process were studied, and the most suitable leach conditions were then determined. In the second stage, the effect of physical pre-enrichment experiments on leach process was investigated. While a product containing 48.2% humic substance was obtained with 87.63% humic substance extraction efficiency through chemical enrichment experiments, a product containing 62.74% humic substance (concentrate) was obtained with 92.4% humic substance extraction efficiency after pre-enrichment combined with leach processes.

2.2.6. Identité d'isomères inactifs, d'impuretés et d'additifs

Selon la législation alimentation animale européenne, la teneur en arsenic de la leonardite ne doit pas dépasser 5ppm.

COMMISSION REGULATION (EU) 2019/1869 of 7 November 2019 amending and correcting Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for certain undesirable substances in animal feed

2.2.7. Méthodes d'analyses

Des analyses standards permettent de déterminer la composition de la leonardite.

Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council relating to fertilizers ¹⁶ COM/2001/0508 final - COD 2001/0212 ¹⁷; Official Journal 051 E , 26/02/2002 P. 0001 - 0192

La phase cristalline de la leonardite peut être analysée par la méthode de diffraction aux rayons X

Chanyut Ratanaprommanee, Kawiporn Chinachanta, Fapailin Chaiwan, Arawan Shutsrirung; 2016, Chemical characterization of leonardite and its potential use as soil conditioner and plant growth enhancement; *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*: Volume: 22. Issue: 04

Les composants majeurs de la leonardite peuvent être analysés par la méthode de fluorescence aux rayons X

Chanyut Ratanaprommanee, Kawiporn Chinachanta, Fapailin Chaiwan, Arawan Shutsrirung; 2016, Chemical characterization of leonardite and its potential use as soil conditioner and plant growth enhancement; *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*: Volume: 22. Issue: 04

2.3 Nom de la substance, du produit, tel qu'elle se trouve sur le marché

On peut trouver la leonardite sur le marché, il existe plusieurs noms.

Leonardite-natural unalterd oxidized lignite.



<https://www.amazon.com/l-b-Pulverized-Leonardite-Unaltered-Oxidized/dp/B01J8X8VPE>

Brown leonardite powder

<https://www.indiamart.com/proddetail/leonardite-powder-18618227791.html>

2.4 Producteur de la substance, du produit

Nom Tradecorp international
Adresse : Avenue louise
050 Bruxelles BELGIQUE

Nom CIFO
Adresse : Via Oradour, 6/8

40016 S. Giorgio di Piano (Bologna) – Italy

Nom Laguna RM
Adresse 11/11 rue Vasilkovskaya
Kiev, Ukraine 03040

2.5 Type de préparation de la substance, du produit

Poudre dispersable

2.6 Description de la préparation du produit destiné à l'usage biostimulant

La leonardite pure doit être réduite à l'état de poudre via des procédés mécaniques. Si la substance est n'est pas achetée sous forme de poudre il est nécessaire de la moudre.

Akinremi, O. & Janzen, H. & Lemke, Reynald & Larney, Francis. 2000. Response of canola, wheat, and green beans to leonardite additions. *Canadian Journal of Soil Science*. 80. 437-443.

Freshly mined leonardite, ground to pass through a 2-mm mesh sieve, was applied at rates of 0, 0.5, 1, 5 and 10 g (on an oven-dry weight basis) to 3 kg of soil. Appropriate nutrient solution was added to 3 kg of dry soil in a plastic tray, and then a pre-weighed amount of leonardite was sprinkled on the soil and thoroughly mixed.

Ali, Ece & Saltali, Kadir & Nurhan, Eryigit & Fatma, Uysal. 2007. The Effects of Leonardite applications on Climbing Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Yield and the Some Soil Properties. *Journal of Agronomy*. 6.

The factors studied were ground leonardite and fertilizer rate. Leonardite was ground and passed through a 2mm mash sieve and was applied at the rate of 10 and 20 Mg.ha⁻¹(on an air dry weight basis) to the plots.

Sariyildiz, Temel. 2020. Effects of Leonardite and Mineral Fertilizer Applications on Plant Growth and Soil Quality of Garlic (*Allium sativum* L.). *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*. 8. 1763-1772.

Leonardite was ground and passed through a 2 mm mesh sieve and was applied at the rates of 2.8-, 6.9- and 9.7-ton ha⁻¹ to the plots. Different doses of the leonardite, the mineral fertilizer and the combinations of both were applied and mixed before sowing.

Préparation solide :

	Mode de préparation
Etape 1	Moudre
Etape 2	Tamiser
Etape 3	Incorporer/épandre au sol

Extrait poudreux

La substance sous la forme de poudre est à utiliser en épandage au champ.

Préparation liquide :

	Mode de préparation
Etape 1	Incorporer dans l'eau
Etape 2	Agiter
Etape 3	Pulvériser au sol

Quantité de Leonardite (kg/L)	Quantité de Leonardite dans la préparation (kg/L)
2,5 à 10 g/L	2.5g à 10g/ 1L 250g à 1000g/ 100L

Conclusion §2 : La Leonardite est une substances naturelles issue de la dégradation de la matière organique, ayant plusieurs usages non agricoles, cette substance est principalement vendue sous forme de poudre.

3. Usages biostimulants de la substance et de ses produits

3.1 Domaine d'utilisation

La léonardite est principalement utilisée en tant qu'amendement biostimulant.

Akimbekov, Nuraly, Xiaohui Qiao, Ilya Digel, Gulzhamal Abdieva, Perizat Ualieva, and Azhar Zhubanova. 2020. The Effect of Leonardite-Derived Amendments on Soil Microbiome Structure and Potato Yield. *Agriculture* 10 (5): 147.

Humic substances originating from various organic matters can ameliorate soil properties, stimulate plant growth, and improve nutrient uptake. Due to the low calorific heating value, leonardite is rather unsuitable as fuel. However, it may serve as a potential source of humic substances. This study was aimed at characterizing the leonardite-based soil amendments and examining the effect of their application on the soil microbial community, as well as on potato growth and tuber yield. A high yield (71.1%) of humic acid (LHA) from leonardite has been demonstrated. Parental leonardite (PL) and LHA were applied to soil prior to potato cultivation. The 16S rRNA sequencing of soil samples revealed distinct relationships between microbial community composition and the application of leonardite-based soil amendments. Potato tubers were planted in pots in greenhouse conditions. The tubers were harvested at the mature stage for the determination of growth and yield parameters. The results demonstrated that the LHA treatments had a significant effect on increasing potato growth (54.9%) and tuber yield (88.4%) when compared to the control. The findings highlight the importance of amending leonardite-based humic products for maintaining the biogeochemical stability of soils, for keeping their healthy microbial community structure, and for increasing the agronomic productivity of potato plants.

Kaya, Cengiz, Mehmet Şenbayram, Nudrat Aisha Akram, Muhammed Ashraf, Mohammed Nasser Alyemeri, and Parvaiz Ahmad. 2020. Sulfur-Enriched Leonardite and Humic Acid Soil Amendments Enhance Tolerance to Drought and Phosphorus Deficiency Stress in Maize (*Zea Mays* L.). *Scientific Reports* 10 (1): 6432.

Soil amendments are known to promote several plant growth parameters. In many agro-ecosystems, water scarcity and drought induced phosphorus deficiency limits crop yield significantly. Considering the climate change scenario, drought and related stress factors will be even more severe endangering the global food security. Therefore, two parallel field trials were conducted to examine at what extent soil amendment of leonardite and humic acid would affect drought and phosphorus tolerance of maize. The treatments were: control (C: 100% A pan and 125 kg P ha⁻¹), P deficiency (phosphorus stress (PS): 62.5 kg P ha⁻¹), water deficit stress (water stress (WS): 67% A pan), and PS + WS (67% A pan and 62.5 kg P ha⁻¹). Three organic amendments were (i) no amendment, (ii) 625 kg S + 750 kg leonardite ha⁻¹ and (iii) 1250 kg S + 37.5 kg humic acid ha⁻¹ tested on stress treatments. Drought and P deficiency reduced plant biomass, grain yield, chlorophyll content, Fv/Fm, RWC and antioxidant activity (superoxide dismutase, peroxidase, and catalase), but increased electrolyte leakage and leaf H₂O₂ in maize plants. The combined stress of drought and P deficiency decreased further related plant traits. Humic acid and leonardite enhanced leaf P and yield in maize plants under PS. A significant increase in related parameters was observed with humic acid and leonardite under WS. The largest increase in yield and plant traits in relation to humic acid and leonardite application was observed under combined

stress situation. The use of sulfur-enriched amendments can be used effectively to maintain yield of maize crop in water limited calcareous soils.

Schobert, Harold. 2017. Introduction to Low-Rank Coals: Types, Resources, and Current Utilization. *Low-Rank Coals for Power Generation, Fuel and Chemical Production*, 3–21. Woodhead Publishing.

Soil conditioners and fertilizers are produced in Australia from brown coal. Performance of lignites in this application can be enhanced by oxidation, e.g., with nitric acid. Leonardite, a naturally occurring oxidatively weathered form of lignite, and humalite, an analogous material from subbituminous coals, are also used as soil additives. These materials can be used in reclamation and reconstruction of soils in agricultural areas. Lignites, sometimes modified by various chemical treatments, are used in well drilling fluids (drilling mud) in the oil industry.

Saengwilai, Patompong, Weeradej Meeinkuir, Theerawut Phusantisampan, and John Pichtel. 2020. Immobilization of Cadmium in Contaminated Soil Using Organic Amendments and Its Effects on Rice Growth Performance. *Exposure and Health* 12 (2): 295–306.

Cadmium (Cd) contamination of rice is a serious public health concern in certain parts of the world. Amendment application based on local organic materials (e.g., manures, compost) is considered effective for reducing plant-available Cd in soil. In this study, two Thai rice (*Oryza sativa* L.) varieties, Chorati and Mali Daeng, were grown in Cd-contaminated soil amended with cow manure, pig manure, organic fertilizer, and leonardite in a mesocosm system. Organic amendment treatments reduced Cd availability in soil. Specific effects of amendments were a function of amendment type and rice variety. Cow manure and leonardite substantially increased growth of the Mali Daeng variety in Cd-contaminated soils; however, there was no significant effect on total biomass of Chorati. Leonardite significantly enhanced grain production of Chorati (12.2 g plant⁻¹) and reduced Cd content in rice grain to 0.14 mg kg⁻¹ which is considered safe for consumption. Leonardite increased CEC in contaminated soil which helped reduce Cd bioavailability to plants. Both rice varieties had 'excluder potential,' as they accumulated Cd primarily in roots with translocation factor (TF) values < 1. Root anatomical analysis revealed that leonardite and pig manure treatments increased metaxylem vessel area, which could result in the enhancement of TF in the Chorati variety. However, any increase in TF was not associated with Cd content in rice grains. Our findings indicate that organic amendments immobilized Cd in soil and enhanced rice growth and production while reducing Cd content in rice grain. We emphasize here that the selection of cultivars and amendments plays a key role in the success of low-Cd rice production.

Akinremi, O. O., H. H. Janzen, R. L. Lemke, and F. J. Larney. 2000. Response of Canola, Wheat and Green Beans to Leonardite Additions. *Canadian Journal of Soil Science* 80 (3): 437–43.

Leonardite, an oxidized form of lignite obtained from coal mines, is readily available and high in humic acids (HA). It has potential as a soil amendment and may have positive effects on crop growth and yield. This greenhouse experiment evaluated the agronomic effect of leonardite on three crops: canola (*Brassica napus*), wheat (*Triticum aestivum*) and green beans (*Phaseolus vulgare*). The factorial design combined five rates of leonardite with five fertility treatments. The fertility treatments had a significant effect on the dry matter yield (DMY) of canola, wheat and green beans. There were also significant effects of fertility on the concentration and uptake of N, P and K by the three crops and S by canola. The application of leonardite had no significant effect on the DMY of wheat and green beans but that of

canola was significantly increased. Application of 10 g of leonardite to 3 kg of soil caused a 27% increase in the DMY of canola when S was excluded from added nutrients, while 1 g of leonardite resulted in a 15% increase in yield when all nutrients were applied. In addition, uptake of S, N, P and K by canola were significantly affected by the application of leonardite. The yield response of canola was apparently due to the supply of S by leonardite with an increasing rate of leonardite supplying increasing amounts of S. This result was confirmed in a second experiment where high quantities of leonardite were applied. We concluded that leonardite increased the yield of canola by supplying S directly and by possibly facilitating the uptake of other nutrients. The lack of response of wheat and green beans to leonardite was attributed to their lack of response to S. The experiment showed beneficial effects of leonardite on canola, though high rates may be needed to exploit this benefit in field situations. Key words: Leonardite, humic acid, green house, canola, fertility

Sarıyıldız, Temel. 2020. Effects of Leonardite and Mineral Fertilizer Applications on Plant Growth and Soil Quality of Garlic (*Allium Sativum* L.). *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 8 (8): 1763–72.

Turkey is one of the major garlic producing country in the world and the significant amount of Turkey's production has been made using a garlic variety called Taşköprü garlic (*Allium sativum* L.) in Kastamonu, Turkey. In order to improve the quality of garlic production, a field experiment was conducted to evaluate the effects of different doses of leonardite organic fertilizer, mineral fertilizer NPK and the mixture of both the leonardite and NPK fertilizers on the soil properties and mean performances of different characters and yield production of Taşköprü garlic. The treatments were: the plots without leonardite and NPK fertilizers (Control), (2) 80 N kg ha⁻¹ + 40 kg ha⁻¹ P₂O₅ + 100 kg ha⁻¹ K₂O (MF), (3) 2.6 ton ha⁻¹ leonardite (Leo1), (4) 6.9 ton ha⁻¹ leonardite (Leo2), (5) 9.7 ton ha⁻¹ leonardite (Leo3), (6) Leo1 + MF, (7) Leo2 + MF and Leo3 + MF. Most soil characteristics and the different characters and yield production of Taşköprü garlic statistically varied between the different fertilizer treatments. The plots with the Leo3MF application showed the highest soil organic C, N, P and K concentrations, and the SOCstock and TNstock, while it had the highest bulb weight, length, equatorial diameter, weight of cloves, width of cloves, length of cloves as well as bulb yield per decare. Of the soil properties, the garlic yield was strongly positively correlated with the soil N concentration, indicating that the applications of leonardite with the different doses or the mixture of leonardite with the mineral fertilizer were resulting in higher soil N concentration and thus having the greatest effect on the garlic yields.

3.2 Biostimulation au niveau de la plantes (incluant le mode d'action)

"biostimulant des végétaux", un produit qui stimule les processus de nutrition des végétaux indépendamment des éléments nutritifs qu'il contient, dans le seul but d'améliorer une ou plusieurs des caractéristiques suivantes des végétaux ou de leur rhizosphère:

Les critères de biostimulation des sont :

- a) l'efficacité d'utilisation des éléments nutritifs;
- b) la tolérance au stress abiotique;
- c) les caractéristiques qualitatives; (*générique*)
- d) la disponibilité des éléments nutritifs confinés dans le sol ou la rhizosphère.

Substance	Effet potentiel biostimulant	Références
Lignite	Efficacité d'utilisation des éléments nutritifs	Boldt-Burisch, 2022
Acide humique	Générique	Conselvan, 2021
Acide fulvique	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disponibilité des éléments nutritifs confinés dans le sol ou la rhizosphère 2. Tolérance au stress abiotique 3. Générique 	Canellas, 2015 Kamran, 2023 Elrys, 2020 Ali, 2022

Boldt-Burisch Katja, Steffi Schillem, Bernd Uwe Schneider Reinhard F. Hüttl 2022. The effect of nitrogen-modified lignite granules on mycorrhization and root and shoot growth of *Secale cereale* (winter rye) in a nutrient-deficient, sandy soil. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 68 (8): pp. 1117-1130. <https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1869724>

Significantly highest mycorrhizal colonization intensity was found for AMF+NH. The co-application of AMF+NH revealed that shoot and root development and shoot nutrient concentrations were significantly higher or were among the significantly highest values, when compared to the other treatments. AMF+NH may be a suitable soil amendment for nutrient-limited soils and may be more sustainable than Nmin due to a combined increase of nitrogen, AMF and carbon/humic acids in the soil that comes with the NH.

Conselvan Giovanni Battista, Diego Pizzeghello, Ornella Francioso, Michele Di Foggia, Serenella Nardi, Paolo Carletti. 2017. Biostimulant activity of humic substances extracted from leonardites. *Plant Soil*, 420 (1): 119–134. DOI 10.1007/s11104-017-3373-z

Background and aims

Biostimulants are natural compounds that enhance plant growth and plant nutrient use efficiency. In this study, biostimulant effects of humic substances (HS) extracted from leonardites were analysed on the metabolism of maize plants grown in hydroponic conditions.

Results

HS from leonardites had similar spectroscopic pattern, with small differences. The HS from the South Dakota lignite (HS_USA) had more carboxylic groups, whereas the three from Turkish mines had more aromatic and aliphatic structures. HS_USA best enhanced total root growth, root surface area, and proliferation of secondary roots. Plant nutrient use efficiency was enhanced by HS_4, HS_USA and HS_B, with increment of GS and GOGAT enzymes activity and total protein production. HS stimulated also PAL enzyme activity, followed by a higher production of total soluble phenols, p-hydroxybenzoic acid, p-coumarilic acid, and chlorogenic acid.

Conclusion

This study found that, although the activity of the HS depended on the origin of the leonardite, these compounds can be attributed to the biostimulant products, eliciting plant growth, nitrogen metabolism, and accumulation of phenolic substances.

Canellas Luciano P., Fábio L. Olivares, Natália O. Aguiar, Davey L. Jones, Antonio Nebbioso, Pierluigi Mazzei, Alessandro Piccolo 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196: pp. 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>

Finally, we summarize and critically evaluate experimental data related to the overall effect of humic substances applied to horticultural crops. Current evidence suggests that the biostimulant effects of humic substances are characterized by both structural and physiological changes in roots and shoots related to nutrient uptake, assimilation and distribution (nutrient use efficiency traits). In addition, they can induce shifts in plant primary and secondary metabolism related to abiotic stress tolerance which collectively modulate plant growth as well as promoting fitness. In conclusion, the exogenous application of humic substances within agronomic systems can be used to aid the development of sustainable intensification. As most humic substances used in agriculture are currently derived from non-renewable resources like coal and peat, the promotion of this technology also requires the development of new sustainable sources of humic products (e.g. organic wastes).

Kamran Atif, Muhammad Mushtaq, Muhammad Arif, Saima Rashid 2023. Role of biostimulants (ascorbic acid and fulvic acid) to synergize Rhizobium activity in pea (*Pisum sativum* L. var. Meteor). *Plant Physiology and Biochemistry*, 196: pp. 668-682. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.02.018>

Abstract

Biostimulants such as ascorbic acid (AA) and fulvic acid (FA) can enhance the efficiency of root-nodulating bacteria. This study investigates optimum concentration of these two biostimulants to maximize the Rhizobium activity and increase root size, nodulation capability, NPK uptake, yield and quality. Interaction with nitrogenase enzyme through molecular docking was also studied by using both AA and FA as ligands to better understand their inhibitory role in excess amounts. The findings of the study suggest: the combined application of both FA and AA at 200 ppm concentrations proved to be more effective than the individual application. Excellent vegetative growth was noticed which translated into an increased reproductive growth i.e. statistically significant increase in number of pods per plant, fresh and dry weight of pods per plant, number of seeds per pod, total chlorophyll, carotenoids and chemical constituents of pea seeds i.e. N (16.17%), P (40.47%), K (39.96%) and protein (16.25%). These findings were substantiated by molecular docking of nitrogenase enzyme with ascorbic acid and fulvic acid. The XP docking score of ascorbic acid (-7.07 kcal mol⁻¹) and fulvic acid (-6.908 kcal mol⁻¹) exhibited that the optimum doses (200 ppm) should be used as higher dose or their excess amount can hinder the Rhizobium activity of nitrogen fixation by interacting with the nitrogenase enzyme.

Elrys Ahmed S., Ahmed I.E. Abdo, Enas M.W. Abdel-Hamed, El-Sayed M. Desoky 2020. Integrative application of licorice root extract or lipoic acid with fulvic acid improves wheat production and defenses under salt stress conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190: pp. 110144. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110144>

Abstract

Although different plant extracts and plant growth regulators are used as biostimulants to support plants grown under salt stress conditions, little information is available regarding the use of licorice root extract

(LRE) or lipoic acid (LA) as biostimulants. Studies on the application of LRE or LA in combination with fulvic acid (FA) as natural biostimulants have not been performed. Therefore, in this study, two pot experiments were conducted to evaluate the potential effects of LRE (5 g L⁻¹) or LA (0.1 mM) supplemented as a foliar spray in combination with FA (0.2 mg kg⁻¹ soil) on osmoprotectants and antioxidants, growth characteristics, photosynthetic pigments, nutrient uptake, and yield as well as on the anatomical features of the stems and leaves of wheat plants irrigated with three levels of saline water (0.70, 7.8, and 14.6 dSm⁻¹).

Salinity stress altered ($p \leq 0.05$) wheat stem and leaf structures; however, treatment with LRE + FA significantly improved these negative effects. These findings indicate that FA + LRE treatment significantly improved the antioxidant defense system of the plants, thereby reducing ROS levels and increasing wheat growth and production under saline conditions.

Ali, E.F.; Al-Yasi, H.M.; Issa, A.A.; Hessini, K.; Hassan, F.A.S. 2022. Ginger Extract and Fulvic Acid Foliar Applications as Novel Practical Approaches to Improve the Growth and Productivity of Damask Rose. *Plants*, 11 (): pp. 412. <https://doi.org/10.3390/plants11030412>

Abstract

Plant biostimulants (BIOs) have been identified as among the best agricultural practices over the past few decades. Ginger extract (GE) and fulvic acid (FA) are a new family of multifunctional BIOs that positively affect development processes in plants. However, the underlying mechanisms that influence these development processes are still unknown. The objective of this study was to determine how GE and FA affect the plant growth and productivity in damask rose. Furthermore, the mechanisms of these BIOs that regulate the performance of this plant were investigated. Damask rose plants were foliar-sprayed with GE (5, 10 and 15 mg L⁻¹) or FA (1, 3 and 5 g L⁻¹), while control plants were sprayed with tap water. The results showed that GE or FA foliar applications enhanced plant height and branch number much more than the control; however, FA treatment was more effective than GE. Intriguingly, flower number, flower yield, relative water content, and total chlorophyll content were all improved by either GE or FA, paying attention to reducing the blind shoot number per plant. Relative to the control, foliar application with 15 mg L⁻¹ GE or 3 mg L⁻¹ FA increased the flower number by 16.11% and 19.83% and the flower yield per hectare by 40.53% and 52.75%, respectively. Substantial enhancements in volatile oil content and oil yield were observed due to GE and FA treatments, especially with the highest concentrations of both BIOs. The treatments of GE and FA considerably improved the total soluble sugars, total phenolic content, total anthocyanin content, and total carotenoid content, more so with FA. Additionally, the contents of N, P, K, Mg, Fe, and Zn elements were also enhanced by applying either GE or FA, especially at higher levels of both BIOs. In sum, our findings illuminate the potential functions of exogenous application of GE and FA in improving the growth, flower yield, and volatile oil yield in damask rose through enhancing the phytochemical and nutrient profiles. Applications of GE and FA can, thus, be a promising approach for enhancing the productivity of damask rose

3.3 Utilité dans le cadre de la biostimulation végétale

3.4 Sommaire des intentions d'usages

3.4.1. Tableau d'usages

Crop and/or situation (a)	Example product name as available on the market	F G or I (b)	Biostimulant effect claimed (c)	Formulation		Application				Application rate			PHI (days) (m)	Remarks	
				Type (d-f)	Conc of a.i. g/L (i)	Method kind (f-h)	Growth Stage & season (j)	No. of application min/max (k)	Interval between applications (min)	g de substance a.l./hl (g/ha)	Eau l/ha dans la solution min max	Dose d'emploi kg de substance/ha min max (kg/ha) (l)			
Cultures maraichères, grandes cultures, arboriculture, vigne	Leonardite	F, G	Assimilation des nutriments, résistance aux stress hydriques	Liquide	10g/L	Pulvérisation du sol	Avant semis/plantation	1			1000 g/ha	150 à 450 L/ha	1,5 à 4,5 kg/ha	Non pertinent	
Cultures maraichères, grandes cultures, arboriculture, vigne	Leonardite	F, G	Assimilation des nutriments, résistance aux stress hydriques	Solide	1kg/kg	Incorporation dans le sol	Avant semis/plantation	1			1 à 3 g/kg de sol	0	1,5 à 4,5 kg/ha	Non pertinent	La dose dépend du type de sol.


* e.g.

<p>* For uses where the column „Remarks. As above or other conditions to take into account</p> <p>(a) For crops, the EU and Codex classification (both) should be taken into account ; where relevant, the use situation should be described (e.g. fumigation of a structure)</p> <p>(b) Outdoor or field use (F), greenhouse application (G) or indoor application (I)</p> <p>(c) e.g. bioavailability, absorption, valuation of nutrients, tolerance to abiotic stress, crop and products quality</p>	<p>(l) g/kg or g/L. Normally the rate should be given for the substance (according to ISO)</p> <p>(j) Growth stage at last treatment (BBCH Monograph, Growth Stages of Plants, 1997, Blackwell, ISBN 3-8263-3152-4), including where relevant, information on season at time of application</p> <p>(k) Indicate the minimum and maximum number of application possible under practical conditions of use</p>
---	--

<p>(d) e.g. wettable powder (WP), emulsifiable concentrate (EC), granule (GR) etc..</p> <p>(e) GCPF Codes – GIFAP Technical Monograph N° 2, 1989</p> <p>(f) All abbreviations used must be explained</p> <p>(g) Method, e.g. high volume spraying, low volume spraying, spreading, dusting, drench</p> <p>(h) Kind, e.g. overall, broadcast, aerial spraying, row, individual plant, between the plant – type of equipment used must be indicated</p>	<p>(l) The values should be given in g or kg whatever gives the more manageable number (e.g. 200 kg/ha instead of 200 000 g/ha or 12.5 g/ha instead of 0.0125 kg/ha)</p> <p>(m) PHI - minimum pre-harvest interval</p>
---	--

4. Classification et étiquetage de la substance

La substance n'est pas classifiée par l'ECHA, elle n'est de plus sujette à aucune labellisation.

EC / List no.  EC: European Community number/ List no.: List number assigned by ECHA.	Name	CAS Number
940-742-0	Humic acids and fulvic acids extracted from leonardite, reaction product with formaldehyde, potassium hydrogen sulfite, sodium hydrogen sulfite and potassium hydroxide	

Classification		Labelling		Specific Concentration limits, M-Factors	Notes	Classification affected by Impurities / Additives.	Additional Notified Information	Number of Notifiers	Joint Entries
Hazard Class and Category Code (s)	Hazard State Code(s)	Hazard State Code(s)	Supplementary Hazard Statement Code(s)						
Not classified								1	

Concernant le test de biodégradation, les résultats suivants ont été trouvés :

The following values were attained in the current study: All the validity criteria were fulfilled.

1. Oxygen depletion in the inoculum blank reached 0.27 mg.L⁻¹ on 28th day of the test.
2. The lowest concentration of dissolved oxygen in bottles was 5.92 mg.L⁻¹.
3. The difference of two determinations of test substance degradation at the end of test was 0.8 %.
4. The percentage degradation of the reference substance has reached the level for the ready biodegradability (min.60%) by the 3rd day of the test.
5. In the toxicity test, after 14 days of incubation the degradation of test and reference substance was 33 %. Therefore the test substance is not inhibiting for the used inoculum.

Concernant le test de toxicité aquatique, les résultats suivants ont été trouvés :

The test substance was tested for acute toxicity on fish *Poecilia reticulata*.

The test was performed according to EU Method C.1., Acute toxicity for fish, Directive 92/69/EEC.

Published in O.J. L 383A, 1992.

The water solubility of the test substance is 279 mg·L⁻¹ (see Study No. 26/07/46: Humic acids, potassium salts - Water solubility).

The preliminary test was performed in range of test substance nominal concentrations 1 – 100 mg·L⁻¹.

The analytical results showed, that the composition of the dilution water has influence on the solubility of the test substance and the part of the test substance is precipitated at preparation of the stock solution. For this reason concentrations measured at the beginning of the test are lower than nominal concentrations. Based on no toxicity of the test substance found in preliminary test, the limit test was performed.

The limit test was performed in range of test substance nominal concentrations 61 – 150 mg·L⁻¹. The test was performed as static.

With regards to analytical results obtained by preliminary test, the analytical determination of the test substance concentrations was performed in each test concentrations at the beginning and at the end of the test.

For all evaluations and results were used the concentrations measured at the beginning of the test.

Test results:

24h	LC50->	128 mg·L ⁻¹ (determined concentration)
48h	LC50 >	128 mg·L ⁻¹ (determined concentration)
72h	- LC50 >	128 mg·L ⁻¹ (determined concentration)
96h	- LC50 >	128 mg·L ⁻¹ (determined concentration)
24h	NOEC =	128 mg·L ⁻¹ (determined concentration)
48h	NOEC =	128 mg·L ⁻¹ (determined concentration)
72h	NOEC =	128 mg·L ⁻¹ (determined concentration)
96h	NOEC =	128 mg·L ⁻¹ (determined concentration)
24h	LC100 >	128 mg·L ⁻¹ (determined concentration)
48h	LC100 >	128 mg·L ⁻¹ (determined concentration)
72h	LC100 >	128 mg·L ⁻¹ (determined concentration)
96h	LC100 >	128 mg·L ⁻¹ (determined concentration)

Humic acids and fulvic acids extracted from leonardite, reaction product with formaldehyde, potassium hydrogen sulfite, sodium hydrogen sulfite and potassium hydroxide, Classifications – Inventaire CL. ECHA. Accessed 13 April 2021. <https://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/241308>.

Les résultats trouvés montrent qu'il n'y a pas de toxicité pour des exposition de 24 à 96h de *Poecilia reticulata* à une dose de 128mg/L. Cette valeur est inférieure à la valeur préconisée dans le cadre d'un traitement à base de solution solubilisée, toutefois le risque est atténué à la fois par le fait que le transfert de la substance du champ au milieu aquatique n'est pas de 100%, puis par le fait que la substance se dilue dans le milieu et sa concentration baisse rapidement. Toutefois une interdiction de traitement aux abords de points d'eau peut être envisagée, la distance pertinente est renseignée au paragraphe 7.

Composés actifs estimés :

4.1.1.1 Lignite

Pas de classification

4.1.1.2 Acide fulvique

Pas de classification pour l'acide fulvique en particulier, voir §4 pour l'acide fulvique extrait de la leonardite.

4.1.1.3 Acide humique

Classification		Labelling			Specific Concentration limits, M-Factors	Notes	Classification affected by Impurities / Additives.	Additional Notified Information	Number of Notifiers	Joint Entries
Hazard Class and Category Code(s)	Hazard State Code(s)	Hazard State Code(s)	Supplementary Hazard Statement Code(s)	Pictograms, Signal Word Code(s)						
Skin Irrit. 2	H315	H315		GHS07					60	
Eye Irrit. 2	H319	H319		Wng						
STOT SE 3	H335 (other: respira to...)	H335								
Skin Irrit. 2	H315	H315		GHS07					38	

Eye Irrit. 2	H319	H319		Wng						
STOT SE 3	H335	H335								
Not Classified									11	
		H315		GHS07				State/Form	1	
		H319		Wng						

Classification pour l'acide humique seul, à noter que cela est différent de celui extrait de la leonardite selon les procédés cités au §4.

Humic acids, Classifications – Inventaire CL. ECHA. Accessed 14 April 2021.
<https://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/57717>.

5. Impacte sur la santé humaine et animale

5.1 Toxicité

La léonardite étant majoritairement composée de substances humiques, les études présentées dans cette partie concernent principalement les substances humiques, celles-ci constituant entre 50 et 90% de la léonardite en fonction de sa provenance.

Un avis concernant un produit contenant de la léonardite a déjà été émis par l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation.

Anses– dossier n° 2010-9011 – HUMIFIRST, 28 janvier 2011, AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'extension d'usage de l'homologation du produit HUMIFIRST de la société TRADECORP SA

Aucune des matières premières entrant dans la composition du produit HUMIFIRST ne présente de danger physico-chimique. Cependant la léonardite est susceptible de complexer divers contaminants cationiques (ETM 2 , HAP3 , PCB4 , radionucléides), notamment d'origine atmosphérique. La provenance de cette matière première pour laquelle le pétitionnaire a également fait référence à des garanties spéciales, doit être connue et nécessite la présentation des attestations de fourniture et d'approvisionnement exclusifs.

D'autres études viennent supporter cet avis. L'étude toxicologique comprenant des tests in vitro et in vivo montrent une absence de toxicité des substances humiques, chez le rat à des doses ingérées de 2000mg/kg/jour pendant 90j. Ces doses sont importantes lorsque comparées au risque d'exposition lié aux conditions d'emploi de la substance.

Murbach, Timothy S., Róbert Glávits, John R. Endres, Amy E. Clewell, Gábor Hirka, Adél Vértési, Erzsébet Béres, and Ilona Pasics Szakonyiné. 2020. A Toxicological Evaluation of a Fulvic and Humic Acids Preparation. *Toxicology Reports* 7 : 1242–54.

Abstract: Humic substances are ubiquitous in soils and waters. These complex superstructures are derived from the decomposition of dead plant and animal matter and are vital to soil health. Their heterogenous composition is specific to their site of origin and is comprised of weakly bound aggregates of small organic compounds that can sequester minerals and make them available to plants. As such, they may possess potential nutritional value for humans, and extractions of fulvic and humic acids can be produced that could be suitable for such purposes. For this reason, we evaluated the toxicological profile of a specific preparation (blk. 333) of fulvic and humic acids derived from a lignite deposit in Alberta, Canada and found it to lack genotoxic potential in a bacterial reverse mutation test, in vitro mammalian chromosomal aberration test, and in vivo mammalian micronucleus test. No general or organ toxicity was observed in Wistar rats following 90 days of continuous exposure, and a no observed adverse effect level (NOEAL) was determined at 2000 mg/kg bw/day, the highest tested dose. Our results suggest the feasibility of further evaluation for development of the preparation as a nutritional supplement in food.

Conclusion: For the reasons stated above, we determined that the test item (blk. 333 fulvic and humic acids preparation derived from a lignite deposit in Alberta, Canada) was not mutagenic or clastogenic

under the applied test conditions, and the NOAEL in male and female Han:WIST rats was 2000 mg/kg bw/day, the highest dose tested, following 90 days of continuous exposure by gavage.

5.1.1. Toxicocinétique et métabolisation chez l'Homme

5.1.2. Toxicité aiguë

L'agence européenne du médicament a publié un rapport concernant les acides humiques, la toxicité aiguë des acides humique par administration orale est définie comme faible avec comme espèce modèle le rat.

**The European Agency for the Evaluation of Medicinal products, EMEA/MRL/554/99-FINAL
February 1999, COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS, HUMIC ACIDS AND
THEIR SODIUM SALTS, SUMMARY REPORT**

Humic acids are of low toxicity after oral administration. The LD₅₀ in rats is greater than 11 500 mg/kg bw.

5.1.3. Toxicité à court-terme

Dans ce même rapport, une étude de toxicité à court terme, sur des rats, montre que les acides humiques à concentration variant de 100 à 1000 mg/kg bw/day n'a pas d'impact sur le comportement et ne provoque aucune perturbation clinique.

**The European Agency for the Evaluation of Medicinal products, EMEA/MRL/554/99-FINAL
February 1999, COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS, HUMIC ACIDS AND
THEIR SODIUM SALTS, SUMMARY REPORT**

In a 30-days toxicity study in rats oral doses levels of 100 to 1000 mg/kg bw/day of concentrated humic acid or of its sodium salt had no effects on the behaviour and induced no clinical disturbances.

5.1.4. Toxicité chronique

Le rapport de l'agence européenne des médicaments spécifie que les acides humiques n'ont aucun effet sur les chiens lorsqu'ils se voient administrés 300mg/kg pendant 90 jours. De même, la substance ne modifie pas le pH du tube digestif de rats ou de lapins.

**The European Agency for the Evaluation of Medicinal products, EMEA/MRL/554/99-FINAL
February 1999, COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS, HUMIC ACIDS AND
THEIR SODIUM SALTS, SUMMARY REPORT**

In a 30-days toxicity study in rats oral doses levels of 100 to 1000 mg/kg bw/day of concentrated humic acid or of its sodium salt had no effects on the behaviour and induced no clinical disturbances. The same results were obtained in dogs which received daily doses of 300 mg/kg bw for 90 days. Humocarb or concentrated humic acids administered with feed for 90 days at the dose of 1000 mg/kg bw/day had no effects on the pH in the gastrointestinal tract of rats and rabbits.

5.1.5. Genotoxicité

Cette étude de la toxicité de l'ingestion de 100mg/kg après dissolution dans l'eau à la concentration de 4g/l suggère que les acides humiques ont une activité mutagène sur les cellules intestinales au lieu d'absorption de la substance. L'étude rappelle toutefois qu'il n'a pas été démontré d'activité génotoxique de la substance in vitro ou in vivo.

Bernacchi, Francesca, Isabella Ponzanelli, Maria Minunni, Anita Falezza, Nicola Loprieno, and Roberto Barale. 1996. In Vivo Cytogenetic Effects of Natural Humic Acid. *Mutagenesis* 11 (5): 467–69.

Abstract: As humic compounds are naturally widespread in the environment and present in surface water, studies on their genotoxicity are justified. Humic acid (HA) has not been demonstrated to be genotoxic either in vitro or in vivo. In the present paper we investigated its activity both in intestinal and bone marrow cells following a single dose (100 mg/kg b.w. corresponding to 0.5 ml per animal of an aqueous solution of 4 g/l) of HA administered to mice by gastric intubation, to mimic the most likely route of human exposure. HA induced structural and, in particular, numerical chromosome abnormalities in intestinal cells. A marginal, non-significant induction of aneuploidy was also found in bone marrow cells. **Conclusion:** These data strongly suggest that HA could exert mutagenic activity at the site of absorption. The different sensitivity observed in bone marrow and small intestine underlines the need to use an intestinal cytogenetic test to investigate the possible effects directly induced by chemicals at the site of administration. However, to obtain sufficiently well spread metaphases from intestinal epithelium as compared with bone marrow involves laborious procedures and requires highly skilled technicians. Consequently this methodology is particularly suitable for implementation of mutagenicity data in cases considered relevant for health risk evaluation.

Toutefois, d'autres études montrent que les acides humiques n'ont pas d'activité mutagène. L'étude toxicologique comprenant des tests in vitro et in vivo montrent une absence d'activité mutagène chez le rat, des substances humiques à des doses ingérées de 2000mg/kg/jour pendant 90j. Ces doses sont importantes lorsque comparées au risque d'exposition lié aux conditions d'emploi de la substance.

Murbach, Timothy S., Róbert Glávits, John R. Endres, Amy E. Clewell, Gábor Hirka, Adél Vértési, Erzsébet Béres, and Ilona Pasics Szakonyiné. 2020. A Toxicological Evaluation of a Fulvic and Humic Acids Preparation. *Toxicology Reports* 7 : 1242–54.

Humic substances are ubiquitous in soils and waters. These complex superstructures are derived from the decomposition of dead plant and animal matter and are vital to soil health. Their heterogenous composition is specific to their site of origin and is comprised of weakly bound aggregates of small organic compounds that can sequester minerals and make them available to plants. As such, they may possess potential nutritional value for humans, and extractions of fulvic and humic acids can be produced that could be suitable for such purposes. For this reason, we evaluated the toxicological profile of a specific preparation (blk. 333) of fulvic and humic acids derived from a lignite deposit in Alberta, Canada and found it to lack genotoxic potential in a bacterial reverse mutation test, in vitro mammalian chromosomal aberration test, and in vivo mammalian micronucleus test. No general or organ toxicity was observed in Wistar rats following 90 days of continuous exposure, and a no observed adverse effect

level (NOEL) was determined at 2000 mg/kg bw/day, the highest tested dose. Our results suggest the feasibility of further evaluation for development of the preparation as a nutritional supplement in food. Conclusion: For the reasons stated above, we determined that the test item (blk. 333 fulvic and humic acids preparation derived from a lignite deposit in Alberta, Canada) was not mutagenic or clastogenic under the applied test conditions, and the NOAEL in male and female Han:WIST rats was 2000 mg/kg bw/day, the highest dose tested, following 90 days of continuous exposure by gavage.

Cette étude de l'activité antimutagène de différents extraits de leonardites traités sur *Saccharomyces cerevisiae* suggère que les acides humiques une activité antimutagène différente selon le traitement subi, le degré d'oxygénation de la substance semble le facteur influençant l'activité antimutagène des acides humiques.

Marova, I., J. Kucerik, K. Duronova, A. Mikulcova, and Z. Vlckova. 2011. Antimutagenic and/or Genotoxic Effects of Processed Humic Acids as Tested upon *S. Cerevisiae* D7. *Environmental Chemistry Letters* 9 (2): 229–33.

Abstract: Humic acids (HAs) are formed during decomposition of organic matter. Their adsorption, dispersion or emulsification properties attract the interest of medical science and pharmacy. The aim of this work was to study antimutagenic effects of processed HA. Yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* D7 was first used for HA antimutagenicity testing. The highest antimutagenic activity was found in potassium and sodium humates. Humates isolated from lignite pre-treated by HNO₃ exhibited slightly lower antimutagenic activity; this effect is caused probably by their higher oxidation degree. Sodium humate processed at 250°C exhibited genotoxic effect, which is probably connected with accelerated formation of reactive oxygen species such as superoxide anion by HA at higher temperature. Conclusion: The highest antimutagenic activity was observed when using simple sodium and potassium humates; regeneration by 20% nitric acid led to slight decrease of antimutagenic effect. Except for sodium humate processed at 250°C all samples exhibited better antimutagenic effect at higher concentrations.

Cette étude menée sur des cultures de cellules lymphoblastoïde humaines traitées à la mitomycine C et exposées à des concentrations de 2,5 et 10 g/ml d'acides humiques suggèrent une activité antimutagène de ces acides, dépendant principalement de la concentration ainsi que des propriétés structurales.

Ferrara, G., E. Loffredo, N. Senesi, and R. Marcos. 2006. Humic Acids Reduce the Genotoxicity of Mitomycin C in the Human Lymphoblastoid Cell Line TK6. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 603 (1): 27–32.

Abstract: The antimutagenic/desmutagenic activity of a leonardite humic acid (LHA) and a soil humic acid (SHA) was studied in the cultured human lymphoblastoid cell line TK6 treated with mitomycin C (MMC) as reference mutagen by evaluating the induction of micronuclei (MN). Two different concentrations of HA were used, 2.5 and 10 g/ml, in three different treatments: (1) HA alone (genotoxic test); (2) HA after 2-h pre-incubation with 0.3 M of MMC (desmutagenic test) and (3) combinations of HA and MMC at 0.3 M without pre-incubation (antimutagenic test). Neither of the HA used alone did produce genotoxic effects, but both HAs reduced significantly the frequencies of MN induced by MMC, especially in the desmutagenic test. A slight cellprotective effect against the cytotoxicity of MMC was also exhibited by the two HAs in the desmutagenic test. The LHA showed a desmutagenic/antimutagenic

activity that was more pronounced than that of SHA, which is possibly related to the higher carboxylic group content and lower phenolic group content of LHA. These results confirm the antigenotoxic action exerted by HAs in human cells, similarly to what has been previously observed in various plant species. Conclusion: In agreement with previous findings obtained using plants, results obtained in this work confirm that HAs do not exhibit mutagenic and cytotoxic effects in human lymphoblastoid TK6 cells. Further, the HAs examined exhibit a significant desmutagenic activity and a limited antimutagenic activity towards the mutagen MMC. The antigenotoxic efficiency exerted by HAs appears to depend partially on the concentration and especially on some chemical and structural properties of HAs. As a whole, these results appear to provide some novel useful information in the field of mutation research in human cell systems.

Les acides humiques sont génotoxiques et des provoquent des stress oxydatifs au niveau de l'ADN. L'étude menée ici concerne des lymphocytes sanguin périphériques exposés a des concentration entre 0 et 200µg/mL d'acides humiques pendant 2h. Les acides humiques semblent causer des dégâts oxydatifs.

Hseu, You-Cheng, Ssu-Ching Chen, Ya-Lai Chen, Jing-Yi Chen, Mei-Ling Lee, Fung-Jou Lu, Fang-Yang Wu, Jim-Shoung Lai, and Hsin-Ling Yang. 2008. Humic Acid Induced Genotoxicity in Human Peripheral Blood Lymphocytes Using Comet and Sister Chromatid Exchange Assay. *Journal of Hazardous Materials* 153 (1): 784–91.

Abstract: Humic acid (HA) in well water used by the inhabitants for drinking is one of the possible etiological factors for blackfoot disease (BFD). Moreover, within BFD endemic areas cancers occur at significantly higher rates than in areas free of BFD. In this study, the genotoxic potential of HA is assessed using human peripheral blood lymphocytes. The cells were exposed to HA (0–200 µg/mL for 2 h), and the induction of DNA primary damage in cellular DNA was evaluated by single-cell gel electrophoresis (comet assay). HA-induced DNA damage was decreased by superoxide (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), and reactive oxygen species (ROS) scavengers (superoxide dismutase, catalase, and Trolox), and nitric oxide (NO) synthase inhibitors (NG-nitro-L-arginine methyl ester and NG-methyl-L-arginine). Moreover, formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III), known to catalyze the excision of oxidized bases, increase the amount of DNA migration in HA-treated cells. Pretreatment of the cells with both the Ca²⁺-chelator BAPTA and EGTA completely inhibited HA-induced DNA damage, indicating that HA-induced changes in Ca²⁺-homeostasis are the predominant pathways for the HA induction of genotoxicity. Furthermore, sister chromatid exchange was found in the HA-treated lymphocytes. Our findings suggest that HA can induce oxidative DNA damage and genotoxicity in human lymphocytes.

Conclusion: In conclusion, HA induces oxidative DNA damage via two pathways: O₂⁻, H₂O₂ and -OH; and, NO, O₂⁻ and OONO⁻. DNA damage has also been linked to intracellular Ca²⁺ increases, indicating an obligatory intermediary role for Ca²⁺ [31,24]. Previously, we had demonstrated that HA disrupts intracellular calcium homeostasis and HA enhances the permeability of cell membranes to extracellular Ca²⁺, resulting in sustained elevation of cytosolic Ca²⁺ in endothelial cells. The basal [Ca²⁺] level of the resting cells measured just after Fura-2 (calcium indicator) loading was 70±5 nM and for endothelial cells treated.

Mais des études suggèrent que les acides humiques ont une activité protectrice contre certains désinfectants contenant du chlore. Cette étude sur *Cyprinus carpio* exposé dans le milieu de vie pendant 3 jours à des composés chlorés seuls et à des composés chlorés additionnés d'acides humiques montre

que l'addition d'acides humiques entraîne une réduction de la génotoxicité mesurée à l'aide de la méthode comet et du taux de survie des poissons.

Gustavino, Bianca, Annamaria Buschini, Monica Monfrinotti, Marco Rizzoni, Lorenzo Tancioni, Paola Poli, and Carlo Rossi. 2005. Modulating Effects of Humic Acids on Genotoxicity Induced by Water Disinfectants in *Cyprinus Carpio*. *Mutation Research* 587 (1–2): 103–13.

Abstract: The use of chlorinated disinfectants during drinking-water production has been shown to generate halogenated compounds as a result of interactions of humic acids with chlorine. Such chlorinated by-products have been shown to induce genotoxic effects and consumption of chlorinated drinking-water has been correlated with increased risk for cancer induction in human populations. The aim of this work was to test the potential genotoxic effects on circulating erythrocytes of the fish *Cyprinus carpio* exposed in vivo to well-waters disinfected with sodium hypochlorite (NaClO), chlorine dioxide (ClO₂) or peracetic acid (CH₃COO₂H, PAA), in the absence or presence of standard humic acids (HA). The effects were measured by use of the micronucleus (MN) and the single-cell gel electrophoresis (Comet) assays at different sampling times after a 3-day exposure period. The exposure to chlorine disinfectants without the addition of HA produced a clear toxic effect. Significant cytogenetic damage (i.e. MN induction) was detected in fish populations exposed to both NaClO and ClO₂ with humic acids. In the Comet assay, a significant decrease of DNA migration was observed in erythrocytes of specimens after exposure to NaClO-disinfected water without HA. No effects were observed in any other experimental condition.

Conclusion: Pure chlorinated disinfectants appeared to be highly toxic and their genotoxic potential could not be pointed out within the present experimental schedule. On the other hand, two main effects of humic acids could be observed: (i) a genotoxic effect after their reaction with chlorinated compounds and (ii) a protective effect against the toxicity of the chlorinated compounds, the reduction of which rendered the clastogenic effects detectable. The use of the in vivo Comet assay and MN test, together with evaluation of survival, has enabled us to point out the complexity of the reaction pathways of the different disinfectants, especially chlorine biocides and/or their by-products with organic compounds present in the water.

Enfin, il semblerait que l'activité mutagène soit causée par la réaction des acides humiques avec le chlore. C'est ce que suggèrent les auteurs de cette étude.

Murbach, Timothy S., Róbert Glávits, John R. Endres, Amy E. Clewell, Gábor Hirka, Adél Vértési, Erzsébet Béres, and Ilona Pasics Szakonyiné. 2020. A Toxicological Evaluation of a Fulvic and Humic Acids Preparation. *Toxicology Reports* 7 : 1242–54.

Humic substances are ubiquitous in soils and waters. These complex superstructures are derived from the decomposition of dead plant and animal matter and are vital to soil health. Their heterogeneous composition is specific to their site of origin and is comprised of weakly bound aggregates of small organic compounds that can sequester minerals and make them available to plants. As such, they may possess potential nutritional value for humans, and extractions of fulvic and humic acids can be produced that could be suitable for such purposes. For this reason, we evaluated the toxicological profile of a specific preparation (blk. 333) of fulvic and humic acids derived from a lignite deposit in Alberta, Canada and found it to lack genotoxic potential in a bacterial reverse mutation test, in vitro mammalian chromosomal aberration test, and in vivo mammalian micronucleus test. No general or organ toxicity was observed in Wistar rats following 90 days of continuous exposure, and a no observed adverse effect

level (NOEL) was determined at 2000 mg/kg bw/day, the highest tested dose. Our results suggest the feasibility of further evaluation for development of the preparation as a nutritional supplement in food.

Conclusion: For the reasons stated above, we determined that the test item (blk. 333 fulvic and humic acids preparation derived from a lignite deposit in Alberta, Canada) was not mutagenic or clastogenic under the applied test conditions, and the NOEL in male and female Han:WIST rats was 2000 mg/kg bw/day, the highest dose tested, following 90 days of continuous exposure by gavage.

Citation: Indeed, chlorination, under conditions of decreasing pH and adequate HA and chlorine concentrations, of organic non-volatile substances contained in HA and FA is known to result in formation of compounds (such as mucochloric acid and 2,3,3-trichloropropenal) that are mutagenic in bacterial reverse mutation tests. However, in general, these studies have been negative with respect to humic substances that have not undergone disinfection, which were often included as control substances or investigated for other reasons.

Cette étude menée sur *S.typhimurium* suggère que l'activité mutagène est liée à l'ozonation des acides humiques et à leur complexation avec des éléments minéraux mutagènes. Les capacités mutagènes sont donc liées à la source d'où proviennent les acides humiques et du traitement qu'ils ont subis.

Ueno, Hitoshi, Toshiharu Segawa, Katsuhiko Nakamuro, Yasuyoshi Sayato, and Shoji Okada. 1989. Mutagenicity and Identification of Products Formed by Aqueous Ozonation of Humic Acids of Different Origins. *Chemosphere* 19 (12): 1843–52.

Ozonated soil-humic acid induced direct mutagenicity on *S.typhimurium* TA98, TA100 and TA104, while not the ozonated reagent- and wastewater-humic acids. Oxygen radicals generated from mutagens such as glyoxal and hydrogen peroxide identified as the ozonation products might, in part, contribute to the mutagenicity of ozonated soil-humic acid.

5.1.6. Toxicité reproductive

Cette étude concernant la teratogénicité sur les rats administrés 500mg/kg d'humates suggère que les acides humiques ne sont pas toxiques lorsque administrés durant la gestation.

Van Rensburg, C E; J; Snyman, J R; Mokoete, T; Cromarty, A D, 2007, Brown Coal Derived Humate Inhibits Contact Hypersensitivity; An Efficacy, Toxicity and Teratogenicity Study in Rats, *Inflammation*, Vol. 30, No. 5,

Abstract:Objectives. The effects of two humate products were compared to that of prednisolone on a contact hypersensitivity rat model. Methods. Rats, sensitized with dinitrofluorobenzene (DNFB), were placed on a daily oral treatment of 61 mg/kg BW of humate derived from either leonardite or bituminous coal or on prednisolone at one mg/kg BW and challenged 6 days later with a topical application of DNFB to the right ear. The inflamed ears were measured daily. In a toxicity study rats were exposed to daily oral treatment of leonardite humate at 1,000 mg/kg BW for 1 month. A teratogenicity study was done where pregnant rats were treated with 500 mg/kg BW on days 5 to 17 of pregnancy. Results. Only the leonardite humate compared favourably with prednisolone in suppressing contact hypersensitivity. No signs of toxicity were observed and weight gain was normal during the 6-day and 1 month treatments and during the teratogenicity study with the leonardite humate. However, the rats on the other two products experienced slower weight gain. Conclusion. The identification of a naturally occurring nontoxic

compound with anti-inflammatory activity is exciting and merits further evaluation in the treatment of patients suffering from inflammatory conditions.

Conclusion: The lack of toxicity and teratogenicity documented in this study confirm the summary report on a brown coal derived humate released by The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products in 1999. This study describes a similar chronic toxicity and teratogenicity study done on rats, using the same dosages as in this study. In addition they also reported a LD50 > 11 500 mg/kg BW obtained in an acute toxicity test in rats. In summary: Brown coal derived humate inhibited the cutaneous hypersensitivity reaction in rats similar to a known anti-inflammatory glucocorticosteroid (i.e. prednisolone) but with no signs of systemic toxicity. This warrants further evaluation of brown coal derived humate in humans as anti-inflammatory agent.

5.1.7. Neurotoxicité

La capacité de complexation des acides humiques peut être problématique lorsque les éléments complexés sont toxiques comme cela peut être le cas pour les métaux lourds.

Anses– dossier n° 2010-9011 – HUMIFIRST, 28 janvier 2011, AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'extension d'usage de l'homologation du produit HUMIFIRST de la société TRADECORP SA

Aucune des matières premières entrant dans la composition du produit HUMIFIRST ne présente de danger physico-chimique. Cependant la léonardite est susceptible de complexer divers contaminants cationiques (ETM 2, HAP3, PCB4, radionucléides), notamment d'origine atmosphérique. La provenance de cette matière première pour laquelle le pétitionnaire a également fait référence à des garanties spéciales, doit être connue et nécessite la présentation des attestations de fourniture et d'approvisionnement exclusifs.

Cette étude menée sur la toxicité des complexes cuivre-acides humiques sur *Daphnia magna* à des doses de cuivre entre 50 et 500 µg/l de cuivre et 2,5 à 10 mg/l d'acides humiques suggère que les complexes acides humique-ions Cu^{2+} ne sont pas toxiques.

Linnik P.N., Vasilchuk T.A. 2002 Role of Humic Substances in the Complexation and Detoxification of Heavy Metals: Case Study of the Dnieper Reservoirs, Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice. Edited by Irina V. Perminova, Kirk Hatfield, Norbert Hertkom

Results of long-term investigations of the heavy metal content and speciation in the Dnieper water bodies (Ukraine) are presented. The particular importance was given to the study of dissolved organic matter (DOM) composition, to binding affinity of metals such as Fe, Mn, Cu, Zn, Pb, Cr, and Cd for DOM, and to molecular weight distribution and chemical nature of metal-DOM complexes. The chemiluminescence and anodic stripping voltammetry in combination with membrane filtration, gel permeation chromatography, and ion-exchange chromatography were used for this purpose. It is shown that complexation with natural organic ligands plays the major role in the fate of HM in fresh water systems. The prevailing fraction of dissolved metals is found to present as complexes with humic substances, mainly, with fulvic acids. For the evaluation of the stability of aquatic ecosystems to the toxic action of HM, the potential complexing ability of DOM was investigated. The results on copper toxicity are presented obtained in long-term experiments with distilled and tap waters as well as with the

natural water from the Kanev reservoir containing additives of copper ions and humic acids (HA). The toxic effect of free Cu^{2+} ions is determined using biotests with *Daphnia magna*. It was established that a decrease in integral water toxicity correlated with a reduction in free Cu^{2+} concentration in water medium. Hence, Cu^{2+} ions present in aquatic media in the form of non-toxic complexes with organic ligands. The maximal decrease in toxicity was observed in natural water where the complexation occurred with participation of both DOM and added HA.

Conclusion: The results of our research show that HS are the main component of DOM in the Dnieper reservoirs. The concentration of FA is 20-40 times higher than that of HA. The content of HS decreases from the north to south in these reservoirs. FA in the Dnieper reservoirs are mostly compounds of low molecular weight, up to 1kDa. The contribution 151 of high molecular weight FA to the total amount of DOM increases in spring. The greater part of heavy metals resides as complexes with DOM of both different chemical nature and molecular weight. Humic substances, mostly fulvic acids, preferentially bind HM. The content of metals bound into complexes with DOM reaches 70-100% of the total dissolved forms, depending on the season. HM complexes with relatively low molecular weight (0.5-5 kDa) are the most widespread. They make up 40-85% of all organic complexes. The predominance of these metal complexes is probably due to the complexation with participation of the low molecular weight fulvic acids. The potential complexing ability of DOM is connected with its component composition and the chemical properties of metals. The decrease in CA usually occurs in late spring and early summer, probably because of the specific nature of HS as the most important complexing ligand in this period. The binding of metals with HS occurs slowly. Complexation of HM with DOM is the dominant factor of detoxification resulting in disappearance of free metal ions, which are the most toxic forms. The results of experiments on the impact of HA on the toxicity of Cu (II) in aquatic environments (distilled, tap, and natural water) show that the maximum decrease of toxicity was observed in natural water because the binding of Cu (II) into complexes occurred with participation of both DOM in natural water and added HA.

De plus, les acides humiques semblent avoir une activité, encore une fois de complexation, des prions causant les maladies à prions. Rendant ces prions incapables d'intégrer les cellules animales et donc de contaminer les individus.

Corsaro, Alessandro, Claudio Anselmi, Maurizio Polano, A Aceto, Tullio Florio, and Maria Nobili. 2010. The Interaction of Humic Substances with the Human Prion Protein Fragment 90-231 Affects Its Protease K Resistance and Cell Internalization. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 24 (January): 27–39.

In this paper we analyzed the determinants and the structural effects of the interaction of human prion protein fragment 90-231 (HuPrP) with humic substances, (HS) including humic (HA) and fulvic (FA) acids, natural refractory organic polyanions widely diffused in soils and waters. We show that this interaction is mainly driven by non-specific electrostatic attraction involving regions situated within alpha-helix A and beta-sheet S1 of human PrP. FA binding to HuPrP altered its ability to acquire some PrP^{Sc}-like characteristics induced by the mild thermal denaturation of the peptide (1 h at 53 degrees C). In particular, in the presence of FA, HuPrP shows a reduced amount of beta-sheet content (as demonstrated by the reduced binding of thioflavin T), an increased sensitivity to protease K and an inhibition of the entering in the fibrillogenic pathway. FA/HuPrP interaction caused the aggregation of the peptide in unstructured macrocomplexes, as demonstrated by the altered electrophoretic migration in semi-denaturing detergent-agarose gel assay. Importantly, in the presence of FA the rate of internalization of HuPrP in human neuroblastoma cells was significantly reduced as compared to that of

the beta-structured peptide. Therefore, HS inhibited the acquisition of PrP(Sc)-like structural properties that, in turn, are responsible for HuPrP intracellular accumulation and lead to neuronal death. Important implications of these data are that HuPrP-HS complexes, being unable to be internalized in living cells may represent a molecular mechanism for the reduced transmission of prion transmission from HS-rich soil also in the presence of contamination from infected animals.

5.1.8. Toxicité des métabolites et impuretés

La leonardite est susceptible d'adsorber des impuretés si celles-ci sont chargées positivement, ce qui peut être le cas pour certains métaux lourds, cette étude liste Fe, Ca, K, Mg, Na, Ti and S comme des métaux lourds se complexant avec la leonardite.

Ausavasukhi, Artit, Chonhawan Kamposoen, and Oatchara Kengnok. 2016. Adsorption Characteristics of Congo Red on Carbonized Leonardite. *Journal of Cleaner Production, Special Volume: Green and Sustainable Innovation for Cleaner Production in the Asia-Pacific Region*, 134 : 506–14.

In this study, a low-rank coal (leonardite) was used as adsorbent for the removal of Congo red (CR) aqueous solution, a model compound representing an anionic azo dye. The effects of oxygen-containing groups, particularly carboxylic, lactonic, and phenolic groups, on the adsorption of CR on leonardite after carbonization at various temperatures were studied. It was determined that the surface chemistry change of carbonized leonardite greatly influenced its adsorption characteristics. Solution pH affects not only the surface charge of the adsorbents but also the ionization of the CR dyes. Based on the experimental data, a mechanism of interaction between CR anionic dye and carbonized leonardite was proposed. A comparison of kinetic and isothermal models demonstrated that the CR adsorption process was best described by a pseudo-second-order kinetic model and RedlichePeterson model. Further thermodynamic investigations indicated that the adsorption was an endothermic and spontaneous process.

Conclusion: This study shows that the parent leonardite and leonardite carbonized at 900 C (Leo(900)) are effective adsorbents for the removal of CR dye from aqueous solution. Surface properties of leonardite can be greatly changed by carbonization, which was confirmed through TGA/DTG, FTIR, Boehm titration, and gas adsorption analysis. The change in CR adsorption over the pH range may relate to two possible mechanisms: electrostatic interaction and p-p interaction between adsorbent and CR, depending on the surface chemistry. Acidic solution pH was proved to be more favorable for adsorption of CR on the parent leonardite, whereas Leo(900) can greatly enhance the adsorption ability under a wide pH range.

Citation: The formation of leonardite is a result of the oxidation of lignite. Therefore, depending on the content of humic substances and the conditions of the processes, leonardite with various organic matter, mineralogical and elemental compositions is formed. Leonardite is a highly dispersive aluminosilicate with macrocomponents SiO₂ and Al₂O₃ containing impurities such as Fe, Ca, K, Mg, Na, Ti and S. In previous studies on low-rank coal used as an adsorbent, the moisture and volatile matter of low-rank coal were mostly in the range of 10–80% and 30–50%, respectively.

Une analyse de détection et quantification de contaminants contenus dans la leonardite utilisée pour nourrir de jeunes cochons à été réalisée et a montré que certains métaux lourds peuvent se complexifier

avec les acides humiques, particulièrement Fe, Ca et Al. Les autres métaux lourds contaminants étant présents en dessous des limites de sécurité européennes, ou non détectables.

Dell'Anno, Matteo, Monika Hejna, Stefania Sotira, Valentina Caprarulo, Serena Reggi, Roberto Pilu, Francesco Miragoli, Maria Luisa Callegari, Sara Panseri, and Luciana Rossi. 2020. Evaluation of Leonardite as a Feed Additive on Lipid Metabolism and Growth of Weaned Piglets. *Animal Feed Science and Technology* 266 : 114519.

Abstract: We evaluated the effects of leonardite supplementation, mainly composed of humic acids (HAs), as a functional feed additive in weaned piglets. One hundred and twenty piglets (Large White x Landrace) were weaned at 28±2 days, and randomly divided into two groups (6 pens per group, 10 piglets per pen). After one week of adaptation, for 40 days groups were fed a control diet (CTRL) and an HA enriched diet (0.25% of leonardite; HAG). Body weight (BW), average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG), feed conversion ratio (FCR) were measured throughout the experimental period. On the last day of the trial four piglets per pen were randomly selected and the blood was collected to evaluate the serum metabolic profile and diamine oxidase content. Chemical analyses showed that leonardite was characterized by a high content of ash 23.27% (as-fed basis), polyphenolic content of 35.18±3.91 mg TAEq/g, and an antioxidant capacity of 73.31±8.22 µmol TroloxEq/g. The HAG group showed an increase in BW, ADG and ADFI (P<0.01) compared to the CTRL group during the experimental period. In terms of the serum metabolic profile, the HAG group showed a significant increase in total protein content (P<0.001), albumin (P<0.001), albumin/ globulin ratio (P<0.01), phosphatase alkaline (P<0.01), calcium, phosphorus and magnesium (P<0.05) compared to the CTRL group. A modulation in the serum lipid profile was recorded. The HAG group showed a decrease in total triglycerides (P<0.05) with higher total cholesterol (P<0.05), however only high-density lipoprotein showed a significant increase (P<0.001) compared to the CTRL group. No significant differences in the amount of diamine oxidase were found between groups. In conclusion, leonardite inclusion in the diet at 0.25% was shown to have a positive effect on the serum lipid profile and animal growth. This thus suggests that leonardite can be considered as a new feed additive, which improves the health and performance of weaned piglets.

Conclusion: Dietary supplementation with 0.25% leonardite improved the zootechnical performance, serum lipidic profile and gut epithelium integrity, thus indicating a good general health status. The increased serum HDL and decreased total triglycerides suggest that leonardite is a promising feed additive to improve lipid metabolism. The higher serum Mg content found also suggests that leonardite supports an improved stress response in weaned piglets.

Citation: Leonardite showed a high content of Ca, Fe and Al. The contaminants (As, Pb, Cd) were scarce and below the safety limits (Commission Regulation EU, 1275/, 2013). Moreover, no contaminants (under the detection limits) were revealed in the diet supplemented with 0.25% leonardite.

Des impuretés de silice peuvent aussi être trouvées dans les substances humiques, cette étude a réalisé des analyses infrarouges de différents composés humiques.

Helal, Aly A., G. A. Murad, and A. A. Helal. 2011. Characterization of Different Humic Materials by Various Analytical Techniques. *Arabian Journal of Chemistry* 4 (1): 51–54.

In a previous paper, we studied the characterization of the three humic materials, humic acid, fulvic acid and humin, by simple analytical techniques such as elemental analysis and potentiometric titration. In this work, the same humic fractions were investigated by the developed analytical methods CP/MAS

¹³C NMR, IR and visible spectroscopy's; to evaluate the harmony of the different analytical methods used for characterization of humic materials and to recognize and evaluate the properties of humic acid, fulvic acid and humin separated from the same source. The results of these developed analytical methods were compared with that of simple analytical techniques. It was found that the low cost simple analytical techniques are suitable for description of humic materials, where the results are in fine agreement with each other. The E3/E5 ratio was found to designate a more or less similar indication like E4/E6 ratio.

La présence d'impuretés de silicate est aussi trouvée dans cette étude qui analyse la leonardite à l'aide d'infrarouge.

Simsek, Yunus Emre, and Levent Degirmenci. 2018. Effect of Atmosphere and Temperature Treatment on Leonardite for Increasing Humic Acid Yield. *Journal of the Geological Society of India* 92 (2): 209–14.

Humic acid is a complex molecule including carboxylic, phenolic, alcoholic, and carbonyl fractions in its structure. Addition of this complex structure in soil improves its fertility by increasing its porosity along with water/nutrient capacity. Although naturally exists in soil, humic acid must be added to soil externally in regions with low soil fertility. The present study was conducted to provide insight on improving the efficiency of humic acid yield during its extraction. Leonardite was selected as raw material due to its higher amounts of humic acid compared to low rank coals, soil, agricultural crop residues, compost, sewage sludge, landfill leachate and animal waste. Leonardite was treated at 200, 300 and 400°C, in the presence of air and nitrogen atmospheres and humic acid was extracted from this treated samples. Compared to untreated leonardite, an improvement in humic acid efficiency was achieved for samples treated at 200°C, in the presence of nitrogen atmosphere. The reasons of this distinct behavior in the presence of nitrogen was elaborated with elemental, FT-IR, UV-Vis and XRD analyses.

5.1.9. Données médicales : effets indésirables signalés chez l'humain

Les substances humiques, acides humiques et acides fulviques, ont une activité génotoxique que cette étude suggère responsable de la maladie du pied noir.

Hseu, You-Cheng, Ssu-Ching Chen, Ya-Lai Chen, Jing-Yi Chen, Mei-Ling Lee, Fung-Jou Lu, Fang-Yang Wu, Jim-Shoung Lai, and Hsin-Ling Yang. 2008. Humic Acid Induced Genotoxicity in Human Peripheral Blood Lymphocytes Using Comet and Sister Chromatid Exchange Assay. *Journal of Hazardous Materials* 153 (1): 784–91.

Humic acid (HA) in well water used by the inhabitants for drinking is one of the possible etiological factors for blackfoot disease (BFD). Moreover, within BFD endemic areas cancers occur at significantly higher rates than in areas free of BFD. In this study, the genotoxic potential of HA is assessed using human peripheral blood lymphocytes. The cells were exposed to HA (0–200 µg/mL for 2 h), and the induction of DNA primary damage in cellular DNA was evaluated by single-cell gel electrophoresis (comet assay). HA-induced DNA damage was decreased by superoxide (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), and reactive oxygen species (ROS) scavengers (superoxide dismutase, catalase, and Trolox), and nitric oxide (NO) synthase inhibitors (NG-nitro-L-arginine methyl ester and NG-methyl-L-arginine). Moreover, formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III), known to

catalyze the excision of oxidized bases, increase the amount of DNA migration in HA-treated cells. Pretreatment of the cells with both the Ca²⁺-chelator BAPTA and EGTA completely inhibited HA-induced DNA damage, indicating that HA-induced changes in Ca²⁺-homeostasis are the predominant pathways for the HA induction of genotoxicity. Furthermore, sister chromatid exchange was found in the HA-treated lymphocytes. Our findings suggest that HA can induce oxidative DNA damage and genotoxicity in human lymphocytes.

Cette étude sur les substances humiques de synthèse considère qu'elles sont responsable de la maladie du pied noir car elles ont un effet négatif sur la coagulation du sang et la formation de caillots.

Lu, F. J. 1990. Blackfoot Disease: Arsenic or Humic Acid? *The Lancet* 336 (8707): 115–16.

A further experiment with synthetic humic substances was done to find out if the humic acid or arsenic in organometallic complex influences prothrombin time. Protocatechuic acid can be oxidised and polymerised to form humic substances (humic and fulvic acid). If As₂O₃ is included in the process of oxidative polymerisation, the production of humic acid increases 1.5-2.3-fold and that of fulvic acid 10-fold or more. The resultant humic and fulvic acids both shortened prothrombin times, especially when As₂O₃ had served as a promoter during oxidative polymerisation. As₂O₃ or protocatechuic acid alone did not shorten prothrombin times. It seems that the main cause of blackfoot disease is not arsenic but humic acid. Concepts about the pathogenesis of this disease may need to be revised, and the effect of humic acid on blood coagulation needs to be studied further.

5.2 Valeurs de références : Dose journalière acceptable, dose aiguë de référence, niveau acceptable d'exposition de l'opérateur

Toxicité orale	LD50>	11 500 mg/kg
Toxicité parentérale	54.8 mg/kg <LD50<58.5 mg/kg chez la souris 163.5 mg/kg < LD50 < 205.8 mg/kg chez le rat	
Toxicité	NOAEL	50 mg/kg bw/jour

5.3 Exposition à la substance et ses impuretés

5.3.1. Exposition liées à l'usage biostimulant

L'exposition à la leonardite dans le cadre de la biostimulation en amendement peut être comparée à celle de la chaux dans la fréquence de traitement, les quantités utilisées étant bien moins importantes, l'exposition à la leonardite lors de la biostimulation peut être considérée comme faible.

5.3.2. Exposition de fond à la substance, dues à d'autres raisons

Il n'y a pas d'exposition à la leonardite pure, outre lors de son extraction. Toutefois, les acides humiques sont naturellement présents dans l'eau potable.

**The European Agency for the Evaluation of Medicinal products, EMEA/MRL/554/99-FINAL
February 1999, COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS, HUMIC ACIDS AND
THEIR SODIUM SALTS, SUMMARY REPORT**

Humic acids are a class of compounds resulting from decomposition of organic matter, particularly plants, and are natural components of drinking water, soil and lignite. They are three dimensional macro colloidal molecules with a polyaromatic center containing iso- and heterocyclic structures and peripheral side-chains. The humic acids under considerations are extracted from lignite (brown coal) and have an average molecular mass of 20 000 to 150 000. They include humocarb with a humic acid content of 55 ±10% concentrated humic acid and a humic acid-iron(II)-carboxymethylcellulose-complex.

Cette étude confirme la présence d'acides humiques de manière naturelle dans l'eau.

Rodrigues, Alexandrina, Antonio Brito, Peter Janknecht, Maria Fernanda Proenca, and Regina Nogueira. 2009. Quantification of Humic Acids in Surface Water: Effects of Divalent Cations, PH, and Filtration, 6. J. Environ. Monit., 2009, 11, 377–382

Abstract: Humic acids (HAs) content of raw water is an important analytical parameter in water treatment facilities because HAs in the presence of chlorine may lead to the formation of dangerous by-products (e.g., trihalomethanes). The concentration of HAs in water is not directly accessible by common analytical methods due to their heterogeneous chemical structure. The aim of this study was to compare two methods to assess humic acids (HAs) in surface water namely absorbance of ultraviolet light at 254 nm (UV254) and total organic carbon (TOC), as well as to evaluate the effects of calcium and magnesium concentrations, pH and sample filtration on the methods' results. An aqueous solution of a commercial HA with 10 mg L⁻¹ was used in the present work. Quantification of the HA was carried out by both UV254 and TOC (combustion-infrared method) measurements. UV254 results were converted to TOC using a calibration curve. The effects of calcium (0–136.3 mg L⁻¹) and magnesium (0–34.5 mg L⁻¹) concentrations, pH (4.0, 7.0 and 9.0) and sample filtration on UV254 and TOC measurements of the HA suspension were evaluated. More accurate TOC values of HA suspensions were obtained by the combustion-infrared method than by the UV254 absorbance method. The higher differences of TOC values between unfiltered and filtered samples were detected in the presence of calcium at pH 9.0 using the spectrophotometric method.

Conclusion: From this work's results can be concluded that humic acids monitoring with respect to its total organic carbon content (TOC) by different methods leads to different results. Unfiltered samples presented considerably higher total organic carbon (TOC) values than filtered ones, independently of the method used. The higher differences of TOC values between unfiltered and filtered samples were detected in the presence of calcium at pH 9.0 using the spectrophotometric method. The UV spectroscopic method gives information about the aromatic content of the sample, unlike the combustion infrared method, but suffers from interferences resulting from molecular aggregation in the presence of divalent cations. The combustion-infrared method gave the most accurate values although the precision was lower than the one obtained in the UV spectrophotometric method. In this regard and due the fact that pH values and divalent cations concentration in surface water may vary considerably, the combustion-infrared method is recommended for HSs quantifications in surface water.

Citation: Natural organic matter (NOM) concentration in surface water typically ranges from 0.1 mg L⁻¹ to 20 mg L⁻¹ and is mainly composed of humic substances (HSs).¹ HSs composition varies from source to source as they result from microbiological, chemical and photochemical transformations of plant and animal residues.² The main constituents of HSs include aromatic and aliphatic structures as well as

carboxylic, phenolic-OH, amino and quinone groups. These groups may be evaluated by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy which is by far the single most powerful tool for structural HSs studies.

5.3.3. Comparaison de l'exposition liée à l'usage et l'exposition de fond

L'exposition liée à l'usage en tant que biostimulant est bien moins importante que l'exposition liée à la présence d'acides humiques dans l'eau potable, principalement de par la fréquence d'exposition à la substance.

L'exposition non liée à l'application de la substance dans le cadre des usages préconisés à proprement parler est réalisée au 7.2.3. L'exposition des opérateurs est estimée ci-dessous selon le modèle « PUFFER PACK » de la Health and Safety Executives qui sont aussi responsables des études PEC.

PUFFER PACK MODEL				
PRODUCT NAME	Leonardite			
ACTIVE SUBSTANCE	humic substances			
ACTIVE CONTENT	1000 g/kg			
FORMAL ABSORPTION	100 %			
AOEL	1100 mg/kg bw/day			
	Rate of exposure (mg/min)	Exposure Duration (mins)	Estimated exposure to body (mg/day)	
Hand and forearm	2,80	30	84,9	
Legs, feet and face	2,15		84,9	
TOTAL Dermal EXPOSURE TO POWDER (mg/day)			169,8	
ABSORPTION			169,8	
ABSORBED FORMAL DOSE (mg/day)			169,8	
	Rate of exposure (mg/m ³)	Exposure Duration (mins)	Estimated exposure to body (mg/day)	
Breathing rate - 1m ³ /h	0,02960	30	0,88800	
INHALATION EXPOSURE - 100% ABSORPTION (mg/day)			0,888	
				No data refer to the 75th percentile values
FORMAL (mg/kg bw/day)			169,8	
INHALATION (mg/day)			0,888	
TOTAL (mg/day)			170,688	
DOUYWELGIII (kg)			60	
OPERATOR EXPOSURE (mg/kg bw/day)			2,8448	
THIS IS		0,2%	OF THE AOEL FOR	humic substances
THE ESTIMATE FOR		Leonardite	IS WITHIN ACCEPTABLE LEVELS	

L'étude menée montre donc que l'exposition à la leonardite dans le cadre d'un usage sous forme de poudre ne présente pas de risque pour l'opérateur. L'usage sous forme de dilution liquide pourrait néanmoins nécessiter des équipements individuels de protection comme précisé au 7.2.3.

5.4 Impacte sur la santé humaine et animale provenant de la substance ou de ses impuretés

Les acides humiques entraînent un gain de poids chez les porcelets sevrés dans cette étude ou est ajouté 0,25% de leonardite dans leur ration pendant 40 jours.

Dell'Anno, Matteo, Monika Hejna, Stefania Sotira, Valentina Caprarulo, Serena Reggi, Roberto Pilu, Francesco Miragoli, Maria Luisa Callegari, Sara Panseri, and Luciana Rossi. 2020. Evaluation of Leonardite as a Feed Additive on Lipid Metabolism and Growth of Weaned Piglets. *Animal Feed Science and Technology* 266 : 114519.

Abstract:We evaluated the effects of leonardite supplementation, mainly composed of humic acids (HAs), as a functional feed additive in weaned piglets. One hundred and twenty piglets (Large White × Landrace) were weaned at 28±2 days, and randomly divided into two groups (6 pens per group, 10 piglets per pen). After one week of adaptation, for 40 days groups were fed a control diet (CTRL) and an HA enriched diet (0.25% of leonardite; HAG). Body weight (BW), average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG), feed conversion ratio (FCR) were measured throughout the experimental period. On the last day of the trial four piglets per pen were randomly selected and the blood was collected to evaluate the serum metabolic profile and diamine oxidase content. Chemical analyses showed that leonardite was characterized by a high content of ash 23.27% (as-fed basis), polyphenolic content of 35.18±3.91 mg TAEq/g, and an antioxidant capacity of 73.31±8.22 μmol TroloxEq/g. The HAG group showed an increase in BW, ADG and ADFI (P<0.01) compared to the CTRL group during the experimental period. In terms of the serum metabolic profile, the HAG group showed a significant increase in total protein content (P<0.001), albumin (P<0.001), albumin/ globulin ratio (P<0.01), phosphatase alkaline (P<0.01), calcium, phosphorus and magnesium (P<0.05) compared to the CTRL group. A modulation in the serum lipid profile was recorded. The HAG group showed a decrease in total triglycerides (P<0.05) with higher total cholesterol (P<0.05), however only high-density lipoprotein showed a significant increase (P<0.001) compared to the CTRL group. No significant differences in the amount of diamine oxidase were found between groups. In conclusion, leonardite inclusion in the diet at 0.25% was shown to have a positive effect on the serum lipid profile and animal growth. This thus suggests that leonardite can be considered as a new feed additive, which improves the health and performance of weaned piglets.

Conclusion: Dietary supplementation with 0.25% leonardite improved the zootechnical performance, serum lipidic profile and gut epithelium integrity, thus indicating a good general health status. The increased serum HDL and decreased total triglycerides suggest that leonardite is a promising feed additive to improve lipid metabolism. The higher serum Mg content found also suggests that leonardite supports an improved stress response in weaned piglets.

D'autres effets sont rapportés par les acides humiques chez les porcelets sevrés à qui on a administré 20g/kg de leonardite dans la ration alimentaire pendant 21 jours.

Trckova, Martina, Alena Lorencova, Vladimir Babak, Jiri Neca, and Miroslav Ciganek. 2018. The Effect of Leonardite and Lignite on the Health of Weaned Piglets. *Research in Veterinary Science* 119 : 134–42.

Abstract: A three-week trial was conducted to evaluate the effects of leonardite and lignite, natural sources of humic substances, on selected indicators of health status of weaned piglets. A total of 45 weaned piglets were assigned to three dietary treatments: Control - basal diet without any medication; Leonardite or Lignite - diet supplemented with lignite or leonardite at a dose of 20 g/kg, respectively. Leonardite differed from lignite in the content of humic substances and minerals. Diarrhoea incidence and severity, growth performance, haematological and biochemical status, biomarkers of oxidative

stress, serum fatty acid (FA) profile and faecal microbiota composition were monitored. Significantly lower faecal score, diarrhoea incidence, serum biomarkers of oxidative stress, higher body weight gain and no mortality were observed in leonardite and lignite group. The supplemented groups had or tended to have higher haematocrit, haemoglobin, erythrocyte counts, iron, cholesterol and lower urea in blood. Increased serum minerals (calcium, phosphorus, magnesium) were detected in the leonardite group. Different effects of leonardite and lignite on serum FA profile were detected. Significantly lower proportion of saturated FA, higher unsaturated, monounsaturated, polyunsaturated (PUFA) n-3 FA and PUFA n6/n3 ratio were detected in leonardite group compared to lignite group. Both treatments decreased microbial diversity and richness of faecal microbiota at the genus level. Specifically, lower relative abundance of Firmicutes, Bacteroides, Anaerovibrio, Oscillospira, SMB53, Ruminococcus, and a tendency to a higher abundance of Prevotella was found compared to control group. Natural humic materials may provide benefit to piglets' health in the difficult post-weaning period.

Conclusion: Natural humic materials – leonardite and lignite cannot completely prevent diarrhoea in piglets after weaning but they may significantly reduce its severity and related mortality, decrease oxidative stress, enhance feed intake and promote growth in the post-weaning period. This may also involve enhanced haematological parameters associated with the amount of functioning iron in the body, serum minerals, or even the serum n-6/n-3 ratio, and prompt the development of new microbiota in response to the dietary change after weaning. However, an important issue to consider about the supplementation of natural humic materials is the content of HS, their fractions as well as minerals. Leonardite as a highly oxidized form of humic materials with a considerably higher amount of HS may promote more substantial effect than lignite.

Toutefois, il est possible que les acides humiques soient responsables de la maladie du pied noir de par leur activité genotoxique.

Hseu, You-Cheng, Ssu-Ching Chen, Ya-Lai Chen, Jing-Yi Chen, Mei-Ling Lee, Fung-Jou Lu, Fang-Yang Wu, Jim-Shoung Lai, and Hsin-Ling Yang. 2008. Humic Acid Induced Genotoxicity in Human Peripheral Blood Lymphocytes Using Comet and Sister Chromatid Exchange Assay. *Journal of Hazardous Materials* 153 (1): 784–91.

Humic acid (HA) in well water used by the inhabitants for drinking is one of the possible etiological factors for blackfoot disease (BFD). Moreover, within BFD endemic areas cancers occur at significantly higher rates than in areas free of BFD. In this study, the genotoxic potential of HA is assessed using human peripheral blood lymphocytes. The cells were exposed to HA (0–200 µg/mL for 2 h), and the induction of DNA primary damage in cellular DNA was evaluated by single-cell gel electrophoresis (comet assay). HA-induced DNA damage was decreased by superoxide (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), and reactive oxygen species (ROS) scavengers (superoxide dismutase, catalase, and Trolox), and nitric oxide (NO) synthase inhibitors (NG-nitro-L-arginine methyl ester and NG-methyl-L-arginine). Moreover, formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III), known to catalyze the excision of oxidized bases, increase the amount of DNA migration in HA-treated cells. Pretreatment of the cells with both the Ca²⁺-chelator BAPTA and EGTA completely inhibited HA-induced DNA damage, indicating that HA-induced changes in Ca²⁺-homeostasis are the predominant pathways for the HA induction of genotoxicity. Furthermore, sister chromatid exchange was found in the HA-treated lymphocytes. Our findings suggest that HA can induce oxidative DNA damage and genotoxicity in human lymphocytes.

5.5 Autres informations au sujet des propriétés thérapeutiques ou allégations liées à la santé

Ce chapitre de livre est une review et concerne les effets thérapeutiques des substances humiques sur la santé, de nombreuses allégations sont faites, activité antiviral, anti-inflammatoire, anti-coagulant, remède pour les maladies gastrointestinales.

Klöcking, Renate, Helbig Björn. 2005. Medical Aspects and Application of Humic Substances. Biopolymers for Medical and Pharmaceutical Applications. Edited by A. Steinbüchel and R.H. Marchessault. Wiley-VCH.

Citation: As outlined in this chapter, some of the naturally occurring or synthetically prepared biopolymers of the HA type have the potential of highly effective drugs.

Les acides humiques améliorent le gain de poids chez les rats administrés 2,5g/kg dans la ration pendant 20 jours.

Yasar, S., A. Gokcimen, I. Altuntas, Z. Yonden, and E. Petekkaya. 2002. Performance and Ileal Histomorphology of Rats Treated with Humic Acid Preparations. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 86 (7–8): 257–64.

Abstract: As humic acid (HA) substances have antiphlogistic, adsorptive, antitoxic and antimicrobial properties, we studied the possible effects of Farmagulator®, an organic HA preparation, on the rat performance, nutrient retention, ileal histomorphology and hydroxyproline (HP) content of the ileum in two experiments. In experiment 1, 48 male Wistar albino rats were allotted to three dietary treatments. Each was randomly assigned to four cages, each with four rats. The treatments consisted of a control diet (C) with no addition of Farmagulator® Dry or Liquid, a treatment with addition of 2.5 g/kg Farmagulator® Dry (FDry) and a control diet containing no FDry, but the rats had 3.5 ml/l Farmagulator® Liquid in drinking water (FLiquid). The experiment lasted for 20 days. Changes in live weight were recorded at days 10 and 20 of the experiment. At the end of 20 days, all rats were killed to collect samples of intestinal tissues for the measurements of histological parameters. In experiment 2, 30 rats weaned at 21 days of age were divided into three groups, each with 10 rats, and individually caged in metabolism cages for 10 days. The above three treatments were randomly assigned to rats for 10 days to record body weight and feed intake. During the last 5 days, faecal outputs were collected to determine the dry matter and nitrogen retention. In experiment 1, FDry and FLiquid rats significantly ($p < 0.05$) gained more live weight than the control rats. Improved weight gain with HA preparations was found to be highly associated with a high epithelial surface area as there were significantly ($p < 0.05$) longer villi heights and crypt depths and increased HP contents of ileum in the HA treated rats compared with the control rats. Although the increased weight gain in FLiquid rats did not significantly ($p > 0.05$) differ from the control rats in experiment 2 in contrast to the result in experiment 1, the FDry rats significantly ($p < 0.05$) gained more weight than the control rats. This was primarily found to be associated with significantly ($p < 0.05$) increased feed intake and nitrogen retention in FDry rats compared with the control rats. It can be concluded that HA preparations, especially FDry, caused increased weight gain in rats as overall of two experiments. The improved weight gain only by FDry preparation was associated with

increased ileal epithelial mass, increased feed intake, improved feed: gain ratio and increased nitrogen retention in rats.

Conclusion: In short, the present results revealed that dry and liquid forms of HA preparations, particularly dry form significantly increased body mass in rats. This was found to be highly associated with the increased feed intake, increased nitrogen retention, improved feed : gain ratio, development of mucosal tissue, in particular with the size of villus height and crypt depth and increased HP content of ileum. Dry form of HA preparation used in the current study lead to increased body weight gain. The mechanism of the improved performance in rats was seen to be the result of the increased feed intake, improved feed : gain ratio and development of mucosal tissue of the ileum in rats.

Les effets thérapeutiques sont présents chez plusieurs espèces comme le suggère cette review.

Khan, Md Shaiful, Islam, K. M. S. Islam, A. Schuhmacher, and J. M. Gropp. 2005. Humic Acid Substances in Animal Agriculture. *Pakistan Journal of Nutrition* 4 (3): 126-134

Abstract: Humic acids (HA), a class of compounds resulting from decomposition of organic matter, particularly plants are natural constituents of drinking water, soil and lignite. It inhibit bacterial and fungal growth, thus decrease levels of mycotoxins in feed. Stress management, immune system, anti-inflammatory activity, antiviral properties as well as prevention of intestinal diseases, mainly diarrhoea in humans and animals are described as its beneficial effect. The use of HA and related products in feed improved gut health for better nutrient utilization as well as improved the health status by working against pathogens by developing immunity. Routine use of HA in feed improved growth of broilers by increasing digestion of protein and trace element utilization but a few researches has been conducted in this area. However, also contradictory findings in piglets are described. Most of the literature found is from companies but scientific articles are rather limited. There are also strong limitations in the knowledge of HA uses as feed additive for growth of other species of animal. It is really difficult to compare the actual effects of HA preparations due to different sources and nature as well as because rearing of animal in different region of the world varies as climatic conditions and aspects. So, bio-effect of HA product depends on specification.

Conclusion: There is no doubt that HA has many beneficial effect like antibacterial, antiviral and anti-inflammatory in animals, improves immune system, stress management and reduce odour in faeces. It also has positive effect on liver functioning. Ultimately reduces mortality and increases growth in poultry. But the level of benefits is now questionable for ruminants because due to its antimicrobial affect may cause depression of protein synthesis by reducing rumen microorganism. Supported literature those indicates the HA as growth promoter in ruminants seems weak in this aspects and facing question. It's affect as goitrogenic substance in rat is rejected in case of poultry by recent findings. So, in relation to growth promoter, using routinely is not so positive but where health risk is higher might be reflect beneficial due to protection of diseases. It is also difficult to compare the actual effects of HA preparations due to different sources and preparations as well as because rearing of animal in various region of the world differing the climate

Les acides humiques sont immunomodulateurs dans cette étude ou sont réalisés différents tests concernant les réaction immunitaires cellulaires et humorales.

Vetvicka, Vaclav, Roberto Baigorri, Angel Zamarreño, Jose Garcia-Mina, and Jean-Claude Yvin. 2010. Glucan and Humic Acid: Synergistic Effects on the Immune System. *Journal of Medicinal Food* 13 : 863–69.

Abstract: Humic acids are compounds resulting from decomposition of organic matter. Despite their common presence, our knowledge of their biological effects is limited, and current findings are controversial. We decided to evaluate the immunological effects of two different types of humic acids, differing in source and biochemical characteristics. Using both components either alone or in combination with the well-established yeast-derived immunomodulator glucan, we measured their effects on both the cellular (phagocytosis and tumor suppression) and humoral (antibody production and cytokine secretion) branches of immune reactions. In summary, our results suggest that humic acids are biologically active immunomodulators affecting both the humoral and cellular branches of immune reactions. In addition, the two humic acids studied here are working in synergy in stimulation of the immune reaction, supporting further studies of these natural immunomodulators.

Conclusion: To summarize our data, our report suggests that HAs are biologically active immunomodulators affecting both the humoral and cellular branches of immune reactions. In addition, both HZ and HC are working in synergy in stimulation of the immune reaction, a finding supporting further studies of these natural immunomodulators.

5.6 Autres informations au sujet des usages liées à l'alimentation

Des acides humiques provenant de tourbe Hongroise ont fait l'objet d'une demande d'autorisation en tant que Nouveaux Aliments aux Etats-Unis.

Murbach, Timothy S., Róbert Glávits, John R. Endres, Amy E. Clewell, Gábor Hirka, Adél Vértési, Erzsébet Béres, and Ilona Pasics Szakonyiné. 2020. A Toxicological Evaluation of a Fulvic and Humic Acids Preparation. *Toxicology Reports* 7 : 1242–54.

Abstract: Humic substances are ubiquitous in soils and waters. These complex superstructures are derived from the decomposition of dead plant and animal matter and are vital to soil health. Their heterogeneous composition is specific to their site of origin and is comprised of weakly bound aggregates of small organic compounds that can sequester minerals and make them available to plants. As such, they may possess potential nutritional value for humans, and extractions of fulvic and humic acids can be produced that could be suitable for such purposes. For this reason, we evaluated the toxicological profile of a specific preparation (blk. 333) of fulvic and humic acids derived from a lignite deposit in Alberta, Canada and found it to lack genotoxic potential in a bacterial reverse mutation test, in vitro mammalian chromosomal aberration test, and in vivo mammalian micronucleus test. No general or organ toxicity was observed in Wistar rats following 90 days of continuous exposure, and a no observed adverse effect level (NOEAL) was determined at 2000 mg/kg bw/day, the highest tested dose. Our results suggest the feasibility of further evaluation for development of the preparation as a nutritional supplement in food.

Citation: One particular preparation of HA and FA derived from Hungarian peat has been the subject of two successful New Dietary Ingredient Notifications (NDIN) to the US Food and Drug Administration for use in a dietary supplement that also contains added minerals in order to enhance mineral and trace element status in the human body [16,17]. The latter NDIN [17] reported 9 unpublished and one published [18] clinical evaluations in which this substance was found to improve mineral status in humans and/or to inhibit absorption and improve excretion of toxic elements. However, due to potential

differences between this and other humic preparations, as well as the addition of exogenous minerals, it is unclear whether such results can be extrapolated to humic substances in general.

Conclusion §5 : La Leonardite pure ne présente pas de toxicité en tant que tel, toutefois les acides humiques qui la composent peuvent se révéler génotoxiques s'ils ont subi un traitement au chlore.

L'activité d'adsorption de la Léonardite peut entraîner une concentration de métaux lourds ce qui peut augmenter leur toxicité.

L'exposition à la substance dans le cadre de son usage biostimulant est faible, et négligeable comparativement à l'exposition liée à l'eau potable.

De plus, des propriétés thérapeutiques sont rapportées, les acides humiques agissant sur le système immunitaire.

6. Résidus

Les résidus issus de la Leonardite sont les substances humiques, naturellement omniprésentes dans les sols, les résidus de Leonardite non contaminée ne sont donc pas une préoccupation.

L'ANSES préconise de s'assurer la non-contamination de la Leonardite pure lorsque son origine est inconnue.

Anses– dossier n° 2010-9011 – HUMIFIRST, 28 janvier 2011, AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'extension d'usage de l'homologation du produit HUMIFIRST de la société TRADECORP SA

Les propriétés du produit fini permettent d'identifier les dangers spécifiques suivants pour le consommateur : - la teneur en ETM, HAP, PCB et radioéléments devrait être vérifiée dans chaque lot si la provenance géographique précise de la Leonardite n'est pas garantie par le fabricant.

De plus, selon un rapport de l'EGTOP concernant la nourriture animale, les acides humiques ne sont pas sujets à une limite maximale de résidus.

EGTOP, Expert Group for Technical Advice on Organic Production, 2011, Final Report On Feed, EGTOP/1/2011

Humic acids are not currently authorised as a feed additive. This product would need approval under EC Regulation 1831/2003 before it can be considered for possible inclusion in Annex VI of Regulation 889/2008. Humic acids and their sodium salts are, however, identified as pharmacologically active substances with no maximum residue level and no restrictions on use under Regulation 37/2010 and Annex II of Regulation 2377/90.

7. Devenir et comportement dans l'environnement

7.1 Devenir et comportement dans l'environnement

La leonardite pure est principalement composée de substances humiques, l'application de ces substances au niveau du sol viendra s'ajouter à la quantité de substances humiques qui y sont déjà présentes.

Une fois incorporées au sol, les substances humiques issues de la leonardite vont adsorber différents éléments.

Anses– dossier n° 2010-9011 – HUMIFIRST, 28 janvier 2011, AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'extension d'usage de l'homologation du produit HUMIFIRST de la société TRADECORP SA

La nature des matières premières et du procédé de fabrication sont en faveur d'un impact à court terme acceptable du produit sur l'environnement, sous réserve de vérification de la teneur en radio-éléments et de respect des teneurs en ETM déclarées, même en cas de changement d'origine géographique de la leonardite. La leonardite contient des sites d'adsorption cationiques susceptibles de fixer d'éventuels radio-éléments d'origine atmosphérique. La radioactivité du produit fini devrait donc être contrôlée

Le rapport de l'EGTOP n'identifie pas de problème particulier.

EGTOP, Expert Group for Technical Advice on Organic Production, 2011, Final Report On Feed, EGTOP/1/2011

Environmental issues

No specific issues identified, but humic acids are widespread in the environment.

7.2 Estimation de l'exposition aiguë et à long terme des substrats environnementaux d'intérêt (sol, nappes phréatiques, eaux de surfaces)

L'exposition à la leonardite au niveau du sol n'est pas problématique au vu de la teneur naturelle du sol en substances humiques.

Lipczynska-Kochany, Ewa. 2018. Effect of Climate Change on Humic Substances and Associated Impacts on the Quality of Surface Water and Groundwater: A Review. *Science of The Total Environment* 640–641 : 1548–65.

Humic substances (HS), a highly transformed part of non-living natural organic matter (NOM), comprise up to 70% of the soil organic matter (SOM), 50–80% of dissolved organic matter (DOM) in surface water, and 25% of DOM in groundwater. They considerably contribute to climate change (CC) by generating greenhouse gases (GHG). On the other hand, CC affects HS, their structure and reactivity. HS important role in global warming has been recognized and extensively studied. However, much less attention has been paid so far to effects on the freshwater quality, which may result from the climate induced impact on HS, and HS interactions with contaminants in soil, surface water and groundwater. It is expected that an increased temperature and enhanced biodegradation of SOM will lead to an increase in the

production of DOM, while the flooding and runoff will export it from soil to rivers, lakes, and groundwater. Microbial growth will be stimulated and biodegradation of pollutants in water can be enhanced. However, there may be also negative effects, including an inhibition of solar disinfection in brown lakes. The CC induced desorption from soil and sediments, as well as re-mobilization of metals and organic pollutants are anticipated. In-situ treatment of surface water and groundwater may be affected. Quality of the source freshwater is expected to deteriorate and drinking water production may become more expensive. Many of the possible effects of CC described in this article have yet to be explored and understood. Enormous potential for interesting, multidisciplinary studies in the important research areas has been presented.

Les acides humiques sont présents en quantités variables dans les eaux de surface.

Rodrigues, Alexandrina, Antonio Brito, Peter Janknecht, Maria Fernanda Proenca, and Regina Nogueira. 2009. Quantification of Humic Acids in Surface Water: Effects of Divalent Cations, PH, and Filtration, 6. J. Environ. Monit., 2009, 11, 377–382

Natural organic matter (NOM) concentration in surface water typically ranges from 0.1 mg L⁻¹ to 20 mg L⁻¹ and is mainly composed of humic substances (HSs).¹ HSs composition varies from source to source as they result from microbiological, chemical and photochemical transformations of plant and animal residues.² The main constituents of HSs include aromatic and aliphatic structures as well as carboxylic, phenolic-OH, amino and quinone groups. These groups may be evaluated by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy which is by far the single most powerful tool for structural HSs studies.

7.2.1. Exposition liée à l'usage biostimulant

L'addition de leonardite liée à l'usage biostimulant entraîne une augmentation directe de la teneur du sol en substances humiques. La grande variabilité naturelle en fonction des situations géographiques suppose que l'exposition naturelles liée à l'usage biostimulant n'est pas problématique.

7.2.2. Exposition de fond à la substance, dues à d'autres raisons)

Les substances humiques sont naturellement présentes en grande quantité dans les différents substrats environnementaux d'intérêt.

Lipczynska-Kochany, Ewa. 2018. Effect of Climate Change on Humic Substances and Associated Impacts on the Quality of Surface Water and Groundwater: A Review. Science of The Total Environment 640–641 : 1548–65.

Humic substances (HS), a highly transformed part of non-living natural organic matter (NOM), comprise up to 70% of the soil organic matter (SOM), 50–80% of dissolved organic matter (DOM) in surface water, and 25% of DOM in groundwater. They considerably contribute to climate change (CC) by generating greenhouse gases (GHG). On the other hand, CC affects HS, their structure and reactivity. HS important role in global warming has been recognized and extensively studied. However, much less attention has been paid so far to effects on the freshwater quality, which may result from the climate induced impact on HS, and HS interactions with contaminants in soil, surface water and groundwater. It is expected that an increased temperature and enhanced biodegradation of SOM will lead to an increase in the

production of DOM, while the flooding and runoff will export it from soil to rivers, lakes, and groundwater. Microbial growth will be stimulated and biodegradation of pollutants in water can be enhanced. However, there may be also negative effects, including an inhibition of solar disinfection in brown lakes. The CC induced desorption from soil and sediments, as well as re-mobilization of metals and organic pollutants are anticipated. In-situ treatment of surface water and groundwater may be affected. Quality of the source freshwater is expected to deteriorate and drinking water production may become more expensive. Many of the possible effects of CC described in this article have yet to be explored and understood. Enormous potential for interesting, multidisciplinary studies in the important research areas has been presented.

Le temps de demi-vie des substances humiques peut aller jusqu'à des milliers d'années.

Grinhut, Tzafrir, Yitzhak Hadar, et Yona Chen. 2007. « Degradation and Transformation of Humic Substances by Saprotrophic Fungi: Processes and Mechanisms ». *Fungal Biology Reviews* 21 (4): 179-89. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.09.003>.

Humic substances represent the main carbon reservoir in the biosphere, estimated at 1600×10^{15} g C. Due to their crucial role in reductive and oxidative reactions, sorption, complexation and transport of pollutants, minerals and trace elements, sustaining plant growth, soil structure and formation, and control of the biogeochemistry of organic carbon in the global ecosystem, humic substances are extremely important to environmental processes. Saprotrophic fungi active in the decomposition process of humic substances include mainly ascomycetes and basidiomycetes, which are both common in the upper layers of soils. White rot and litter decomposing fungi are the most important organisms in the degradation and mineralization of refractory organic matter (OM), whereas ascomycetes are mainly involved in the modification and polymerization of humic substances. The mechanisms of degradation probably involve mainly a variety of non specific oxidizing enzymes. This review provides an overview of the subject, while bridging two main disciplines: soil OM chemistry and fungal microbiology. It is aimed to highlight problems, unsolved questions and hypotheses.

La datation carbone 14 de deux échantillons de sols ont montré que les acides humiques étaient âgés de 2455 et 1720. Leur persistance est donc supérieure à des milliers d'années.

Paul, E. A., R. F. Follett, S. W. Leavitt, A. Halvorson, G. A. Peterson, et D. J. Lyon. 1997. « Radiocarbon Dating for Determination of Soil Organic Matter Pool Sizes and Dynamics ». *Soil Science Society of America Journal* 61 (4): 1058-67.

The size and turnover rate of the resistant soil organic matter (SOM) fractions were measured by ^{14}C dating and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ measurements. This involved soils archived in 1948, and recent samples, from a series of long-term sites in the North American Great Plains. A reevaluation of C dates obtained in the 1980s expanded the study scope. The ^{14}C ages of surface soils were modern in some native sites and near modern in the low, moist areas of the landscape. They were much older at the catena summits. The ^{14}C ages were not related to latitude although this strongly influenced the total SOM content. Cultivation resulted in lower C contents and increased the ^{14}C age by an average of 900 yr. The 10- to 20-cm depths from both cultivated and native sites were 1200 yr older than the 0- to 10-cm depth. The 90- to 120-cm depth of a cultivated site at 7015 yr before present (BP) was 6000 yr older than the surface. The nonhydrolyzable C of this depth dated 9035 yr BP. The residue of 6 M HCl hydrolysis comprised 23 to 70% of the total soil C and was, on the average, 1500 yr older. The percentage of

nonhydrolyzable C and its ^{14}C age analytically identify the amount and turnover rate of the old resistant soil C.

Trevisan, Sara, Ornella Francioso, Silvia Quaggiotti, et Serenella Nardi. 2010. « Humic substances biological activity at the plant-soil interface ». *Plant Signaling & Behavior* 5 (6): 635-43.

Humic substances (HS) represent the organic material mainly widespread in nature. HS have positive effects on plant physiology by improving soil structure and fertility and by influencing nutrient uptake and root architecture. The biochemical and molecular mechanisms underlying these events are only partially known. HS have been shown to contain auxin and an "auxin-like" activity of humic substances has been proposed, but support to this hypothesis is fragmentary. In this review article, we are giving an overview of available data concerning molecular structures and biological activities of humic substances, with special emphasis on their hormone-like activities.

La concentration en matière organique naturelle dans les eau de surface est entre 0,1mg/L et 20mg/L. La quasi-totalité de celle-ci étant des substance humiques on peut extrapoler que la concentration en substance humiques varie entre 0,1 et 20 mg/L.

Rodrigues, Alexandrina, António Brito, Peter Janknecht, Maria Fernanda Proença, et Regina Nogueira. 2009. « Quantification of Humic Acids in Surface Water: Effects of Divalent Cations, PH, and Filtration ». *Journal of Environmental Monitoring: JEM* 11 (2): 377-82.

Humic acids (HAs) content of raw water is an important analytical parameter in water treatment facilities because HAs in the presence of chlorine may lead to the formation of dangerous by-products (e.g., trihalomethanes). The concentration of HAs in water is not directly accessible by common analytical methods due to their heterogeneous chemical structure. The aim of this study was to compare two methods to assess humic acids (HAs) in surface water namely absorbance of ultraviolet light at 254 nm (UV(254)) and total organic carbon (TOC), as well as to evaluate the effects of calcium and magnesium concentrations, pH and sample filtration on the methods' results. An aqueous solution of a commercial HA with 10 mg L⁻¹ was used in the present work. Quantification of the HA was carried out by both UV(254) and TOC (combustion-infrared method) measurements. UV(254) results were converted to TOC using a calibration curve. The effects of calcium (0-138.3 mg L⁻¹) and magnesium (0-34.5 mg L⁻¹) concentrations, pH (4.0, 7.0 and 9.0) and sample filtration on UV(254) and TOC measurements of the HA suspension were evaluated. More accurate TOC values of HA suspensions were obtained by the combustion-infrared method than by the UV(254) absorbance method. The higher differences of TOC values between unfiltered and filtered samples were detected in the presence of calcium at pH 9.0 using the spectrophotometric method.

Dans le sol, 60% de la matière organique présente dans le sol est composée de substances humiques.

Donc si l'on prend entre 1 et 5 % de matière organique dans le sol on obtient rapidement des valeurs importantes de l'ordre de 600 mg a 3000mg de substances humiques par kg de sol.

7.2.3. Comparaison de l'exposition liée à l'usage et l'exposition de fond

L'exposition aux substances humiques issues de la léonardite, liée à l'usage biostimulant est donc bien moins importante que l'exposition de fond dans le cas du sol.

Une étude PECsol à été réalisée (GC et maraichage, plein champ) :

Number of applications	1	
depth of soil (cm) =	100	
density (g/cm ³) =	1.3	
Soil DT50 =	1000	
1st Application		
Rate (g/ha)=	4500	
Crop interception (%) =	5	
		TWA
PECINI mg/kg (1st)	0.329	0.329
1	0.329	0.329
2	0.328	0.329
4	0.328	0.328
7	0.327	0.328
14	0.326	0.327
21	0.324	0.326
28	0.323	0.326
48	0.318	0.323
100	0.307	0.318

L'exposition de fond dans le sol étant de 600 à 3000 mg/kg de sol, l'addition dans le cadre de la biostimulation (4500 mg/kg) est donc comparable (1,5 fois) à celle de fond dans le cas de l'amendement au sol. Concernant l'apport sous forme liquide, l'exposition liée à l'usage est plus importante que l'exposition de fond, il sera donc nécessaire de se munir d'équipement de protection individuel. L'étude PECsol réalisée montre tout de même que dans ces cas les niveaux d'expositions ne sont pas comparables, l'exposition liée à l'usage est plus faible que l'exposition de fond.

Une étude PECsw a été réalisée

Number of applications	1
Water DT50	1000
1st Application	
Rate (q/ha)=	4500
Distance (m)	PECsw ini (µg/L)
1 m	41.550
5 m	8.550
6 m	7.200
7 m	6.150
8 m	5.400
9 m	4.800
10 m	4.350
11 m	4.050
12 m	3.600
13 m	3.450
14 m	3.150
15 m	3.000
16 m	2.700
17 m	2.550
18 m	2.400
19 m	2.400
20 m	2.250

L'exposition de fond dans un environnement aquatique étant compris entre 0,1 mg et 20mg par litre, l'étude PECsw nous renseigne que ces valeurs sont dépassées à un mètre de distance, toutefois on peut voir que dès que l'on passe à 5 mètres du point d'application la valeur baisse considérablement et on retrouve des valeurs dans la fourchette d'exposition naturelle. Il est donc pertinent d'interdire l'application de léonardite à moins de 5 mètres des points d'eau.

Conclusion §7 : Les substances humiques, composantes du sol, sont présentes en grande quantité dans les sols, et en concentration variable dans les eaux de surface, leur devenir et leur comportement dans l'environnement ne sont donc pas préoccupant.

8. Effets sur les organismes non-cibles

8.1 Effets sur les vertébrés terrestres

Les acides humiques sont utilisés pour le traitement de divers problèmes vétérinaires.

**The European Agency for the Evaluation of Medicinal products, EMEA/MRL/554/99-FINAL
February 1999, COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS, HUMIC ACIDS AND
THEIR SODIUM SALTS, SUMMARY REPORT**

Humic acids are used in horses, ruminants, swine and poultry at a oral doses level of 500 to 2000 mg/kg bw for the treatment of diarrhoea, dyspepsia and acute intoxications. They exert a protective action on the mucosa of the intestine and have antiphlogistic, adsorptive, antitoxic and antimicrobial properties. They are not used in humans.

8.1.1. Oiseaux

Les acides humiques sont rapportés comme améliorant la croissance des volailles lorsque incorporés à hauteur de 0,25% dans leur ration, l'hypothèse de limitation du développement des parasites est émise.

Dominguez-Negrete, Alejandra, Sergio Gómez-Rosales, María de Lourdes Angeles, Luis Humberto López-Hernández, Tercia Cesaria Reis-de Souza, Yair López-García, Anai Zavala-Franco, et Guillermo Téllez-Isaías. 2019. « Effect of the Addition of Humic Substances as Growth Promoter in Broiler Chickens Under Two Feeding Regimens ». *Animals* 9 (12): 1101.

Abstract : Humic substances (HS) from different sources have been evaluated to replace or reduce the use of growth promoter antibiotics (GPA) in the feeds of broiler chickens. The objective was to evaluate the growth performance, tibia measurements, nutrient balance, meat quality, and microbiological status of broiler fed with an HS extract (EHS) under ad libitum (ADLIB) or feed restriction (REST). Individually caged broilers (n = 180, 14–35 day of age) were assigned to a factorial arrangement of three dietary treatments: (1) positive control with bacitracin methylene disalicylate (BMD) and salinomycin; (2) negative control without BMD nor salinomycin, and (3) same as negative control with 0.25% EHS, and two feeding regimens 1) ADLIB or REST for 24 h on d 1, 7, and 14. Results were subjected to ANOVA. Positive control and EHS-fed broilers showed higher carcass yield ($p < 0.05$) and lower oocyst excretion ($p < 0.01$) compared to negative control birds. Lactic acid bacteria (LAB) and *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) were higher in negative control and EHS-broilers compared to positive control ($p < 0.01$). In conclusion, higher carcass yield, lower *C. perfringens* and oocyst excretion were found in positive control and higher carcass yield, higher LAB and lower oocyst excretion were found in EHS-fed broilers. Broilers subjected to REST had reduced growth performance and meat quality. In conclusion, EHS could be used to increase the carcass yield and beneficial LAB in broilers.

Conclusion: Broiler chickens from 14 to 35 d of age, allocated in holding pens and added with an EHS in the feed had similar carcass yield and coccidian oocyst excretion but increased LAB and *Clostridium perfringens* counts compared to broilers fed diets added with GPA. Whilst negative control broilers had lower carcass yield, higher *C. perfringens*, LAB, and oocyst excretion. Broilers subjected to REST had reduced growth performance and meat quality. These findings suggest that EHS could be used to

increase the carcass yield and beneficial LAB in broilers; but cannot be used to mitigate the deleterious effects of feed restriction.

8.1.2. Mammifères

Les acides humiques sont rapportés comme n'ayant pas de toxicité sur les rats lorsque administré par gavage jusqu'à 2000 mg/jour. Cette dose est bien supérieure à celle à laquelle pourraient être exposés les mammifères dans le cadre des usages revendiqués.

Murbach, Timothy S., Róbert Glávits, John R. Endres, Amy E. Clewell, Gábor Hirka, Adél Vértési, Erzsébet Béres, and Ilona Pasics Szakonyiné. 2020. A Toxicological Evaluation of a Fulvic and Humic Acids Preparation. *Toxicology Reports* 7 : 1242–54.

Abstract: Humic substances are ubiquitous in soils and waters. These complex superstructures are derived from the decomposition of dead plant and animal matter and are vital to soil health. Their heterogenous composition is specific to their site of origin and is comprised of weakly bound aggregates of small organic compounds that can sequester minerals and make them available to plants. As such, they may possess potential nutritional value for humans, and extractions of fulvic and humic acids can be produced that could be suitable for such purposes. For this reason, we evaluated the toxicological profile of a specific preparation (blk. 333) of fulvic and humic acids derived from a lignite deposit in Alberta, Canada and found it to lack genotoxic potential in a bacterial reverse mutation test, in vitro mammalian chromosomal aberration test, and in vivo mammalian micronucleus test. No general or organ toxicity was observed in Wistar rats following 90 days of continuous exposure, and a no observed adverse effect level (NOEAL) was determined at 2000 mg/kg bw/day, the highest tested dose. Our results suggest the feasibility of further evaluation for development of the preparation as a nutritional supplement in food.

Conclusion: All genetic toxicity tests having met their respective acceptance criteria, including validation of the negative and positive controls, the test item was determined to lack genotoxic potential as no frameshift or base pair substitution mutations or in vitro or in vivo chromosomal damage were observed. As discussed above, Bernacchi et al. suggested a potential for gastrointestinal chlorination of ingested HA [29], although, to the best of our knowledge, this has not been demonstrated in any experiments. As such, further investigation into the potential for the current test item to undergo chlorination within the gastrointestinal track could be considered, and if confirmed, an in vivo investigation of genotoxic potential in intestinal cells could be conducted. Nonetheless, in contrast to the test item of Bernacchi, the current test item was not treated with hydrochloric acid during its production, and another HA preparation was not carcinogenic, with or without chlorination, in a 2-year study in mice (although results could be considered equivocal for the chlorinated HA with respect to leukemia incidence in males only) [27]. Thus, it is questionable whether such additional investigations are warranted.

While our 90-day study was not suggestive of any thyrotoxicity of the test item, in the study by Daniel et al. thyroid lesions that could be indicative of the presence of a goitrogen in their test item or iodine sequestration by HA in the gastrointestinal track were observed [31]. Because some known goitrogenic substances have been reported as degradation products of humic substances [68], further investigations into the toxicological potential of blk. 333 could include an assay for known goitrogenic substances under simulated gastrointestinal conditions. With respect to gastrointestinal sequestration of iodine, in addition to a lack of effect on the thyroid, we did not observe any correlating findings, such as estrogenic lesions in breast tissue, suggestive of such an effect. However, in contrast to our study, in which we

administered the test item by gavage, Daniel et al. administered their test item in drinking water, and it might be supposed that such effects could be less pronounced or absent when the gavage route is used. Such effects could be further investigated via a binding affinity study and/or a subchronic or chronic repeated-dose study with administration in drinking water. Dark colored stools and intestinal content observed in the 90-day study were considered to be due to the color of the test item and without toxicological relevance. Additionally, statistically significant and dose-related slightly higher food consumption, clinical chemistry alterations, and kidney weights were also considered to have occurred without toxicologic relevance due to their low magnitudes and lack of correlating findings. Histological findings observed were without dose relationships and were generally lesions commonly observed in untreated laboratory rats (including control animals of the current study) without pathological changes while vacuolation of hepatocytes observed in the livers of male control and high-dose animals were considered due to the sunflower oil vehicle; thus, these were considered as unrelated to the test item and without toxicological relevance.

For the reasons stated above, we determined that the test item (blk. 333 fulvic and humic acids preparation derived from a lignite deposit in Alberta, Canada) was not mutagenic or clastogenic under the applied test conditions, and the NOAEL in male and female Han:WIST rats was 2000 mg/kg bw/day, the highest dose tested, following 90 days of continuous exposure by gavage.

La leonardite augmente les performances et améliore la santé des porcelets sevrés lorsque administré à hauteur de 0,25% de leur ration journalière.

Dell'Anno, Matteo, Monika Hejna, Stefania Sotira, Valentina Caprarulo, Serena Reggi, Roberto Pilu, Francesco Miragoli, Maria Luisa Callegari, Sara Panseri, and Luciana Rossi. 2020. Evaluation of Leonardite as a Feed Additive on Lipid Metabolism and Growth of Weaned Piglets. *Animal Feed Science and Technology* 266 : 114519..

Abstract: We evaluated the effects of leonardite supplementation, mainly composed of humic acids (HAs), as a functional feed additive in weaned piglets. One hundred and twenty piglets (Large Withe x Landrace) were weaned at 28 ± 2 days, and randomly divided into two groups (8 pens per group, 10 piglets per pen). After one week of adaptation, for 40 days groups were fed a control diet (CTRL) and an HA enriched diet (0.25% of leonardite; HAG). Body weight (BW), average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG), feed conversion ratio (FCR) were measured throughout the experimental period. On the last day of the trial four piglets per pen were randomly selected and the blood was collected to evaluate the serum metabolic profile and diamine oxidase content. Chemical analyses showed that leonardite was characterized by a high content of ash 23.27% (as-fed basis), polyphenolic content of 35.18 ± 3.91 mg TAEq/g, and an antioxidant capacity of 73.31 ± 8.22 μ mol TroloxEq/g. The HAG group showed an increase in BW, ADG and ADFI ($P < 0.01$) compared to the CTRL group during the experimental period. In terms of the serum metabolic profile, the HAG group showed a significant increase in total protein content ($P < 0.001$), albumin ($P < 0.001$), albumin/globulin ratio ($P < 0.01$), phosphatase alkaline ($P < 0.01$), calcium, phosphorus and magnesium ($P < 0.05$) compared to the CTRL group. A modulation in the serum lipid profile was recorded. The HAG group showed a decrease in total triglycerides ($P < 0.05$) with higher total cholesterol ($P < 0.05$), however only high-density lipoprotein showed a significant increase ($P < 0.001$) compared to the CTRL group. No significant differences in the amount of diamine oxidase were found between groups. In conclusion, leonardite inclusion in the diet at 0.25% was shown to have a positive effect on the serum lipid profile and animal growth. This thus

suggests that leonardite can be considered as a new feed additive, which improves the health and performance of weaned piglets.

Conclusion: Dietary supplementation with 0.25% leonardite improved the zootechnical performance, serum lipidic profile and gut epithelium integrity, thus indicating a good general health status. The increased serum HDL and decreased total triglycerides suggest that leonardite is a promising feed additive to improve lipid metabolism. The higher serum Mg content found also suggests that leonardite supports an improved stress response in weaned piglets.

8.2 Effets sur les organismes aquatiques

Les substances humiques ont des vertus thérapeutiques chez les poissons en stimulant leur système immunitaire. Cela a des concentrations testées jusqu'à 180 mg/L dans le milieu de vie, ces doses testées sont plus faibles que celles utilisées dans le cadre des usages revendiqués, toutefois dans le cadre des organismes aquatiques les doses appliquées sont diluées dans le milieu.

Lieke, Thora, Thomas Meinelt, Seyed Hossein Hoseinifar, Bo Pan, David L. Straus, and Christian E. W. Steinberg. 2020. Sustainable Aquaculture Requires Environmental-Friendly Treatment Strategies for Fish Diseases. *Reviews in Aquaculture* 12 (2): 943–65.

Abstract: Many classical therapeutants are going to be banned in Europe, and an urgent need for alternatives is emerging. This issue can be exemplified by one major parasitic disease in aquaculture and ornamental fish breeding: velvet disease. This disease, caused by dinoflagellates of the genera *Amyloodinium* and *Piscinoodinium*, is an important infection affecting cultured freshwater and marine ornamental and food fish, and consistently causes great financial loss to the associated industries. Therapeutants available contain copper, malachite green, or methylene blue, and which can be toxic to non-target organisms in the surrounding environment. As a result, these chemicals are banned for use by the aquaculture industry in several countries, and a prohibition for commercial ornamental fishkeeping is likely to follow in most countries. Increasing development of resistance to therapeutants, and growing public awareness for animal welfare and environmental protection, have prompted research in the areas of alternative treatment options and immunostimulants. Hydrogen peroxide and peracetic acid are possible 'green' therapeutants which do not contribute residues to the environment. Natural feed supplements such as pre- and probiotics can increase animal welfare and prevent stress and/or infections. Humic substances are another promising, natural immunostimulants which will be considered in depth. The aim of this review is to provide an overview of risks and benefits of current treatment options and new approaches to replace harmful therapeutants and minimize the number of toxic residues discharged into the environment. Treatments will be discussed on various parasitic infections and focus, where available, on *Amyloodinium* and *Piscinoodinium*.

Les substances humiques, en concentration jusqu'à 180mg/L dans le milieu de vie, augmentent la masse corporelle de *Xiphophorus helleri*, l'hypothèse est qu'elles stimulent positivement le métabolisme, elles provoquent de plus une légère féminisation qui peut être attribuée aux facteurs

environnementaux, au fait que les substances testées soient xénobiotiques, aux alkylphenols présents dans les substances humiques, mais aussi à la durée d'exposition de 21 semaines. Cet effet nécessite d'être testé plus en détail et sur différentes espèces afin d'être confirmé. Ces doses testées sont plus faibles que celles utilisées dans le cadre des usages revendiqués, toutefois dans le cadre des organismes aquatiques les doses appliquées sont diluées dans le milieu.

Steinberg, Christian E. W., Thomas Meinelt, Kurt Schreckenbach, Klaus Knopf, Andreas Wienke, and Angelika Stüber. 2004. Humic Substances Affect Physiological Condition and Sex Ratio of Swordtail (*Xiphophorus helleri* Heckel). *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 66 (2): 239–45.

Exposure of young swordtail (*Xiphophorus helleri*) to increasing concentrations of synthetic humic substances (HS1500) significantly effected the physiological condition and slightly effected the sex ratio of the fish. Any exposure enhanced the body mass development of the swordtail compared to the control. No dose-dependent effect of HS on growth was detectable. After a two-week period of stressful handling, the HS-exposed fish recovered quickly whereas growth stagnated in the control fish. The examination of gills, fins, and skins revealed no infestation with ectoparasites. We assume that the growth promoting effect of HS1500 was due to an overall stimulation in metabolism. Furthermore, the sex ratio of fish exposed to HS1500 for 21 weeks slightly shifted in favor of females in a dose-dependent manner. Although the mode of action is still obscure, there is a probability that alkylphenol structures in HS1500 may be responsible for this weak feminization.

Les substances humiques incorporées au milieu de vie aquatique, à des d allant jusqu'à 20 mg/L ont un effet bénéfique sur la longévité, et sur la réponse au stress salin, chez *M. macropoda*. Ces doses testées sont plus faibles que celles utilisées dans le cadre des usages revendiqués, toutefois dans le cadre des organismes aquatiques les doses appliquées sont diluées dans le milieu.

Suhett, Albert L., Christian E. W. Steinberg, Jayme M. Santangelo, Reinaldo L. Bozelli, and Vinicius F. Farjalla. 2011. Natural Dissolved Humic Substances Increase the Lifespan and Promote Transgenerational Resistance to Salt Stress in the Cladoceran *Moina Macrocopa*. *Environmental Science and Pollution Research* 18 (6): 1004–14.

Abstract: Purpose Evidence has accumulated that humic substances (HS) are not inert biogeochemicals. Rather, they cause stress symptoms and may modulate the life history of aquatic organisms. Nevertheless, it is still not clear how HS interact with additional stressors and if their effects are transgenerational. We tested the interactive effects of HS and salt to cladocerans, discussing their consequences for the persistence in fluctuating environments, such as coastal lagoons. Methods We used life-table experiments to test the effects of natural HS from a polyhumic coastal lagoon (0, 5, 10, 20, 50, and 100 mg dissolved organic carbon (DOC) L⁻¹) on the life-history of the cladoceran *Moina macrocopa*. We further tested the effects of HS (10 mg DOC L⁻¹), within and across generations, on the resistance of *M. macrocopa* to salt stress (5.5 gL⁻¹). Results HS at 5–20 mg DOC L⁻¹ extended the mean lifespan of *M. macrocopa* by ~30%. HS also increased body length at maturity by ~4% at 5–50 mg DOC L⁻¹ and stimulated male offspring production at all tested concentrations. Exposure to HS (even maternal only) alleviated the salt-induced reduction of somatic growth. Co-exposure to HS

increased body volume by 12–22% relative to salt-only treatments, while pre-exposure to HS increased body volume by 40–56% in treatments with salt presence, when compared to non-pre-exposed animals. **Conclusions** HS at environmentally realistic concentrations, by acting as mild chemical stressors, modify crucial life-history traits of *M. macrocopa*, favoring its persistence in fluctuating environments. Some of the effects of HS are even transgenerational.

Les acides fulviques modulent la réponse immunitaire de *Litopenaeus vannamei* et augmentent le taux de survie par rapport à *V. parahaemolyticus*. Les effets sont présents dès 2g par kg de nourriture, 6g/kg ne présente pas de toxicité.

Fierro-Coronado, Jesús A., Carlos Angulo, Arturo Rubio-Castro, Antonio Luna-González, Carlos J. Cáceres-Martínez, Cesar A. Ruiz-Verdugo, Píndaro Álvarez-Ruiz, Ruth Escamilla-Montes, Héctor A. González-Ocampo, and Genaro Diarte-Plata. 2018. Dietary Fulvic Acid Effects on Survival and Expression of Immune-Related Genes in *Litopenaeus Vannamei* Challenged with *Vibrio Parahaemolyticus*. *Aquaculture Research* 49 (9): 3218–27.

Abstract:The effects of fulvic acid (FA) on survival and immune-related gene expression were investigated in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* by immersion. Shrimp were fed with different dietary FA concentrations (1, 2, 4 and 6 g/kg feed) for 20 days (first bioassay) or 8 days (second bioassay, 2 g/kg feed of FA added every 2 days) and then challenged with *V. parahaemolyticus*. In a third bioassay, the expression of three immune-related genes (translationally controlled tumour protein [TCTP], superoxide dismutase [SOD] and heat-shock protein 70 [HSP70]) in haemocytes or hepatopancreas of experimental shrimp was measured by real-time quantitative PCR at 0, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hr after FA (2 g/kg feed) administration. Fulvic acid increased survival at a concentration of 2 g/kg feed supplied every two days. Interestingly, TCTP gene expression was upregulated, whereas gene expression of SOD and HSP70 was downregulated. In conclusion, dietary fulvic acid improves survival in white shrimp challenged with *V. parahaemolyticus* and modulates the immune response. Therefore, FA merits further evaluation as prophylactic treatment in commercial shrimp farms.

Conclusion: Fulvic acid protects *L. vannamei* from *V. parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND. Regarding the immune response, significant changes were found in gene expression in haemocytes and hepatopancreas of *L. vannamei* fed FA. Therefore, FA merits further evaluation as prophylactic treatment in commercial shrimp farms.

Les acides fulviques ont un effet bénéfique sur la croissance et le système immunitaire de *Paramisgurnus dabryanus*. Cela jusqu'à la supplémentation de 2% de la ration.

Gao, Yang, Jie He, Zhuliu He, Zhiwei Li, Bo Zhao, Yi Mu, Jeong-Yeol Lee, and Zhangjie Chu. 2017. Effects of Fulvic Acid on Growth Performance and Intestinal Health of Juvenile Loach *Paramisgurnus Dabryanus* (Sauvage). *Fish & Shellfish Immunology* 62 : 47–56.

Abstract: A 60-day feeding trial was conducted to determine the effect of dietary fulvic acid supplements on intestinal digestive activity (enzymatic analysis), antioxidant activity, immune enzyme activity and microflora composition of juvenile loach (initial weight of 6.2 ± 0.1 g) reared in experimental aquaria. Five test diets containing 0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2% fulvic acid were randomly assigned to three aquaria,

respectively. Elevated growth performance including final weight, weight gain (WG), specific growth rate (SGR) and feed conversion ratio (FCR) was observed in loaches that were fed fulvic acid. Maximal weight gain rates and specific growth rates occurred at the 1.5% additive level. The optimal dietary fulvic requirement for maximal growth of juvenile loach is 16.4 g per kg of the diet based on the quadratic regression analysis of specific growth rate against dietary fulvic acid levels. Furthermore, intestinal protease activity, antioxidant activity, lysozyme activity (LZM), complement 3 (C3) content, immunoglobulin M (IgM) content, acid phosphatase activity (ACP) and alkaline phosphatase activity (AKP) were significantly elevated with concomitant increasing levels of dietary fulvic acid. Following a deep sequencing analysis, a total of 42,058 valid reads and 809 OTUs (operational taxonomic units) obtained from the control group and the group displaying the most optimal growth rate were analyzed. Fulvic acid supplementation resulted in an abundance of Firmicute and Actinobacteria sequences, with a concomitant reduction in the abundance of Proteobacteria. Results indicated that fulvic acid supplementation resulted in a reduction in the relative abundance of *Serratia*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* and *Edwardsiella*, and a relative increase in the abundance of *Lactobacillus* in the intestine. In conclusion, these results suggest that fulvic acid improves growth performance and intestinal health condition of loach, indicates that fulvic acid could be used as an immunoenhancer in loach culture. Conclusion: These results indicate that fulvic acid improves characteristics including fish growth, intestinal digestive activity, antioxidant activity, immunity, microflora community diversity, and beneficial bacteria prevalence. The addition of fulvic acid to the diet also reduced the relative abundances of opportunistic pathogenic bacteria in the analyzed specimens. Further research is required to examine the effects of fulvic acid on gene expression of intestinal antioxidant and immune enzyme. Further studies are required to elucidate the mechanisms that underlie FA-improved growth and intestinal health condition alteration in fish.

Les substances humiques dans l'environnement aquatique entre 50 et 90 mg/L semblent permettre un meilleur rétablissement après un stress et une réduction du parasitisme chez la truite arc en ciel. Ces doses testées sont plus faibles que celles utilisées dans le cadre des usages revendiqués, toutefois dans le cadre des organismes aquatiques les doses appliquées sont diluées dans le milieu.

Meinelt, Thomas, Kurt Schreckenbach, Michael Pietrock, Stefan Heidrich, and Christian E. W. Steinberg. 2008. Humic Substances: Part 1: Dissolved Humic Substances (HS) in Aquaculture and Ornamental Fish Breeding. *Environmental Science and Pollution Research* 15 (1): 17.

Abstract : Goals, Scope and Background. Changing environmental conditions and handling stress are well known to cause chronic or acute stress situations in fish with subsequent infections. These requires a therapy by means of antibiotics and chemicals. In contrast to the huge number of pathogens, only a few substances are permitted for application as therapeutics in German aquaculture. Hence, there emerges an urgent need for highly effective and residueless alternatives. Main Features. The prophylactic stimulation and training of the defense system of fish by alternative approaches becomes increasingly necessary. One approach is the application of dissolved humic substances (HS) of natural or artificial origin. For example, there exist several reports on the positive effect of HS to fishes. These effects shall be considered in detail. Furthermore, the impact of HS on the constitution of parasites and pathogens will be displayed. The reports on this issue are diverse, if not inconsistent. We try to shed some light on these discrepancies. The last aspect covered by this review is the outdated paradigm that calcium ions act as antidotes. In the presence of HS, even the opposite effect may occur. Approach. To overcome old paradigms on HS and their potential interactions with fish and fish parasites, we reviewed

recent international literature, as well as 'grey' literature. We also include results from own former and ongoing studies. Results and Discussion. HS are able to increase the physiological condition of the individuals and to reduce adverse physiological and histological consequences caused by stress; the mechanism behind remains obscure. HS detoxify heavy metals and organic pollutants. Damages caused by several fish pathogens, such as bacteria and parasites, can be repaired more quickly in the presence of HS. Some parasites – mainly fungi – appear to be directly affected by HS. Comparing the fungicidal effects of HS from various sources, evidence is increasing that the aliphatic moiety may be the effective structures. However, further research is necessary to relate more physiological and anti-pathogenic effects to the chemical characteristics of HS.

Conclusions: HS are not real alternatives to strong traditional therapeutics. However, they show different advantages in repairing secondary, stress induced damages in fish. The ecophysiological relevance of HS in either aquatic systems or aquaculture is getting conspicuously. Perspectives. The lack of therapeutic and antiparasitic substances in aquaculture requires new strategies and ways of thinking. The search for alternatives to the 'traditional' chemical therapeutics calls for the intensive research. Inevitably, this search will lead to an intensive contemplation on HS as 'health promoting substances' and/or even therapeutics. Basic research is needed to detect the functional groups of the HS responsible for the effects observed. Health promoting effects of first investigations made in vitro to affect pathogens via application of HS and several field studies with HS raises hopes for a broader utilisation of HS to reduce stress consequences in fish and fish pathogens residuelessly.

La Leonardite réduit le taux d'infection de *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* chez *Cyprinus carpio* L., lorsque présente dans le milieu à 20mg/L et dans la nourriture à 20g/kg. Ces doses testées sont plus faibles que celles utilisées dans le cadre des usages revendiqués, toutefois dans le cadre des organismes aquatiques les doses appliquées sont diluées dans le milieu.

Yamin, G., R. Falk, R. R. Avtalion, N. Shoshana, T. Ofek, R. Smirnov, G. Rubenstein, and J. van Rijn. 2017. The Protective Effect of Humic-Rich Substances on Atypical *Aeromonas Salmonicida* Subsp. *Salmonicida* Infection in Common Carp (*Cyprinus Carpio* L.). *Journal of Fish Diseases* 40 (12): 1783–90.

When challenged with atypical *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, exposure of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) to different humic-rich compounds resulted in a significant reduction in infection rates. Specifically, in fish exposed to (i) humic-rich water and sludge from a recirculating system, (ii) a synthetic humic acid, and (iii) a Leonardite-derived humic-rich extract, infection rates were reduced to 14.9%, 17.0% and 18.8%, respectively, as compared to a 46.8% infection rate in the control treatment. An additional set of experiments was performed to examine the effect of humic-rich components on the growth of the bacterial pathogen. Liquid culture medium supplemented with either humic-rich water from the recirculating system, the synthetic humic acid or the Leonardite humic-rich extract resulted in a growth reduction of 41.1%, 45.2% and 61.6%, respectively, as compared to the growth of the *Aeromonas* strain in medium devoid of humic substances. Finally, in a third set of experiments it was found that while the innate immune system of the carps was not affected by their exposure to humic-rich substances, their acquired immune system was affected. Fish, immunized against bovine serum albumin, displayed elevated antibody titres as compared to immunized carps which were not exposed to the various sources of humic substances.

Conclusion: In the present study, a protective effect of three substances, rich in HS, against carp erythrodermatitis was found. This observed protection could be explained by (i) growth inhibition of atypical *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in the presence of the various HS-rich compounds, and (ii) a stimulation of the adaptive immune system of carps in the presence of such compounds. In this study, evidence was provided for the beneficial role of humic-rich culture systems for fish growth. Contrary to prevailing beliefs, these humic-rich systems may exert fish health promoting properties not found in "cleaner" systems. As this study was conducted with only one experimental model (common carp and the pathogen atypical *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*), further research should be focused on different fish species and different classes of fish pathogens such as helminths, protozoa and fungi.

Cette étude concerne les carpes (*Cyprinus Carpio* L.), les substances humiques a hauteur de 10% de la ration entraînent une réduction du parasitisme par *Aeromonas salmonicida*.

Kodama, Hiroshi, Denso, and Tsuyoshi Nakagawa. 2007. Protection against Atypical *Aeromonas Salmonicida* Infection in Carp (*Cyprinus Carpio* L.) by Oral Administration of Humus Extract. *Journal of Veterinary Medical Science* 69 (4): 405–8.

Humic substances are formed during the decomposition of organic matter in humus, and are found in many natural environments in which organic materials and microorganisms have been present. In the present study, oral administration of humus extract to common carp (*Cyprinus carpio* L.) induced effective protection against experimental atypical *Aeromonas salmonicida* infection. Mortality of fish and development of skin lesions such as hemorrhages and ulcers were significantly suppressed in carp treated with 10%, 5% or 1% humus extract adsorbed on dry feeding pellets. The median surviving days was also greater in fish treated with 10% or 5% humus extract than in untreated fish. Atypical *A. salmonicida* was isolated from ulcerative lesions of part of dead fish, but *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium* sp. were also isolated from these fish, verifying bacterial population changes during the progression of skin lesions. These results clearly show that treatment of fish with humus extract is effective in preventing *A. salmonicida* disease.

8.3 Effets sur abeilles et autres espèces d'arthropodes

8.3.1. Effets sur les abeilles

Les substances humiques solubilisées à l'aide de sodium en concentration de moins de 1mg/L a 2,4 mg/L sont bénéfiques pour la production de miel par *Apis mellifera* L. jusqu'à une certaine dose ou ils deviennent néfastes (6mg/L dans le sirop nourricier). Ces doses sont inférieures à celles utilisées dans le cadre de l'usage revendiqué, toutefois concernant l'exposition dans le cadre de l'ingestion de la substance diluée dans le sirop nourricier. De plus, l'application est préconisée en amont de la mise en place de la culture, et donc en l'absence de végétation, la présence d'abeilles et autres arthropodes est donc limitée.

Tunç, Muhammet Ali, Mahir Murat Cengiz, Kemal Yazici, and Metin Turan. 2020. THE EFFECTS OF SUPPLEMENTAL FEEDING WITH SODIUM HUMATE ON THE PERFORMANCE OF HONEY BEE COLONIES (*Apis Mellifera* L.). *Uludağ Arıcılık Dergisi* 20 (2): 181–88.

Abstract: In plant and animal production, sodium or potassium compounds which are soluble forms of humic substances are used. Sodium humates are used because of the sodium content which is important for animals in animal production. This study was carried out to investigate the effects of sodium humate added to sugar syrup in the development of adult honey bees, brood production and honey yield. Experimental colonies were randomly selected, and 5 study groups were formed with 6 colonies in each group. In the study, 4 different doses of sodium humate (5 cc, 10 cc, 20 cc, 50 cc/L and control 0 cc/L) were added to 1 liter 1:1 ratio of sucrose syrup and given to the experimental colonies. The highest brood production was obtained at a dose of 10 cc. In addition to, high dose (50 cc) negatively affected brood production. The average honey yield for the 5 cc, 10 cc, 20 cc, 50 cc and control groups was determined as 19.15±1.48, 26.35±1.83, 22.50±1.86, 8.75±1.29 and, 18.50±1.57 kg/colony, respectively. The highest honey yield was obtained from the group of 10 cc. For this group, the honey yield was 29.79 % higher than the control group.

Conclusion: As a result, certain doses (5 cc, 10 cc and 20 cc) of sodium humate increase the development of adult bees, the brood production and total honey production in honey bees. However, a high dose of sodium humate (50 cc) causes a negative effect on the physiological properties of honey bees. Beekeepers can use the ideal dose (10 cc) of humate in syrup to strengthen their honey bee colonies in the early spring, which could increase honey production without a significant cost increase (1 liter of sodium humate is approximately \$ 0.97).

8.3.2. Effets sur les autres arthropodes

Les acides humiques et fulviques ont une activité insecticide contre *A. gossypii* et *B. tabaci*. A des concentrations de 2000mg/l pour l'acide humique et 3490mg/l pour les acides fulviques, les traitements sont réalisés sur les parties aériennes. Ces doses sont plus faibles que celles utilisées dans le cadre de l'usage revendiqué. Ce qui suggère une toxicité aux doses utilisées dans le cadre de l'usage revendiqué, toutefois l'application à lieu avant la mise en place de la culture et donc en l'absence d'insectes.

EI - Zahi, E. S., and Madeha E. H. El - Dewy. 2018. Field Efficiency of Humic Substances, Boric Acid and Some Novel Insecticides against *Aphis Gossypii* Glover and *Bemisia Tabaci* (Gennadius) on Cotton Plants. *Journal of Plant Protection and Pathology* 9 (5): 301-7.

Nutritive acids improve the plant growth via increasing its carbohydrates content and nutrients uptake, and enhance the plant resistance to biotic and a biotic stress factors. Accordingly, field experiments were conducted at Sakha Agricultural Research Station, Kafr EL-Sheikh Governorate, Egypt during seasons 2016 and 2017 to evaluate the insecticidal activity of the nutritive acids (boric acid, humic acid and fulvic acid), pymetrozine, dinotefuran and thiamethoxam against *Aphis gossypii* Glover and *Bemisia tabaci* (Gennadius) on cotton plants under the field conditions. The toxicity of the binary mixtures of the nutritive acids with the tested insecticides against the two insects was evaluated as well. The tested compounds were applied at their field recommended rates. Pymetrozine, dinotefuran and thiamethoxam applied separately exhibited high efficiency against *A. gossypii* (causing 90.10 – 97.48% reduction), *B. tabaci* adults (recording 88.07 – 94.68% reduction) and *B. tabaci* immature stages (producing 87.29 – 92.43% reduction). Boric acid, humic acid and fulvic acid resulted in a considerable toxicity to both *A. gossypii* (31.60 – 55.21% reduction) and *B. tabaci* adults (29.51 – 43.70% reduction) and immature

stages (22.46 – 37.94% reduction). Among the tested nutritive acids, humic acid proved to be the most potent against *A. gossypii*, while fulvic acid was the most effective on *B. tabaci*. Binary mixtures of the nutritive acids with the tested insecticides resulted in insignificant changes in the insecticides activity against the two pests. These results suggest that boric acid, humic acid and fulvic acid could be effectively used to improve the cotton plant growth (as recommended) and, at the same time, to control *A. gossypii* and *B. tabaci*. Further studies are required to clarify the mode of action through which the nutritive acids cause their insecticidal activity against sucking insects on cotton plants.

8.4 Effets sur lombrics et autres macro-organismes du sol

Les substances humiques issus de la leonardite sont naturellement présents en grande quantité dans le sol. Les lombrics et autres macro-organismes du sol ne sont donc pas impactés par les quantités apportées dans le cadre de l'amendement.

8.5 Effets sur les micro-organismes du sol

Les amendements à base de leonardite à hauteur de 1,5g/kg de sol sont bénéfiques au la structure des communautés du sol. La dose utilisée dans le cadre des usages revendiqués est légèrement supérieur, à hauteur de 2g/kg de sol.

Akimbekov, Nuraly, Xiaohui Qiao, Ilya Digel, Gulzhamal Abdieva, Perizat Ualieva, and Azhar Zhubanova. 2020. The Effect of Leonardite-Derived Amendments on Soil Microbiome Structure and Potato Yield. *Agriculture* 10 (5): 147.

Abstract: Humic substances originating from various organic matters can ameliorate soil properties, stimulate plant growth, and improve nutrient uptake. Due to the low calorific heating value, leonardite is rather unsuitable as fuel. However, it may serve as a potential source of humic substances. This study was aimed at characterizing the leonardite-based soil amendments and examining the effect of their application on the soil microbial community, as well as on potato growth and tuber yield. A high yield (71.1%) of humic acid (LHA) from leonardite has been demonstrated. Parental leonardite (PL) and LHA were applied to soil prior to potato cultivation. The 16S rRNA sequencing of soil samples revealed distinct relationships between microbial community composition and the application of leonardite-based soil amendments. Potato tubers were planted in pots in greenhouse conditions. The tubers were harvested at the mature stage for the determination of growth and yield parameters. The results demonstrated that the LHA treatments had a significant effect on increasing potato growth (54.9%) and tuber yield (88.4%) when compared to the control. The findings highlight the importance of amending leonardite-based humic products for maintaining the biogeochemical stability of soils, for keeping their healthy microbial community structure, and for increasing the agronomic productivity of potato plants.

Conclusionj : In summary, the present study suggests beneficial impacts of leonardite-derived amendments on potato plant growth and soil microbial community structure. According to our metagenomic analysis, the soil samples amended with coal-based humic acids displayed high microbial diversity and richness compared to the control. The greenhouse trials demonstrated that both the plant growth and tuber yield were affected by the supplementation of the soil with leonardite-based amendments. Humic acids, being the most important component of any soil, may represent an enzymatically active complex, which can trigger various reactions that are usually assigned to the

microbial metabolic activity. The observed effects of the supplementation may presumably be attributed to (a) lowering of the pH soil samples; (b) higher concentration and availability of nitrogen-containing functional groups; (c) better ion-exchange capacity; (d) better water retention capacity; (e) facilitation (heterophase catalysis) of certain biochemical reactions; and (f) hypothetic adaptogenic mechanisms, etc. Our findings indicated stimulating effects of leonardite-derived humic substances on plant growth and tuber yield. The humic acid compounds from leonardite may provide useful options in developing sustainable agricultural technologies for soil amendments and organic fertilizers in an ecologically responsible manner. However, some limitations and other issues should be addressed in the future in order to successfully implement the positive effects of leonardite-based amendments on plant growth and yield. The impact of humic-based coal residues on phylogenetic distinct and abundant groups of microorganisms still lacks an adequate understanding. The important aspects for future studies include the heterogeneity, variability, and complexity of coal-derived humic substances; lack of valid experimental studies on an amendment dosage depending on the soil type, exact definitions of dose-response relationships; necessity for a better understanding of the underlying mechanism of LHA in plant growth promotion and development; etc.

Dans cette étude, application de substances humiques à différentes concentrations (jusqu'à 140mg/kg de sol) modifie les communautés bactériennes de la rhizosphère, et stimule leur activité. Ces doses sont inférieures à celles préconisées dans le cadre des usages revendiqués.

Puglisi, Edoardo, George Fragoulis, Patrizia Ricciuti, Fabrizio Cappa, Riccardo Spaccini, Alessandro Piccolo, Marco Trevisan, and Carmine Crecchio. 2009. Effects of a Humic Acid and Its Size-Fractions on the Bacterial Community of Soil Rhizosphere under Maize (*Zea Mays* L.). *Chemosphere* 77 (6): 829–37.

The effects of a humic acid (HA) and its size-fractions on plants carbon deposition and the structure of microbial communities in the rhizosphere soil of maize (*Zea mays* L.) plants were studied. Experiments were conducted in rhizobox systems that separate an upper soil-plant compartment from a lower compartment, where roots are excluded from the rhizosphere soil by a nylon membrane. The upper rhizobox compartment received the humic additions, whereas, after roots development, the rhizosphere soil in the lower compartment was sampled and sliced into thin layers. The lux-marked biosensor *Pseudomonas fluorescens* 10586 pUCD607 biosensor showed a significant increase in the deposition of bioavailable sources of carbon in the rhizosphere of soils when treated with bulk HA, but no response was found for treatments with the separated size-fractions. PCR-DGGE molecular fingerprintings revealed that the structure of rhizosphere microbial communities was changed by all humic treatments and that the smaller and more bioavailable size-fractions were more easily degraded by microbial activity than the bulk HA. On the other hand, highly hydrophobic and strongly associated humic molecules in the bulk HA required additional plant rhizodeposition before their bio-transformation could occur. This work highlights the importance of applying advanced biological and biotechnological methods to notice changes occurring in plant rhizodeposition and rhizosphere microbial activity. Moreover, it suggests correlations between the molecular properties of humic matter and their effects on microbial communities in the rhizosphere as mediated by root exudation.

8.6 Effets sur les autres organismes non-cibles (faune et flore)

La leonardite augmentant la disponibilité des éléments nutritifs du sol, l'ensemble des organismes non-cibles présents dans le sol auront eu aussi accès à ces éléments nutritifs.

Anses– dossier n° 2010-9011 – HUMIFIRST, 28 janvier 2011, AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'extension d'usage de l'homologation du produit HUMIFIRST de la société TRADECORP SA

Ces substances humiques agissent sur le transport des éléments nutritifs dans le sol grâce à leur capacité de complexation des ions métalliques, qui améliore la disponibilité pour la plante des éléments nutritifs du sol. Le mode d'action biologique envisagé concerne l'augmentation du développement racinaire.

8.7 Effets sur les méthodes biologiques de traitements des eaux usées

Le traitement au chlore des substances humiques peut résulter en la formation de composés mutagènes, cela même à des bas niveaux de traitement au chlore, l'activité mutagène étant absente lorsque les substances humiques ne sont pas désinfectées au chlore.

Kringstad, K. P., P. O. Ljungquist, F. De Sousa, and L. M. Stroemberg. 1983. On the Formation of Mutagens in the Chlorination of Humic Acid. *Environmental Science & Technology* 17 (9): 553–55.

The present investigation shows that the strong direct-acting mutagens 1,3-dichloroacetone and 2-chloropropenal are formed at low levels in the chlorination of humic acid. These results therefore suggest that these two compounds may also possibly contribute to the mutagenic activity of chlorinated drinking water.

Les acides humiques et fulviques qui composent la leonardite deviennent mutagènes lorsque traités à la chlorure au ratio molaire de 0,8 par rapport au carbone contenu dans l'eau. L'activité mutagène n'est pas retrouvée dans les eau de surfaces traitées car les concentration en substances humiques est fortement variable.

Bull, R. J., M. Robinson, J. R. Meier, and J. Stober. 1982. Use of Biological Assay Systems to Assess the Relative Carcinogenic Hazards of Disinfection By-Products. *Environmental Health Perspectives* 46 : 215–27.

Other workers have clearly shown that most, if not all, drinking water in the U.S. contains chemicals that possess mutagenic and/or carcinogenic activity by using bacterial and in vitro methods. In the present work, increased numbers of tumors were observed with samples of organic material isolated from 5 U.S. cities administered as tumor initiators in mouse skin initiation/promotion studies. Only in one case was the result significantly different from control. In studies designed to test whether disinfection practice contributes significantly to the tumor initiating activity found in drinking water mixed results have been

obtained. In one experiment, water disinfected by chlorination, ozonation or combined chlorine resulted in a significantly greater number of papillomas when compared to nondisinfected water. In two subsequent experiments, where water was obtained from the Ohio River at different times of the year, no evidence of increased initiating activity was observed with any disinfectant. Analysis of water obtained at the comparable times of the year for total organic halogen, and trihalomethane formation revealed a substantial variation in the formation of these products. Considering the problems such variability poses for estimating risks associated with disinfection by-products, a model system which makes use of commercially obtained humic acid as a substrate for chlorination was investigated using the Ames test. Humic and fulvic acids obtained from two surface waters as well as the commercially obtained humic acid were without activity in TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98 or TA 100 strains of *S. typhimurium*. Following treatment with a 0.8 molar ratio of chlorine (based on carbon) significant mutagenic activity was observed with all humic and fulvic acid samples. Comparisons of the specific mutagenic activity of the chlorinated products suggests that the commercial material might provide a useful model for studying health hazards associated with disinfection reactions by-products.

L'activité mutagène n'est trouvée lorsque il n'y a pas de traitement de la solution aqueuse contenant des acides humiques, du plus, la formation des composés mutagènes n'a lieu que lorsque le milieu est acide.

Meier, J. R., R. D. Lingg, and R. J. Bull. 1983. Formation of Mutagens Following Chlorination of Humic Acid A Model for Mutagen Formation during Drinking Water Treatment. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 118 (1): 25–41.

Aqueous chlorination of humic acids results in the formation of compounds with direct-acting mutagenic activity in the Ames/Salmonella plate assay for tester strains TA98, TA100, TA1535, TA1537 and TA1538. The addition of a rat-liver microsomal fraction (S9) plus cofactors causes a substantial decrease of activity, the extent of which is tester strain dependent. The non-chlorinated humic acids are not mutagenic either in the presence or absence of S9. Formation of mutagenic activity and of total organic halogen (TOX) is linearly related to humic concentration in the range of 0.2–1.6 mg/ml total organic carbon (TOC), and to chlorine concentration in the range of 0.1–1.0 chlorine equivalents per mole of carbon. The mutagenic activity is due predominantly to non-volatile compounds. Mutagenic activity is also detectable, after sample concentration by lyophilization, upon chlorination at a humic acid level of 0.02 mg/ml TOC. The specific mutagenic activities (per mg TOX), and also the degree of chlorine incorporation into humic acid, at 0.02 mg/ml TOC are similar to those present after chlorination at 1 mg/ml TOC. Production of mutagens is greatly dependent on the chlorination pH, with a pattern of decreasing mutagenic activity with increasing pH. This order of activity can be at least partially explained by the alkali lability of the compounds. Chlorination of commercial humic acids is proposed as a model for examination of mutagen formation during water chlorination.

Les mécanismes entraînant la formation de composés mutagènes est difficile à comprendre. Le traitement au chlore des acides humiques est une des principales explications de la formation de ces composés.

Meier, John R., H. Paul Ringhand, W. Emile Coleman, Jean W. Munch, Robert P. Streicher, William H. Kaylor, and Kathy M. Schenck. 1985. Identification of Mutagenic Compounds Formed during Chlorination of Humic Acid. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 157 (2): 111–22.

Abstract: Humic acid chlorination products are being studied in an effort to identify the chemicals responsible for the mutagenicity formed during water chlorination. In the present report, 19 chlorinated organic compounds have been identified and quantified in ether extracts of chlorinated humic acid solutions. 10 of these compounds, including a number of chlorinated propanones and chlorinated propenals, are direct-acting mutagens in the Salmonella/microsome mutagenicity assay. The position of the chlorine substituent has been found to be an important factor in the mutagenic activity of these two classes of compounds. The total mutagenicity of the compounds identified thus far, when tested either individually or as a composite, accounts for only 7–8% of the total TA100 mutagenicity, and less than 2% of the TA98 mutagenicity formed during humic acid chlorination. The addition of bromide to the humic acid chlorination reaction results in up to a 2-fold increase in the level of mutagenicity formed.

Conclusion: although a number of mutagenic chemicals have been identified in chlorinated humic acid solutions, the large majority of the mutagenic activity remains uncharacterized. The characterization of the mutagenicity appears to be limited by problems in the analytical methodologies. Efforts aimed at isolation and derivatization of the responsible mutagens should help resolve the problems. The examination of humic acid chlorination by-products still appears to be a viable approach to the identification of the compounds responsible for the mutagenicity of chlorinated drinking water. Once such identifications are made, an evaluation of the potential health risks posed by the presence of these compounds in drinking water can be undertaken.

Une concentration de ratio 1:1 de carbone et chlore, à hauteur de 75mg/l dans l'eau de boisson de souris exposées pendant 2 ans montrent une augmentation significative du nombre de leucémie, un ratio a 1:0,3 n'entraîne pas d'activité cancérogène.

Van Duuren, B L, S Melchionne, I Seidman, and M A Pereira. 1986. Chronic Bioassays of Chlorinated Humic Acids in B6C3F1 Mice. *Environmental Health Perspectives* 69 : 109–17.

Humic acids (Fluka), chlorinated to carbon:chlorine (C:Cl) ratios of 1:1 and 1:0.3, were administered to B6C3F1 mice, 50 males and 50 females per group, in the drinking water at a total organic carbon (TOC) level of 0.5 g/L. The mice were 6 to 8 weeks old at the beginning of the bioassays. The doses used were based on short-term (8 weeks) evaluations for toxicity, palatability, and weight gain. The chronic bioassays included the following control groups: unchlorinated humic acids (0.5 g/L), no-treatment (100 males and 100 females), dibromoethane (DBE, 2.0 mM in drinking water; positive control) and 0.44% sodium chloride in drinking water, i.e., at the same concentration as those receiving chlorinated humic acids. The chlorinated humic acids were prepared freshly and chemically assayed once per week. All chemicals were, with the exception of DBE, administered for 24 months; DBE was administered for 18 months. The volumes of solutions consumed were measured once weekly. All treatment groups showed normal weight gain except the DBE group. At the completion of exposure, the animals were sacrificed and necropsied, and tissue sections were taken for histopathology. No markedly significant increases in tumor incidences were evident in any of the organs and tissues examined in the chlorinated humic acid groups compared to unchlorinated humic acids and the no-treatment control groups. DBE caused the expected high incidence of squamous carcinomas of the forestomach. The chlorinated humic acids

tested contained direct-acting alkylating agents, based on their reactivity with p-nitrobenzylpyridine (PNBP), and showed mutagenic activity in *S. typhimurium*.

L'eau des rivières présentent des teneurs différentes en substances humiques d'origine naturelle ou humaine, cette teneur dépend du type de sol que traverse la rivière, certaines d'entre elles présentent donc des taux importants qui augmente l'activité cancérigène des substances humiques traitées au chlore.

Watt, B. E., R. L. Malcolm, M. H. B. Hayes, N. W. E. Clark, and J. K. Chipman. 1996. Chemistry and Potential Mutagenicity of Humic Substances in Waters from Different Watersheds in Britain and Ireland. *Water Research* 30 (6): 1502–16.

Humic substances are amorphous organic macromolecules responsible for the hue of natural waters. They are also known to be precursors of mutagens formed on chlorination prior to distribution of drinking water. In this study humic substances from the waters of primary streams, from major rivers, and from reservoirs were isolated and fractionated into humic acids (HA), fulvic acids (FA) and XAD-4 acids using columns of XAD-8 and of XAD-4 resins in tandem, and the fractions from the different sources were chlorinated and assayed for mutagenicity. CPMAS ¹³C NMR spectroscopy showed marked differences in compositions not only between HA, FA, and XAD-4 acids from the same water samples, but also between the same fractions from water samples from different watersheds. There were found to be strong similarities between the fractions from watersheds which had closely related soil types. Aromaticity was greatest in HAs, and lowest in XAD-4 acids, and carboxyl contents and aliphatic character were greatest in the XAD-4 acids. Carbon content decreased in the order HA > FA > XAD-4 acids, and amino acids and neutral sugars contents decreased in the order HA > XAD-4 > FA. Titration data complemented aspects of the NMR data, demonstrating that carboxyl content decreased in the order XAD-4 acids > FA > HA, and indicated that phenolic character was highest in HAs and lowest in the XAD-4 acids. All samples tested gave rise to bacterial mutagens on chlorination. Although the mutagenicities were of the same order of magnitude for the chlorinated humic samples from the different sources, the samples which showed the greatest number of revertant bacterial colonies were from the Thames and Trent, large rivers with humic materials from diverse environments, and relatively high in amino acid contents.

Conclusion §8 : La Leonardite et les substances humiques qu'elle contient présentent des effets bénéfiques sur les organismes non-cibles lorsque les doses sont faibles.

Toutefois, la présence d'acides humiques peut se révéler problématique après désinfection des eaux usées au chlore.

9. Conclusion générale sur le respect de l'éligibilité de la substance pour l'approbation en tant que substance naturelle à usage biostimulant

Ce dossier est soumis pour supporter la demande d'agrément de la Leonardite en tant que SNUB.

La Leonardite n'est pas une substance préoccupante, elle est communément utilisée et les substances humiques qui la composent sont présents en grande quantité dans l'environnement.

La Leonardite est vendue en tant que matière fertilisante, et peut être achetée sous forme de poudre diluable dans l'eau ou utilisable directement, elle ne nécessite donc pas de procédé non accessible à tout utilisateur final. Son efficacité est démontrée, sa capacité à améliorer la rétention des nutriments et de l'eau par le sol en fait une substance biostimulante.

La Leonardite pure ne présente pas d'effet indésirable immédiat ou à long terme sur la santé humaine ou animale. La substance ne présente pas de toxicité intrinsèque mais peut se révéler problématique en cas de désinfection au chlore, ou lors de contamination par des métaux lourds. Toutefois, des effets bénéfiques sur la santé et la croissance ont été reportés.

Au regard de toutes ces informations, la Leonardite peut être approuvée en tant que Substance Naturelle à Usage Biostimulant.

10. Bibliographie

Les dossiers d'homologations sont pour des substances biostimulantes, ont donc été choisis comme critères de pertinence le fait que l'article scientifique traite de :

- utilisation de la leonardite sur une plante cultivée
- mesure de la réponse d'une plante cultivée à l'application de la leonardite

De plus, les dossiers comportant une partie concernant la toxicité de la substance évaluée, d'autres critères de pertinences furent fixés :

- mesure de la teneur en élément toxique de la leonardite
- évaluation de l'effet de la leonardite sur une fonction physiologique d'un vertébré

Nous avons choisi le webofscience car celui-ci est le plus exhaustif possible en termes de quantité d'articles scientifiques. De plus, le format du document exporté est un excel facilitant le travail car contenant beaucoup d'informations sur l'article.

Les mots clefs concernant la substance furent recherchés dans le moteur de recherche du webofscience, un export fut réalisé à partir du résultat de la recherche, puis les articles furent triés selon les critères énoncés plus hauts.

Les articles exclus sont surlignés en jaune et la raison de leur exclusion est la non-conformité à l'un des critères de pertinence

La liste des articles scientifiques pertinents concernant la leonardite se trouve dans un document annexe Microsoft Excel.

11. ANNEXE I – Liste des sources sur lequel s'appuie le dossier

Sont incluses ici toutes les sources (études et rapports d'évaluation) citées dans les différents chapitres de la demande

Auteurs	Année	Titre Source Entreprise, rapport N° GLP ou GEP statut Publié ou non
SECTION 1 : Objet de la candidature		

Auteurs	Année	Titre Source Entreprise, rapport N° GLP ou GEP statut Publié ou non
SECTION 2 : Identité de la substance/produit disponible sur le marché et principaux usages		
Ryen Caenn, H.C.H. Darley, George R. Gray	2017	Titre : Chapter 13 - Drilling Fluid Components, Composition and Properties of Drilling and Completion Fluids (Seventh Edition). Source : <i>Gulf Professional Publishing</i>
Damian, Gianina Elena, Valer Micle, and Ioana Monica Sur	2019	Titre : Mobilization of Cu and Pb from Multi-Metal Contaminated Soils by Dissolved Humic Substances Extracted from Leonardite and Factors Affecting the Process. Source : <i>Journal of Soils and Sediments</i> 19 (7): 2889–81
Murbach, Timothy S., Róbert Glávits, John R. Endres, Amy E. Clewell, Gábor Hirka, Adél Vértesi, Erzsébet Béres, and Ilona Pasics Szakonyiné	2020	Titre : A Toxicological Evaluation of a Fulvic and Humic Acids Preparation Source : <i>Toxicology Reports</i> 7 : 1242–54.
Weimin Cheng, Jiao Xue, Jun Xie, Orcid, Gang Zhou, and Wen Nie	2017	Titre : A Model of Lignite Macromolecular Structures and Its Effect on the Wettability of Coal: A Case Study Source : <i>Energy Fuels</i> , 31, 12, 13834–13841
Fakoussa, R. & Hofrichter, Martin.	1999	Titre : Biotechnology and microbiology of coal degradation Source : <i>Applied microbiology and biotechnology</i>
Products, Leonardite.	2021	Titre : Primary and specialty processing, Services. Source : https://www.leonarditeproducts.com/Mining Accessed 27 May 2021.

Conselvan, Giovanni & Pizzeghello, Diego & Francioso, Ornella & Foggia, Michele & Nardi, Serenella & Carletti, Paolo	2017	Titre : Biostimulant activity of humic substances extracted from leonardites Source : <i>Plant and Soil</i> . 420
Canieren, Omer, Cengiz Karaguzel, and Ahmet Aydin.	2017	Titre : Effect of Physical Pre-Enrichment on Humic Substance Recovery from Leonardite. Source : <i>Physicochemical Problems of Mineral Processing</i> ; ISSN 2084-4735.
EC	2019	Titre : COMMISSION REGULATION (EU) 2019/1869 of 7 November 2019 amending and correcting Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for certain undesirable substances in animal feed Source : EU
EC	2002	Titre : Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council relating to fertilizers Source : EU
Chanyut Ratanaprommanee, Kawiporn Chinachanta, Fapailin Chaiwan, Arawan Shutsrirung	2018	Titre : Chemical characterization of leonardite and its potential use as soil conditioner and plant growth enhancement Source : <i>Asia-Pacific Journal of Science and Technology</i> ; Volume: 22. Issue: 04
Akinremi, O. & Janzen, H. & Lemke, Reynald & Lamey, Francis	2000	Titre : Response of canola, wheat, and green beans to leonardite additions Source : <i>Canadian Journal of Soil Science</i> . 80. 437-443.
Ali, Ece & Saltali, Kadir & Nurhan, Eryigit & Fatma, Uysal	2007	Titre : The Effects of Leonardite applications on Climbing Bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Yield and the Some Soil Properties. Source : <i>Journal of Agronomy</i> . 6.
Sariyildiz, Temel	2020	Titre : Effects of Leonardite and Mineral Fertilizer Applications on Plant Growth and Soil Quality of Garlic (<i>Allium sativum</i> L.). Source : <i>Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology</i> . 8. 1763-1772.

Auteurs	Année	Titre Source Entreprise, rapport N° GLP ou GEP statut Publié ou non
SECTION 3 : Usages biostimulants de la substance et de ses produits		
Akimbekov, Nuraly, Xiaohui Qiao, Ilya Digel, Gulzhamal	2020	Titre: The Effect of Leonardite-Derived Amendments on Soil Microbiome Structure and Potato Yield

Abdieva, Perizat Ualieva, and Azhar Zhubanova		Source: <i>Agriculture</i> 10 (5): 147.
Akinremi, O. O., H. H. Janzen, R. L. Lemke, and F. J. Lamey.	2011	Titre: Response of Canola, Wheat and Green Beans to Leonardite Additions. Source: <i>Canadian Journal of Soil Science</i> 80 (3): 437–43.
Ali, E.F.; Al-Yasi, H.M.; Issa, A.A.; Hessini, K.; Hassan, F.A.S.	2022	Titre: Ginger Extract and Fulvic Acid Foliar Applications as Novel Practical Approaches to Improve the Growth and Productivity of Damask Rose. Source: <i>Plants</i> , 11 (): pp. 412. https://doi.org/10.3390/plants11030412
ANSES	2011	Titre: AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'extension d'usage de l'homologation du produit HUMIFIRST de la société TRADECORP SA Source: Agence nationales de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Boldt-Burisch Katja, Steffi Schillem, Bernd Uwe Schneider Reinhard F. Hüttl	2022	Titre: The effect of nitrogen-modified lignite granules on mycorrhization and root and shoot growth of <i>Secale cereale</i> (winter rye) in a nutrient-deficient, sandy soil. Source: <i>Archives of Agronomy and Soil Science</i> , 68 (8): pp. 1117-1130. https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1889724
Canellas Luciano P., Fábio L. Olivares, Natália O. Aguiar, Davey L. Jones, Antonio Nebbioso, Pierluigi Mazzei, Alessandro Piccolo.	2015	Titre: Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. Source: <i>Scientia Horticulturae</i> , 196: pp. 15-27. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013
Conselvan Giovanni Battista, Diego Pizzeghello, Ornella Francioso, Michele Di Foggia, Serenella Nardi, Paolo Carletti	2017	Titre: Biostimulant activity of humic substances extracted from leonardites. Source: <i>Plant Soil</i> , 420 (): 119–134. DOI 10.1007/s11104-017-3373-z
Elrys Ahmed S., Ahmed I.E. Abdo, Enas M.W. Abdel-Hamed, El-Sayed M. Desoky	2020	Titre: Integrative application of licorice root extract or lipoic acid with fulvic acid improves wheat production and defenses under salt stress conditions. Source: <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> , 190: pp. 110144. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110144
Kaya, Cengiz, Mehmet Şenbayram, Nudrat Aisha Akram, Muhammed Ashraf, Mohammed Nasser Alyemeni, and Parvaiz Ahmad.	2020	Titre: Sulfur-Enriched Leonardite and Humic Acid Soil Amendments Enhance Tolerance to Drought and Phosphorus Deficiency Stress in Maize (<i>Zea Mays</i> L.). Source: <i>Scientific Reports</i> 10 (1): 6432.
Schobert, Harold.	2017	Titre: Introduction to Low-Rank Coals: Types, Resources, and Current Utilization. <i>Low-Rank Coals for Power Generation</i>

		Source: <i>Fuel and Chemical Production</i> , 3–21. Woodhead Publishing
Saengwilai, Patompong, Weeradej Meeinkuir, Theerawut Phusantisampan, and John Pichtel	2020	Titre: Immobilization of Cadmium in Contaminated Soil Using Organic Amendments and Its Effects on Rice Growth Performance Source: <i>Exposure and Health</i> 12 (2): 295–306.
Sarıyıldız, Temel Turkish Journal of Agriculture	2020	Titre: Effects of Leonardite and Mineral Fertilizer Applications on Plant Growth and Soil Quality of Garlic (<i>Allium Sativum</i> L.). Source: <i>Food Science and Technology</i> 8 (8): 1763–72.
Elena, Aguirre, Leménager Diane, Bacaicoa Eva, Fuentes Marta, Baigorri Roberto, Angel Ma Zamarreño, and José Ma García-Mina	2009	Titre: The Root Application of a Purified Leonardite Humic Acid Modifies the Transcriptional Regulation of the Main Physiological Root Responses to Fe Deficiency in Fe-Sufficient Cucumber Plants Source: <i>Plant Physiology and Biochemistry</i> 47 (3): 215–23.
Khattak, R. A., K. Haroon, and D. Muhammad	2013	Titre: Mechanism(s) of Humic Acid Induced Beneficial Effects in Salt-Affected Soils. Source: <i>Scientific Research and Essays</i> 8 (21): 932–39
Hatami, Elnaz, Ali Akbar Shokouhian, Ali Reza Ghanbari, and Lof Ali Naseri	2018	Titre: Alleviating Salt Stress in Almond Rootstocks Using of Humic Acid. Source: <i>Scientia Horticulturae</i> 237 (July): 296–302.
Kamran Atif, Muhammad Mushtaq, Muhammad Arif, Saima Rashid	2023	Titre: Role of biostimulants (ascorbic acid and fulvic acid) to synergize Rhizobium activity in pea (<i>Pisum sativum</i> L. var. Meteor). Source: <i>Plant Physiology and Biochemistry</i> , 196: pp. 688-682. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.02.018
Kaya, C., N. A. Akram, M. Ashraf, and O. Sonmez	2018	Titre: Exogenous Application of Humic Acid Mitigates Salinity Stress in Maize (<i>Zea Mays</i> L.) Plants by Improving Some Key Physico-Biochemical Attributes. Source : <i>Cereal Research Communications</i> 46 (1): 67–78.
Khaleda, Laila, Hee Jin Park, Dae-Jin Yun, Jong-Rok Jeon, Min Gab Kim, Joon-Yung Cha, and Woe-Yeon Kim.	2017	Titre: Humic Acid Confers HIGH-AFFINITY K ⁺ TRANSPORTER 1-Mediated Salinity Stress Tolerance in <i>Arabidopsis</i> Source: <i>Molecules and Cells</i> 40 (12): 966–75.
Murbach, Timothy S., Róbert Glávits, John R. Endres, Amy E. Clewell, Gábor Hirka, Adél Vértési, Erzsébet Béres, and Ilona Pasics Szakonyiné.	2020	Titre: A Toxicological Evaluation of a Fulvic and Humic Acids Preparation Source: <i>Toxicology Reports</i> 7: 1242–54.

Auteurs	Année	Titre
---------	-------	-------

		Source Entreprise, rapport N° GLP ou GEP statut Publié ou non
SECTION 4: Classification et étiquetage de la substance		
ECHA	2021	Titre : Humic acids and fulvic acids extracted from leonardite, reaction product with formaldehyde, potassium hydrogen sulfite, sodium hydrogen sulfite and potassium hydroxide, Classifications – Inventaire CL. ECHA Source : ECHA Europa
ECHA	2021	Titre: Summary of Classification and Labelling Source: ECHA Europa

Auteurs	Année	Titre Source Entreprise, rapport N° GLP ou GEP statut Publié ou non
SECTION 5 : Impacte sur la santé humaine et animale		
EMEA	1999	Titre: COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS, HUMIC ACIDS AND THEIR SODIUM SALTS, SUMMARY REPORT Source: The European Agency for the Evaluation of Medicinal products
Bernacchi, Francesca, Isabella Ponzanelli, Maria Minunni, Anita Falezza, Nicola Loprieno, and Roberto Barale.	1996	Titre: In Vivo Cytogenetic Effects of Natural Humic Acid Source: <i>Mutagenesis</i> 11 (5): 467–89.
Marova, I., J. Kucerik, K. Duronova, A. Mikulcova, and Z. Vlckova	2011	Titre: Antimutagenic and/or Genotoxic Effects of Processed Humic Acids as Tested upon <i>S. Cerevisiae</i> D7 Source : <i>Environmental Chemistry Letters</i> 9 (2): 229–33.
ANSES	2011	Titre : AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'extension d'usage de l'homologation du produit HUMIFIRST de la société TRADECORP SA Source : Agence nationales de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Ferrara, G., E. Loffredo, N. Senesi, and R. Marcos	2006	Titre: Humic Acids Reduce the Genotoxicity of Mitomycin C in the Human Lymphoblastoid Cell Line TK6. Mutation Source: <i>Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis</i> 603 (1): 27–32.

Hseu, You-Cheng, Ssu-Ching Chen, Ya-Lai Chen, Jing-Yi Chen, Mei-Ling Lee, Fung-Jou Lu, Fang-Yang Wu, Jim-Shoung Lai, and Hsin-Ling Yang	2008	Titre: Humic Acid Induced Genotoxicity in Human Peripheral Blood Lymphocytes Using Comet and Sister Chromatid Exchange Assay. Source: <i>Journal of Hazardous Materials</i> 153 (1): 784–91.
Gustavino Bianca, Annamaria Buschini, Monica Monfrinotti, Marco Rizzoni, Lorenzo Tancioni, Paola Poli, and Carlo Rossi.	2005	Titre: Modulating Effects of Humic Acids on Genotoxicity Induced by Water Disinfectants in <i>Cyprinus Carpio</i> Source: <i>Mutation Research</i> 587 (1–2): 103–13.
Corsaro, Alessandro, Claudio Anselmi, Maurizio Polano, A Aceto, Tullio Florio, and Maria Nobili...	2010	Titre: The Interaction of Humic Substances with the Human Prion Protein Fragment 90-231 Affects Its Protease K Resistance and Cell Internalization Source: <i>Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents</i> 24 (January): 27–39.
Ausavasukhi, Arjit, Chonhawan Kamposoen, and Oatchara Kengnok	2016	Titre: Adsorption Characteristics of Congo Red on Carbonized Leonardite. Source: <i>Journal of Cleaner Production, Special Volume: Green and Sustainable Innovation for Cleaner Production in the Asia-Pacific Region</i> , 134 : 506–14.
Dell'Anno, Matteo, Monika Hejna, Stefania Sotira, Valentina Caprarulo, Serena Reggi, Roberto Pilu, Francesco Miragoli, Maria Luisa Callegari, Sara Panseri, and Luciana Rossi	2020	Titre: Evaluation of Leonardite as a Feed Additive on Lipid Metabolism and Growth of Weaned Piglets Source: <i>Animal Feed Science and Technology</i> 266 : 114519..
Helal, Aly A., G. A. Murad, and A. A. Helal.	2011	Titre: Characterization of Different Humic Materials by Various Analytical Techniques Source: <i>Arabian Journal of Chemistry</i> 4 (1): 51–54.
Simsek, Yunus Emre, and Levent Degirmenci..	2018	Titre: Effect of Atmosphere and Temperature Treatment on Leonardite for Increasing Humic Acid Yield Source: <i>Journal of the Geological Society of India</i> 92 (2): 209–14.
Van Rensburg, C E; J; Snyman, J R; Mokoele, T; Cromarty, A D	2007	Titre: Brown Coal Derived Humate Inhibits Contact Hypersensitivity; An Efficacy, Toxicity and Teratogenicity Study in Rats Source: <i>Inflammation</i> , Vol. 30, No. 5
Lu, F. J.	1990	Titre: Blackfoot Disease: Arsenic or Humic Acid? Source: <i>The Lancet</i> 336 (8707): 115–16.
Murbach, Timothy S., Róbert Glávits, John R. Endres, Amy E. Clewell, Gábor	2020	Titre: A Toxicological Evaluation of a Fulvic and Humic Acids Preparation Source: <i>Toxicology Reports</i> 7 : 1242–54.

Hirka, Adél Vértesi, Erzsébet Béres, and Ilona Pasics Szakonyiné...		
Ueno, Hitoshi, Toshiharu Segawa, Katsuhiko Nakamuro, Yasuyoshi Sayato, and Shoji Okada.	1989	Titre : Mutagenicity and Identification of Products Formed by Aqueous Ozonation of Humic Acids of Different Origins Source: <i>Chemosphere</i> 19 (12): 1843–52.
Rodrigues, Alexandrina, Antonio Brito, Peter Janknecht, Maria Fernanda Proenca, and Regina Nogueira	2009	Titre : Quantification of Humic Acids in Surface Water: Effects of Divalent Cations, PH, and Filtration Source: <i>J. Environ. Monit</i> 11, 377–382
Trckova, Martina, Alena Lorencova, Vladimir Babak, Jiri Neca, and Miroslav Ciganek.	2018	Titre : The Effect of Leonardite and Lignite on the Health of Weaned Piglets Source: <i>Research in Veterinary Science</i> 119 : 134–42.
Klöcking, Renate, Helbig Björn.	2005	Titre : Medical Aspects and Application of Humic Substances Source : Biopolymers for Medical and Pharmaceutical Applications. Edited by A. Steinbüchel and R.H. Marchessault. Wiley-VCH.
Yasar, S., A. Gokcimen, I. Altuntas, Z. Yonden, and E. Petekkaya...	2002	Titre : Performance and Ileal Histomorphology of Rats Treated with Humic Acid Preparations Source: <i>Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition</i> 86 (7–8): 257–64.
Khan, Md Shaiful, Islam, K. M. S. Islam, A. Schuhmacher, and J. M. Gropp.	2005	Titre : Humic Acid Substances in Animal Agriculture Source : <i>Pakistan Journal of Nutrition</i> 4 (3): 126-134
Vetvicka, Vaclav, Roberto Baigorri, Angel Zamarreño, Jose Garcia-Mina, and Jean-Claude Yvin	2010	Titre : Glucan and Humic Acid: Synergistic Effects on the Immune System. Source: <i>Journal of Medicinal Food</i> 13 : 863–69.
P.N. Linnik, T.A. Vasilchuk	2002	Titre : Role of Humic Substances in the Complexation and Detoxification of Heavy Metals: Case Study of the Dnieper Reservoirs Source : Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice. Edited by Irina V. Perminova, Kirk Hatfield, Norbert Hertkom

Auteurs	Année	Titre Source Entreprise, rapport N° GLP ou GEP statut Publié ou non
SECTION 6 : Résidus		

ANSES	2011	Titre : AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'extension d'usage de l'homologation du produit HUMIFIRST de la société TRADECORP SA Source : Agence nationales de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
EGTOP	2011	Titre: Final Report On Feed, Source: EGTOP/1/2011

Auteurs	Année	Titre Source Entreprise, rapport N° GLP ou GEP statut Publié ou non
SECTION 7 : Devenir et comportement dans l'environnement		
ANSES	2011	Titre : AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'extension d'usage de l'homologation du produit HUMIFIRST de la société TRADECORP SA Source : Agence nationales de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Grinhut, Tzafirir, Yitzhak Hadar, et Yona Chen	2007	Titre: .Degradation and Transformation of Humic Substances by Saprotrophic Fungi: Processes and Mechanisms. Source: Fungal Biology Reviews 21 (4): 179-89.
Lipczynska-Kochany, Ewa.	2018	Titre : Effect of Climate Change on Humic Substances and Associated Impacts on the Quality of Surface Water and Groundwater: A Review Source: <i>Science of The Total Environment</i> 640–641 : 1548–65.
Paul, E. A., R. F. Follett, S. W. Leavitt, A. Halvorson, G. A. Peterson, et D. J. Lyon..	1997	Titre: Radiocarbon Dating for Determination of Soil Organic Matter Pool Sizes and Dynamics. Source: Soil Science Society of America Journal 61 (4): 1058-67.
Rodrigues, Alexandrina, Antonio Brito, Peter Janknecht, Maria Fernanda Proenca, and Regina Nogueira	2009	Titre : Quantification of Humic Acids in Surface Water: Effects of Divalent Cations, PH, and Filtration Source: <i>J. Environ. Monit</i> 11, 377–382

Trevisan, Sara, Omella Francioso, Silvia Quaggiotti, et Serenella Nard	2010	Titre: Humic substances biological activity at the plant-soil interface Source: <i>Plant Signaling & Behavior</i> 5 (8): 635-43.
--	------	---

Auteurs	Année	Titre Source Entreprise, rapport N° GLP ou GEP statut Publié ou non
SECTION 8 : Effets sur les organismes non-cibles		
EMEA	1999	Titre: COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS, HUMIC ACIDS AND THEIR SODIUM SALTS, SUMMARY REPORT Source: The European Agency for the Evaluation of Medicinal products
Lieke Thora, Thomas Meinelt, Seyed Hossein Hoseinifar, Bo Pan, David L. Straus, and Christian E. W. Steinberg.	2020	Titre : Sustainable Aquaculture Requires Environmental-Friendly Treatment Strategies for Fish Diseases Source: <i>Reviews in Aquaculture</i> 12 (2): 943–65.
Steinberg, Christian E. W., Thomas Meinelt, Kurt Schreckenbach, Klaus Knopf, Andreas Wienke, and Angelika Stüber.	2004	Titre: Humic Substances Affect Physiological Condition and Sex Ratio of Swordtail (<i>Xiphophorus Helleri</i> Heckel) Source: <i>Aquatic Sciences - Research Across Boundaries</i> 66 (2): 239–45.
Suhett, Albert L., Christian E. W. Steinberg, Jayme M. Santangelo, Reinaldo L. Bozelli, and Vinicius F. Farjalla.	2011	Titre : Dissolved Humic Substances Increase the Lifespan and Promote Transgenerational Resistance to Salt Stress in the Cladoceran <i>Moina</i> <i>Macrocopa</i> . Source: <i>Natural Environmental Science and Pollution Research</i> 18 (6): 1004–14.
Fierro-Coronado, Jesús A., Carlos Angulo, Arturo Rubio-Castro, Antonio Luna-González, Carlos J. Cáceres-Martínez, Cesar A. Ruiz-Verdugo, Píndaro Álvarez-Ruiz, Ruth Escamilla-Montes, Héctor A. González-Ocampo, and Genaro Diarte-Plata..	2018	Titre : Dietary Fulvic Acid Effects on Survival and Expression of Immune-Related Genes in <i>Litopenaeus Vannamei</i> Challenged with <i>Vibrio Parahaemolyticus</i> . Source: <i>Aquaculture Research</i> 49 (9): 3218–27.

Gao, Yang, Jie He, Zhuliu He, Zhiwei Li, Bo Zhao, Yi Mu, Jeong-Yeol Lee, and Zhangjie Chu	2017	Titre : Effects of Fulvic Acid on Growth Performance and Intestinal Health of Juvenile Loach <i>Paramisgurnus dabryanus</i> (Sauvage). Source : <i>Fish & Shellfish Immunology</i> 62 : 47–56.
Meinelt, Thomas, Kurt Schreckenbach, Michael Pietrock, Stefan Heidrich, and Christian E. W. Steinberg.	2008	Titre : Humic Substances: Part 1: Dissolved Humic Substances (HS) in Aquaculture and Ornamental Fish Breeding. Source : <i>Environmental Science and Pollution Research</i> 15 (1): 17.
Yamin, G., R. Falk, R. R. Avtalion, N. Shoshana, T. Ofek, R. Smimov, G. Rubenstein, and J. van Rijn.	2017	Titre : The Protective Effect of Humic-Rich Substances on Atypical <i>Aeromonas salmonicida</i> Subsp. <i>salmonicida</i> Infection in Common Carp (<i>Cyprinus Carpio</i> L.). Source : <i>Journal of Fish Diseases</i> 40 (12): 1783–90.
Kodama, Hiroshi, Denso, and Tsuyoshi Nakagawa.	2007	Titre : Protection against Atypical <i>Aeromonas salmonicida</i> Infection in Carp (<i>Cyprinus Carpio</i> L.) by Oral Administration of Humus Extract. Source : <i>Journal of Veterinary Medical Science</i> 69 (4): 405–8.
Tunç, Muhammet Ali, Mahir Murat Cengiz, Kemal Yazici, and Metin Turan.. <i>Uludağ Arıcılık Dergisi</i> 20 (2): 181–88.	2020	Titre : THE EFFECTS OF SUPPLEMENTAL FEEDING WITH SODIUM HUMATE ON THE PERFORMANCE OF HONEY BEE COLONIES (<i>Apis Mellifera</i> L.). Source : <i>Uludağ Arıcılık Dergisi</i> 20 (2): 181–88.
Akimbekov, Nuraly, Xiaohui Qiao, Ilya Digel, Gulzhamal Abdieva, Perizat Ualieva, and Azhar Zhubanova	2020	Titre : The Effect of Leonardite-Derived Amendments on Soil Microbiome Structure and Potato Yield Source: <i>Agriculture</i> 10 (5): 147
Puglisi, Edoardo, George Fragoulis, Patrizia Ricciuti, Fabrizio Cappa, Riccardo Spaccini, Alessandro Piccolo, Marco Trevisan, and Carmine Crecchio.	2009	Titre: Effects of a Humic Acid and Its Size-Fractions on the Bacterial Community of Soil Rhizosphere under Maize (<i>Zea Mays</i> L.). Source : <i>Chemosphere</i> 77 (6): 829–37.
Bull, R. J., M. Robinson, J. R. Meier, and J. Stober	1982	Titre : Use of Biological Assay Systems to Assess the Relative Carcinogenic Hazards of Disinfection By-Products.

		Source : <i>Environmental Health Perspectives</i> 46 : 215–27.
Kringstad, K. P., P. O. Ljungquist, F. De Sousa, and L. M. Stroemberg	1983	Titre : On the Formation of Mutagens in the Chlorination of Humic Acid. Source : <i>Environmental Science & Technology</i> 17 (9): 553–55.
Meier, J. R., R. D. Lingg, and R. J. Bull	1983	Titre : Formation of Mutagens Following Chlorination of Humic Acid A Model for Mutagen Formation during Drinking Water Treatment. Source : <i>Mutation Research/Genetic Toxicology</i> 118 (1): 25–41.
Meier, John R., H. Paul Ringhand, W. Emile Coleman, Jean W. Munch, Robert P. Streicher, William H. Kaylor, and Kathy M. Schenck.	1985	Titre : Identification of Mutagenic Compounds Formed during Chlorination of Humic Acid. Source : <i>Mutation Research/Genetic Toxicology</i> 157 (2): 111–22.
Van Duuren, B L, S Melchionne, I Seidman, and M A Pereira.	1986	Titre : Chronic Bioassays of Chlorinated Humic Acids in B6C3F1 Mice. Source : <i>Environmental Health Perspectives</i> 69 : 109–17.
Watt, B. E., R. L. Malcolm, M. H. B. Hayes, N. W. E. Clark, and J. K. Chipman.	1996	Titre : Chemistry and Potential Mutagenicity of Humic Substances in Waters from Different Watersheds in Britain and Ireland Source : <i>Water Research</i> 30 (6): 1502–16.
Dell'Anno, Matteo, Monika Hejna, Stefania Sotira, Valentina Caprarulo, Serena Reggi, Roberto Pilu, Francesco Miragoli, Maria Luisa Callegari, Sara Panseri, and Luciana Rossi	2020	Titre: Evaluation of Leonardite as a Feed Additive on Lipid Metabolism and Growth of Weaned Piglets Source: <i>Animal Feed Science and Technology</i> 266 : 114519..
El - Zahi, E. S., and Madeha E. H. El - Dewy.	2018	Titre: Field Efficiency of Humic Substances, Boric Acid and Some Novel Insecticides against <i>Aphis Gossypii</i> Glover and <i>Bemisia Tabaci</i> (Gennadius) on Cotton Source: <i>Plants. Journal of Plant Protection and Pathology</i> 9 (5): 301–7.

Auteurs	Année	Titre Source Entreprise, rapport N° GLP ou GEP statut
---------	-------	--

		Publié ou non
SECTION 9 : Conclusion générale		

		Titre Source Entreprise, rapport N° GLP ou GEP statut Publié ou non
Auteurs	Année	
SECTION 10 : Bibliographie		
		Titre : Source :

Appendice

Attaché au modèle de candidature, en appendice toutes les sources présentes en annexe 1 (liste des sources) doivent être rassemblées et soumises en complément du fichier de candidature Substance Naturelle à Usage Biostimulant. Les études doivent être soumises lorsque cela est possible.

Table de commentaires Anses
Léonardite

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

1/30

Section 1 – Objet de la demande

Commentaires de l'ANSES : dossier SNUB soumis par l'ITAB, Léonardite.

1. Objet de la demande

General			
No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
1(1)			
1(2)			
1(3)			

<<pas de commentaire>>.

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

2/30

Section 2 – Identité de la substance/produit disponible sur le marché et principaux usages

2. Identité de la substance/produit disponible sur le marché et principaux usages

2.1. Principaux usages en dehors de la biostimulation végétale

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
2(1)			
2(2)			
2(3)			

<<pas de commentaire>>

2.2. Identité et propriété chimique de la substance et du produit destiné à l'usage

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
2(4)		La substance étant une substance naturelle extraite des sols, la variabilité de composition (notamment les teneurs en contaminants) est très dépendante de lieu d'extraction et de l'historique du sol.	Un profil de composition commun à l'ensemble des sources de Léonardite ne peut être établi

2.3. Nom de la substance, du produit, tel qu'elle se trouve sur le marché

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
2(5)		Des techniques analytiques ont été proposées pour analyser la phase cristalline (Rayons X) / et les composées majoritaires (Fluorescence). Les techniques proposées semblent être pertinentes au vu la composition de la léonardite.	
2(6)			

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

3/30

Section 2 – Identité de la substance/produit disponible sur le marché et principaux usages

2.4. Producteur de la substance, du produit

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
2(7)		Trois sites de production de la substance (léonardite) ont été présentés, issus de trois pays différents dans le dossier.	En absence d'information suffisante sur la composition des sources de Léonardite (profil de contaminants et teneur maximales en contaminants) et sur la représentativité des sources, il n'est pas possible d'établir un profil de composition commun pour les sources de Léonardite.

2.5. Type de préparation de la substance, du produit

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
2(8)		Les formes sous laquelle la léonardite est disponible dans le commerce n'est pas précisée. La substance telle que revendiquée est une poudre dispersable. La granulométrie de la poudre n'est pas définie.	Les formes sous laquelle la Léonardite est disponible dans le commerce sont manquantes

2.6. Description de la préparation du produit destiné à l'usage biostimulant

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
2(9)		Pour les préparations liquides : La nature et la qualité de l'eau utilisée pour préparer la solution de léonardite n'est pas précisée.	La nature et la qualité de l'eau doit être en accord avec le règlement (CE) 852/2004.
2(10)		Pour les préparations liquides : Aucune vérification de la stabilité du produit au stockage n'est proposée dans le dossier pour les préparations liquides.	Lors du stockage de la préparation liquide, une contamination par des micro-organismes ne peut être exclue. Par conséquent, la préparation liquide doit

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

4/30

Section 2 – Identité de la substance/produit disponible sur le marché et principaux usages

2.6. Description de la préparation du produit destiné à l'usage biostimulant

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
2(11)		Pour les préparations solides: Il est indiqué qu'avant utilisation, il est nécessaire de moudre la léonardite via des procédés mécaniques.	être appliquée dans les 24 heures suivant la fin de sa préparation. La description des types de procédés mécaniques qui peuvent être utilisés pour réduire la léonardite à l'état de poudre est manquante. Ces procédés doivent être accessibles à tout utilisateur final.

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

5/30

Section 3 – Usages biostimulants de la substance et de ses produits

3. Usages biostimulants de la substance et de ses produits

3.1 Domaine d'utilisation

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
3(1)			
3(2)			
3(3)			

<<pas de commentaire>>

3.2 Biostimulation au niveau de la plantes (incluant le mode d'action)

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
3(4)			
3(5)			
3(6)			

<< >> Non évalué (en accord avec la réglementation applicable)

3.3 Utilité dans le cadre de la biostimulation végétale

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
3(7)			
3(8)			
3(9)			

<< >> Non évalué (en accord avec la réglementation applicable)

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

6/30

Section 3 – Usages biostimulants de la substance et de ses produits

3.4 Sommaire des intentions d'usages (tableau des usages)

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
3(10)			
3(11)			
3(12)			

<<pas de commentaire>>

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

7/30

Section 4 – Classification et étiquetage de la substance

4. Classification et étiquetage de la substance

4. Classification et étiquetage de la substance

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
4(1)	-	<p>Le demandeur indique que la léonardite n'est pas classée pour l'environnement.</p> <p>Dans le dossier technique, des données relatives à la biodégradabilité facile de la léonardite et des données de toxicité aiguë pour le poisson sont présentées par le demandeur. Ces informations sont extraites à partir du site de l'ECHA (date d'extraction : 13 avril 2021).</p> <p>L'Anses souligne que des données additionnelles de toxicité aquatique pour d'autres taxons sont également disponibles sur le site de l'ECHA (12/06/2023), mais ne sont pas prises en compte par le demandeur.</p> <p>Par ailleurs, l'argumentaire du demandeur reposant sur le niveau d'exposition des organismes non-cibles pour déterminer le classement de la léonardite n'est pas accepté pour caractériser le danger.</p> <p>L'Anses indique qu'un classement harmonisé au niveau européen selon le règlement (CE) n° 1272/2008 (base de données consultée le 12/06/2023) n'est pas disponible pour la léonardite (CAS n° 940-742-0). Une notification sur 1 ne propose pas de classement de la léonardite.</p> <p>Sur la base des informations transmises, aucun classement aigu pour le poisson (CL50-96h / NOEC > 128 mg/L) n'est attendu pour la léonardite.</p> <p>La léonardite n'est pas classée pour la toxicité aiguë en ce qui concerne l'environnement. Les données fournies sont insuffisantes pour proposer un classement chronique pour l'environnement. Pour déterminer le classement de la léonardite, des données de toxicité aquatique pour trois niveaux trophiques et des données de toxicité chronique sont requises.</p>	<p>La léonardite n'est pas classé en aigu pour l'environnement.</p> <p>Les données de toxicité aquatique pour la léonardite sont insuffisantes pour déterminer un classement chronique pour l'environnement.</p> <p>Des données de toxicité aquatique chronique pour trois niveaux trophiques auraient dû être fournies.</p>

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

8/30

Section 4 – Classification et étiquetage de la substance

4. Classification et étiquetage de la substance

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
4(2)	-	Le demandeur indique que les principaux constituants de la léonardite : la lignite (CAS n° 129521-88-0), l'acide fulvique (CAS n° 479-88-3) et l'acide humique (CAS n° 1415-93-8), ne sont pas classés pour l'environnement. Un classement harmonisé au niveau européen pour l'environnement selon le règlement (CE) n° 1272/2008 (base de données consultée le 12/08/2023) n'est pas disponible pour ces constituants majeurs.	Les données de toxicité aquatique pour les principaux constituants de la léonardite sont insuffisantes pour déterminer par calcul le classement aigu et chronique pour l'environnement pour la léonardite. Voir réponse au point 4(1)
4(3)	-	Le règlement d'exécution (UE) 2019/2164 a été fourni dans la partie 7 du dossier de soumission mais n'a pas été utilisé par le demandeur dans le dossier technique. Le règlement indique que la léonardite est inscrite en tant qu'engrais, amendements du sol et nutriments (règlement d'exécution (UE) 2019/2164 de la Commission du 17 décembre 2019 ; Article 3, paragraphe 1, et à l'article 8 quinquies, paragraphe 2 du règlement (CE) n° 834/2007).	-

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

9/30

Section 5 – Impact sur la santé humaine et animale

5. Impact sur la santé humaine et animale

5.1. Toxicité			
No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
5(1)	5.1.6 Toxicité reproductive	La toxicité reproductive n'était pas l'objectif principal de l'étude fournie pour cet endpoint. Même si l'étude soumise indique une absence de reprotoxicité, les résultats sont jugés insuffisants pour permettre de conclure.	
5(2)	5.1.7 Neurotoxicité	Les études fournies portent sur les réactions de complexation que peut avoir la léonardite et ne permettent pas de conclure sur une absence de neurotoxicité.	
5.2. Valeurs toxicologiques de référence : DJA, ArfD, AOEL			
No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
5(3)		La valeur retenue pour l'AOEL n'est pas estimée. La valeur retenue pour la NOAEL n'est pas commentée dans la mesure où différentes valeurs ont été proposées via différentes études.	
5.3. Exposition à la substance et à ses impuretés			
No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés lors de la phase de commentaires
5(4)	5.3.3 Comparaison de l'exposition liée à l'usage et l'exposition de fond.	Une estimation de l'exposition de l'opérateur a été présentée. Or, elle n'a pas été réalisée selon le modèle en vigueur (Efsa, 2014). De plus, le fichier de calcul n'a pas été fourni. L'AOEL proposée pour cette estimation n'est pas justifiée et n'a pas été présentée par ailleurs. La valeur d'absorption cutanée retenue (100%) n'est pas justifiée.	

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

10/30

Section 5 – Impact sur la santé humaine et animale

5.4. Impacte sur la santé humaine et animale provenant de la substance ou de ses impuretés

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
5(5)			
5(6)			
5(7)			

<<pas de commentaire>>

5.5. Autres informations au sujet des propriétés thérapeutiques ou allégations liées à la santé

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
5(8)			
5(9)			
5(10)			

<<pas de commentaire>>

5.6. Autres informations au sujet des usages liées à l'alimentation

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
5(11)			
5(12)			
5(13)			

<<pas de commentaire>>

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

11/30

Section 6 – Résidus

6. Résidus

6. Résidus

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
0(1)		La provenance de la léonardite doit être renseignée et des éléments attestant l'absence de contamination de celle-ci n'ont pas été fournis. Ces informations sont essentielles compte tenu de la faculté de complexation des constituants de la léonardite (en particulier les acides humiques) avec des contaminants cationiques	
0(2)		La qualité des eaux employées pour préparer la solution de léonardite n'est pas précisée.	En lien avec les recommandations formulées dans le cadre du cahier des charges des préparations SNUB, il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que l'eau utilisée ne soit pas contaminée (éléments traces métalliques, polluants organiques, hydrocarbures, micro-organismes pathogènes, ...) et ne présente donc pas de risques pour la santé humaine

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

12/30

Section 7 – Devenir et comportement dans l'environnement

7. Devenir et comportement dans l'environnement

7.1 Devenir et comportement dans l'environnement

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
7(1)	Général	Une revue bibliographique sur la léonardite et ses principaux constituants a été fournie par le demandeur. Cependant, la méthodologie suivie pour conduire la recherche bibliographique n'est pas suffisamment explicitée dans le dossier technique, en particulier les mots-clés, la période de recherche, la syntaxe de la requête, et le nombre de résultats (total et sélectionnés). Une recherche bibliographique mise à jour et sa synthèse conduite selon les recommandations du document guide l'EFSA (2011) devrait être proposée.	Une recherche bibliographique mise à jour et sa synthèse conduite selon les recommandations du document guide l'EFSA (2011) auraient dû être proposée sur la léonardite et ses principaux constituants. Voir également Point 8(1).
7(2)	Général	Pour la majorité des références, seul le résumé présenté par les auteurs de l'article est reporté dans le dossier technique. Une présentation plus méthodique des articles aurait dû être soumise comprenant systématiquement un résumé détaillé présentant les résultats majeurs des études.	-
7(3)	7.1 Devenir et comportement dans l'environnement	Sur la base des informations bibliographiques transmises, les substances dites humiques sont naturellement présentes dans l'environnement (EGTOP, 2011) et sont considérées comme persistantes dans le sol (temps de demi-vie > 1000 ans ; Grinhut <i>et al.</i> , 2007). Une accumulation dans le sol ne peut être exclue pour la léonardite et ses principaux constituants.	La persistance de la léonardite dans le sol devrait être prise en compte pour l'évaluation du risque des organismes non-cibles.
7(4)	7.1 Devenir et comportement dans l'environnement	La potentielle persistance de la léonardite et des substances dites humiques dans le milieu aquatique n'a pas été renseignée par le demandeur. L'Anses indique que des données d'hydrolyse en milieu aqueux à 25°C et aux valeurs de pH de 4, 7 et 9 montrent que la léonardite est stable dans ses conditions (DT ₅₀ estimée > 1 an) (site de l'ECHA ; date d'extraction : 13 avril 2021 ; https://echa.europa.eu/fr/registration-dossier/-/registered-dossier/16516/5/2/3). Ces dernières informations n'ont pas été fournies par le demandeur.	Des données sur la persistance/dégradation de la léonardite et ses principaux constituants dans les milieux aquatiques auraient dû être fournies.
7(5)	7.1 Devenir et comportement dans l'environnement	Le rapport de l'EGTOP (2011) n'identifie pas d'alerte pour l'environnement pour les substances humiques utilisées comme additif alimentaire. Toutefois, les auteurs Lipczynska-Kochany <i>et al.</i> (2018) mentionnent qu'une contamination des eaux de surface liée au ruissellement et des eaux souterraines par lessivage est possible pour les	Une exposition des organismes non-cibles aquatiques à la léonardite et à ses principaux constituants ne peut être exclue suite à l'application de la

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

13/30

Section 7 – Devenir et comportement dans l'environnement

7.1 Devenir et comportement dans l'environnement

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
		substances humiques. Aussi, une exposition des organismes non-cibles aquatiques à la léonardite et aux substances dites humiques ne peut être exclue suite à l'application de la substance naturelle à usage biostimulant. Par ailleurs, la présence de substances humiques dans les eaux peut affecter la qualité des eaux traitées destinées à la consommation des eaux de boisson (voir Partie 8.7 ci-dessous). De plus, leur présence dans l'environnement pourrait impacter indirectement le climat.	substance naturelle à usage biostimulant. voir Point 7 (9).

7.2 Estimation de l'exposition aiguë et à long terme des substrats environnementaux d'intérêt (sol, nappes phréatiques, eaux de surfaces)

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
7(6)	7.2.2 Exposition de fond à la substance, dues à d'autres raisons	Une estimation de la concentration en acides humiques dans les eaux de surface sur la base la concentration en matière organique naturelle dans les eaux a été proposée par le demandeur. Il indique que la concentration en matière organique naturelle dans les eaux varie entre 0,1 et 20 mg/L et que ces valeurs sont extrapolables aux substances humiques. Cependant, ces données proviennent d'informations générales présentées dans l'introduction de l'article (Rodrigues, 2009) et dont leur origine n'est pas indiquée. L'occurrence naturelle des eaux de surface en matière organique et en substances humiques ne peut être retenue pour conduire l'évaluation du risque pour l'environnement et les organismes non-cibles. Par ailleurs, l'article de Rodrigues (2009) concerne le développement d'une méthode analytique pour la quantification des acides humiques dans les eaux et ne donne pas d'information sur les concentrations en léonardite et/substances humiques dans les cours d'eau en France.	Des données supplémentaires sur la concentration naturelle dans les eaux de surface en léonardite et en substances humiques auraient dû être fournies.
7(7)	7.2.3 Comparaison de l'exposition liée à l'usage et l'exposition de fond	Une estimation de l'occurrence naturelle en substances humiques dans le sol est proposée par le demandeur à partir d'un faible nombre de données. Le demandeur fait l'hypothèse que 80% de la matière organique du sol est composée de substances humiques. Cependant, les auteurs Lipczynska-Kochany (2018) estiment que les substances humiques représentent 70% de la matière organique du sol. Par ailleurs, le demandeur estime que les sols contiennent de 1 à 5% de matière organique, mais il ne justifie ces valeurs par aucune	Des données supplémentaires sur la concentration naturelle dans les sols en léonardite et en substances humiques auraient dû être fournies.

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

14/30

Section 7 – Devenir et comportement dans l'environnement

7.2 Estimation de l'exposition aiguë et à long terme des substrats environnementaux d'intérêt (sol, nappes phréatiques, eaux de surfaces)

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
7(8)	7.2.3 Comparaison de l'exposition liée à l'usage et l'exposition de fond	<p>source bibliographique.</p> <p>A partir de ces hypothèses, le demandeur estime que les sols contiennent entre 800 et 3000 mg substances humiques par kg de sol.</p> <p>Les niveaux d'exposition pour le sol n'ont pas été calculés par le demandeur en considérant des hypothèses appropriées. Les niveaux auraient dû être calculés en considérant une densité de sol de 1,5 g/cm³, une profondeur de sol de 5 cm (sans incorporation) et sans interception par la culture (apport au sol) au lieu de 1,3 g/cm³, 100 cm et 5%. Les niveaux d'exposition proposés par le demandeur ne sont pas retenus pour conduire l'évaluation du risque pour les organismes non-cibles.</p> <p>En considérant ces hypothèses et la dose d'apport maximale de 4,5 kg léonardite/ha, la concentration attendue dans le sol (PECsol) est de 8 mg/kg suite à l'apport de la substance naturelle léonardite au lieu de 0,329 mg/kg comme estimée par le demandeur. Cette valeur de PECsol est 100 fois plus faible que la valeur basse du bruit de fond naturel estimée en substances humiques dans le sol. Ceci est valable pour l'apport de la léonardite sous forme solide ou liquide.</p> <p>Une accumulation dans le sol des substances dites humiques et de la léonardite ne peut être exclue, mais leur persistance n'a pas été prise en compte par le demandeur dans les calculs d'exposition. Des calculs d'exposition complémentaires sont requis pour le plein champ et sous-abri à l'exception des serres permanentes hors sol.</p> <p>Pour l'apport sous serre permanente en culture hors-sol, une exposition des organismes non-cibles n'est pas attendue. Aucun niveau d'exposition n'est nécessaire pour cet usage.</p>	<p>Les niveaux d'exposition pour le sol doivent être mis à jour et comparés au niveau naturel en léonardite et en substances humiques dans le sol.</p> <p>Voir également le Point 7(7).</p> <p>Pour l'usage sous serre permanente en culture hors-sol, une exposition des organismes non-cibles terrestres n'est pas attendue.</p>
7(9)	7.2.3 Comparaison de l'exposition liée à l'usage et l'exposition de fond	<p>Pour les applications au champ, une exposition des organismes non-cibles aquatiques liée à la dérive de pulvérisation, au ruissellement et au drainage ne peut être exclue. Les voies de contamination liées au drainage et ruissellement n'ont pas été prises en compte par le demandeur bien qu'elles sont identifiées à partir de la bibliographie proposée (Lipczynska-Kochany, 2018).</p> <p>Les niveaux d'exposition liée à la dérive de pulvérisation (2,77%) pour une application sur cultures basses sont correctement calculés.</p>	<p>Les niveaux d'exposition pour le compartiment eau devraient être calculés pour l'ensemble des voies de contamination des eaux de surface. De plus, ces niveaux d'exposition devraient être comparés au niveau naturel en léonardite et/ou en substances humiques dans l'eau et</p>

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

15/30

Section 7 – Devenir et comportement dans l'environnement

7.2 Estimation de l'exposition aiguë et à long terme des substrats environnementaux d'intérêt (sol, nappes phréatiques, eaux de surfaces)

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
		<p>Pour l'apport de la léonardite sous forme de poudre, la dérive n'est pas considérée comme une voie majeure de contamination pour les applications au champ et sous abri.</p> <p>Pour l'apport sous serre permanente en culture hors-sol, une exposition des organismes non-cibles n'est pas attendue. Aucun niveau d'exposition n'est nécessaire pour cet usage.</p>	<p>aux valeurs écotoxicologiques de référence.</p> <p>Pour l'usage sous serre permanente en culture hors-sol, une exposition des organismes non-cibles aquatiques n'est pas attendue.</p> <p>voir Point 7(6)</p>

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

16/30

Section 8 – Effets sur les organismes non cibles

8. Effets sur les organismes non cibles

8. Effets sur les organismes non-cibles

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
8(1)	Général	<p>Une revue bibliographique sur la léonardite et ses principaux constituants a été fournie par le demandeur. Cependant, la méthodologie suivie pour conduire la recherche bibliographique n'est pas suffisamment explicitée dans le dossier technique, en particulier les mots-clés, la période de recherche, la syntaxe de la requête et le nombre de résultats (total et sélectionnés).</p> <p>Une recherche bibliographique conduite selon les recommandations du document guide l'EFSA (2011), ainsi que sa synthèse, devraient être proposées.</p> <p>De plus, des articles pertinents sont cités dans des publications soumises (voir Points 8(11) et 8(12)) mais n'ont pas été inclus dans le dossier technique par le demandeur. Ces études auraient dû être incluses pour étayer les informations fournies.</p> <p>Suite à une recherche non exhaustive réalisée par l'Anses, des articles pertinents bien que récents sont identifiés mais non retrouvés dans la recherche bibliographique proposée par le demandeur. Par exemple, l'étude de récente Turan et Turgut (2020) sur les effets de la léonardite sur le poisson est absente de sa recherche bibliographique. <i>Turan F., and Turgut M. (2020), The Effect of Leonardite as Feed Additive on Growth of Goldfish (Carassius auratus L.), Natural and Engineering Sciences, 184 - 191, 27.11.2020</i></p> <p>Une recherche bibliographique mise à jour conduite selon les recommandations du document guide l'EFSA (2011), ainsi que sa synthèse, devraient être proposées pour obtenir suffisamment d'informations sur les effets non intentionnels de la léonardite et de ses principaux constituants sur les organismes non-cibles.</p>	<p>Une recherche bibliographique mise à jour conduite selon les recommandations du document guide l'EFSA (2011), ainsi que sa synthèse auraient dû être proposées pour obtenir suffisamment d'informations sur les effets non intentionnels de la léonardite et de ses principaux constituants sur les organismes non-cibles.</p>
8(2)	Général	<p>Pour la majorité des références, seul le résumé de l'article est reporté dans le dossier technique. Une présentation plus méthodique des articles aurait dû être soumise comprenant systématiquement un résumé détaillé présentant les résultats majeurs de l'étude.</p>	-
8(3)	Général	<p>Il convient de noter que les études renseignant les effets de la léonardite, des acides humiques et/ou des acides fulviques sur les organismes non-cibles font référence à des</p>	<p>Informations générales montrant l'utilisation possible de la léonardite,</p>

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

17/30

Section 8 – Effets sur les organismes non cibles

8. Effets sur les organismes non-cibles

No.	Référence au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
		<p>utilisations vétérinaires/pharmacologiques. L'Agence européenne pour l'évaluation des produits médicamenteux (1999) indique que les acides humiques sont utilisés pour traiter les chevaux, les ruminants, les porcs et les volailles à des doses d'administration orale entre 500 et 2000 mg/kg contre certains symptômes et pour de la lutte parasitaire. Par ailleurs, le rapport final de l'EGTOP (2011) conclut que les substances humiques ne peuvent pas être acceptées en tant qu'additifs alimentaires : <i>Their classification as feed material was not considered to be appropriate by the Group, which also noted their current designation as pharmacologically active substances with possible implications for animal health.</i></p> <p>Le demandeur précise que les effets thérapeutiques aux doses renseignées pour les organismes aquatiques et terrestres réfutent une éventuelle toxicité aux mêmes doses.</p> <p>L'Anses considère que ces études donnent des informations sur les usages thérapeutiques mais ne renseignent pas sur l'éventuelle toxicité de ces composés pour les organismes non-cibles aquatiques et terrestres. Les effets non intentionnels n'ont pas été reportés dans les études et il n'y pas d'information sur d'éventuelles relations dose-réponse.</p> <p>Voir également Points 8(4) à 8(7).</p>	<p>des acides humiques et/ou des acides fulviques sur les organismes non-cibles pour des utilisations à des fins vétérinaires/pharmacologiques (lutte contre des symptômes spécifiques).</p>
8(4)	Général	<p>Les auteurs Lieke <i>et al.</i> (2020) présentent une revue bibliographique non exhaustive sur l'intérêt de la léonardite en tant qu'alternative aux traitements thérapeutiques actuels. Les auteurs concluent que la structure des substances humiques est très diversifiée et que différentes substances humiques peuvent provoquer des effets contrastés.</p> <p>Il convient de noter que les articles soumis ont été conduits avec des acides humiques (EGTOP Expert Group for Technical Advice on Organic Production, 2011 ; El-Zahi <i>et al.</i>, 2018 ; Puglisi <i>et al.</i>, 2009), un extrait de substances humiques (référence citée dans Murbach <i>et al.</i>, 2020), des substances humiques (Lieke <i>et al.</i>, 2020 ; Suhett <i>et al.</i>, 2011 ; Yamin <i>et al.</i>, 2017 ; Akimbekov <i>et al.</i>, 2020), des substances humiques de synthèse (Steinberg <i>et al.</i>, 2004), des substances humiques dissoutes (Meinelt <i>et al.</i>, 2008) et solubles (Tunç <i>et al.</i>, 2020), des acides fulviques (Fierro-Coronado <i>et al.</i>, 2018 ; Gao <i>et al.</i>, 2017 ; El-Zahi <i>et al.</i>, 2018), un mélange d'acides humiques et fulviques naturels (Murbach</p>	<p>Les informations proposées par le demandeur sont insuffisantes pour confirmer l'extrapolation des données existantes à la léonardite et à ses principaux constituants présents dans le produit à usage biostimulant.</p>

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

18/30

Section 8 – Effets sur les organismes non cibles

8. Effets sur les organismes non-cibles

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
		<p><i>et al.</i>, 2020) et d'un extrait d'humus (Kodama <i>et al.</i>, 2007). La composition des composés testés n'est généralement pas renseignée. Le demandeur précise que la léonardite est composée d'acides humiques et fulviques à hauteur de 50 à 90%. Le reste étant des éléments constitutifs du sol, leur action et addition au sol ont un effet neutre et donc négligeable. Ainsi, seul l'effet des acides humiques et fulviques est étudié et leur activité peut être extrapolée à l'effet global de la léonardite.</p> <p>Il est à noter que d des articles pertinents sont cités dans des publications soumises mais n'ont pas été inclus dans le dossier technique par le demandeur. Ces études auraient dû être incluses pour étayer les informations fournies (par exemple Gutiérrez-Dagnino <i>et al.</i>, 2015; Islam <i>et al.</i>, 2005; Kunavue and Lien, 2012; Trckova <i>et al.</i>, 2005; Vucskits <i>et al.</i>, 2010 citées dans Fierro-Coronado <i>et al.</i>, 2018).</p> <p>Aussi, il est considéré que les informations proposées par le demandeur sont insuffisantes pour confirmer l'extrapolation des données existantes à la léonardite et aux substances humiques vu que la composition de la léonardite est variable et est liée à son origine d'extraction.</p>	

8.1. Effets sur les vertébrés terrestres

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
8(5)	8.1.1. Oiseaux Domínguez-Negrete <i>et al.</i> (2019)	<p>Les auteurs montrent qu'un extrait d'acides humiques, obtenus à partir d'un lombricomposteur, à une teneur de 0,25% dans la ration alimentaire des poulets, améliore leur croissance et limiterait le développement de pathogènes dans leurs intestins. Une copie de l'article de Domínguez-Negrete <i>et al.</i> (2019) n'a pas été fournie. Sur la base des informations disponibles dans le résumé de cette étude dans le dossier technique, il n'est pas possible d'estimer le niveau d'exposition en acides humiques des poulets nourris avec l'extrait.</p> <p>Une évaluation du risque pour les oiseaux n'a pas été conduite par le demandeur pour la condition d'emploi revendiquée.</p>	<p>Une évaluation du risque pour les oiseaux liée à l'utilisation de la substance naturelle léonardite pour les conditions d'emplois revendiquées aurait dû être fournie..</p>

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

19/30

Section 8 – Effets sur les organismes non cibles

8.1. Effets sur les vertébrés terrestres

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
8(6)	8.1.1. Oiseaux	<p>L'étude de Sanmiguel et Rondon (2016) citée dans l'étude de Tong <i>et al.</i> (2020) présentée dans la partie 8.3.1) auraient dû être également soumise et considérée dans la partie 8.1 du dossier technique. Une copie de l'étude de Sanmiguel et Rondon n'a pas été fournie.</p> <p><i>Sanmiguel, P., Rondon, B. (2016). Supplementation with humic substances affects the innate immunity in layer hens in postfasting phase. Rev MVZ Córdoba. 21(1): 5198-5210.</i></p>	
8(7)	8.1.2 Mammifères Murbach <i>et al.</i> , 2020 Dell'Anno <i>et al.</i> , 2020	<p>Les études soumises montrent que la léonardite améliore la santé des porcelets à une dose administrée de 0,25% de la ration alimentaire pendant 40 jours. Sur la base des informations disponibles dans l'article, il n'est pas possible d'estimer le niveau d'exposition en acides humiques des porcelets nourris avec la léonardite.</p> <p>Par ailleurs, les extraits d'acides fulviques et humiques (issus de la lignite) n'ont pas d'effets néfastes sur les rats à la dose de gavage de 2000 mg/kg poids corporel/ jour (NoAEL) pendant 90 jours. Des données de toxicité sur rats sont présentées dans la partie 5.</p> <p>Une évaluation du risque pour les mammifères n'a pas été conduite par le demandeur pour les conditions d'emplois revendiquées.</p>	Une évaluation du risque pour les mammifères liée à l'utilisation de la substance naturelle léonardite pour les conditions d'emplois revendiquées aurait dû être fournie.

8.2. Effets sur les organismes aquatiques

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
8(8)	Général	<p>L'ensemble des données de toxicité pour les organismes aquatiques (poisson, invertébrés aquatiques et algues) disponibles sur le site de l'ECHA n'ont pas été incluses par le demandeur. Ces données de toxicité devraient être présentées et utilisées pour conduire l'évaluation du risque pour les organismes non-cibles aquatiques.</p> <p>voir point 4(1).</p>	
8(9)	Lieke <i>et al.</i> , 2020, revue bibliographique	Les auteurs présentent une revue bibliographique non exhaustive sur l'intérêt de la léonardite en tant qu'alternative aux traitements thérapeutiques actuels.	-

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

20/30

Section 8 – Effets sur les organismes non cibles

8.2. Effets sur les organismes aquatiques

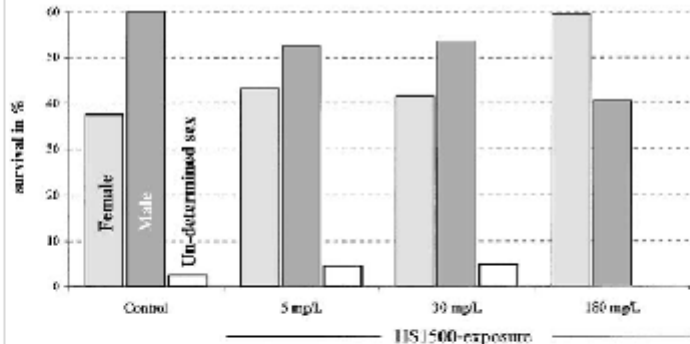
No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
8(10)	Meinelt <i>et al.</i> (2004)	<p>Meinelt <i>et al.</i> (2004) observent une prise de masse et une augmentation de la longueur du corps des poissons (<i>Xyphophorus helleri</i>) exposés pendant 21 semaines en conditions de laboratoire à des substances humiques de synthèse (HS1500) aux concentrations testées de 5, 30 et 180 mg/L en comparaison de celles des échantillons control. Les substances humiques stimulent le métabolisme des poissons. Par ailleurs, le nombre de poissons femelles augmente de 60% après 21 semaines d'exposition (modification du sexe ratio avec une effet dose-réponse). La mortalité observée est du même ordre de grandeur pour l'ensemble des modalités testées (12-20%).</p> <p>Figure extraite de l'article (Meinelt <i>et al.</i>, 2004) :</p>  <p>Figure 5. Sex ratio of <i>X. helleri</i> after 21-week exposure to HS1500 at different concentrations.</p>	<p>Des effets néfastes chez le poisson et les amphibiens ne peuvent être exclus. Des données supplémentaires auraient dû être fournies.</p>
		<p>Le demandeur indique que « la féminisation observée nécessite d'être confirmée car de nombreux paramètres environnementaux peuvent en être la cause, de plus, cet effet peut aussi être attribué au fait que les substances humiques soient des substances xénobiotiques et la présence de alkylphenols présents dans les substances humiques.</p>	

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

21/30

Section 8 – Effets sur les organismes non cibles

8.2. Effets sur les organismes aquatiques

No.	Référence au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
8(11)	Suhett <i>et al.</i> , 2011	<p>De plus, les doses testées dans cette étude sont plus faibles que celles utilisées dans le cadre des usages revendiqués, toutefois dans le cadre des organismes aquatiques, les doses appliquées sont diluées dans le milieu ».</p> <p>L'Anses indique toutefois que les concentrations d'exposition testées couvrent celles attendues dans l'eau de surface liées à la dérive de pulvérisation dans les conditions d'emploi revendiquées et non pas plus faibles comme indiqué par le demandeur.</p> <p>L'Anses conclut que des effets néfastes sur les poissons ne peuvent être exclus dans les conditions d'emploi revendiquées. Les auteurs indiquent que les alkylphénols sont connus pour causer de la féminisation chez les jeunes poissons mâles et les amphibiens via un mode d'action extrogénique. Les articles cités par les auteurs (Gimeno <i>et al.</i>, 1997; Nakamura <i>et al.</i>, 2002; Schwaiger <i>et al.</i>, 2002 ; Steinberg <i>et al.</i>, 2003) n'ont pas été inclus par le demandeur. Les auteurs concluent que des études supplémentaires devraient être conduites pour voir si un effet peut être observé chez d'autres espèces de poisson et chez les amphibiens.</p> <p><i>Gimeno, S., H. Komen, P. W. M. Venderbosch and T. Bowmer, 1997. Disruption of sexual differentiation in genetic male common carp (Cyprinus carpio) exposed to an alkylphenol during different life stages. Environ. Sci. Technol. 31, 10: 2884–2890</i></p> <p><i>Nakamura, M., H. Nagoya and T. Hirai, 2002. Nonylphenol induces complete feminization of the gonad in genetically controlled all-male amago salmon. Fisheries Science 68: 1387–1389.</i></p> <p><i>Schwaiger, J., U. Mallow, H. Ferling, S. Knoerr, T. Braunbeck, W. Kalbfus and R. D. Negele, 2002. How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) as a test organism. Aquat. Toxicol. 59: 177–189.</i></p> <p><i>Steinberg, C. E. W., A. Paul, S. Pflugmacher, T. Meinelt, R. Klöcking and C. Wiegand, 2003. Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals – A review. Fresen. Environ. Bull. 12, 5: 391–401.</i></p> <p>Les substances humiques ne présentent pas d'effets néfastes sur la longévité et la réponse au stress salin (5,5 g/L) chez <i>M. macocopa</i> jusqu'à une concentration de 20 mg carbone organique dissout /L.</p> <p>Le demandeur indique que « ces doses testées dans l'étude sont plus faibles que celles</p>	

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

22/30

Section 8 – Effets sur les organismes non cibles

8.2. Effets sur les organismes aquatiques

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
		<p>utilisées dans le cadre des usages revendiqués, toutefois dans le cadre des organismes aquatiques les doses appliquées sont diluées dans le milieu ». L'Anses indique toutefois que les concentrations d'exposition testées couvrent celles attendues dans l'eau de surface liées à la dérive de pulvérisation dans les conditions d'emploi revendiquées et non pas plus faibles comme indiqué par le demandeur.</p> <p>Les études suivantes citées par Suhett <i>et al.</i> (2011) auraient dû être prise en compte dans le dossier technique : par exemple, <i>Bouchnak R, Steinberg CEW (2010) Modulation of longevity in Daphnia magna by food quality and simultaneous exposure to dissolved humic substances. Limnologia 40:86–91</i> <i>Euent S, Menzel R, Steinberg CEW (2008) Gender-specific lifespan modulation in Daphnia magna by a dissolved humic substances preparation. Ann Env Sci 2:7–10</i> <i>Steinberg CEW, Vičentić L, Rauch R, Bouchnak R, Suhett AL, Menzel R (2010b) Exposure to humic material modulates life history traits of the cladocerans Moina macrocopa and M. micrura. Chem Ecol.</i></p>	
8(12)	Kodama <i>et al.</i> , 2007	<p>L'administration orale d'extrait d'humus à la carpe commune (<i>Cyprinus carpio</i> L.) induit un effet protecteur contre les infections avec <i>Aeromonas salmonicida</i>. Une diminution significative de la mortalité des carpes et du développement des lésions cutanées a été observée avec une alimentation enrichie en extrait d'humus à des teneurs de 1,5 et 10%. Cette étude montre que les substances humiques à une teneur de 10% de la ration alimentaire des carpes communes (<i>Cyprinus Carpio</i> L.) entraînent une réduction du parasitisme par <i>Aeromonas salmonicida</i>.</p> <p>Sur la base des informations disponibles dans l'article il n'est pas possible d'estimer le niveau d'exposition des poissons à l'extrait d'humus.</p>	-
8(13)	Fierro-Coronado <i>et al.</i> , 2018	<p>Les acides fulviques modulent la réponse immunitaire de <i>Litopenaeus vannamei</i> et augmentent le taux de survie par rapport à <i>V. parahaemolyticus</i>.</p> <p>Les crevettes sont nourries à des concentrations en acides fulviques comprises entre 1 et 6 g/kg de nourriture pendant 20 jours ou 8 jours à la concentration de 2g/kg (nourries tous les deux jours).</p> <p>Les effets sont observés dès 2 g par kg de nourriture, la dose de 6 g/kg ne présente pas de toxicité.</p> <p>Les études suivantes citées par Fierro-Coronado <i>et al.</i> auraient dû être prises en compte</p>	-

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

23/30

Section 8 – Effets sur les organismes non cibles

8.2. Effets sur les organismes aquatiques

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
		dans le dossier technique : par exemple, Gubiérrez-Dagnino <i>et al.</i> , 2015; Islam <i>et al.</i> , 2005; Kunavue & Lien, 2012; Meinelt <i>et al.</i> , 2004; Trokova <i>et al.</i> , 2005; Vuoskits <i>et al.</i> , 2010).	
8(14)	Gao <i>et al.</i> , 2017	Les acides fulviques (ajoutés en tant qu'additif alimentaire) ont un effet bénéfique sur la croissance et le système immunitaire des loches juvéniles <i>Paramisgurnus dabryanus</i> jusqu'à la teneur maximale testée de 2% de la ration alimentaire pendant 60 jours en conditions contrôlées de laboratoire.	-
8(15)	Menelt <i>et al.</i> , 2008 revue bibliographique	Le demandeur indique que les substances humiques dans l'environnement aquatique entre 50 et 90 mg/L semblent permettre un meilleur rétablissement après un stress et une réduction du parasitisme chez la truite arc en ciel. Ces doses testées sont plus faibles que celles utilisées dans le cadre des usages revendiqués, toutefois, dans le cadre des organismes aquatiques, les doses appliquées sont diluées dans le milieu. Toutefois, l'Anses spécifie que les études ayant conduit à cette conclusion sont citées dans la revue mais n'ont pas été soumises.	-
8(16)	Yamin <i>et al.</i> , 2017	Les milieux riches en composés humiques (eau et boues des systèmes de recirculation, acides humiques de synthèse, extraits de composés humiques issus de la léonardite) réduisent le taux d'infection vis-à-vis de <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>Salmonicida</i> chez <i>Cyprinus carpio</i> L. (respectivement de 14,9%, de 17,0% et de 18,8% comparés à un taux d'infection de 46,8% dans le contrôle), lorsque la concentration d'exposition dans le milieu à 20 mg/L et dans la nourriture à 20 g/kg. Ces doses testées sont plus faibles que celles utilisées dans le cadre des usages revendiqués, toutefois, dans le cadre des organismes aquatiques, les doses appliquées sont diluées dans le milieu. L'Anses indique que les concentrations d'exposition testées couvrent celles attendues dans l'eau de surface liées à la dérive de pulvérisation et non pas plus faibles comme indiqué par le demandeur.	-

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

24/30

Section 8 – Effets sur les organismes non cibles

8.3. Effets sur les abeilles et autres espèces d'arthropodes

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
8(17)	8.3.1. Effets sur les abeilles Tonç <i>et al.</i> (2020)	<p>Dans l'étude de Tonç <i>et al.</i> (2020), un effet néfaste des substances humiques (sels sodiques d'acide humique) solubles sur les abeilles ne peut être exclu. Le demandeur indique que les substances humiques solubilisées à l'aide de sodium en concentration variant de moins de 1 mg/L à 2,4 mg/L favorisent la production de miel par <i>Apis mellifera L.</i> jusqu'à une certaine dose où ils deviennent néfastes (8 mg/L dans le sirop nourricier). Ces doses sont inférieures à celles utilisées dans le cadre de l'usage revendiqué, toutefois concernant l'exposition dans le cadre de l'ingestion de la substance diluée dans le sirop nourricier. Certains facteurs liés aux conditions d'application et donc d'exposition réduisent les risques pour les abeilles. De plus, l'application est préconisée en amont de la mise en place de la culture, et donc en l'absence de végétation, la présence d'abeilles est donc limitée.</p> <p>L'Anses indique que les concentrations converties en mg/L par le demandeur ne peuvent être retrouvées à partir des données disponibles dans l'article.</p> <p>L'article indique que les abeilles ont été exposées pendant 8 semaines à 4 doses de sels sodiques d'acide humique (5 cc, 10 cc, 20 cc, 50 cc/L) qui ont été ajoutées à 1 L de sirop de sucrose. Les substances humiques représentaient 12% de l'item test (suspension liquide) et le produit testé a une densité relative de 1,12 kg/L.</p> <p>L'Anses indique qu'un effet néfaste sur les abeilles et autres pollinisateurs ne peut pas être exclu dans les conditions d'emploi revendiquées (concentration en léonardite dans la bouillie entre 2500 et 10000 mg/L).</p>	<p>Un effet néfaste sur les abeilles et autres pollinisateurs ne peut pas être exclu dans les conditions d'emploi revendiquées. Une mesure d'atténuation du risque devrait être proposée.</p> <p>Il conviendra de ne pas appliquer la léonardite en présence d'abeilles et autres pollinisateurs.</p>
8(18)	8.3.2. Effets sur les autres arthropodes	<p>El-Zahi <i>et al.</i> (2018) observent un effet néfaste des acides humiques et fulviques sur le puceron et l'aleurode. Le demandeur précise les acides humiques et fulviques ont une activité insecticide contre <i>A. gossypii</i> et <i>B. tabaci</i> à des concentrations de 2000 mg/L pour l'acide humique et 3498 mg/L pour les acides fulviques, les traitements sont réalisés sur les parties aériennes. Ces doses sont plus faibles que celles utilisées dans le cadre de l'usage revendiqué. Ce qui suggère une toxicité aux doses utilisées dans le cadre de l'usage revendiqué, toutefois l'application à lieu avant la mise en place de la culture et donc en l'absence d'insectes. Le demandeur propose que l'application soit réalisée au sol en l'absence de culture au champ et donc réduisant considérablement la présence d'éventuels arthropodes non cibles au champ.</p>	<p>L'Anses indique qu'un effet néfaste sur les arthropodes non-cibles du sol ne peut pas être exclu même en l'absence de culture.</p> <p>La mesure d'atténuation du risque proposée par le demandeur n'est suffisante pour protéger les arthropodes du sol.</p>

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

25/30

Section 8 – Effets sur les organismes non cibles

8.3. Effets sur les abeilles et autres espèces d'arthropodes

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
		<p>Les auteurs indiquent que le mode d'action par lequel les acides nutritifs causent une activité insecticide contre les insectes des plants de coton n'est pas connu.</p> <p>L'Anses indique qu'un effet néfaste sur les arthropodes non-cibles du sol ne peut pas être exclu même en l'absence de culture dans les conditions d'emploi revendiquées (concentrations en léonardite dans la bouillie varient entre 2500 et 10000 mg/L). La mesure d'atténuation n'est pas applicable car les arthropodes non-cibles du sol sont présents en absence de culture.</p>	

8.4. Effets sur lombrics et autres macro-organismes du sol

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
8(19)		<p>Aucune étude/information n'a été fournie. Toutefois, des études citées par dans l'article de Suhett <i>et al.</i> (2011 ; soumis dans la partie 8.2 du dossier technique) relatives aux effets des substances humiques sur les nématodes du sol auraient dues être incluses dans la partie 8.4 et prises en compte pour conduire l'évaluation du risque. Une copie de ces articles n'est pas disponible.</p> <p>A titre d'exemple, les articles suivants devraient être pris en compte dans le dossier technique :</p> <p><i>Pietsch K, Hofmann S, Henkel R, Saul N, Menzel R, Steinberg CEW (2010) The plant polyphenol caffeic acid affects life traits differently in the nematode Caenorhabditis elegans and the cladoceran Moina macrocopa. Fresenius Env Bull 19:1238–1244</i></p> <p><i>Saul N, Pietsch K, Menzel R, Steinberg CEW (2008) Quercetin-mediated longevity in Caenorhabditis elegans: is DAF-16 involved? Mech Ageing Dev 129(10):611–613</i></p> <p><i>Saul N, Pietsch K, Menzel R, Sturzenbaum SR, Steinberg CEW (2010) The longevity effect of tannic acid in Caenorhabditis elegans: disposable soma meets hormesis. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 65(6):626–635</i></p> <p><i>Menzel R, Sturzenbaum S, Barenwaldt A, Kulas J, Steinberg CEW (2005) Humic material induces behavioral and global transcriptional responses in the nematode Caenorhabditis elegans. Environ Sci Technol 39(21):8324–8332</i></p>	<p>Une mise à jour du dossier est nécessaire.</p>

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

26/30

Section 8 – Effets sur les organismes non cibles

8.4. Effets sur lombrics et autres macro-organismes du sol

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires

8.5. Effets sur les micro-organismes du sol

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
8(20)	Akimbekov <i>et al.</i> , 2020	Les auteurs indiquent que les amendements à base de léonardite acidifient significativement le sol en conditions sous serre. Toutefois, à la dose de 1,5 g/kg de sol, la léonardite n'a pas d'effet néfaste sur la structure des communautés microbiennes du sol. Ces apports sont supérieurs à ceux préconisés dans le cadre des usages revendiqués. L'Anses indique que la PECsol est de 6 mg/kg (voir Point 7(8)). Aucun effet significatif sur la communauté microbienne des sols n'est attendue dans les conditions d'emploi revendiquées.	-
8(21)	Puglisi <i>et al.</i> , 2009	L'application de substances humiques jusqu'à la concentration de 140 mg/kg de sol affecte les communautés bactériennes de la rhizosphère, et stimule leur activité. Ces apports sont supérieurs à ceux préconisés dans le cadre des usages revendiqués. L'Anses indique que la PECsol est de 6 mg/kg (voir Point 7(8)). Aucun effet significatif sur la communauté bactériennes de la rhizosphère n'est attendue dans les conditions d'emploi revendiquées.	-

8.6. Effets sur les autres organismes non-cibles (faune et flore)

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
8(22)		Aucune étude n'a été fournie. Le demandeur fait référence à un avis de l'ANSES sur un produit contenant des substances humiques.	Il n'est pas attendu d'effets néfastes pour les plantes terrestres pour les usages revendiqués.

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

27/30

Section 8 – Effets sur les organismes non cibles

8.7. Effets sur les méthodes biologiques de traitements des eaux usées

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
8(23)		voir point 7(5).	-

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

28/30

Section 9 – Conclusion générale sur le respect de l'éligibilité de la substance pour l'approbation en tant que substance naturelle à usage biostimulant

8.8. Conclusion générale des effets sur les organismes non-cibles

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
8(24)			
8(25)			
8(26)			

<<pas de commentaire>>.

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

29/30

Section 9 – Conclusion générale sur le respect de l'éligibilité de la substance pour l'approbation en tant que substance naturelle à usage biostimulant

9. Conclusion générale sur le respect de l'éligibilité de la substance pour l'approbation en tant que substance naturelle à usage biostimulant

No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
0(1)		<p>Les données présentées ne sont donc pas considérées suffisamment exhaustives pour caractériser l'ensemble des dangers liés à la léonardite, prenant en compte les différentes compositions et à la présence potentielle de contaminants et ne permettent donc pas de finaliser l'évaluation quantitative des risques pour la santé humaine et l'environnement</p> <p>L'Anses ne dispose pas d'éléments suffisants et pertinents pour caractériser la variabilité de composition de la léonardite et vérifier l'absence d'effet nocif sur la santé humaine, et sur l'environnement, notamment en l'absence des analyses démontrant que les teneurs en ETM et HAP et les critères microbiologiques relatifs aux micro-organismes pathogènes sont conformes à celles définies en annexe de l'arrêté du 1^{er} avril 2020.</p>	
0(2)		<p>Compte tenu de ces incertitudes, l'Anses ne recommande l'ajout de la léonardite à l'annexe de l'arrêté du 27 avril 2016 établissant à liste des substances naturelles à usage biostimulant (SNUB)</p>	

Table de commentaires dossier SNUB, Léonardite

30/30

Section 10 – Bibliographie

10. Bibliographie			
No.	Reference au dossier soumis par l'ITAB	Commentaires ANSES	Position scientifique de l'ANSES par rapport aux points soulevés dans les commentaires
10(1)			
10(2)			
10(3)			

<<pas de commentaire>>

ANNEXE 4

Revue de la littérature scientifique conduite par l'Anses portant sur les dangers et risques pour la santé humaine et pour l'environnement associés à l'usage de la léonardite en tant que SNUB

1. Objet

Cette annexe résume la méthodologie suivie par l'Anses pour conduire une recherche bibliographique sur la littérature scientifique portant sur les dangers et risques pour la santé humaine et pour l'environnement associés à l'usage de la léonardite en tant que SNUB. Elle ne constitue pas une synthèse bibliographique : son objectif se limite à vérifier le caractère exhaustif de la revue bibliographique fournie par l'ITAB.

2. Méthodologie

○ Identité

Nom commun de la substance et du produit, ainsi que leurs synonymes et nomenclature

Nom proposé : léonardite

Nom commun ISO (approuvé or proposé) : Ne s'applique pas

Synonyme : brown coal : lignite ; leonardite (Anglais) ; leonardit (Allemand) ; leonardita (Espagnol) ; leonardyt (Polonais) ; leonardiet (Néerlandais) ;

Nom chimique et numéro CAS, EC et CIPAC

Nom du produit : Lignite

N° CAS : 129521-66-0

N° EINECS 603-338-2

Principaux constituants actifs d'intérêt

1) Acide humique

IUPAC Name: Humic acid

CAS Number: 1415-93-6

EINECS: 215-809-6

2) Acide fulvique

IUPAC Name: 3,7,8-trihydroxy-3-methyl-10-oxo-1,4-dihydropyrano[4,3-b]chromene-9-carboxylic acid

CAS Number: 479-66-3

EINECS: -

○ Critères de sélection:

Article susceptible de contenir des informations sur :

- Effets sur la santé humaine et toxicologie

- Effets sur l'environnement et écotoxicologie
- Des teneurs en ETM, HAP ou autres polluants

La sélection a été conduite à partir des informations données dans le titre et le résumé. Elle est volontairement large et contient par conséquent des articles qui peuvent se révéler peu pertinents à la lecture du contenu.

- **Database:**
 - Scopus
- **Date :** 21/09/23 (absence de restriction dans le temps)

Tableau 1 : syntaxe des requêtes et nombre de publications identifiés ou sélectionnés

N°	Type de requête et syntaxe	Nombre de documents identifiés	Commentaires et nombre de documents sélectionnés
Toxicologie			
1	TITLE-ABS-KEY(Leonardite OR lignite OR Fulvic acid OR Humic Acid OR brown coal ; 129521-66-0) AND TITLE-ABS-KEY(tox*)	3159	
2	TITLE-ABS-KEY (leonardite OR lignite OR "Fulvic acid" OR "Humic Acid" OR "brown coal" OR 129521-66-0) AND TITLE-ABS-KEY (tox*) AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "PHAR") OR LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI") OR LIMIT-TO (SUBJAREA , "BIOC") OR LIMIT-TO (SUBJAREA , "HEAL"))	744	Recherche limitée aux domaines définis par Scopus pouvant recouvrir des études de toxicologie
3	TITLE-ABS-KEY (leonardite OR lignite OR "brown coal" OR 129521-66-0) AND TITLE-ABS-KEY (tox*) AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "PHAR") OR LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI") OR LIMIT-TO (SUBJAREA , "BIOC") OR LIMIT-TO (SUBJAREA , "HEAL"))	87	Exclusion dans les mots clés de fulvic acid et humic acid 11 articles sélectionnés comme pertinent (lecture titre/abstract)
Environnement, écotoxicologie			
	TITLE-ABS-KEY (leonardite OR lignite OR "Fulvic acid" OR "Humic Acid" OR "brown coal" OR 129521-66-0) AND TITLE-ABS-KEY (ecotox* OR bird* OR aquatic OR fish OR daphni* OR amphib* OR bee* OR vertebrat* OR mammal* OR	189	

	rat OR mouse OR mice OR rabbit OR arthropod* OR insect* OR worm*)		
	TITLE-ABS-KEY (leonardite OR lignite OR "brown coal" OR 129521-66-0) AND TITLE-ABS-KEY (ecotox* OR bird* OR aquatic OR fish OR daphni* OR amphib* OR bee* OR vertebrat* OR mammal* OR rat OR mouse OR mice OR rabbit OR -arthropod* OR insect* OR worm*)	57 (67 en ajoutant certaines publications identifiées dans la recherche tox)	Exclusion dans les mots clés de fulvic acid et humic acid 10 articles sélectionnés comme pertinent (lecture titre/abstract)

Une recherche complémentaire a été faite dans Scopus pour vérifier si des articles portaient spécifiquement sur les teneurs en métaux lourds.

Teneurs en en éléments traces métalliques

	TITLE-ABS-KEY (leonardite) AND TITLE-ABS-KEY(arsenic OR lead OR Cadmium OR Zinc or metal)	8	
--	---	---	--

Quelques articles de la recherche faite sur la toxicologie ont été ajoutés aux résultats obtenus pour chacune des requêtes (selon l'approche dite "snowball").

3. Résultats de la recherche

Listes des Références bibliographiques

Santé humaine

Alexakis, D., Gamvroula, D., 2014. Arsenic, chromium, and other potentially toxic elements in the rocks and sediments of oropos-kalamos basin, attica, Greece. *Applied and Environmental Soil Science* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/718534>

Clark, P.J., Zingaro, R.A., Irgolic, K.J., McInleyr, A.N., 1980. Arsenic and Selenium in Texas Lignite. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 7, 295–314. <https://doi.org/10.1080/03067318008071492>

Ikeda, M., Yamakawa, K., Saoo, K., Matsuda, Y., Hosokawa, K., Takeuchi, H., Li, J.-Q., Zeng, Y., Yokohira, M., Imaida, K., 2008. Induction of multiple granulomas in the liver with severe hepatocyte damage by montan wax, a natural food additive, in a 90-day toxicity study in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology* 46, 654–661. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.084>

Montano, D., 2014. Chemical and biological work-related risks across occupations in Europe: A review. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 9. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-9-28>

Murbach, T.S., Glávits, R., Endres, J.R., Clewell, A.E., Hirka, G., Vértési, A., Béres, E., Pasics Szakonyiné, I., 2020. A toxicological evaluation of a fulvic and humic acids preparation. *Toxicology Reports* 7, 1242–1254. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.030>

Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M., 2002. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: A review on aetiological causes and the

potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 19, 282–302. <https://doi.org/10.1080/02652030110079815>

Sekar, A., Varghese, G.K., Varma, R., 2023. Exposure to volatile organic compounds and associated health risk among workers in lignite mines. *International Journal of Environmental Science and Technology* 20, 4293–4306. <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04056-4>

Stiborová, M., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., 2016. Balkan endemic nephropathy: an update on its aetiology. *Archives of Toxicology* 90, 2595–2615. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1819-3>

Sycheva, D.G., Kosheleva, N.E., Timofeev, I.V., 2022. Contamination of soil cover with compounds of metals, arsenic and antimony in the area of impact of fuel and energy complex. *Theoretical and Applied Ecology* 48–55. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-2-048-055>

Tucker, J.D., Ong, T. -M., 1985. Induction of sister chromatid exchanges by coal dust and tobacco snuff extracts in human peripheral lymphocytes. *Environmental Mutagenesis* 7, 313–324. <https://doi.org/10.1002/em.2860070308>

Voice, T.C., McElmurry, S.P., Long, D.T., Dimitrov, P., Ganev, V.S., Peptropoulos, E.A., 2006. Evaluation of the hypothesis that Balkan endemic nephropathy is caused by drinking water exposure to contaminants leaching from Pliocene coal deposits. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 16, 515–524.

Environnement et écotoxicologie

Chmielewska, E., 2017. Multiversatile zeolite contribution in order to sustain the environment, in: *Ion Exchange: Theory and Applications*. pp. 185–214.

Glina, B., Kowalska, J.B., Łuczak, K., Mazurek, R., Spsychalski, W., 2021. Potentially toxic elements in fen peatland soils located near lignite-fired power plants in Central Poland. *Geoderma Regional* 25. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2021.e00370>

Kwiatkowska-Malina, J., Maciejewska, A., 2012. The effect of brown coal on the microbial activity in soils contaminated by heavy metals. *Soil Science Annual* 63, 39–42. <https://doi.org/10.2478/v10239-012-0010-7>

Meng, F., Huang, Q., Cai, Y., Yuan, G., Xiao, L., Han, F.X., 2022. Effect of humic acid derived from leonardite on the redistribution of uranium fractions in soil. *PeerJ* 10. <https://doi.org/10.7717/peerj.14162>

Meinelt, T., Schreckenbach, K., Knopf, K., Wienke, A., Stüber, A., Steinberg, C.E.W., 2004. Humic substances affect physiological condition and sex ratio of swordtail (*Xiphophorus helleri* Heckel). *Aquat. Sci.* 66, 239–245. <http://dx.doi.org/10.1007/s00027-004-0706-9>. Moreno, J.L., Ondoño, S., Torres, I., Bastida, F., 2017. Compost, leonardite, and zeolite impacts on soil microbial community under barley crops. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 17, 214–230. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017005000017>

Narayanasamy, P., 2019. Potential and futuristics of fly ash nanoparticle technology in pest control in agriculture and synthesis of chemical and herbal insecticides formulations, in: *Circular Economy and Fly Ash Management*. pp. 95–107. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0014-5_7

Pascual, J.A., Ayuso, M., Hernandez, T., Garcia, C., 1997. Phytotoxicity and fertilizer value of different organic materials. *Agrochimica* 41, 50–62.

Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M., 2002. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: A review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 19, 282–302. <https://doi.org/10.1080/02652030110079815>

Rohasliney, H., Jackson, D.C., 2008. Lignite mining and stream channelization influences on aquatic macroinvertebrate assemblages along the Natchez Trace Parkway, Mississippi, USA. *Hydrobiologia* 598, 149–162. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9147-5>

Schreck, P., 1998. Environmental impact of uncontrolled waste disposal in mining and industrial areas in Central Germany. *Environmental Geology* 35, 66–72. <https://doi.org/10.1007/s002540050293>

Teneurs en éléments traces métalliques

Antón-Herrero, R., Vega-Jara, L., García-Delgado, C., Mayans, B., Camacho-Arévalo, R., Moreno-Jiménez, E., Plaza, C., Eymar, E., 2022. Synergistic effects of biochar and biostimulants on nutrient and toxic element uptake by pepper in contaminated soils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 102, 167–174. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11343>

Damian, G.E., Micle, V., Sur, I.M., 2019. Mobilization of Cu and Pb from multi-metal contaminated soils by dissolved humic substances extracted from leonardite and factors affecting the process. *Journal of Soils and Sediments* 19, 2869–2881. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02291-w>

Dolphen, R., Thiravetyan, P., 2019. Reducing arsenic in rice grains by leonardite and arsenic-resistant endophytic bacteria. *Chemosphere* 223, 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.054>

Jarosz, R., Szerement, J., Mokrzycki, J., Marcińska-Mazur, L., Szara-Bąk, M., Mierzwa-Hersztek, M., 2023. Mobility of Lead in Soil after Application the Innovative Mineral-Organic Mixtures. Presented at the World Congress on Civil, Structural, and Environmental Engineering. <https://doi.org/10.11159/iceptp23.181>

Mierzwa-Hersztek, M., Klimkowicz-Pawlas, A., Jarosz, R., Biel, K., Marcińska-Mazur, L., Paluszewska, A., Gondek, K., Szara-Bąk, M., 2023. Effect of Mineral-Organic Mixtures on Ecotoxicity in Contaminated Soil. Presented at the World Congress on Civil, Structural, and Environmental Engineering. <https://doi.org/10.11159/iceptp23.183>

Olego, M.A., Cordero, J., Quiroga, M.J., Sánchez-García, M., Álvarez, J.C., Garzón-Jimeno, E., 2015. Effect of leonardite application on soil organic matter and micronutrient levels in an inceptisol soil cultivated with vine (*Vitis vinifera* L.). *ITEA Informacion Tecnica Economica Agraria* 111, 210–226. <https://doi.org/10.12706/itea.2015.014>

Saengwilai, P., Meeinkuir, W., 2021. Cadmium (Cd) and zinc (Zn) accumulation by Thai rice varieties and health risk assessment in a Cd–Zn co-contaminated paddy field: Effect of soil amendments. *Environmental Geochemistry and Health* 43, 3659–3674. <https://doi.org/10.1007/s10653-021-00858-6>

Wolny-Koładka, K., Jarosz, R., Juda, M., Mierzwa-Hersztek, M., 2022. Distinct Changes in Abundance of Culturable Microbial Community and Respiration Activities in Response to Mineral–Organic Mixture Application in Contaminated Soil. *Sustainability (Switzerland)* 14. <https://doi.org/10.3390/su142215004>

La revue de la littérature scientifique conduite par l'agence portant sur les dangers et risques pour la santé humaine et pour l'environnement associés à l'usage de la léonardite en tant que SNUB permet de mettre en évidence que les publications d'intérêt suivantes n'ont pas été reportées par l'ITAB dans le dossier soumis ainsi que dans les versions actualisées :

Voice, T. C., McElmurry, S. P., Long, D. T., Dimitrov, P., Ganey, V. S., & Peptropoulos, E. A. (2006). Evaluation of the hypothesis that Balkan endemic nephropathy is caused by drinking water exposure to contaminants leaching from Pliocene coal deposits. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 16(6), 515-524

Clark, P.J., Zingaro, R.A., Irgolic, K.J., Mcglnlejr, A.N., 1980. Arsenic and Selenium in Texas Lignite. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 7, 295–314. <https://doi.org/10.1080/03067318008071492>

Alexakis, D., Gamvroula, D., 2014. Arsenic, chromium, and other potentially toxic elements in the rocks and sediments of oropos-kalamos basin, attica, Greece. *Applied and Environmental Soil Science* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/718534>

Sycheva, D.G., Kosheleva, N.E., Timofeev, I.V., 2022. Contamination of soil cover with compounds of metals, arsenic and antimony in the area of impact of fuel and energy complex. *Theoretical and Applied Ecology* 48–55. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-2-048-055>

Glina, B., Kowalska, J.B., Łuczak, K., Mazurek, R., Spsychalski, W., 2021. Potentially toxic elements in fen peatland soils located near lignite-fired power plants in Central Poland. *Geoderma Regional* 25. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2021.e00370>

Meinelt, T., Schreckenbach, K., Knopf, K., Wienke, A., Stüber, A., Steinberg, C.E.W., 2004. Humic substances affect physiological condition and sex ratio of swordtail (*Xiphophorus helleri* Heckel). *Aquat. Sci.* 66, 239–245, <http://dx.doi.org/10.1007/s00027-004-0706-9>. (uniquement dans la liste des références du dossier).