

Maisons-Alfort, le 10 mars 2017

Conclusions de l'évaluation

relatives à la demande d'autorisation de mise sur le marché de RIZOLIQ TOP S, emballage associatif contenant un inoculum bactérien et une solution d'inoculation carbonée (Premax), déposée par la société DE SANGOSSE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a notamment pour missions l'évaluation ainsi que la délivrance des décisions relatives aux autorisations de mise sur le marché (AMM) des matières fertilisantes, des adjuvants pour matières fertilisantes et des supports de culture.

Les « conclusions de l'évaluation » portent sur l'évaluation des effets que l'utilisation des matières fertilisantes, des adjuvants pour matières fertilisantes et des supports de culture peuvent présenter pour la santé humaine, la santé animale et pour l'environnement ainsi que sur l'évaluation de leur efficacité au regard des effets revendiqués dans les conditions d'emploi prescrites.

Le présent document ne constitue pas une décision.

PRESENTATION DE LA DEMANDE

L'Anses a accusé réception d'une demande d'autorisation de mise sur le marché de RIZOLIQ TOP S de la société DE SANGOSSE.

RIZOLIQ TOP S correspond à un emballage associatif se présentant sous forme de deux sachets stériles, l'un contenant un inoculum bactérien composé de *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et de *Bradyrhizobium diazoefficiens* souche SEMIA 5080¹ (suspension liquide) formulé avec une technologie dite osmo-protectrice², l'autre sachet contenant une solution d'inoculation carbonée (Premax)³.

La finalisation de RIZOLIQ TOP S avant application est effectuée par l'utilisateur in situ en mélangeant l'inoculum bactérien et le Premax. RIZOLIQ TOP S est donc le résultat du mélange de ces deux sachets.

L'apport de RIZOLIQ TOP S est effectué avant le semis, par enrobage des semences de soja.

RIZOLIQ TOP S est destiné à l'amélioration du rendement des cultures de soja, à l'amélioration de l'installation de la culture et du développement racinaire et à l'amélioration de la nodulation.

Les caractéristiques garanties, ainsi que l'usage revendiqué par le demandeur pour RIZOLIQ TOP S, sont présentés en annexe 1.

L'évaluation de la présente demande est fondée sur l'examen par la Direction d'évaluation des produits réglementés (DEPR) du dossier déposé à l'Anses pour cette matière fertilisante, conformément aux dispositions du code rural et de la pêche maritime⁴ et sur la base des recommandations proposées dans la « Note d'information aux pétitionnaires concernant l'homologation des MFSC⁵ ».

¹ La souche SEMIA 5080 avait été initialement placée dans le groupe 1a de *Bradyrhizobium japonicum*. Cependant, une nouvelle étude montre que les souches de ce groupe présentent des caractéristiques génomiques, génotypiques et morphologiques en faveur de leur regroupement dans une nouvelle espèce appelée *Bradyrhizobium diazoefficiens*.

² Selon le pétitionnaire, l'adjonction de substances osmo-protectrices au cours du procédé de fabrication de l'inoculum bactérien conduit à un épaississement de la paroi cellulaire de la bactérie et contribue ainsi à la résistance bactérienne à la dessiccation.

³ La solution Premax contient des éléments carbonés dont la fonction est, selon le pétitionnaire, d'améliorer la survie bactérienne et la mise en place de la nodulation.

⁴ Les principes de la mise sur le marché des matières fertilisantes, des adjuvants pour matières fertilisantes et des supports de culture sont définis dans le chapitre V du titre V du livre II du code rural et de la pêche maritime.

⁵ Note d'information aux pétitionnaires concernant l'homologation des matières fertilisantes et supports de culture (MFSC) : Etat des exigences scientifiques - 1 août 2013.

Les données prises en considération sont celles soumises par le demandeur et jugées valides par la DEPR, ainsi que l'ensemble des éléments dont la DEPR a eu connaissance. Les conclusions relatives à la conformité des éléments présentés se réfèrent aux critères définis dans le « Guide pour la constitution des dossiers de demande d'homologation Matières fertilisantes - Supports de culture » (formulaire cerfa n° 50644#01), sous réserve de l'utilisation des matières fertilisantes, des adjuvants pour matières fertilisantes et des supports de culture dans le respect des bonnes pratiques agricoles.

Lorsque des données complémentaires sont identifiées comme nécessaires, celles-ci sont détaillées à la fin des conclusions.

SYNTHESE DE L'EVALUATION

Après évaluation de la demande et avec l'accord du Comité d'experts spécialisé "Matières Fertilisantes et Supports de Culture", réuni le 10 janvier 2017, la Direction d'évaluation des produits règlementés émet les conclusions suivantes.

CONCLUSIONS RELATIVES A LA CARACTERISATION DE LA MATIERE FERTILISANTE ET A LA QUALITE DE LA PRODUCTION

Caractérisation et procédé de fabrication

RIZOLIQ TOP S correspond au mélange (effectué par l'utilisateur in situ) d'un inoculum bactérien osmo-protégé de *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et de *Bradyrhizobium diazoefficiens* souche SEMIA 5080 et d'une solution d'inoculation carbonée (Premax)

Les spécifications de l'inoculum bactérien osmo-protégé telles que décrites sur le formulaire cerfa n° 11385 et la fiche d'information sont conformes aux exigences réglementaires. En revanche, la caractérisation de cet inoculum bactérien est incomplète, la proportion de chacune des deux espèces dans l'inoculum bactérien de RIZOLIQ TOP S devra être précisée.

Les souches de *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium diazoefficiens* utilisées pour la production de l'inoculum bactérien sont des souches naturelles, non génétiquement modifiées et enregistrées au Brésil par FEPAGRO (Fondation d'Etat pour la Recherche Agricole), respectivement sous les numéros SEMIA 5079 et SEMIA 5080.

La présence de *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium diazoefficiens* dans les sols français n'a pas été mise en évidence. Actuellement la souche G49 est la seule souche de *B. japonicum* autorisée à la commercialisation en France.

L'inoculum bactérien est obtenu à partir des souches SEMIA 5079 et SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium diazoefficiens* multipliées sur un milieu de culture approprié en conditions aseptiques. Les substances osmo-protectrices sont ajoutées à la culture bactérienne ainsi obtenue.

Chaque lot de production correspond aux volumes des bioréacteurs dans lesquels est effectuée la multiplication bactérienne, soit 300 à 10000 litres.

Le Premax est préparé par dilution stérile de ses composants (nutriments carbonés) dans de l'eau.

Chaque lot de commercialisation de RIZOLIQ TOP S correspond à un emballage associatif contenant deux sachets stériles : l'un contenant l'inoculum bactérien de *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et *Bradyrhizobium diazoefficiens* souche SEMIA 5080 (sachets de 0,15 L à 3 L), l'autre contenant la solution d'inoculation carbonée Premax (sachets de 0,05 L à 1 L).

Le système de contrôle de la qualité de la fabrication et de la traçabilité des matières premières et des lots de production est décrit de manière complète et est considéré satisfaisant. La gestion des non-conformités est pertinente.

Les attestations croisées de fourniture et d'approvisionnement sont présentées de manière exhaustive pour ce qui concerne les sources des matières premières. Toute autre provenance correspondrait à un changement de composition et nécessiterait une évaluation complémentaire.

Les matières premières, ainsi que le procédé de fabrication, ne présentent pas de dangers physico-chimiques particuliers.

Constance de composition

La constance de composition de l'inoculum bactérien (*Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium diazoefficiens*) est convenablement établie pour l'homogénéité et l'invariance.

L'étude de stabilité montre que l'inoculum bactérien est stable 12 mois à 20°C dans l'obscurité.

Par ailleurs, il conviendra de soumettre une étude de stabilité pour la solution d'inoculation carbonée Premax.

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse

La méthode d'échantillonnage utilisée dans le cadre du dossier technique pour constituer les échantillons soumis à l'analyse est pertinente compte tenu du procédé de production, de la matrice considérée et des essais réalisés.

L'analyse de caractérisation a été effectuée par un laboratoire accrédité par le COFRAC⁶ sur le programme 108 et de nombreuses analyses elles-mêmes ont été effectuées sous accréditation.

La méthode d'analyse mise en œuvre pour le dénombrement microbien (sur milieu de culture YMA⁷) est considérée acceptable.

La méthode mise en œuvre pour la caractérisation de l'inoculum bactérien, basée sur une méthode d'analyse de séquences multiples (MLSA), permet de caractériser la souche 5079 de *Bradyrhizobium japonicum* et la souche 5080 de *Bradyrhizobium diazoefficiens* composant l'inoculum bactérien.

Il est rappelé que, aux écarts admissibles près, la conformité de chaque unité de commercialisation de la préparation aux teneurs garanties sur l'étiquette est requise et que ces écarts admissibles ne peuvent pas être exploités de manière systématique. Les lots non-conformes sur ces critères devront être déclassés selon la procédure prévue par le pétitionnaire.

CONCLUSIONS RELATIVES AUX PROPRIETES TOXICOLOGIQUES ET A L'EXPOSITION DE L'OPERATEUR

Profil toxicologique

Bradyrhizobium japonicum et *Bradyrhizobium diazoefficiens* ne sont pas inscrits à l'annexe III de la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail et ne bénéficient pas du statut de présomption d'innocuité reconnue (*Qualified presumption of safety – QPS*) tel que défini par le comité scientifique des risques biologiques de l'EFSA. Concernant les risques pour l'homme, seuls de rares cas d'allergie induite par la mise en présence de grandes quantités de *Rhizobium spp* au cours de la production ont été signalés⁸.

Les autres matières premières entrant dans la composition de RIZOLIQ TOP S ne sont pas considérées comme des substances dangereuses pour l'homme au sens de la réglementation européenne.

Analyses réglementaires

Les teneurs en éléments traces métalliques (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn), mesurées dans l'inoculum bactérien et dans RIZOLIQ TOP S (mélange de l'inoculum bactérien et de la solution d'inoculation carbonée (Premax)) permettent de respecter les critères d'innocuité⁹ pour l'autorisation de mise sur le marché des matières fertilisantes dans les conditions d'emploi préconisées.

Les teneurs en composés traces organiques (fluoranthène, benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène et 7 PCB¹⁰) n'ont pas été mesurées. Cependant, compte tenu de la nature des matières premières et du procédé de fabrication, il n'est pas attendu de contamination de la préparation bactérienne (*Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium diazoefficiens*) et du Premax par des micropolluants organiques.

⁶ COFRAC = comité français d'accréditation

⁷ YMA = Yeast Manitol Agar

⁸ <http://www.oecd.org/fr/science/biotrack/1943522.pdf>

⁹ Tels que définis à l'Annexe VII du formulaire cerfa n° 50644#01 'Guide pour la constitution des dossiers de demande d'homologation Matières fertilisantes - Supports de culture'

¹⁰ PCB = polychlorobiphényle

Les analyses microbiologiques effectuées sur des échantillons de l'inoculum bactérien et dans RIZOLIQ TOP S (mélange de l'inoculum bactérien et de la solution d'inoculation carbonée (Premax)) montrent que l'ensemble des valeurs microbiologiques de référence⁶ est respecté.

Etudes toxicologiques, classement et conditions d'emploi

Des essais toxicologiques ont été réalisés sur l'inoculum bactérien (*Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et de *Bradyrhizobium diazoefficiens* souche SEMIA 5080).

La classification toxicologique de RIZOLIQ TOP S, déterminée au regard des résultats expérimentaux, de la classification des matières premières ainsi que de leur teneur dans le produit fini, est, au sens du règlement (CE) n° 1272/2008¹¹ : sans classement.

Les éléments communiqués dans le dossier technique, ainsi que les informations disponibles dans la littérature, ne mettent pas en évidence de risque pour les opérateurs dans les conditions d'emploi préconisées.

Néanmoins, s'agissant d'une matière fertilisante à base de micro-organismes, la phrase de précaution « Contient *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Les micro-organismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation » devra être mentionnée sur l'étiquette.

De plus, des gants et un vêtement de protection appropriés, ainsi qu'un masque filtrant anti-aérosol (EN149 FFP3 ou équivalent), devront être portés pendant toutes les phases de finalisation du produit (mélange des sachets d'inoculum et de Premax) et de traitement des semences.

CONCLUSIONS RELATIVES AUX RESIDUS ET A L'EXPOSITION DU CONSOMMATEUR

Bradyrhizobium japonicum et *Bradyrhizobium diazoefficiens* ne bénéficient pas du statut de présomption d'innocuité reconnue. Toutefois, compte tenu de la nature de l'inoculum bactérien et de la solution d'inoculation carbonée Premax, ainsi que des conditions d'emploi revendiquées (apport limité au semis), il n'est pas attendu de risque pour le consommateur lié à l'utilisation de RIZOLIQ TOP S sur soja.

CONCLUSIONS RELATIVES AU DEVENIR ET AU COMPORTEMENT DE LA MATIERE FERTILISANTE DANS L'ENVIRONNEMENT ET A SON ECOTOXICITE

Des essais d'écotoxicité et un test d'impact aigu vis-à-vis des organismes aquatiques et/ou terrestres, ainsi que des données de la littérature sur le devenir dans l'environnement des constituants de RIZOLIQ TOP S, ont été soumis.

La classification de RIZOLIQ TOP S vis-à-vis de l'environnement, déterminée par calcul au regard de la classification des matières premières ainsi que de leur teneur dans le produit fini et des résultats des tests d'écotoxicité, est, au sens du règlement (CE) n° 1272/2008 : sans classement.

Devenir dans l'environnement des micro-organismes

L'inoculum bactérien est constitué de 2 micro-organismes : *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et *Bradyrhizobium diazoefficiens* souche SEMIA 5080. Toutefois, la proportion de chacune des deux espèces dans l'inoculum bactérien de RIZOLIQ TOP S n'est pas précisée.

Actuellement la souche G49 de *Bradyrhizobium japonicum* est la seule souche acclimatée et pouvant persister dans les sols français d'après la littérature scientifique. Le risque environnemental lié à l'utilisation de produits à base de *B. japonicum* relève de l'effet que pourrait avoir l'apport d'une souche nouvelle dans un milieu où une souche déjà acclimatée remplit déjà la fonction agronomique attendue dans le sol. En effet, si les nouvelles souches sont plus compétitives que l'ancienne, elles pourraient dominer la population déjà acclimatée au sol.

Une recherche bibliographique conduite par le pétitionnaire sur le devenir et le comportement dans l'environnement a été réalisée sur l'espèce *Bradyrhizobium japonicum*. Les informations

¹¹ Règlement (CE) n° 1272/2008 (ou CLP : « Classification, Labelling, Packaging ») du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006

soumises sur l'espèce *Bradyrhizobium diazoefficiens* fournissent des éléments de comparaison avec *Bradyrhizobium japonicum* en milieu tropical uniquement.

Selon les éléments disponibles, *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 et *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 sont des micro-organismes adaptés aux régions tropicales, caractérisées par des sols acides, des températures élevées et une faible humidité des sols. Selon Siqueira *et al.* (2014)¹², *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 montre une forte capacité saprophyte, c'est-à-dire qu'elle est capable de survivre pendant de longues périodes dans les sols. *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080, est plus efficace en termes de fixation d'azote que *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079, mais montre une compétitivité et une capacité saprophyte plus faibles. Le comportement et l'adaptation en zone tempérée de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 et *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080, seuls ou en association, ne sont pas établis. Or, la compétitivité et la capacité des *Bradyrhizobia* à induire la nodulation du soja sont influencées par la température (Shiro *et al.* (2016)¹³).

Ainsi, d'après les éléments disponibles, le risque que l'une des deux espèces composant l'inoculum bactérien de RIZOLIQ TOP S soit plus compétitive que l'autre espèce présente ou que les souches composant l'inoculum soient plus compétitives que la souche G49 de *B. japonicum* ne peut, notamment, pas être exclu.

Par ailleurs, le devenir dans le sol des deux souches dans des conditions tempérées n'a pas été étudié, ni la persistance de chacune des souches, considérées séparément, par rapport à la souche déjà introduite dans les sols français. Ces éléments sont nécessaires pour mieux appréhender le devenir dans les sols français et s'assurer que le produit permette de préserver la qualité des sols pour ce qui concerne la fonction symbiotique de fixation d'azote.

Ecotoxicité du produit fini

Un test d'impact à court terme de l'inoculum bactérien sur spores de champignons mycorrhizogènes (*Glomus mosseae*) a été réalisé à des doses équivalentes à 0,54, 2,7 et 5,4 µL par graine¹⁴. Les résultats de cet essai ne montrent aucun effet néfaste sur la germination des spores de *Glomus mosseae* jusqu'à la dose de 5,4 µg/L soit 9,5¹⁵ fois la dose d'apport préconisée.

Par ailleurs, un test de toxicité aiguë sur daphnies ($CE_{50-48h}^{16} = 8,1\%$ correspondant à 87,4 g.L⁻¹) a été réalisé sur l'inoculum bactérien. Toutefois, au regard du mode d'apport de RIZOLIQ TOP S (traitement de semences), l'exposition des organismes aquatiques est considérée faible. Il n'est donc pas attendu d'effets néfastes sur les organismes aquatiques.

CONCLUSIONS RELATIVES A L'EFFICACITE DE LA MATIERE FERTILISANTE

Caractéristiques biologiques

Effets revendiqués

Les effets revendiqués concernent l'amélioration du rendement des cultures de soja, l'amélioration de l'installation de la culture et du développement racinaire, ainsi que l'amélioration de la nodulation (formulaire cerfa n° 11385 du 05/09/2016).

Éléments relatifs à l'efficacité intrinsèque et au mode d'action

Les revendications de RIZOLIQ TOP S sont basées sur la nature de ses éléments de composition : *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079, *Bradyrhizobium diazoefficiens* souche SEMIA 5080 et nutriments issus de la solution d'inoculation carbonée Premax.

Le mode d'action des bactéries du genre *Rhizobium* est bien établi dans la bibliographie et repose sur l'existence effective d'une symbiose entre ces dernières et les Fabacées comme le

¹² Siqueira, A. F., Ormeño-Orrillo, E., Souza, R. C., Rodrigues, E. P., Almeida, L. G. P., Barcellos, F. G., ... & Hungria, M. (2014). Comparative genomics of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. BMC genomics, 15(1), 1.)

¹³ Shiro S *et al.*, 2016, Temperature-Dependent Expression of *NodC* and Community Structure of Soybean-Nodulating *Bradyrhizobia*, Microbes Environ. Vol. 31, No. 1, 27-32, 2016

¹⁴ Les doses testées ont été calculées avec un PMG moyen de 180, une densité de semis de 600 000 graines/ha et un apport maximal de la préparation bactérienne de 300mL/100kg de semences.

¹⁵ En considérant un PMG moyen de 190, une densité de semis de 600 000 graines/ha et un apport maximal de la préparation bactérienne de 300mL/100kg de semences.

¹⁶ CE_{50-48h} = concentration produisant 50% d'effet après 48h d'exposition

soja. En revanche, l'intérêt d'associer deux souches bactériennes de *Bradyrhizobium* au sein de l'inoculum bactérien n'est pas étayé.

Par ailleurs, le demandeur indique que le Premax permet d'améliorer la survie bactérienne et la mise en place de la nodulation. Ces effets sont étayés dans une publication¹⁷ qui démontre que l'apport de nutriments lors de l'enrobage du soja par *Bradyrhizobium japonicum* souche G49 permet d'observer une augmentation de la concentration bactérienne dans les sols, de la nodulation et de la teneur en azote des productions.

Essais d'efficacité

Le pétitionnaire présente 3 essais en conditions contrôlées et 11 essais en conditions d'emploi préconisées. Pour l'ensemble de ces 14 essais, l'inoculum bactérien est toujours testé en association avec la solution d'inoculation carbonée Premax.

Essais en conditions contrôlées

Les résultats de 2 essais réalisés en Argentine en conditions contrôlées montrent que RIZOLIQ TOP S (inoculum bactérien + Premax) ne permet pas d'augmenter le nombre de nodules observés sur les racines principales et secondaires des plants de soja de manière significative par rapport à la modalité non traitée (non inoculé).

En revanche, un essai conduit en France en 2014 en conditions contrôlées sur des cultures de soja a permis de montrer que le nombre de nodules observés sur les racines des plants de soja inoculés (inoculum + Premax) a significativement augmenté par rapport à la modalité témoin (non inoculé). Cette augmentation du nombre de nodules est accompagnée par une augmentation significative du pourcentage des nodules actifs.

Essais en conditions d'emploi préconisées

Les résultats de 10 essais conduits en Argentine entre 2005 et 2011 en plein champ montrent que le traitement de graines de soja avec RIZOLIQ TOP S (inoculum + Premax) a permis d'augmenter le rendement de 5,5% à 18,7% pour les cultures de soja issues de ces graines inoculées par rapport à des graines non traitées (résultats non significatifs).

Par ailleurs, un essai conduit en France en 2014 en champ a permis de montrer que l'application de RIZOLIQ TOP S (inoculum + Premax) sur des semences de soja entraîne une augmentation significative des paramètres du rendement (rendement en grains, poids de 1000 grains, poids spécifique, rendement en huile et rendement protéique) en comparaison avec la modalité témoin (semences non inoculées), similaire au produit FORCE 48 à base de *Bradyrhizobium japonicum* souche G49. Dans cet essai, le semis a été réalisé en Alsace au mois de mai.

Cependant, s'agissant de l'introduction de nouvelles souches bactériennes, SEMIA 5079 et SEMIA 5080, sur le sol français, des tests d'efficacité supplémentaires permettant de comparer les souches SEMIA 5079 et 5080, utilisées seules et en association, avec la souche G49 de *B. japonicum*, devraient être fournis.

D'autre part, Shiro *et al* (2016¹⁸) font part de l'importance de la température sur l'efficacité de ces souches. Celles-ci sont des souches bactériennes tropicales, il devra donc être démontré l'efficacité de telles souches (SEMIA 5079 ou SEMIA 5080), utilisées seules et en association, dans des sols français où les semis de soja peuvent être effectués dès une température du sol de 10°C.

Conclusions sur le mode d'emploi

Le mode d'emploi indiqué est suffisant pour permettre une bonne utilisation de RIZOLIQ TOP S.

Conclusions sur les revendications

Considérant l'ensemble des données d'efficacité disponibles, seules les revendications relatives à l'amélioration du rendement des cultures de soja et à l'amélioration de la nodulation peuvent être considérées comme soutenues.

¹⁷ Fouilleux, G., Revellin, C., Hartmann, A., & Catroux, G. (1996). Increase of *Bradyrhizobium japonicum* numbers in soils and enhanced nodulation of soybean (*Glycine max* CL) merr.) using granular inoculants amended with nutrients. *FEMS microbiology ecology*, 20, 173-183.

¹⁸ Shiro S *et al*, 2016, Temperature-Dependent Expression of *NodC* and Community Structure of Soybean-Nodulating *Bradyrhizobia*, *Microbes Environ.* Vol. 31, No. 1, 27-32, 2016

En revanche, les revendications relatives à l'amélioration de l'installation de la culture et du développement racinaire n'ont pas été spécifiquement démontrées dans les conditions d'emploi prescrites.

La dénomination de classe et de type qui pourrait être proposée est : « Préparation inoculante liquide pour semences de soja » - « Préparation microbienne de *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et de *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 (suspension liquide) conçue pour une utilisation conjointe avec une solution d'inoculation carbonée ».

SYNTHESE DES RESULTATS DE L'EVALUATION

En se fondant sur les données soumises par le demandeur et évaluées dans le cadre de cette demande conformément aux dispositions réglementaires nationales, ainsi que sur l'ensemble des éléments dont elle a eu connaissance, la Direction d'évaluation des produits réglementés estime que :

- A.** RIZOLIQ TOP S correspond au mélange (effectué par l'utilisateur in situ) d'un inoculum bactérien osmo-protégée de *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et de *Bradyrhizobium diazoefficiens* souche SEMIA 5080 et d'une solution d'inoculation carbonnée (Premax).

La caractérisation de l'inoculum bactérien osmo-protégée de *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et de *Bradyrhizobium diazoefficiens* souche SEMIA 5080 est incomplète : la proportion de chacune des deux souches bactériennes présente dans l'inoculum devra être précisée.

La constance de composition de l'inoculum bactérien est établie de manière satisfaisante. L'étude de stabilité montre que cet inoculum bactérien est stable 12 mois à 20°C dans l'obscurité.

Il conviendra, par ailleurs, de soumettre une étude de stabilité pour la solution d'inoculation carbonnée Premax.

- B.** Dans le cadre des usages demandés, l'innocuité de RIZOLIQ TOP S est considérée comme conforme aux dispositions réglementaires pour les contaminants chimiques et biologiques recherchés et pour lesquels il existe une valeur de référence.

Par ailleurs, le devenir dans le sol des deux souches dans des conditions tempérées n'a pas été étudié, ni la persistance de chacune des souches, considérées séparément, par rapport à la souche déjà introduite dans les sols français. Ces éléments sont nécessaires pour mieux appréhender le devenir dans les sols français et s'assurer que le produit permette de préserver la qualité des sols pour ce qui concerne la fonction symbiotique de fixation d'azote.

- C.** Les données d'efficacité disponibles montrent que seules les revendications relatives à l'amélioration du rendement des cultures de soja et à l'amélioration de la nodulation peuvent être considérées comme soutenues dans les conditions d'emploi prescrites.

En revanche, les revendications relatives à l'amélioration de l'installation de la culture et du développement racinaire n'ont pas été spécifiquement démontrées.

Il conviendrait de justifier l'intérêt d'associer la souche SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum* et la souche SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium diazoefficiens* au sein de l'inoculum bactérien de RIZOLIQ TOP S et de fournir des tests d'efficacité supplémentaires permettant de comparer les différentes souches SEMIA 5079 et 5080, utilisées seules et en association, avec la souche G49 de *B. japonicum* et dans les conditions d'emploi préconisées et dans les conditions de température retrouvées en France lors des semis de soja.

La dénomination de classe et de type proposée pourrait être : « Préparation inoculante liquide pour semences de soja » - « Préparation microbienne de *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et de *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 (suspension liquide) conçue pour une utilisation conjointe avec une solution d'inoculation carbonée ».

CONCLUSIONS

La conformité ou l'absence de conformité aux dispositions réglementaires nationales, dans les conditions d'étiquetage et d'emploi décrites aux points II et IV et des compléments d'information et suivis de production listés au point V, est précisée ci-dessous.

- I. **Résultats de l'évaluation pour les usages revendiqués par le demandeur pour une autorisation de mise sur le marché de RIZOLIQ TOP S emballage associatif contenant un inoculum bactérien de *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 osmo-protégé et une solution d'inoculation carbonée (Premax).**

Culture	Dose par apport (en L pour 100 kg de semences)	Nombre d'ufc pour 100 kg de semences	Nombre d'apports par an	Epoque d'apport	Conclusion (commentaires)
Soja	0,4*	3.10^{11}	1	Semis (traitement de semences)	Non finalisé (Devenir dans l'environnement)

* Mélange de 0,3 L d'inoculum bactérien avec 0,1 L de solution d'inoculation carbonée Premax pour 100 kg de semences.

- II. **Résultats de l'évaluation pour les éléments de marquage obligatoire pour une autorisation de mise sur le marché de RIZOLIQ TOP S : emballage associatif contenant un inoculum bactérien de *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 osmo-protégé et une solution d'inoculation carbonée (Premax).**

Paramètre déclarable	Teneur minimale garantie
Genre, espèces, souches <i>Bradyrhizobium japonicum</i> souche SEMIA 5079 et <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> SEMIA 5080	minimum 2.10^9 ufc ¹⁹ par gramme de produit*

* La proportion de chacune des souches (La souche SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum* et la souche SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium diazoefficiens*) dans l'inoculum bactérien de RIZOLIQ TOP S devra être précisée.

III. Classification de RIZOLIQ TOP S au sens du règlement (CE) n° 1272/2008

Sans classement.

L'étiquette devra porter la mention suivante :

« Contient *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Les micro-organismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation ».

IV. Conditions d'emploi

Les conditions d'emploi précisées ci-dessous sont issues de l'évaluation, pour chaque section du dossier pour laquelle l'usage revendiqué pourrait ainsi être considéré comme conforme. Il convient de les reprendre et/ou de les adapter au regard des usages qui seront effectivement accordés.

Port de gants et d'un vêtement de protection appropriés, ainsi que d'un masque filtrant anti-aérosol (EN149 FFP3 ou équivalent), pendant toutes les phases de finalisation du produit (mélange des sachets d'inoculum et de Premax) et de traitement des semences.

¹⁹Unités formant colonies

V. Données identifiées comme manquantes

Il conviendra de :

- Fournir une étude de stabilité sur 12 mois pour la solution d'inoculation carbonée Premax.
- Justifier l'intérêt d'associer la souche SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum* et la souche SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium diazoefficiens* au sein de l'inoculum bactérien de RIZOLIQ TOP S.
- Préciser la proportion de chacune des souches (souche SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum* et souche SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium diazoefficiens*) dans l'inoculum bactérien de RIZOLIQ TOP S.
- Fournir des informations sur le devenir dans le sol des deux souches (souche SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum* et souche SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium diazoefficiens*) dans des conditions tempérées, ainsi que des informations sur la persistance de chacune des souches, considérées séparément, par rapport à la souche déjà introduite dans les sols français.
- Fournir des tests d'efficacité supplémentaires permettant de comparer les différentes souches SEMIA 5079 et 5080, seules et en association, avec la souche G49 de *B. japonicum* et dans les conditions d'emploi préconisées ainsi que dans les conditions de température retrouvées en France lors des semis de soja.

Mots-clés : RIZOLIQ TOP S - solution inoculation carbonée - Premax - *Bradyrhizobium japonicum* souches SEMIA 5079-5080 – soja - FSIM

ANNEXE 1

Caractéristiques revendiquées par le demandeur pour une autorisation de mise sur le marché de RIZOLIQ TOP S emballage associatif contenant un inoculum bactérien de *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 osmo-protégé et une solution d'inoculation carbonée (Premax).

Caractéristiques	Valeurs garanties
Genre, espèce, souche	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> souches SEMIA 5079 et SEMIA 5080
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	minimum 2.10^9 ufc* par gramme de produit

* ufc = unités formant colonies

Usages revendiqués par le demandeur pour une autorisation de mise sur le marché de RIZOLIQ TOP S emballage associatif contenant un inoculum bactérien de *Bradyrhizobium japonicum* souche SEMIA 5079 et *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 osmo-protégé et une solution d'inoculation carbonée (Premax).

(Formulaire cerfa n° 11385 du 09/09/2016)

Cultures	Dose par apport (en L pour 100 kg de semences)	Nombre d'ufc pour 100 kg de semences	Nombre d'apports par an	Epoque d'apport
Soja	0,4*	3.10^{11}	1	Semis (traitement de semences)

* Mélange de 0,3 L d'inoculum bactérien avec 0,1 L de solution d'inoculation carbonée Premax pour 100 kg de semences.