



Government of Canada Gouvernement du Canada

Rapport final d'évaluation préalable sur la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp.

**Environnement et Changement climatique Canada
Santé Canada**

Mai 2016

Canada

N° de cat. : En14-250/2016F-PDF
ISBN 978-0-660-05038-6

Le contenu de cette publication ou de ce produit peut être reproduit en tout ou en partie, et par quelque moyen que ce soit, sous réserve que la reproduction soit effectuée uniquement à des fins personnelles ou publiques mais non commerciales, sans frais ni autre permission, à moins d'avis contraire.

On demande seulement :

- de faire preuve de diligence raisonnable en assurant l'exactitude du matériel reproduit;
- d'indiquer le titre complet du matériel reproduit et l'organisation qui en est l'auteur;
- d'indiquer que la reproduction est une copie d'un document officiel publié par le gouvernement du Canada et que la reproduction n'a pas été faite en association avec le gouvernement du Canada ni avec l'appui de celui-ci.

La reproduction et la distribution à des fins commerciales est interdite, sauf avec la permission écrite de l'auteur. Pour de plus amples renseignements, veuillez communiquer avec l'informathèque d'Environnement et Changement climatique Canada au 1-800-668-6767 (au Canada seulement) ou 819-997-2800 ou par courriel à ec.enviroinfo.ec@canada.ca.

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par le ministre de l'Environnement et Changement climatique, 2016.

Also available in English

Sommaire

Conformément à l'article 74*b*) de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)* [LCPE], la ministre de l'Environnement et du Changement climatique et la ministre de la Santé ont procédé à une évaluation préalable de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp.

La souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. appartient à un groupe de souches dont le nom de l'espèce n'est pas validé. Avant 1982, l'espèce était appelée *Pseudomonas denitrificans*, avant que ce nom soit officiellement rejeté. Par conséquent, pour les besoins de la présente évaluation, le nom « souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. » sera utilisé lorsqu'on abordera des données se rapportant spécifiquement à cette souche.

La souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. est une bactérie qui prolifère dans le sol et dans l'eau. Elle a des propriétés qui lui confère une utilisation potentielle dans la production de la vitamine B₁₂, du coenzyme Q ainsi que d'autres produits biochimiques et de biocarburants; de même que dans les produits de dénitrification destinés à l'amélioration des sols, au traitement des boues activées et des eaux usées ainsi qu'à la dégradation du pétrole.

Aucun cas d'effets nocifs chez les plantes terrestres et aquatiques, les invertébrés et les vertébrés n'a été signalé à l'égard de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. et aucune infection chez les humains n'a été attribuée spécifiquement à la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. ou à l'une de ses proches.

La présente évaluation prend en compte les caractéristiques de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. mentionnées ci-dessus à l'égard des effets sur la santé humaine et l'environnement associés à l'utilisation des produits de consommation et commerciaux et des procédés industriels visés par la LCPE , notamment les rejets dans l'environnement par le flux de déchets et l'exposition humaine fortuite par l'intermédiaire des milieux naturels. Afin de mettre à jour les renseignements sur les utilisations actuelles de cette substance, le gouvernement a lancé une enquête pour la collecte obligatoire de renseignements en application de l'article 71 de la LCPE , tel que publiée dans la Partie I de la *Gazette du Canada* le 3 octobre 2009 (Avis en vertu de l'article 71). Les renseignements fournis en réponse aux avis publiés en vertu de l'article 71 indiquent que la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. n'était pas importée ou fabriquée au Canada.

Compte tenu de tous les éléments de preuve contenus dans la présente évaluation préalable, la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. présente un faible risque d'effets nocifs sur les organismes et sur l'intégrité globale de l'environnement. On conclut que la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. ne satisfait pas aux

critères énoncés aux alinéas 64a) ou b) de la LCPE, car elle ne pénètre pas dans l'environnement en une quantité ou concentration ou dans des conditions de nature à avoir, immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou sur la diversité biologique, ou à mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie.

À la lumière des renseignements contenus dans la présente évaluation préalable, on conclut que la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. ne satisfait pas aux critères énoncés à l'alinéa 64c) de la LCPE, car elle ne pénètre pas dans l'environnement en une quantité ou concentration ou dans des conditions de nature à constituer un danger au Canada pour la vie ou la santé humaines.

Table des matières

Sommaire	ii
Introduction	vii
Décisions d'autorités compétentes sur le plan national et international	viii
1. Évaluation du danger.....	1
1.1 Caractérisation de la souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas sp.</i>	1
1.1.1 Identification taxonomique et historique de la souche	1
1.1.2 Propriétés biologiques et écologiques	6
1.1.3 Effets.....	11
1.2 Gravité du danger	12
2. Évaluation de l'exposition.....	13
2.1 Sources d'exposition.....	13
2.2 Caractérisation de l'exposition	14
2.2.1 Exposition de l'environnement	14
2.2.2 Exposition humaine.....	16
3. Caractérisation des risques.....	17
4. Conclusion	17
5. Références.....	19
Annexes	24
A. Arbre phylogénétique.....	24
B. Analyse de l'ester méthylique d'acide gras (EMAG)	26
C. Cinétique de croissance	27
D. Croissance dans différents milieux.....	28

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Principales souchothèques où la souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas sp.</i> a été déposée.....	2
Tableau 1-2 : Caractéristiques morphologiques et de croissance de la souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas sp.</i> , de la souche SP2 de <i>Pseudomonas sp.</i> et de la souche PAO1 de <i>P. aeruginosa</i>	4
Tableau 1-3 : Caractéristiques biochimiques de la souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas sp.</i> , de la souche SP2 de <i>Pseudomonas sp.</i> et de la souche PAO1 de <i>P. aeruginosa</i>	5

Tableau 1-4 : Caractéristiques moléculaires de la souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas</i> sp., de la souche SP2 de <i>Pseudomonas</i> sp. et de la souche PAO1 de <i>P. aeruginosa</i>	5
Tableau 1-5 : Différentiation des souches ATCC 13867 et SP2 de <i>Pseudomonas</i> sp. fondée sur la morphologie cellulaire, la composition en acides gras et la sensibilité aux antibiotiques, adaptée d'Arasu <i>et al.</i> (2013).....	5
Tableau 1-6 : Profils de sensibilité aux antibiotiques de la souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas</i> sp. (établis à l'aide de la méthode de diffusion sur disque), adaptés d'Arasu <i>et al.</i> (2013).....	8
Tableau 1-7 : Sensibilité de la souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas</i> sp. aux antibiotiques.....	8
Tableau A-1 : Analyse de l'ester méthylique d'acide gras (EMAG) de la souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas</i> sp.....	26
Tableau A-2 : Cinétique de croissance de la souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas</i> sp. dans des milieux liquides sur une période de 24 heures.....	27
Tableau A-3 : Croissance de la souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas</i> sp. à 28 °C (48 heures) dans différents milieux.....	28

Liste des figures

Figure 1-1 : Sous-arbre de l'arbre phylogénétique construit à l'aide des séquences génétiques de l'ARN ribosomique 16S illustrant les espèces et les souches qui sont étroitement apparentées à la souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas</i> sp.....	3
Figure 1-2 : Sous-arbre de l'arbre phylogénétique construit à l'aide des séquences génétiques de l'ARN ribosomique 16S illustrant les espèces et les souches qui sont étroitement apparentées à l'espèce pathogène <i>P. aeruginosa</i>	3
Figure A-1 : Arbre phylogénétique construit à l'aide des séquences génétiques de l'ARN ribosomique 16S illustrant les espèces qui représentent les principaux groupes du genre <i>Pseudomonas</i>	24
Figure A-2 : Arbre phylogénétique partiel construit à l'aide des séquences génétiques de l'ARN ribosomique 16S de l'espèce <i>Pseudomonas</i>	25
Figure A-3 : Analyse du groupement à liens simples dans la base de données environnementales et souches sélectionnées.....	26
Figure A-4 : Analyse du groupement à liens simples dans la base de données cliniques.....	26

Introduction

Conformément à l'alinéa 74b) de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)* [LCPE], la ministre de l'Environnement et du Changement climatique et la ministre de la Santé sont tenues de procéder à l'évaluation préalable des organismes vivants ajoutés à la Liste intérieure en vertu de l'article 105 de la Loi, afin de déterminer si lesdits organismes présentent ou sont susceptibles de présenter un risque pour l'environnement ou la santé humaine [d'après les critères énoncés à l'article 64 de la LCPE]¹. Cette souche a été ajoutée à la Liste intérieure des substances en vertu du paragraphe 105(1) de la LCPE, parce qu'elle a été fabriquée ou importée au Canada entre le 1^{er} janvier 1984 et le 31 décembre 1986, et qu'elle a pénétré ou a été rejetée dans l'environnement sans être assujettie à la LCPE ou à toute autre loi fédérale ou provinciale.

La présente évaluation préalable tient compte des renseignements sur les risques tirés du domaine public et de données de recherche non publiées, ainsi que des commentaires d'examineurs scientifiques. Les renseignements liés à l'exposition ont été obtenus à partir du domaine public et des renseignements découlant de l'avis obligatoire relatif à l'article 71 de la LCPE publié le 3 octobre 2009 dans la Partie I de la *Gazette du Canada*. De plus amples précisions concernant la méthode d'évaluation des risques utilisée sont accessibles dans le document intitulé « [Cadre d'évaluation scientifique des risques liés aux micro-organismes réglementés en vertu de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement \(1999\)](#) » (Environnement Canada et Santé Canada, 2011).

Dans le présent rapport, les données propres à la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* inscrite sur la Liste intérieure des substances sont ainsi indiquées. Les données propres à la souche proviennent de plusieurs sources, dont le proposant, l'American Type Culture Collection (ATCC) ainsi que des documents non publiés produits par Santé Canada² et les publications scientifiques. Lorsque les données propres à la souche n'étaient pas disponibles, des données de substitution provenant de recherches documentaires ont été utilisées. Lorsqu'il y a lieu, les recherches documentaires sur l'organisme comprenaient ses synonymes ainsi que ses noms périmés. Les recherches documentaires ont été effectuées à l'aide de bases de données de publications scientifiques (SCOPUS, CAB Abstracts et PubMed du NCBI), de recherches sur le Web, et de termes de recherche clés afin de cerner les dangers pour la santé humaine et l'environnement. Des

¹ La détermination de la conformité à l'un ou plusieurs des critères énoncés à l'article 64 de la LCPE est basée sur une évaluation des risques potentiels pour l'environnement et/ou la santé humaine liés à l'exposition dans l'environnement en général. Pour les humains, cela inclut, sans toutefois s'y limiter, l'exposition par l'air, l'eau et l'utilisation de produits contenant la substance. Une conclusion établie en vertu de la LCPE sur la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* ne présente pas un intérêt pour une évaluation, qu'elle n'empêche pas non plus, en fonction des critères de risque prévus dans le Système d'information sur les matières dangereuses utilisées au travail (SIMDUT), qui sont définis dans le *Règlement sur les produits contrôlés* visant les produits destinés à être utilisés au travail.

² Essais dirigés par le Bureau de la science et de la recherche en santé environnementale de Santé Canada.

renseignements recensés jusqu'en août 2014 ont été pris en compte dans le présent rapport d'évaluation préalable.

Décisions d'autorités compétentes sur le plan national et international

L'Agence de la santé publique du Canada (ASPC) a classé l'espèce appelée *Pseudomonas sp.* dans le groupe de risque 1 (risque faible pour l'individu et pour la collectivité) pour les humains et les animaux terrestres (communication personnelle, ASPC, 2014).

L'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) ne considère pas l'espèce appelée *Pseudomonas sp.* comme un agent zoopathogène (communication personnelle, ACIA, 2014). Certains membres du genre *Pseudomonas* sont considérés comme des agents pathogènes des plantes; toutefois, dans le cas de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*, il n'a pas été possible de déterminer s'il s'agissait ou non d'une souche pathogène. Par conséquent, si l'organisme devait être importé, les exigences relatives au niveau de confinement 1 des phytoravageurs (PPC-1) devraient être appliquées pour tous les travaux effectués avec cet organisme (communication personnelle, ACIA, 2014).

Aucune autre décision en matière de réglementation de la part d'autres gouvernements ou organismes internationaux³ n'a été relevée concernant la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*, et ce, malgré ses nombreuses utilisations actuelles et potentielles.

³ Les organismes gouvernementaux et les organisations ayant fait l'objet de la recherche sont notamment : Environmental Protection Agency des États-Unis; Food and Drug Administration des États-Unis; Organisation mondiale de la Santé; Center for Disease Control des États-Unis; ministère de la Santé de l'Australie; Autorité européenne de sécurité des aliments; Agence européenne pour la santé et la sécurité au travail; European Food Standards Agency; Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires.

1. Évaluation du danger

1.1 Caractérisation de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*

1.1.1 Identification taxonomique et historique de la souche

Nom binomial : *Pseudomonas sp.*

Désignation taxonomique :

Règne :	Bactéries
Embranchement :	Protéobactéries
Classe :	Gammaprotéobactéries
Ordre :	<i>Pseudomonadales</i>
Famille :	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre :	<i>Pseudomonas</i>
Espèce :	<i>Pseudomonas sp.</i> (Doudoroff <i>et al.</i> , 1974; JCICSB, 1982)
Souche :	ATCC 13867

Voici d'autres désignations de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* : 926, NCIB 9496, NCIMB 9496 BCRC 14386, CCRC 14386, CCT 5425, CCUG 1783, CIP 104375, DSM 1650, DSM 1650/5040, Hugh 926, IAM 12573, IFO 13302, JCM 20650, LMD 84.60, LMG 7983, NBIMCC 1625, NBRC 13302 (Delwiche, 1959; Doudoroff *et al.*, 1974; Sacks et Barker, 1952).

1.1.1.1 Synonymes et noms périmés

Pseudomonas denitrificans (Lysenko, 1961; Peix *et al.*, 2009), *Pseudomonas nitroreductans* lizuka and Komagata 1964 emend. Lang *et al.* 2007 (DSMZ, 2014); *Pseudomonas multiresinivorans* (Mohn *et al.*, 1999; DSMZ, 2014), *Bacillus denitrificans fluorescens* Christensen, 1903 (Lysenko, 1961).

Auparavant, la souche ATCC 13867 était désignée par le nom *P. denitrificans*, mais ce nom a été rejeté officiellement en 1982, ayant été déclaré *nomen ambiguum* d'après une caractérisation phénotypique et génotypique limitée (Doudoroff *et al.*, 1974; JCICSB, 1982). Bien que ce nom d'espèce ait été rejeté, on trouve souvent dans les publications le nom *P. denitrificans* pour désigner la souche inscrite sur la LIS (ATCC 13867) et une autre souche (ATCC 19244). Cependant, ces deux souches représentent différentes espèces qui se distinguent par la composition de leur ADN et au moins 40 caractéristiques phénotypiques (Doudoroff *et al.*, 1974). Ainsi, le nom « souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* » sera utilisé pour exposer les données spécifiques à la souche inscrite sur la LIS (même si un autre nom est utilisé dans la source). Comme il se peut que des souches auparavant nommées *P. denitrificans* ne soient pas étroitement apparentées à la souche inscrite sur la LIS, celles-ci ne sont pas considérées comme des substituts fiables. Or, afin d'assurer la protection de l'environnement et de la santé humaine, on a pris en compte dans la présente évaluation les effets nocifs signalés ayant été attribués à

P. denitrificans dans les cas où la souche en question pouvait vraisemblablement être étroitement apparentée à la souche inscrite sur la LIS.

1.1.1.2 Historique de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp.

La souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. a été isolée du sol après enrichissement dans un milieu succinate-nitrate (Sacks et Barker, 1949). Nommée initialement *Pseudomonas denitrificans* Bergey *et al.* souche 926 ou Hugh 926, elle a été déposée à l'American Type Culture Collection (ATCC) par R. Hugh, qui l'avait reçue de C. Delwiche (Tableau 1-1).

Tableau 1-1 : Principales souchothèques où la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. a été déposée

Souchothèque	Désignation de la souche	Année du dépôt
American Type Culture Collection	ATCC 13867	Non disponible
National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria	NCIMB 9496	1963
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	DSM 1650 (ancien numéro : DSM 50405)	Non disponible
Institute for Fermentation	IFO 13302 (= NBRC ^a 13302)	Non disponible
IAM Culture Collection	IAM 12573	Non disponible
Japan Collection of Microorganisms	JCM 20650	2007

^a NITE Biological Resource Center

1.1.1.3 Phylogénie du genre *Pseudomonas*

Les membres du genre *Pseudomonas* sont des bactéries à Gram négatif, diversifiés, largement répandus et dominés par des colonisateurs saprophytiques non pathogènes du sol, de l'eau et des écosystèmes de la rhizosphère ainsi que par des colonisateurs commensaux de la peau humaine saine (Cogen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013a). Auparavant, le genre *Pseudomonas* (*sensu lato*) comprenait des membres des protéobactéries alpha, bêta, gamma-bêta et gamma, dont un grand nombre a été ou devrait être reclassé par des méthodes taxonomiques modernes. Un sous-groupe de l'espèce *Pseudomonas* classé dans les protéobactéries gamma est considéré comme appartenant au genre (*sensu stricto*), notamment les groupes d'espèce suivants : *P. aeruginosa*, *P. chloroaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. syringae*.

Un arbre phylogénétique a été construit à l'aide des séquences génétiques de l'ARN ribosomique 16S et des séquences obtenues auprès d'Anzai *et al.* (2000) [annexe 1, **Error! Reference source not found.**]. La souche inscrite sur la LIS (nommée *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867 dans la Figure 1-1) est une espèce distincte de la souche néotype ATCC 19244 de *P. denitrificans* (nommée *Pseudomonas denitrificans* IAM 12023 dans la Figure 1-2), et elles se regroupent différemment dans l'analyse phylogénétique (annexe 1, Figure A-2). La souche

ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. n'appartient pas au groupe *P. aeruginosa* (Figure 1-1), mais la souche ATCC 19244 de *P. denitrificans* y appartient (Figure 1-2).

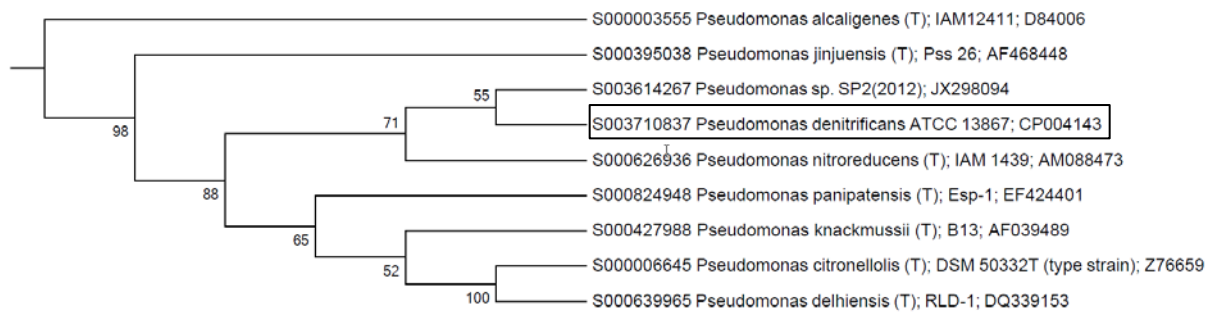


Figure 1-1 : Sous-arbre de l'arbre phylogénétique construit à l'aide des séquences génétiques de l'ARN ribosomique 16S illustrant les espèces et les souches qui sont étroitement apparentées à la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp.

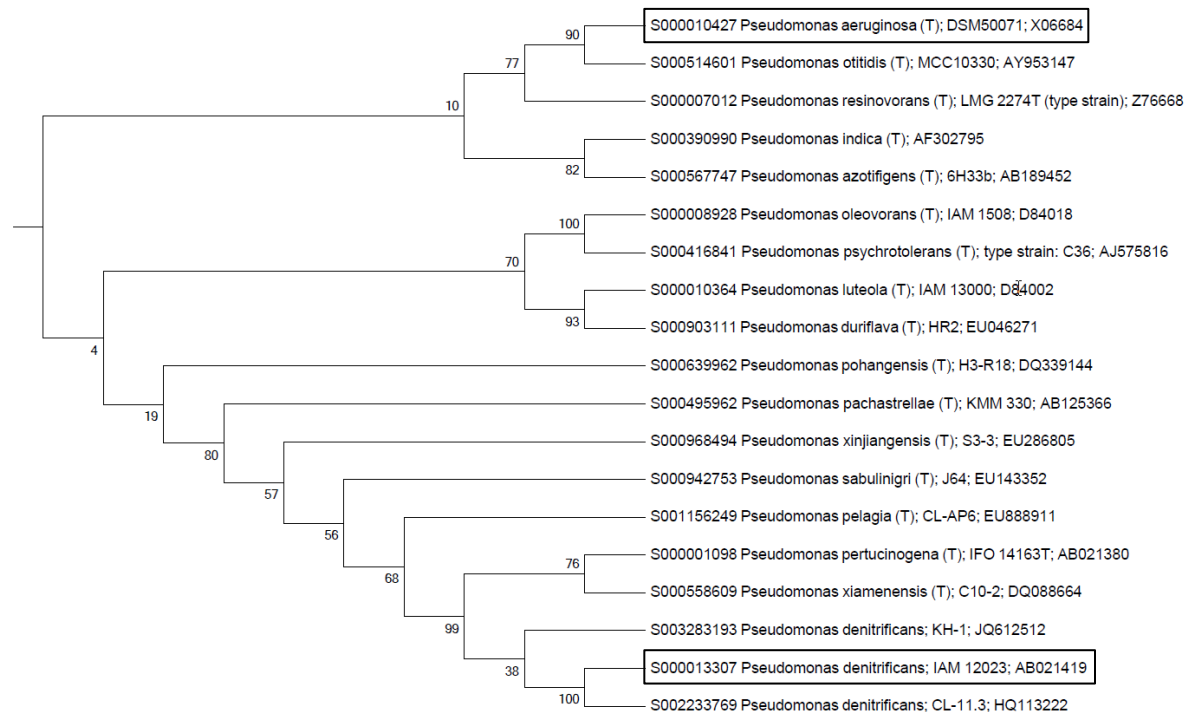


Figure 1-2 : Sous-arbre de l'arbre phylogénétique construit à l'aide des séquences génétiques de l'ARN ribosomique 16S illustrant les espèces et les souches qui sont étroitement apparentées à l'espèce pathogène *P. aeruginosa*

1.1.1.4 Caractéristiques phénotypiques et moléculaires

Cette section décrit les caractéristiques qui peuvent être utilisées pour différencier la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp., une souche étroitement apparentée (SP2, voir la figure 1-1) et la souche PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*, un

pathogène apparenté représentatif (Tableau 1-2. au Tableau 1-4). Les observations effectuées par les scientifiques de Santé Canada sur la souche ATCC 13867 étaient cohérentes avec celles mentionnées dans les publications scientifiques en ce qui a trait à la plupart des caractéristiques morphologiques et de croissance. Bien que Santé Canada n'ait pas produit les courbes de croissance, il a été observé que la taille de la colonie de la souche ATCC 13867 *Pseudomonas* sp. variait en fonction de la température à laquelle elle était incubée lorsqu'elle était déposée sur une plaque couverte d'un bouillon trypticase soya pendant 48 heures (1 à 2 mm à 28 °C, 1 mm à 32 °C, 3 mm à 37 °C et 0,5 mm à 42 °C). Ce résultat semble indiquer que le taux de croissance optimal serait atteint à une température de près de 37 °C.

Tableau 1-2 : Caractéristiques morphologiques et de croissance de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp., de la souche SP2 de *Pseudomonas* sp. et de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*

Caractéristique ^a	ATCC 13867	Souche SP2	Souche PAO1
Taille de la cellule (longueur sur largeur)	1,05 × 0,8 µm	2,0 × 0,5 µm	1,3 à 3,0 × 0,5 à 0,8 µm
Fluorescence	Non fluorescente	Non fluorescente	Fluorescent
Colonies	Entière, lisse, luisante, translucide, blanc cassé/brun clair ^b , surélevée ^b	Couleur crème pâle	Entière, lisse, luisante, convexe, couleur brun clair et morphologie d'œuf poêlé
Production de pigments	Aucun à rose	Rose	Diffusible, vert
Température optimale de croissance	25 °C	Aucune donnée	37 °C
Croissance à 40 °C	Négative	Aucune donnée	Positive
Croissance à 42 °C	Négative ^b	Aucune donnée	Positive

^a Données compilées provenant des sources suivantes : Arasu *et al.*, 2013; ATCC, 2013a; ATCC, 2013b; Doudoroff *et al.*, 1974; Lysenko, 1961; Madigan *et al.*, 2009; Palleroni, 1957; Palleroni, 2005; Pier *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 1989.

^b Données non publiées générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada.

Tableau 1-3 : Caractéristiques biochimiques de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*, de la souche SP2 de *Pseudomonas sp.* et de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*

Caractéristique	ATCC 13867 ^a	ATCC 13867 ^b	Souche SP2 ^b	Souche PAO1 ^b
Liquéfaction de la gélatine	Non observée	Négative	Négative	Positive
Utilisation du maltose	Variable	Positive	Positive	Négative

a Données non publiées générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada.

b (Arasu *et al.*, 2013; Doudoroff *et al.*, 1974; Lysenko, 1961; Palleroni, 2005)

Le séquençage du génome complet de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* a été réalisé : la taille du génome est de 5,7 Mb et il contient 5 135 gènes (Winsor *et al.*, 2011), 2 567 opérons et 5 059 gènes codant pour les protéines (Ainala *et al.*, 2013). Aucun plasmide n'a été repéré dans la souche ATCC 13867 à l'aide de la *Pseudomonas* Genome Database (base de données sur le génome des *Pseudomonas*) [Winsor *et al.*, 2011].

Tableau 1-4 : Caractéristiques moléculaires de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*, de la souche SP2 de *Pseudomonas sp.* et de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*

Caractéristique ^a	ATCC 13867	Souche SP2	Souche PAO1
Taux de GC	65,2 % ^a	Non disponible	66,6 % ^a
Taille du génome et numéro d'enregistrement	5,7 Mb (CP004143)	Non disponible	6,2 Mb (AE004091)
ARNr 16S	NR_102805	JX298094	AB626118

^a(Palleroni 2005; Winsor *et al.*, 2011)

Les caractéristiques telles que la morphologie cellulaire, la teneur totale en lipides et la sensibilité à certains antibiotiques permet de faire la distinction entre la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* et la souche SP2 de *Pseudomonas sp.* (Arasu *et al.*, 2013). On peut se fonder sur les différences soulignées dans le Tableau 1-5 pour différencier la souche inscrite sur la LIS des autres souches de *Pseudomonas sp.* Les scientifiques de Santé Canada ont effectué l'analyse de l'ester méthylique d'acide gras de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* (annexe 2).

Tableau 1-5 : Différentiation des souches ATCC 13867 et SP2 de *Pseudomonas sp.* fondée sur la morphologie cellulaire, la composition en acides gras et la sensibilité aux antibiotiques, adaptée d'Arasu *et al.* (2013)

Caractéristique	Souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas sp.</i>	Souche SP2 de <i>Pseudomonas sp.</i>
Total de lipides (%)	48 %	50 %

Morphologie cellulaire	Cellule courte ayant une surface plus lisse	Cellule allongée ayant une surface plus rugueuse
Acide nalixidique	Sensible	Intermédiaire
Sparfloxacine	Sensible	Intermédiaire
Colistine	Intermédiaire	Résistante

1.1.2 Propriétés biologiques et écologiques

1.1.2.1 Paramètres de croissance

La souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. est une bactérie du soufre incolore ayant un métabolisme mixte (Robertson *et al.* 1989). Elle est anaérobie facultative, chimolithotrophe facultative et est capable de nitrification hétérotrophe et de dénitrification aérobie (Kornaros et Lyberatos, 1998; Robertson *et al.*, 1989). Elle peut utiliser diverses sources de carbone et passer d'une source privilégiée de carbone à une source secondaire selon une tendance à la croissance diauxique (Casasus *et al.*, 2005; Hamilton *et al.*, 2005). La souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. a atteint un taux de croissance maximal de 0,043 mg biomasse sèche/mL par heure dans 4 g/L de glucose (Apel et Turick, 1993). La souche inscrite sur la LIS est également capable d'utiliser du succinate, des extraits de levure, de l'éthanol et des boues d'épuration préalablement traitées comme sources de carbone et d'énergie (Dasu *et al.*, 1993; Nilsson *et al.*, 1980; Wu *et al.*, 2001). La souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. ne s'est pas développée à 4 °C ni à 40 °C (Doudoroff *et al.*, 1974). La cinétique de croissance et la croissance dans différents milieux de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. sont présentées aux annexes 3 et 4, respectivement.

1.1.2.2 Persistance et survie dans l'environnement

Dans le cadre d'une étude, on a élaboré des marqueurs d'ADN propres aux souches à partir du polymorphisme de longueur de fragments amplifiés pour déceler la souche de *Pseudomonas* sp. ATCC 13867 et d'autres espèces de *Pseudomonas* (Xiang *et al.*, 2010). Ces marqueurs ont été utilisés en combinaison avec une PCR quantitative en temps réel afin d'effectuer le suivi des concentrations estimées des cellules de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. dans le sol au fil du temps. Des suspensions de cellules de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. ont été ajoutées à un sol agricole en laboratoire jusqu'à l'obtention d'une concentration finale de 10^8 à 10^{10} UFC/g poids sec. La souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. a persisté dans le sol de loam argileux (22 °C, pH de 5,8, capacité de rétention d'eau de 60 %) pendant au moins 181 jours, ce qui indique une grande capacité de colonisation. Les auteurs laissent entendre que la persistance à long terme observée chez la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. (supérieure à celle de *P. aeruginosa* et égale à celle de *P. stutzeri*) peut être attribuable à la flexibilité métabolique de l'espèce et particulièrement à sa capacité de dénitrification aérobie (Xiang *et al.*, 2010).

Dans une autre étude, la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. a formé des biofilms dans des colonnes à renouvellement continu sous pression. Les colonnes

contenaient du mudstone et du grès à diatomées ainsi que de l'eau souterraine synthétique et un supplément d'acétate de sodium. Le nombre de cellules a augmenté pendant la période expérimentale de 28 jours (Harrison *et al.*, 2011; Wragg *et al.*, 2012).

Selon ces études, des populations introduites de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* devraient persister et proliférer dans certaines conditions environnementales et en présence d'éléments nutritifs.

1.1.2.3 Transformation du nitrate et du nitrite

Il a été mentionné que la croissance de la souche inscrite sur la LIS était plus rapide lorsque le nitrate et l'oxygène étaient présents simultanément que lorsqu'il n'y avait que l'un ou l'autre des accepteurs d'électrons (Robertson *et al.*, 1989). La souche inscrite sur la LIS pouvait réduire rapidement le N₂O en N₂; le taux d'élimination maximal de N₂O de 0,017 mM/h/mg biomasse sèche a été atteint à la température de 35 °C et à la concentration initiale de N₂O de 0,9 mM (Apel et Turick, 1993). À des concentrations supérieures à celle-ci, le taux de réduction diminuait (Apel et Turick, 1993). Lorsque la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* se développait dans le nitrate ou le nitrite, on notait une production immédiate de gaz de N₂ (Robertson *et al.*, 1989). Les scientifiques de Santé Canada ont également observé la capacité de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* à réduire les nitrates et à produire du gaz.

1.1.2.4 Résistance aux antibiotiques, aux métaux et aux autres agents chimiques

La souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* contient de multiples gènes de résistance aux antibiotiques, aux métaux et à d'autres agents chimiques (Winsor *et al.*, 2011), notamment :

- protéine de la famille des métallo-bêta-lactamases et bêta-lactamase/D-alanine carboxypeptidase (*ampC*);
- pompes à efflux, y compris le système de pompe à efflux polychimiothérapeutique de type résistance/nodulation/division cellulaire (RND) [gènes repérés : *MexR*, *RND*, *SugE*], protéine à domaine de résistance à l'acide fusarique;
- kinase de résistance aux antibiotiques hydroxyurée/aminoglycoside;
- protéine de résistance au cobalt/zinc/cadmium (*CzcA*);
- glyoxalase/protéine de résistance à la bléomycine/dioxygénase;
- protéine A de résistance au cuivre;
- protéine de résistance au peroxyde d'hydrogène organique;
- protéine phosphinothricine-*N*-acétyl-transférase (résistance à l'herbicide).

Le profil de sensibilité aux antibiotiques de la souche inscrite sur la LIS a été publié récemment (Arasu *et al.*, 2013). Dans le cadre d'essais effectués à l'aide de la méthode de diffusion sur disque, la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* présentait une sensibilité aux représentants des principales classes d'antibiotiques,

dont les aminoglycosides, les inhibiteurs de β -lactamase et les fluoroquinolones; une résistance aux carboxypénicillines et une sensibilité variable aux céphalosporines ont été signalées (Tableau 1-6). La zone d'inhibition a été mesurée après l'incubation à 37 °C pendant 17 heures.

Tableau 1-6 : Profils de sensibilité aux antibiotiques de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* (établis à l'aide de la méthode de diffusion sur disque), adaptés d'Arasu *et al.* (2013)

Antibiotique (μ g)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	État ^a
Amikacine (30)	23	Sensible
Gentamicine (10)	25	Sensible
Kanamycine (30)	34	Sensible
Streptomycine (30)	17	Résistante
Tobramycine (10)	31	Sensible
Pénicilline (50)	0	Résistante
Ampicilline (50)	0	Résistante
Augmentin (30)	28	Non disponible ^b
Imipénem (10)	30	Sensible
Ticarcilline (75)	25	Sensible
Ciprofloxacine (5)	39	Sensible
Gatifloxacine (5)	32	Sensible
Lévofloxacine (5)	37	Sensible
Moxifloxacine (5)	30	Non disponible
Acide nalidixique (30)	35	Sensible
Norfloxacine (10)	38	Sensible
Ofloxacine (5)	34	Sensible
Sparfloxacine (5)	32	Sensible
Cefpodoxime (10)	0	Résistante
Ceftriaxone (30)	30	Sensible
Colistine (10)	10	Intermédiaire
Co-trimoxazole (25)	25	Non disponible

^a Selon le Clinical and Laboratory Standards Institute (anciennement NCCLS), États-Unis.

^b Aucune interprétation présentée.

Les scientifiques de Santé Canada ont réalisé les épreuves de sensibilité aux antibiotiques (Tableau 1-7). La plupart des antibiotiques mis à l'essai étaient efficaces pour ce qui est d'inhiber la croissance, à l'exception du triméthoprime.

Tableau 1-7 : Sensibilité de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* aux antibiotiques

Antibiotique	Souche ATCC 13867 de <i>Pseudomonas sp.</i> (concentration minimale inhibitrice [CMI], μ g/mL) ^a	Résultat ^b
Amoxicilline	12	S.O. ^c

Aztréonam	15 ± 6	I ^d (S ^e ≤ 1, R ^f > 16)
Céfotaxime/céphotaxime	7,5 ± 3	S.O.
Ciprofloxacine	0,37	S (S ≤ 0,5, R > 1)
Colistine	0,37	S (S ≤ 4, R > 4)
Doxycycline	1,5	S.O.
Érythromycine	1,2	S.O.
Gentamicine	0,37	S (S ≤ 4, R > 4)
Méropénème	0,37	S (S ≤ 2, R > 8)
Triméthoprime	24	S.O.

^a Données non publiées générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada.

^b D'après les valeurs critiques de l'European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

^c S.O. : sans objet. L'EUCAST a indiqué que les épreuves de sensibilité ne sont pas recommandées, car cette espèce est une piètre cible pour le traitement par ce médicament et les isolats peuvent être qualifiés de résistants sans avoir été préalablement soumis à des épreuves.

^d I : Sensibilité intermédiaire.

^e S : Sensible.

^f R : Résistant

Une souche obtenue auprès de C. Delwiche (première personne à avoir déposé la souche inscrite sur la LIS à l'ATCC), qui est vraisemblablement la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* inscrite sur la LIS, a été utilisée dans une étude visant à comparer l'effet inhibiteur des métaux lourds sur les pseudomonades. Il a été observé que cette souche était beaucoup plus résistante à l'effet des métaux lourds par rapport à un autre isolat identifié en tant que *Pseudomonas sp.* et à une souche de *P. aeruginosa* (Bollag et Barabasz, 1979).

Aucune donnée n'a été relevée sur la résistance de la souche 13867 de *Pseudomonas sp.* aux désinfectants, tels que le chlore et les composés d'ammonium quaternaire.

1.1.2.5 Caractéristiques pathogéniques et toxigènes

Les facteurs de virulence associés à *P. aeruginosa* sont notamment : pili; flagelles; sidérophores; pyocyanine; élastase; protéases; rhamnolipides; alginate; autres polysaccharides; lipopolysaccharides (examiné dans Hay *et al.*, 2014; Nelson *et al.*, 2002; Palleroni, 2005). La liste dans la *Pseudomonas* Genome Database concernant la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* confirme la présence de certains de ces facteurs de virulence (Winsor *et al.*, 2011), dont :

- gènes participant à la sécrétion, y compris, sans toutefois s'y limiter : sécrétion de type III, protéine lcmF associée à la sécrétion de type VI, protéine associée au système de sécrétion de type IV et protéine hybride de la membrane associée à la sécrétion de type I (HlyD);
- gènes associés à la formation et à la modification du pilus, y compris, sans toutefois s'y limiter : protéine de modification du pilus associée au système de sécrétion de type VI (PilV), formation du pilus (PilZ), protéine du système, protéine de biogenèse/stabilité du pilus (PilW) et protéine de formation du pilus (PilM);

- molécules de détection du quorum : protéine DksA de liaison à l'ARN polymérase, régulateur de la transcription *MetR* et régulateur de la transcription de la famille *TraR/DskA*;
- protéines associées aux sidérophores, y compris : protéine de réception du signal du complexe fer-sidérophore (FecR), récepteur de sidérophores par l'intermédiaire de TonB, protéine de biosynthèse des sidérophores et protéine de liaison périplasmique soluble associée au transporteur ABC du complexe sidérophore-Fe³⁺;
- monooxygénase associée à la biosynthèse d'antibiotiques, kinase de résistance aux antibiotiques aminoglycosidase/hydroxyurée, protéine phosphinothricine-*N*-acétyl-transférase (résistance aux antibiotiques) et transporteur d'antibiotiques.

Une recherche dans la documentation et la liste de la *Pseudomonas* Genome Database concernant la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* confirme l'absence de toxines extracellulaires, telles que les rhamnolipides, la pyocyanine, la pyocheline et l'acide cyanhydrique (Winsor *et al.*, 2011)

L'alginate, un exopolysaccharide, secrété aide la bactérie à s'adapter à de nombreux habitats et à y survivre. Il intervient également dans la formation de biofilms et de capsules et peut accroître la résistance aux antibiotiques et aux bactéricides, renforçant ainsi la capacité de la bactérie à s'évader du système immunitaire de l'hôte (Govan et Deretic, 1996; examiné dans Hay *et al.*, 2014; Rezaee *et al.*, 2002). Plusieurs gènes associés à la régulation et à la biosynthèse de l'alginate ont été repérés dans la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*, dont : *alg8*, *alg44*, *algK*, *algE*, *algG*, *algX*, *algL*, *algJ*, *algF*, *algR* et *algB* (examiné dans Hay *et al.*, 2014; Winsor *et al.*, 2011). Cependant, d'autres gènes nécessaires à la régulation et à la biosynthèse de l'alginate (comme *algD* [promoteur], *algA*, *algU*, *algC* et *amrZ*) n'ont pas été repérés (examiné dans Hay *et al.*, 2014; Winsor *et al.*, 2011).

Les biofilms constituent un mécanisme de pathogénicité largement reconnu chez les pseudomonades. Les biofilms contribuent à la persistance des infections, et les cellules qui les composent sont jusqu'à 1 000 fois plus résistantes aux effets des agents antimicrobiens que leurs homologues planctoniques (O'Toole et Kolter, 1998; Costerton *et al.*, 1999; Mah et O'Toole, 2001). On sait que la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* forme des biofilms (Harrison *et al.*, 2011; Wragg *et al.*, 2012).

Une forte activité hémolytique (ainsi qu'une activité lécithinase) peut révéler la présence de phospholipases cytotoxiques qui peuvent faciliter l'invasion et qui sont associées à la virulence (Rowan *et al.*, 2001; Sorokulova *et al.*, 2008). Les scientifiques de Santé Canada n'ont observé aucune activité hémolytique lors de l'étude sur la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*

L'activité de la catalase permet au micro-organisme de se protéger contre les éliminations entraînées par l'oxygène réactif que provoquent les cellules immunitaires, ce qui fait de lui un agent pathogène plus efficace. Les scientifiques

de Santé Canada ont déterminé que l'activité de la catalase était positive chez la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*

Dans les essais réalisés par les scientifiques de Santé Canada, la cytotoxicité de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* a été évaluée dans deux lignées cellulaires, J774A.1 (cellules macrophages) et HT29 (cellules épithéliales coliques humaines), avec et sans gentamicine. Aucune toxicité n'a été observée dans les cellules HT29. Une certaine toxicité a été observée dans les cellules J774A.1 en présence de gentamicine. En l'absence d'antibiotiques, les cellules J774A.1 étaient également plus sensibles que les cellules HT29 (en général, les cellules J774A.1 sont plus sensibles aux substances toxiques). Toutefois, dans l'ensemble, la toxicité est limitée (bioréduction maximale de 30 % après 24 heures), ce qui laisse entendre que les composantes structurales de la bactérie peuvent provoquer une réponse toxique limitée. Des réponses marginales semblables ont été observées chez certaines espèces *Acinetobacter* ayant fait l'objet du même test MTT (Tayabali *et al.*, 2012). Aux fins de comparaison, des souches du pathogène connu, *P. aeruginosa*, ont causé une diminution allant de 60 à 90 % de la production de formazan du MTT.

1.1.3 Effets

Afin de faire preuve de prudence et pour garantir que seront répertoriés tous les cas d'infection pouvant impliquer la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* ou des souches étroitement apparentées, la section suivante comprend aussi des renseignements sur les cas d'infection attribués à *P. denitrificans*.

1.1.3.1 Environnement

Une étude a indiqué que *P. denitrificans* était répandu dans les populations de nématodes des plantes, *Xiphinema americanum*, en Virginie-Occidentale. Toutefois, il n'était pas clair si la nature de la relation était symbiotique ou pathogène (Adams et Eichenmuller, 1963).

On n'a trouvé aucune donnée indiquant explicitement que la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* ou des souches étroitement apparentées (souche SP2 de *Pseudomonas sp.*, *P. nitroreducens* et *P. citronellolis*) contribuaient aux effets nocifs sur les plantes, les vertébrés ou les invertébrés terrestres ou aquatiques.

1.1.3.2 Humains

De même, aucune donnée n'a été relevée indiquant que la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* ou ses proches parents (souche SP2 de *Pseudomonas sp.*, *P. nitroreducens* et *P. citronellolis*) contribuaient aux effets nocifs sur la santé humaine.

Un cas mortel impliquant une souche de *P. denitrificans* comme agent étiologique d'une infection grave chez une personne présentant une prédisposition en raison d'une maladie sous-jacente a été recensé (Fischer *et al.*, 1981). Des cultures pures de *P. denitrificans* ont été isolées du liquide céphalorachidien dans un cas de

méningite mortelle chez un patient atteint de lupus érythémateux disséminé, d'ulcère de jambe, d'insuffisance mitrale, de troubles épileptiques et de démence légère. Les auteurs ont proposé qu'un ancien ulcère en voie de guérison aurait été à l'origine de la bactériémie, ayant finalement entraîné l'infection des méninges également. Dans ce cas, la résistance à un certain nombre d'antibiotiques a compromis le traitement. On ne sait pas avec certitude si le micro-organisme isolé était apparenté de près ou de loin à la souche inscrite sur la LIS.

Chez un patient atteint de fibrose kystique présentant des antécédents d'abcès pulmonaires bilatéraux récurrents au cours des deux années précédentes, les résultats d'une bronchoscopie réalisée à des fins thérapeutiques ont indiqué la présence de *P. denitrificans* et de *S. aureus* (Canny *et al.*, 1986). Malgré un traitement par tobramycine, ticarcilline et cloxacilline, le patient a subi un choc septique avec coagulation intravasculaire disséminée et insuffisance rénale ayant causé la mort. À l'autopsie d'un patient atteint de fibrose kystique, *P. denitrificans* a été isolé parallèlement à *S. aureus* d'un abcès pulmonaire, mais les hémato cultures n'ont permis de détecter que *P. denitrificans* qui présentait une sensibilité aux antibiotiques correspondant à l'organisme mis en culture et prélevé à partir de l'abcès pulmonaire.

Aucun cas de réaction allergique liée à la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* ou à des souches étroitement apparentées (souche SP2 de *Pseudomonas sp.*, *P. nitroreducens* et *P. citronellolis*) n'a été trouvé dans les publications scientifiques. Comme tous les micro-organismes, la souche inscrite sur la LIS contient ou produit des composants, tels que des lipopolysaccharides et des enzymes, qui peuvent agir en tant qu'immunostimulants, allergènes ou sensibilisants. La sensibilisation ou les réactions allergiques aux micro-organismes pourraient se produire par voie cutanée ou respiratoire chez des personnes fréquemment exposées ou vulnérables (Martel *et al.*, 2010; Ring *et al.*, 1992).

1.2 Gravité du danger

On estime que la gravité du danger pour l'environnement et la santé humaine attribuable à la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* est faible en raison des points suivants : 1) on peut distinguer la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* des espèces *Pseudomonas* étroitement apparentées, de celles que l'on trouve dans l'environnement et des souches de *P. aeruginosa* qui sont pathogènes pour les espèces environnementales et humaines; 2) bien qu'on ait repéré des gènes pouvant entraîné une virulence dans le génome de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*, rien n'indique que la souche inscrite sur la LIS agit en tant que pathogène. Il est possible que les gènes de virulence soient inactifs ou qu'ils dépendent de l'expression d'autres gènes ou de gènes manquants pour causer un danger; 3) aucun effet nocif sur les espèces environnementales ou les humains attribué à la souche inscrite sur la LIS ou à une souche étroitement apparentée n'a été signalé; 4) dans le cas peu probable d'une infection, il existe des antibiotiques à usage vétérinaire et à usage clinique.

Les dangers liés à l'utilisation de ce micro-organisme en milieu de travail doivent

être classés comme il se doit en vertu du Système d'information sur les matières dangereuses utilisées au travail (SIMDUT)⁴.

2. Évaluation de l'exposition

2.1 Sources d'exposition

Cette évaluation tient compte de l'exposition à la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* résultant de son ajout à des produits commerciaux ou de grande consommation et de son utilisation dans des procédés industriels au Canada.

La souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* a été mise en candidature en 2005 pour être inscrite à la Liste intérieure des substances (LIS) aux fins d'utilisation dans des produits commerciaux et des produits de consommation.

Les réponses à un questionnaire volontaire envoyé en 2007 à un sous-ensemble de sociétés de biotechnologie clés ainsi que les renseignements obtenus d'autres programmes fédéraux réglementaires et non réglementaires indiquent que la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* a été utilisée à des fins commerciales en 2006.

Le gouvernement a procédé à une collecte obligatoire de renseignements en application de l'article 71 de la LCPE, qui a été publié dans la Partie I de la *Gazette du Canada* le 3 octobre 2009 (avis en vertu de l'article 71). L'avis en vertu de l'article 71 s'appliquait à toute personne qui, au cours de l'année civile 2008, avait fabriqué ou importé la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*, que ce soit seule, dans un mélange ou dans un produit. Aucune activité industrielle, commerciale ou par les consommateurs utilisant la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* n'a été déclarée en réponse à l'avis émis en vertu de l'article 71.

Les relevés de 2007 et 2009 étaient vraiment différents en matière de cible et de portée. Dans cette évaluation, les résultats du relevé de 2009 ont été utilisés pour estimer l'exposition due aux utilisations courantes, car elle nécessitait des renseignements sur les utilisations de la souche du micro-organisme qui est inscrit sur la Liste intérieure des substances, tandis que le relevé de 2007 concernait les utilisations des produits qui avaient été associés au micro-organisme lorsque son inscription à la Liste intérieure des substances a été proposée. Compte tenu du fait que les préparations des produits ont pu changer, il se peut que les renseignements du relevé de 2009 représentent plus exactement les utilisations actuelles. Les utilisations déclarées dans le relevé volontaire de 2007 ont également été prises en compte dans l'évaluation des utilisations potentielles.

⁴ La détermination de la conformité à l'un ou plusieurs des critères énoncés à l'article 64 de la LCPE est basée sur une évaluation des risques pour l'environnement et/ou la santé humaine liés à l'exposition dans l'environnement en général. Pour les humains, cela inclut, sans toutefois s'y limiter, l'exposition par l'air, l'eau et l'utilisation de produits contenant la substance. Une conclusion établie en vertu de la LCPE sur la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* ne présente pas un intérêt pour une évaluation, qu'elle n'empêche pas non plus, en fonction des critères de risque prévus dans le SIMDUT, qui sont définis dans le *Règlement sur les produits contrôlés* visant les produits destinés à être utilisés au travail.

Bien qu'aucune utilisation de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* n'ait été déclarée dans le cadre de l'enquête obligatoire, elle est toujours en vente sur le marché par l'ATCC. Étant donné qu'elle est inscrite sur la LIS et peut donc être utilisée au Canada sans avis préalable, elle peut s'avérer un choix intéressant aux fins de commercialisation. Une recherche dans le domaine public (fiches signalétiques, publications et brevets) a permis de recenser les utilisations suivantes actuelles d'autres souches de *Pseudomonas sp.* dans les secteurs de la consommation, du commerce et de l'industrie. Afin de s'assurer que toutes les utilisations éventuelles de la souche inscrite sur la LIS soient prises en compte, les activités trouvées concernant *P. denitrificans* ont également été incluses :

- production de vitamine B₁₂ (Kang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008b; Li *et al.*, 2008c; Li *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013b), de la coenzyme Q (Aida *et al.*, 1981), de cobalamines (Blanche *et al.*, 1991; Blanche *et al.*, 1997) et de produits chimiques de base (Yoshikuni *et al.*, 2010);
- production de biocarburants (Yoshikuni et Kashiyama, 2009);
- amélioration du sol par la précipitation de minéraux découlant de la dénitrification microbienne (Ellis *et al.*, 1996; Hamdan *et al.*, 2011);
- traitement des boues activées dans les usines de traitement des eaux usées municipales (Copp et Dold, 1998);
- traitement des eaux usées (Shiotani *et al.*, 1998);
- dénitrification de l'eau (Nilsson *et al.*, 1980);
- dégradation du pétrole (Yumoto *et al.*, 2005) et utilisation potentielle pour la biorestauration des sols contaminés;
- utilisation dans un mélange de micro-organismes servant à réduire la pollution de l'atmosphère et de l'environnement en diminuant la concentration de monoxyde d'azote, d'ammoniac, de poussière fine et de CO₂ provenant de sources de combustion et de la décontamination de milieux domestiques et commerciaux (Valenti, 2006).

2.2 Caractérisation de l'exposition

2.2.1 Exposition de l'environnement

D'après l'absence d'activités industrielles, commerciales et de consommation au Canada, selon l'avis en vertu de l'article 71, on estime que l'exposition environnementale globale à la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* est faible. Néanmoins, étant donné l'étendue et l'échelle des applications connues et potentielles de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* énumérées à la section 2.1, il y a un risque d'augmentation de l'exposition environnementale aux produits contenant cette souche. Par conséquent, des scénarios d'exposition potentielle découlant de ces produits ont été pris en compte.

Si les utilisations possibles indiquées à la section 2.1 se matérialisaient au Canada, l'exposition des plantes et des animaux à la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* serait fonction de la persistance et de la survie de ce micro-organisme dans l'environnement. Toutefois, la souche inscrite sur la LIS est flexible sur le plan

métabolique et elle devrait facilement coloniser de nouveaux milieux terrestres. Xiang *et al.* (2010) ont étudié la persistance de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* dans les microcosmes du sol et ont constaté que cette souche persistait dans le sol pendant au moins 181 jours, ce qui indique une grande capacité de colonisation. Les auteurs laissent entendre que la persistance à long terme observée chez la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* peut être attribuable à la flexibilité métabolique de l'espèce et particulièrement à sa capacité de dénitrification aérobie. Dans une autre étude mentionnée à la section 1.1.2.2, la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* formait des biofilms dans des colonnes à renouvellement continu sous pression; la phase solide était du mudstone et du grès à diatomées et la phase liquide, de l'eau souterraine synthétique et un supplément d'acétate de sodium. Le nombre de cellules a augmenté pendant la période expérimentale de 28 jours (Harrison *et al.*, 2011; Wragg *et al.*, 2012). La souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* devrait donc pouvoir survivre et persister dans la plupart des milieux terrestres et aquatiques.

Les scénarios d'exposition suivants s'appuient sur les utilisations connues d'autres souches et les utilisations futures probables décrites à la section 2.1. Les utilisations, telles que la biorestauration ainsi que le traitement de l'eau et des eaux usées, sont susceptibles d'introduire la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* dans les écosystèmes terrestres. Il est probable que les invertébrés terrestres vivant dans les sols du lieu de l'application ou de l'élimination et les plantes poussant dans les sols traités soient les plus directement exposés. Les vertébrés pourraient ingérer la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* en se nourrissant des plantes ou des invertébrés vivant dans les sols traités ou contaminés.

Les espèces aquatiques et marines peuvent entrer en contact avec la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* en raison du ruissellement provenant de l'application terrestre et de l'application directe de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* à des plans d'eau pour des utilisations telles que le traitement de l'eau (douce et salée), le traitement des eaux usées ou l'élimination des eaux usées provenant d'applications telles que la récupération du pétrole et de métaux ou la fabrication de produits biochimiques et de biocarburants.

Les applications aquatiques pourraient également exposer les espèces terrestres. Par exemple, les animaux au pâturage pourraient ingérer la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* à la suite de son utilisation dans la restauration de la qualité de l'eau, et les plantes et les invertébrés terricoles pourraient être exposés à la suite du traitement des bassins d'irrigation.

En cas de reprise d'activités commerciales, industrielles ou de consommation, l'exposition de l'environnement à la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* augmentera probablement. Les milieux naturels et les espèces qui seront exposés à la souche inscrite sur la Liste intérieure des substances dépendront des utilisations mentionnées dans les scénarios d'exposition décrits ci-dessus.

2.2.2 Exposition humaine

D'après l'absence d'activités industrielles, commerciales et de consommation au Canada, selon l'avis en vertu de l'article 71, on estime que l'exposition humaine globale à la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* est faible. Néanmoins, étant donné l'étendue et l'échelle des applications connues et potentielles de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* énumérées à la section 2.1, il y a un risque d'augmentation de l'exposition humaine aux produits contenant cette souche, de sorte que des scénarios d'exposition découlant de ces produits ont été pris en compte.

Si des utilisations possibles indiquées à la section 2.1 se matérialisaient au Canada, l'exposition humaine pourrait être plus grande en raison de l'utilisation de produits de consommation prévus pour le traitement des aquariums et des bassins décoratifs, le dégraissage des drains de cuisine, le nettoyage et la désodorisation des fosses septiques ainsi que le compostage. On s'attend à ce que la manipulation et l'application de ces produits entraînent l'exposition directe de la peau. L'inhalation de gouttelettes pulvérisées ou de poussières en suspension dans l'air contenant la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* produites pendant l'application de ces produits est également possible.

Après l'application du produit, la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* résiduelle sur les surfaces et dans les réservoirs, tels que les canalisations traitées, pourrait entraîner une exposition cutanée, une exposition orale par ingestion fortuite si l'organisme persiste sur les surfaces de préparation des aliments et une exposition par inhalation lorsque les aérosols sont générés (p. ex. avec les broyeurs à ordures dans les cuisines). Puisque la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* devrait persister après l'application, ces expositions peuvent ne pas avoir lieu au moment de l'application.

Si des produits commerciaux contenant la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* deviennent accessibles au Canada, la population générale pourrait faire l'objet d'une exposition fortuite lors de l'application de ces produits commerciaux. Le degré d'exposition fortuite dépendra du mode d'application, du volume appliqué et de la proximité des tierces personnes par rapport au lieu de l'application, mais il devrait en général être modéré.

L'exposition humaine à des plans d'eau et à des sols traités avec la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* (p. ex. pendant des activités récréatives) pourrait également conduire à l'exposition de la peau et des yeux, ainsi qu'à une ingestion fortuite.

L'exposition indirecte à la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* dans l'environnement à la suite de son utilisation dans la récupération du pétrole, le traitement de l'eau et des eaux usées, la biorestauration du sol ou l'élimination des déchets provenant de son utilisation dans la production d'enzymes aurait certainement lieu aux alentours des sites d'application ou d'élimination, mais ne

devrait pas être plus importante que l'exposition directe découlant de l'utilisation de l'organisme dans les produits de consommation.

Si l'organisme pénètre dans les systèmes municipaux de traitement de l'eau potable par l'intermédiaire de rejets provenant des utilisations potentielles, ces micro-organismes devraient être éliminés de façon efficace de l'eau potable à l'aide du procédé de traitement de l'eau, qui comprend au moins l'une des méthodes suivantes : la coagulation, la floculation, l'ozonisation, la filtration, le rayonnement ultraviolet et la chloration.

S'il y a utilisation commerciale, industrielle ou de consommation de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*, l'exposition humaine dans les scénarios d'exposition décrits ci-dessus peut se produire et pourrait comprendre une exposition directe et vraisemblablement répétée à des préparations concentrées de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*

3. Caractérisation des risques

Dans cette évaluation, le risque est caractérisé selon un paradigme qui veut qu'un danger et l'exposition à ce danger soient tous deux nécessaires pour qu'il y ait un risque. La conclusion de l'évaluation des risques est basée sur le danger et sur ce que l'on connaît de l'exposition due aux utilisations actuelles.

Concernant la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*, on estime que le danger est faible tant pour l'environnement que pour la santé humaine. Étant donné l'absence d'activités industrielles, commerciales ou de consommation au Canada selon l'Avis en vertu de l'article 71, on ne s'attend pas actuellement à une exposition de l'environnement ou à une exposition humaine à la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* (faible exposition); on estime donc que le risque associé aux utilisations actuelles devrait être faible pour l'environnement et la santé humaine.

La détermination du risque posé que présentent les utilisations actuelles est suivie par la prise en compte du danger estimé lié à de futures expositions prévisibles (découlant de nouvelles utilisations).

La souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* possède des propriétés intéressantes pour des applications qui pourraient entraîner l'exposition de l'environnement et de la population générale du Canada à cette souche dans l'avenir. Le risque pour l'environnement et la santé humaine que présentent les futures utilisations prévisibles de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* est également faible étant donné qu'il n'y a aucune preuve d'effets nocifs sur la santé humaine ou sur l'environnement.

4. Conclusion

À la lumière des renseignements présentés dans cette évaluation préalable, on conclut que la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* ne pénètre pas dans

l'environnement en une quantité ou concentration ou dans des conditions de nature à :

- avoir, immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou sur la diversité biologique;
- mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie;
- constituer ou pouvoir constituer un danger au Canada pour la vie ou la santé humaines.

On conclut donc que la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* ne satisfait à aucun des critères énoncés à l'article 64 de la LCPE.

5. Références

- Adams, R.E., Eichenmuller, J.J. 1963. A bacterial infection of *Xiphinema americanum*. *Phytopathology* 53, 745.
- Aida, K., Uchida, K., Kawada, I., Itoh, H. 1981. Process for the production of coenzyme Q. Patens CA 310399, 1-1.
- Ainala, S.K., Somasundar, A., Park, S. 2013. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867. *Genome Announcements* 1, 10.1128/genomeA.00257-13.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H., Oyaizu, H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1563-1589.
- Apel, W.A., Turick, C.E. 1993. The use of denitrifying bacteria for the removal of nitrogen oxides from combustion gases. *Fuel* 72, 1715-1718.
- Arasu, M.V., Sarkar, R., Sekar, B.S., Kumar, V., Rathnasingh, C., Choi, J., Song, H., Seung, D., Park, S. 2013. Isolation of a novel *Pseudomonas* species SP2 producing vitamin B₁₂ under aerobic condition. *Biot. Bioproc. Eng.* 18, 43-51.
- Blanche, F., Cameron, B., Crouzet, J., Debussche, L., Levy-Schil, S., Thibaut, D. 1991. Polypeptides involved in the biosynthesis of cobalamines and/or colamides, DNA sequences coding for these polypeptides, and their preparation and use. Base de données sur les brevets canadiens 90/01137, 1.
- Blanche, F., Cameron, B., Crouzet, J., Debussche, L., Thibaut, D., Remy, E. 1997. Biosynthesis method enabling the preparation of cobalamins. Base de données sur les brevets canadiens 96 05896, 1-1.
- Bollag, J.M., Barabasz, W. 1979. Effect of heavy metals on the denitrification process in soil. *J. Environ. Qual.* 8, 196-201.
- Canny, G.J., Marcotte, J.E., Levison, H. 1986. Lung abscess in cystic fibrosis. *Thorax* 41, 221-222.
- Casasus, A.I., Hamilton, R.K., Svoronos, S.A., Koopman, B. 2005. A simple model for diauxic growth of denitrifying bacteria. *Water Res.* 39, 1914-1920.
- Cogen, A.L., Nizet, V., Gallo, R.L. 2008. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br. J. Dermatol.* 158, 442-455.
- Copp, J.B., Dold, P.L. 1998. Comparing sludge production under aerobic and anoxic conditions. *Water. Sci. Technol.* 38, 285-294.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284:1318.
- Dasu, B.N., Deshmane, V., Shanmugasundram, R., Lee, C.M., Sublette, K.L. 1993. Microbial reduction of sulfur dioxide and nitric oxide. *Fuel* 72, 1705-1714.
- Delwiche, C.C. 1959. Production and utilization of nitrous oxide by *Pseudomonas denitrificans*. *J. Bacteriol.* 77, 55-59.

- Doudoroff, M., Contopoulou, R., Kunisawa, R., Palleroni, N.J. 1974. Taxonomic Validity of *Pseudomonas denitrificans* (Christensen) Bergey et al. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24, 294-300.
- DSMZ. 2014. Information sur le produit : *Pseudomonas nitroreducens* Iizuka and Komagata 1964 emend. Lang et al. 2007.
- Ellis, S., Dendooven, L., Goulding, K.W.T. 1996. Quantitative assessment of soil nitrate disappearance and N₂O evolution during denitrification: Nitrate disappearance during denitrification. *Soil Biol. Biochem.* 28, 589-595.
- Fischer, R.A., Doern, G.V., and Cheeseman, S.H. 1981. *Pseudomonas denitrificans* meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 13, 1004-1006.
- Govan, J.R.W., Deretic, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60, 539-574.
- Hamdan, N., Kavazanjan, E., Rittmann, B.E., Karatas, I. 2011. Carbonate mineral precipitation for soil improvement through microbial denitrification. 3925.
- Hamilton, R., Casasús, A., Rasche, M., Narang, A., Svoronos, S.A., Koopman, B. 2005. Structured model for denitrifier diauxic growth. *Biot. Bioeng.* 90, 501-508.
- Harrison, H., Wagner, D., Yoshikawa, H., West, J.M., Milodowski, A.E., Sasaki, Y., Turner, G., Lacinska, A., Holyoake, S., Harrington, J., et al. 2011. Microbiological influences on fracture surfaces of intact mudstone and the implications for geological disposal of radioactive waste. *Mineral. Mag.* 75, 2449-2466.
- Hay, I.D., Wang, Y., Moradali, M.F., Rehman, Z.U., Rehm, B.H.A. 2014. Genetics and regulation of bacterial alginate production. *Environ Microbiol* 1-15.
- Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology (JCICSB). 1982. Opinion 54: Rejection of the Species Name *Pseudomonas denitrificans* (Christensen) Bergey et al. 1923. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 466.
- Kang, Z., Zhang, J., Zhou, J., Qi, Q., Du, G., Chen, J. 2012. Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B₁₂. *Biotechnol. Adv.* 30, 1533-1542.
- Kornaros, M., Lyberatos, G. 1998. Kinetic modelling of *Pseudomonas denitrificans* growth and denitrification under aerobic, anoxic and transient operating conditions. *Water Res.* 32, 1912-1922.
- Li, K.T., Liu, D.H., Chu, J., Wang, Y.H., Zhuang, Y.P., Zhang, S.L. 2008a. An effective and simplified pH-stat control strategy for the industrial fermentation of vitamin B₁₂ by *Pseudomonas denitrificans*. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 31, 605-610.
- Li, K.T., Liu, D.H., Li, Y.L., Chu, J., Wang, Y.H., Zhuang, Y.P., Zhang, S.L. 2008b. Improved large-scale production of vitamin B₁₂ by *Pseudomonas denitrificans* with betaine feeding. *Bioresource Technol.* 99, 8516-8520.
- Li, K.T., Liu, D.H., Zhuang, Y.P., Wang, Y.H., Chu, J., Zhang, S.L. 2008c. Influence of Zn²⁺, Co²⁺ and dimethylbenzimidazole on vitamin B₁₂ biosynthesis by *Pseudomonas denitrificans*. *World J. Microb. Biot.* 24, 2525-2530.

- Li, K.T., Zhou, J., Cheng, X., Wei, S.J. 2012. Study on the dissolved oxygen control strategy in large-scale vitamin B12 fermentation by *Pseudomonas denitrificans*. *J. Chem. Tech. Biot.* 87, 1648-1653.
- Li, K., Bihan, M., Methe, B.A. 2013a. Analyses of the stability and core taxonomic memberships of the human microbiome. *PLoS One* 8, e63139.
- Li, K.T., Peng, W.F., Zhou, J., wei, S.J., Cheng, X. 2013. Establishment of beet molasses as the fermentation substrate for industrial vitamin B12 production by *Pseudomonas denitrificans*. *J. Chem. Tech. Biot.* 88, 1730-1735.
- Lysenko, O. 1961. *Pseudomonas*-an attempt at a general classification. *J Gen Microbiol* 25, 379-408.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. 2009. Brock Biology of Microorganisms. San Francisco (Californie) : Pearson - Benjamin Cummings.
- Mah, T.F., O'Toole, G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9, 34-39.
- Martel, C., Nielsen, G.D., Mari, E., Licht, T.R., Poulsen, L.K. 2010. Scientific / Technical Report Submitted to EFSA – Bibliographic Review on the Potential of Microorganisms, Microbial Products and Enzymes to Induce Respiratory Sensitization. CFP/EFSA/FEEDAP/2009/02. Accès : <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/75e.htm> [consulté en juillet 2012].
- Mohn, W.W., Wilson, A.E., Bicho, P., Moore, E.R.B. 1999. Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 68-78.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins, D.S., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., *et al.* 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4, 799-808.
- Nilsson, I., Ohlson, S., Haggstrom, L., Molin, N., Mosbach, K. 1980. Denitrification of water using immobilized *Pseudomonas denitrificans* cells. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 10, 261-274.
- O'Toole, G.A., Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signally pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28, 449.
- Palleroni, N.J. 1957. *Pseudomonas*: Family IV. *Pseudomonaceae*. In: Bergey's manual of determinative bacteriology, Breed, R.S., Murray, E.G.D., Smith, N.R. (éd.), Baltimore : The William and Wilkins Company, p. 116-117.
- Palleroni, N.J. 2005. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237AL (Nom. Cons., Opin. 5 of the Jud. Comm. 1952, 121). In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2 The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria, Brenner, D.J., Krief, N.R., Staley, J.T. (éd.), New York : Springer, p. 323-373.
- Peix, A., Ramirez-Bahena, M.H., Velazquez, E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet Evol* 9, 1132-47.

Pier, G.B., Lyczak, J.B., Wetzler, L.M. 2004. Immunology, Infection, and Immunity. Washington : ASM Press.

Rezaee, M.A., Behzadiyan-Nejad, Q., Pirayeh, S.N., Owlia, P. 2002. Higher aminoglycoside resistance in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* than in non-mucoid strains. *Arch. Iran. Med.* 5, 108-110.

Ring, J., Abeck, D., and Neuber, K. 1992. Atopic eczema: Role of microorganisms on the skin surface. *Allergy Eur. j. Allergy Clin. Immunol.* 47, p. 265-269.

Robertson, L.A., Cornelisse, R., De Vos, P., Hadjioetomo, R., Kuenen, J.G. 1989. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *Anton. Van Lee.* 56, 289-299.

Rowan, N.J., Deans, K., Anderson, J.G., Gemmell, C.G., Hunter, I.S., Chaithong, T. 2001. Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3873-3881.

Sacks, L.E., Barker, H.A. 1952. Substrate oxidation and nitrous oxide utilization in denitrification. *J. Bacteriol.* 64, 247-252.

Sacks, L.E., Barker, H.A. 1949. The influence of oxygen on nitrate and nitrite reduction. *J. Bacteriol.* 58, 11-22.

Shiotani, T., Fujii, H., *et al.* 1998. Water Treatment Carrier, Its Manufacture and Method For Nitrification and Denitrification Using That. Kuraray Co. Ltd 13191797.

Sorokulova, I.B., Pinchuk, I.V., Denayrolles, M., Osipova, I.G., Huang, J.M., Cutting, S.M., Urdaci, M.C. 2008. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Dig. Dis. Sci.* 53, 954-963.

Tayabali, A.F., Nguyen, K.C., Shwed, P.S., Crosthwait, J., Coleman, G., Seligy, V.L. 2012. Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. *Plos One* 7, e37024.

Tayabali, A.F., Seligy, V.L. 2000. Human cell exposure assays of *Bacillus thuringiensis* commercial insecticides: Production of *Bacillus cereus*-like cytolytic effects from outgrowth of spores. *Environ. Health Perspect.* 108, 919-930.

Valenti, G. 2006. Method and equipment for reducing environmental pollution. Base de données sur les brevets canadiens AR2005A000003.

Winsor, G.L., Lam, D.K.W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M.D., Yu, N.Y., Hancock, R.E.W., Brinkman, F.S.L. 2011. *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res.* 39:D596-D600.

Wragg, J., Harrison, H., West, J.M., Yoshikawa, H. 2012. Comparison of microbiological influences on the transport properties of intact mudstone and sandstone and its relevance to the geological disposal of radioactive waste. *Mineral. Mag.* 76, 3251-3259.

Wu, J.S., Langley, W.G., Chao, A.C. 2001. Reaction kinetics of immobilized-cell denitrification. II: Experimental study. *J. Environ. Eng.* 127, 689-697.

Xiang, S., Cook, M., Saucier, S., Gillespie, P., Socha, R., Scroggins, R., Beaudette, L.A. 2010. Development of amplified fragment length polymorphism-derived functional strain-specific markers to assess the persistence of 10 bacterial strains in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7126-7135.

Yoshikuni, Y., Kashiya, Y. 2009. Biofuel Production. Base de données sur les brevets canadiens 60/977,628.

Yoshikuni, Y., Wargacki, A.J., Herman, A. 2010. Biosynthesis of commodity chemicals. Base de données sur les brevets canadiens 61/121,869, 1.

Yumoto, I., Tanaka, M., Yamahira, K. 2005. Highly Functional Denitrifying And Oil Degrading Bacterium, And Method For Purifying Wastewater Using the Same. National Institute of Advanced Industrial Technology 2003357255.

Annexes

A. Arbre phylogénétique

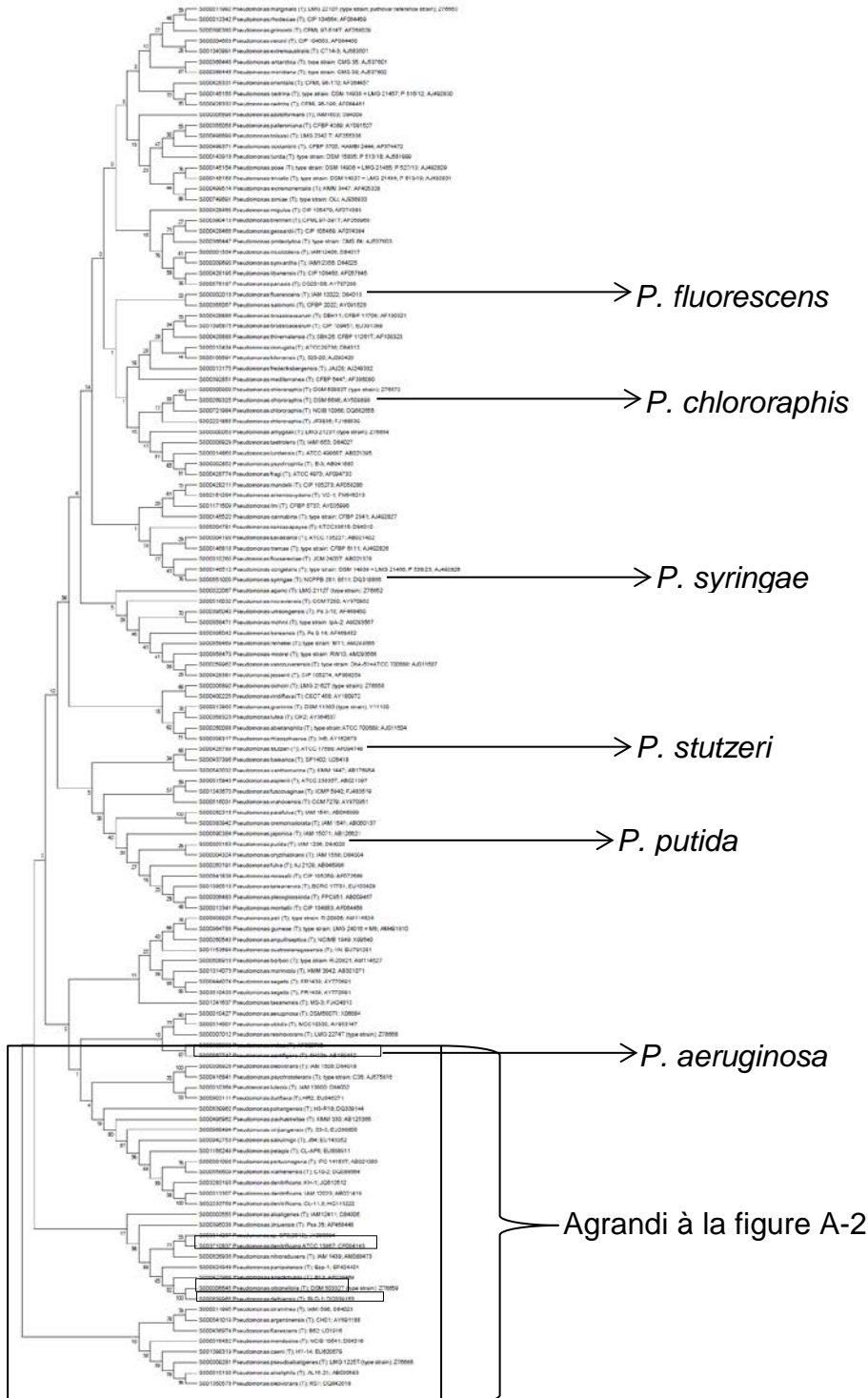


Figure A-1 : Arbre phylogénétique construit à l'aide des séquences génétiques de l'ARN ribosomique 16S illustrant les espèces qui représentent les principaux groupes du genre *Pseudomonas*

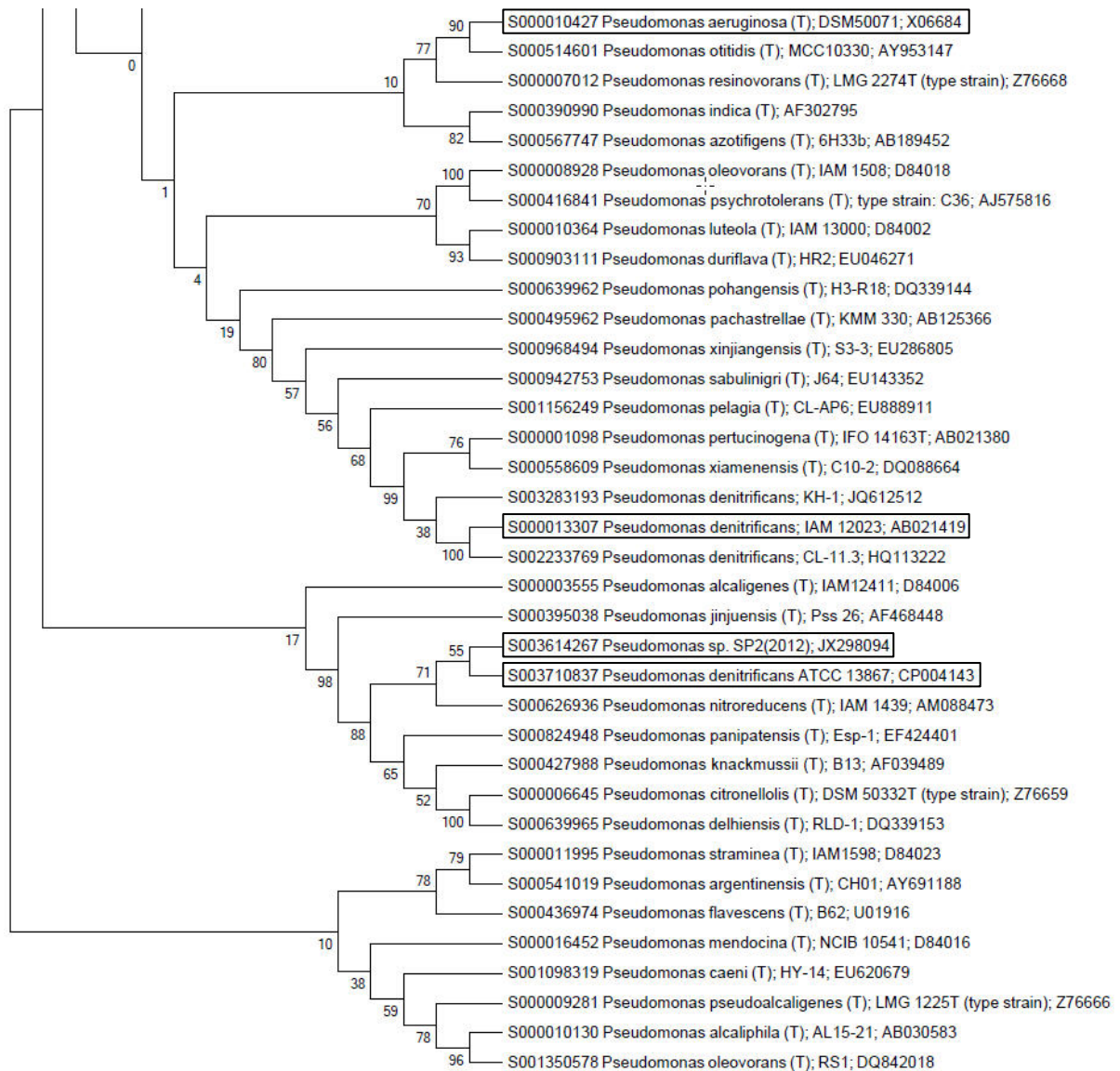


Figure A-2 : Arbre phylogénétique partiel construit à l'aide des séquences génétiques de l'ARN ribosomique 16S de l'espèce *Pseudomonas*

Les arbres phylogénétiques ont été produits par l'Environmental Health Science and Research Bureau à l'aide des séquences génétiques de l'ARNr 16S du genre *Pseudomonas* (Ribosomal Database Project : <http://rdp.cme.msu.edu/>).

L'alignement a été généré par le programme informatique MUSCLE et un arbre de vraisemblance maximale a été construit au moyen de la méthode de distribution gamma avec sites invariants et 500 essais de rééchantillonnage selon la méthode du bootstrap à l'aide de la version 5.2 du logiciel MEGA (Tamura *et al.*, 2011). La souche ATCC 18367 de *Pseudomonas* sp., la souche SP2 de *Pseudomonas* sp., la souche ATCC 19244 de *P. denitrificans* et *P. aeruginosa* ont été mis en évidence. Dans l'arbre phylogénétique, la souche inscrite sur la LIS est indiquée sous le nom « *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867 » et la souche ATCC 19244 de *Pseudomonas denitrificans*, sous le nom « *Pseudomonas denitrificans* IAM 12023 ».

B. Analyse de l'ester méthylique d'acide gras (EMAG)

Données non publiées générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada. Les données présentées sont tirées des bases de données MIDI cliniques et environnementales. MIDI est un système d'identification commercial basé sur l'analyse chromatographique du gaz des esters méthyliques d'acides gras cellulaires. Les bases de données cliniques et environnementales montraient que la relation la plus étroite se situait entre *Pseudomonas sp.* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau A-1 : Analyse de l'ester méthylique d'acide gras (EMAG) de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.*

Contexte	Base de données environnementales	Base de données cliniques
Fréquence	6/6	5/5
Indice de similarité	0,485	0,847
Premier choix	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – GC sous-groupe A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – souches mucoïdes

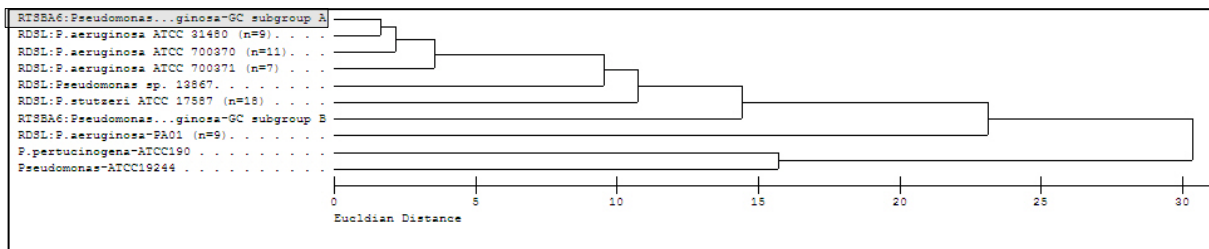


Figure A-3 : Analyse du groupement à liens simples dans la base de données environnementales et souches sélectionnées

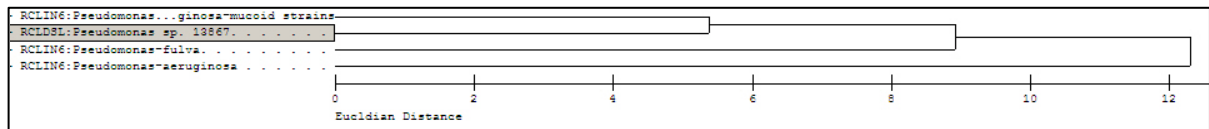


Figure A-4 : Analyse du groupement à liens simples dans la base de données cliniques

C. Cinétique de croissance

La cinétique de croissance a été étudiée à l'aide du milieu Eagle modifié par Dulbecco, de bouillon de trypticase de soya et de sérum fœtal bovin à différentes températures. Chaque vedette du tableau illustre la croissance (augmentation de l'absorption à 500 nm) éventuelle à des températures différentes (28, 32, 37 et 42 °C).

Tableau A-2 : Cinétique de croissance de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas sp.* dans des milieux liquides sur une période de 24 heures

Milieu	28 °C	32 °C	37 °C	42 °C
Bouillon de trypticase soja	+++ ^a	+++	+ ^b	- ^c
Sérum de fœtus de bovin à 10 %	~ ^d	~	~	-
Sérum de fœtus de bovin à 100 %	+	++ ^e	-	-
Milieu Eagle modifié de Dulbecco avec sérum de fœtus de bovin et glutamine	-	-	-	-

Données non publiées générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada. Il a été déterminé que la croissance optimale avait lieu dans un milieu liquide à une température de 32 °C.

^a +++, forte croissance (densité optique [DO] > 1).

^b +, croissance lente (DO > 0,2).

^c -, aucune croissance (OD < 0,05).

^d ~, piètre croissance (DO < 0,2).

^e ++, croissance modeste (DO > 0,5).

D. Croissance dans différents milieux**Tableau A-3 : Croissance de la souche ATCC 13867 de *Pseudomonas* sp. à 28 °C (48 heures) dans différents milieux**

Milieu ^a	Résultats
Bouillon de trypticase soja ^a	Positive
Gélose cétrimide ^b	Positive
Amidon ^c : Croissance	Positive
Amidon ^c : Hydrolyse	Faiblement positive
Gélose MacConkey ^d	Croissance, colonies autres que roses
Suppléments de mannitol, jaune d'œuf, polymyxine ^e	Négative
Gélose mannitol-sel ^f	Positive, mais réaction alcaline
Utilisation du citrate ^g	Négative ^h
Hydrolyse de l'urée ⁱ	Négative

Données non publiées générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada.

^a Milieu pour tout usage.

^b Milieu sélectif pour la croissance de la bactérie à Gram négatif, *P. aeruginosa*.

^c Milieu différentiel permettant de tester la capacité d'un organisme à produire des enzymes extracellulaires qui hydrolysent l'amidon.

^d Détection des organismes coliformes dans le lait et l'eau; tests permettant de définir la capacité d'un organisme à fermenter le lactose.

^e Gélose sélective de *B. cereus*.

^f Isolement et différenciation des staphylocoques.

^g Capacité à utiliser le citrate en tant que source unique de carbone.

^h Les résultats de l'API indiquent que la croissance devrait être positive pour la souche ATCC 13867.

ⁱ Métabolisme de l'urée; dépistage des entéropathogènes dans les échantillons de selles.