

Évaluation préalable finale des souches

***Bacillus amyloliquefaciens* 13563-0**

***Bacillus atrophaeus* 18250-7**

***Bacillus licheniformis* ATCC 12713**

***Bacillus subtilis* ATCC 6051A (= ATCC 6051a)**

***Bacillus subtilis* ATCC 55405**

***Bacillus subtilis* sous-espèce *subtilis* ATCC 6051^T**

***Bacillus subtilis* sous-espèce *inaquosorum* ATCC
55406**

Espèce *Bacillus* 16970-5

Espèce *Bacillus* 2 18118-1

Espèce *Bacillus* 4 18121-4

Espèce *Bacillus* 7 18129-3

Environnement Canada

Santé Canada

Août 2015

N° de cat. : En14-228/2015F-PDF
ISBN 978-0-660-02215-4

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 Canada au 1-800-668-6767 (au Canada seulement) ou 819-997-2800 ou par courriel à enviroinfo@ec.gc.ca.

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par le ministre de l'environnement, 2015.

Also available in English

Sommaire

Conformément à l'alinéa 74b) de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)* [LCPE (1999)], la ministre de l'Environnement et la ministre de la Santé ont procédé à une évaluation préalable des souches d'organismes vivants suivantes, qui figurent sur la *Liste intérieure* :

- *Bacillus amyloliquefaciens* 13563-0
- *Bacillus atrophaeus* 18250-7
- *Bacillus licheniformis* ATCC 12713
- *Bacillus subtilis* ATCC 6051A (que l'on appelle également *Bacillus subtilis* ATCC 6051a)
- *Bacillus subtilis* ATCC 55405
- *Bacillus subtilis* sous-espèce *subtilis* ATCC 6051 (souche type)
- *Bacillus subtilis* sous-espèce *inaquosorum* ATCC 55406
- Espèce *Bacillus* 16970-5
- Espèce *Bacillus* 2 18118-1
- Espèce *Bacillus* 4 18121-4
- Espèce *Bacillus* 7 18129-3

Aux fins de la présente évaluation, les micro-organismes inscrits à la *Liste intérieure* énumérés ci-dessus seront collectivement appelés « groupe *Bacillus licheniformis/subtilis* de la *Liste intérieure* ». Les termes « complexe *Bacillus subtilis* » indiqueront des renseignements qui ne sont pas propres à ces souches de la *Liste intérieure des substances*, mais qui sont liés au groupe plus étendu des espèces comprenant celles de la *Liste intérieure*.

Conformément au *Règlement sur les dénominations maquillées* établi en vertu de l'article 113 de la LCPE (1999), Environnement Canada a attribué des noms « maquillés » et des numéros d'accès aux espèces *Bacillus* 16970-5, *Bacillus* 2 18118-1, *Bacillus* 4 18121-4 et *Bacillus* 7 18129-3 au lieu du nom biologique explicite de ces organismes, lequel est considéré comme confidentiel et ne doit pas être divulgué publiquement.

Les membres du complexe *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) global ont la capacité de s'adapter à plusieurs habitats terrestres et aquatiques et d'y prospérer. Ils peuvent être des contaminants présents dans la nourriture et dans le carburant d'aviation ainsi que des membres transitoires de la microflore intestinale. Certains membres du complexe *B. subtilis* sont utilisés dans la fermentation des aliments. Ils forment des endospores qui assurent leur survie dans des conditions environnementales sous-optimales. De nombreuses variations physiologiques existent dans la nature, ce qui signifie que les membres de ce complexe peuvent s'établir avec succès dans presque tous les

environnements. Diverses caractéristiques du groupe *Bacillus licheniformis/subtilis* (*B. licheniformis/subtilis*) de la *Liste intérieure* les rendent convenables pour une utilisation en tant qu'ingrédients actifs dans des produits commerciaux et des produits de consommation.

Certaines souches de *B. licheniformis* peuvent entraîner un avortement chez les bovins, les porcs et les moutons, ainsi qu'une mammite chez les bovins; toutefois, les répercussions générales de la maladie liée à *B. licheniformis* chez le bétail sont faibles. Les membres du groupe *B. licheniformis/subtilis* de la *Liste intérieure des substances* sont sensibles aux antibiotiques vétérinaires; ainsi, dans le cas d'une infection du bétail, des options de traitement efficaces sont disponibles. Des effets néfastes ont été signalés chez les invertébrés aquatiques et terrestres exposés aux souches de *B. subtilis* et *B. licheniformis*. Un rapport a indiqué qu'un isolat de *B. licheniformis* constituait l'agent responsable du dépérissement de la cime dans le cas de la pistache. Les souches du complexe *B. subtilis* possèdent des propriétés antimicrobiennes ainsi que des propriétés de promotion de la croissance chez les plantes et les animaux.

On rapporte parfois que certains membres du complexe *B. subtilis* provoquent des maladies chez les humains vulnérables (les personnes ayant une maladie invalidante ou une immunité compromise, les nourrissons et les personnes âgées), mais rarement chez la population générale. Certains produisent des enzymes extracellulaires et des toxines susceptibles d'entraîner une intoxication alimentaire. Dans les analyses de laboratoire effectuées par des scientifiques de Santé Canada, il a été déterminé que les souches *B. licheniformis/subtilis* de la *Liste intérieure* n'ont pas produit ces toxines d'intoxication alimentaire.

La présente évaluation prend en compte les caractéristiques des souches susmentionnées à l'égard des effets sur la santé humaine et l'environnement associés à l'utilisation du produit et des procédés industriels visés par la LCPE (1999), y compris les rejets dans l'environnement par l'entremise de flux de déchets et l'exposition humaine fortuite par l'intermédiaire des milieux naturels. Le gouvernement a lancé une collecte obligatoire de renseignements en application de l'article 71 de la LCPE (1999), dont l'avis a été publié dans la Partie I de la *Gazette du Canada* le 3 octobre 2009 (Avis donné en vertu de l'article 71) pour mettre à jour les renseignements relatifs aux utilisations actuelles. Les renseignements présentés en réponse à l'Avis indiquaient que les souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* de la *Liste intérieure* ont été utilisées dans la biodégradation et la biorestauration; dans des produits de nettoyage, de dégraissage et de désodorisation des surfaces et des canalisations; dans la production d'enzymes et de produits chimiques; ainsi que dans le traitement de déchets solides et d'eaux usées.

Compte tenu de tous les éléments de preuve contenus dans la présente évaluation préalable, les souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* présentent un faible risque d'effets nocifs sur les organismes et sur l'intégrité de l'environnement. On conclut que la souche 13563-0 de *Bacillus amyloliquefaciens*, la souche 18250-7 de *Bacillus atrophaeus*, la souche ATCC 12713 de *Bacillus licheniformis*, la souche ATCC 6051A de *Bacillus subtilis*, la souche ATCC 55405 de *Bacillus subtilis*, la souche ATCC 6051 de *Bacillus subtilis* sous-espèce *subtilis*, la souche ATCC 55406 de *Bacillus subtilis* sous-espèce *inaquosorum*, l'espèce *Bacillus* 16970-5, l'espèce *Bacillus* 2 18118-1, l'espèce *Bacillus* 4 18121-4 et l'espèce *Bacillus* 7 18129-3 ne satisfont pas aux critères énoncés aux alinéas 64a) ou b) de la LCPE (1999), car elles ne pénètrent 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 à la vie.

De plus, à la lumière des renseignements contenus dans la présente évaluation préalable, on conclut que la souche 13563-0 de *Bacillus amyloliquefaciens*, la souche 18250-7 de *Bacillus atrophaeus*, la souche ATCC 12713 de *Bacillus licheniformis*, la souche ATCC 6051A de *Bacillus subtilis*, la souche ATCC 55405 de *Bacillus subtilis*, la souche ATCC 6051 de *Bacillus subtilis* sous-espèce *subtilis*, la souche ATCC 55406 de *Bacillus subtilis* sous-espèce *inaquosorum*, l'espèce *Bacillus* 16970-5, l'espèce *Bacillus* 2 18118-1, l'espèce *Bacillus* 4 18121-4 et l'espèce *Bacillus* 7 18129-3 ne satisfont pas aux critères énoncés à l'alinéa 64c) de la LCPE (1999), car elles ne pénètrent 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	xi
Décisions d'autorités compétentes sur le plan national et international	xiii
Échelle nationale	xiii
Échelle internationale	xiii
1. Évaluation du danger	1
1.1 Caractérisation des souches inscrites à la <i>Liste intérieure</i> faisant l'objet d'une évaluation.....	1
1.2 Gravité du danger.....	37
2. Évaluation de l'exposition.....	41
2.1 Sources d'exposition	41
2.2 Caractérisation de l'exposition.....	44
3. Caractérisation des risques.....	48
4. Conclusions.....	50
5. Références.....	52
Annexes	71
Annexe 1. Morphologie des colonies des membres du groupe <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrits à la <i>Liste intérieure</i>	71
Annexe 2. Caractéristique des membres du groupe <i>B. licheniformis/subtilis</i> – Analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S	77
Annexe 3. Caractéristiques des membres du groupe <i>B. licheniformis/subtilis</i> – Analyse des esters méthyliques d'acides gras (EMAG)	82
Annexe 4. Contenu cellulaire de certains acides gras	86
Annexe 5. Liste de certains éléments mobiles et des caractéristiques connexes identifiées dans certains isolats du complexe <i>B. subtilis</i>	87
Annexe 6. Gènes de virulence.....	89
Annexe 7. Essais de virulence et de pathogénicité des souches de <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i> : Activité hémolytique	90
Annexe 8. Essais de virulence et de pathogénicité des souches de <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i> : Production de catalase.....	91
Annexe 9. Composés antimicrobiens, autres métabolites et toxines produits par certains isolats du complexe <i>B. subtilis</i>	92
Annexe 10. Essais de virulence et de pathogénicité des souches de <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i> : Cytotoxicité.....	97

Annexe 11. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation des souches du complexe <i>B. subtilis</i> menés sur les vertébrés, les invertébrés et les plantes terrestres et aquatiques	100
Annexe 12. Essai de virulence et de pathogénicité des souches de <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la LIS	110
Annexe 13. Éclosions d'intoxications alimentaires.....	116

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Synonymes des micro-organismes dans le complexe <i>B. subtilis</i>	2
Tableau 1-2 : Caractéristiques biochimiques des espèces du groupe <i>B. cereus</i> par rapport aux espèces du complexe <i>B. subtilis</i>	4
Tableau 1-3 : Souchothèques comportant les souches du groupe <i>B. licheniformis/ subtilis</i> inscrit à la <i>Liste intérieure</i> et autres désignations de souches reconnues	8
Tableau 1-4 : Souchothèques principales comportant la souche Marburg (souche type ATCC 6051 de <i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>subtilis</i>) et autres désignations de souches.....	8
Tableau 1-5 : Densités cellulaires naturellement présentes des souches viables de <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. licheniformis</i> et <i>B. subtilis</i> dans les écoles et les garderies.....	9
Tableau 1-6 : Densités cellulaires naturellement présentes des souches viables de <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. licheniformis</i> et <i>B. subtilis</i> dans les milieux agricoles (étable à vaches et porcherie).....	9
Tableau 1-7 : Plages de température de croissance et de pH des membres du complexe <i>B. subtilis</i>	11
Tableau 1-8 : Sensibilités des espèces <i>B. licheniformis</i> et <i>B. subtilis</i> aux antibiotiques déclarées dans les ouvrages scientifiques	18
Tableau 1-9 : Concentrations inhibitrices minimales (CMI) pour la souche 13563-0 de <i>B. amyloliquefaciens</i>	21
Tableau 1-10 : Concentrations inhibitrices minimales (CMI) pour la souche 18250-7 de <i>B. atrophaeus</i>	21
Tableau 1- 11 : Concentrations inhibitrices minimales (CMI) pour la souche ATCC 12713 de <i>B. licheniformis</i>	22
Tableau 1-12 : Concentrations inhibitrices minimales (CMI, µg/mL) pour les souches de <i>B. subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i>	23
Tableau 1-13 : Concentrations inhibitrices minimales (CMI, µg/mL) pour l'espèce <i>Bacillus</i> maquillée inscrite à la <i>Liste intérieure</i>	24
Tableau 2-1 : Quantités relatives aux souches du groupe <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrit à la <i>Liste intérieure</i> dont l'importation ou la fabrication a été déclarée au Canada en 2009 ^a	42

Tableau A-1 : Morphologie des colonies de la souche 13563-0 de <i>B. amyloliquefaciens</i>	71
Tableau A-2. Morphologie des colonies de la souche 18250-7 de <i>B. atrophaeus</i>	71
Tableau A-3. Morphologie des colonies de la souche ATCC 12713 de <i>B. licheniformis</i>	72
Tableau A-4. Morphologie des colonies de la souche ATCC 6051A de <i>B. subtilis</i>	72
Tableau A-5. Morphologie des colonies de la souche ATCC 55405 de <i>B. subtilis</i>	73
Tableau A-6. Morphologie des colonies de la souche ATCC 6051 de <i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>subtilis</i>	73
Tableau A-7. Morphologie des colonies de la souche ATCC 55406 de <i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i>	74
Tableau A-8. Morphologie des colonies de l'espèce <i>Bacillus</i> 16970-5.....	74
Tableau A-9. Morphologie des colonies de l'espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1.....	75
Tableau A-10. Morphologie des colonies de l'espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4.....	75
Tableau A-11. Morphologie des colonies de l'espèce <i>Bacillus</i> 7 18129-3.....	76
Tableau A-23. Analyse des EMAG de la souche 13563-0 de <i>B. amyloliquefaciens</i>	82
Tableau A-24. Analyse des EMAG de la souche <i>B. atrophaeus</i> 18250-7	82
Tableau A-25. Analyse des EMAG de la souche ATCC 12713 de <i>B. licheniformis</i>	83
Tableau A-26. Analyse des EMAG de la souche ATCC 6051A de <i>B. subtilis</i>	83
Tableau A-27. Analyse des EMAG de la souche ATCC 55405 de <i>B. subtilis</i>	83
Tableau A-28. Analyse des EMAG de la souche ATCC 6051 de <i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>subtilis</i>	84
Tableau A-29. Analyse des EMAG de la souche ATCC 55406 de <i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i>	84
Tableau A-30. Analyse des EMAG de l'espèce <i>Bacillus</i> 16970-5	84
Tableau A-31. Analyse des EMAG de l'espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	85
Tableau A-32. Analyse des EMAG de l'espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	85
Tableau A-33. Analyse des EMAG de l'espèce <i>Bacillus</i> 7 18129-3	85
Tableau A-23 : Contenu cellulaire de certains acides gras chez les membres du groupe <i>B. licheniformis/subtilis</i> ^a	86
Tableau A-35. Liste de certains éléments mobiles et des caractéristiques connexes identifiées chez certaines souches de <i>B. licheniformis</i>	87
Tableau A-36. Liste de certains éléments mobiles et des caractéristiques connexes identifiées chez certaines souches de <i>B. subtilis</i>	87
Tableau A-37. Liste de certains gènes de virulence identifiés dans certains isolats du complexe <i>B. subtilis</i>	89
Tableau A-38. Activité hémolytique des souches de <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i>	90
Tableau A-39. Production de catalase des souches de <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i>	91

Tableau A-40. Composés antimicrobiens produits dans certaines souches de <i>B. amyloliquefaciens</i>	92
Tableau A-41. Composés antimicrobiens produits dans certaines souches de <i>B. atrophaeus</i>	92
Tableau A-42. Composés antimicrobiens produits dans certaines souches de <i>B. licheniformis</i>	93
Tableau A-43. Composés antimicrobiens produits dans certaines souches de <i>B. subtilis</i>	94
Tableau A-44. Métabolites toxiques produits par certaines souches de <i>B. amyloliquefaciens</i>	95
Tableau A-45. Métabolites toxiques produits par certaines souches de <i>B. licheniformis</i>	95
Tableau A-46. Métabolites toxiques produits par certaines souches de <i>B. subtilis</i>	96
Tableau A-47. Potentiel cytotoxique des souches de <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i> envers les cellules HT29 cultivées en présence de gentamicine après 2, 4 et 24 heures	97
Tableau A-48. Potentiel cytotoxique des souches de <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i> envers les cellules HT29 cultivées sans gentamicine après 2, 4 et 24 heures	98
Tableau A-49. Potentiel cytotoxique des souches de <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i> envers les cellules J774A.1 cultivées en présence de gentamicine après 2, 4 et 24 heures	98
Tableau A-50. Potentiel cytotoxique des souches de <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i> envers les cellules J774A.1 cultivées sans gentamicine après 2, 4 et 24 heures	99
Tableau A-51. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation de la souche FZB24 de <i>B. amyloliquefaciens</i> ^a	100
Tableau A-52. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation de la souche D747 de <i>B. amyloliquefaciens</i> ^a	101
Tableau A-53. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation de la souche SB3086 de <i>B. licheniformis</i> ^a	102
Tableau A-54. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation de plusieurs souches de <i>B. licheniformis</i> et <i>B. subtilis</i>	104
Tableau A-55. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation d'un mélange contenant deux souches de <i>B. licheniformis</i> et <i>B. subtilis</i> ^a	105
Tableau A-56. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation de la souche QST 713 de <i>B. subtilis</i> ^a	106
Tableau A-57. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation de la souche MBI 600 de <i>B. subtilis</i> ^a	108

Tableau A-58. Résultats des essais de pathogénicité et de toxicité des souches ATCC 6051A et ATCC 55405 de <i>B. subtilis</i> ^a	109
Tableau A-59. Dénombrement des cellules végétatives (UFC/mg) des souches du groupe <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i> après une exposition endotrachéale	110
Tableau A-60. Dénombrement des spores (UFC/mg) des souches du groupe <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i> après une exposition endotrachéale	111
Tableau A-61. Expression des cytokines pulmonaires (pg/mL) après l'exposition à des cellules végétatives	113
Tableau A-62. Expression des cytokines pulmonaires (pg/mL) après l'exposition à des spores.....	113
Tableau A-63. Concentration d'amyloïde A ^a (µg/mL) dans les échantillons de sérum obtenus de souris BALB/c traitées avec des cellules végétatives ou des spores des souches inscrites à la <i>Liste intérieure</i>	114
Tableau A-64. Éclosions d'intoxications impliquant <i>B. licheniformis</i>	116

Liste des figures

Figure 1-1 : Liens phylogéniques entre les espèces de la famille des <i>Bacillaceae</i> d'après l'alignement de la séquence de la région codante du gène de l'ARN ribosomique 16S	6
Figure 1-2 : Persistance des souches ATCC 6051 de <i>Bacillus subtilis</i> et ATCC 13933 de <i>Bacillus subtilis</i> dans le sol, selon les analyses de la PCR quantitative de l'ADN extractible du sol	10
Figure A-1. Dénombrement des cellules végétatives (UFC/mg) des souches du groupe <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrit à la <i>Liste intérieure</i> après une exposition endotrachéale	111
Figure A-2. Dénombrement des spores (UFC/mg) des souches du groupe <i>B. licheniformis/subtilis</i> inscrites à la <i>Liste intérieure</i> après une exposition endotrachéale	112
Figure A-3. Concentration d'amyloïde A (µg/mL) dans les échantillons de sérum obtenus de souris BALB/c traitées avec des cellules végétatives ou des spores des souches inscrites à la <i>Liste intérieure</i>	114
Figure A-4. Concentration d'amyloïde A (µg/mL) dans les échantillons de sérum obtenus de souris BALB/c traitées avec des spores des souches inscrites à la LIS.....	115

Introduction

Conformément à l'alinéa 74b) de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)*, le ministre de l'Environnement et le ministre de la Santé sont tenus de procéder à l'évaluation préalable des organismes vivants inscrits sur la *Liste intérieure* et commercialisés entre 1984 et 1986, 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 *Loi*)¹. Ces souches ont été ajoutées à la *Liste intérieure* aux termes du paragraphe 105(1) de la LCPE (1999) parce qu'elles ont été fabriquées ou importées au Canada entre le 1^{er} janvier 1984 et le 31 décembre 1986, et parce qu'elles ont été introduites ou rejetées dans l'environnement sans égard aux conditions de ladite Loi ou de toute autre loi fédérale ou provinciale.

La présente évaluation tient compte des renseignements sur les risques obtenus dans le domaine public, ainsi que des données de recherche et des commentaires non publiés de chercheurs dans des domaines connexes. Les renseignements liés à l'exposition ont été obtenus du domaine public et des renseignements découlant de l'avis obligatoire relatif à l'article 71 de la LCPE (1999) 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 « [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 aux souches du groupe *Bacillus licheniformis/subtilis* de la *Liste intérieure* sont identifiées comme telles et comportent les données présentées par les proposants, celles de l'ATCC ainsi que les données non publiées obtenues par des chercheurs d'Environnement Canada² et de Santé Canada³. Lorsqu'aucune donnée spécifique n'était disponible sur les souches, des données de substitution extraites de publications scientifiques ont été utilisées. Lorsque c'était possible, les recherches documentaires ont inclus les synonymes, le nom usuel et le nom périmé de l'organisme. Les organismes de substitution sont identifiés dans chaque cas au niveau taxonomique fourni par la source. Les recherches

¹ La détermination de la conformité à l'un ou plusieurs des critères énoncés à l'article 64 de la LCPE (1999) 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 (1999), sur les souches du groupe *Bacillus licheniformis/subtilis* de la *Liste intérieure* n'a pas rapport avec une évaluation, qu'elle n'empêche pas non plus, réalisée en fonction des critères de risque du Système d'information sur les matières dangereuses utilisées au travail (SIMDUT), critères qui sont définis dans le *Règlement sur les produits contrôlés* pour les produits destinés à être utilisés au travail.

² Essais réalisés par la Division des méthodes biologiques d'Environnement Canada.

³ Essais dirigés par le Bureau de la science et de la recherche en santé environnementale de Santé Canada

documentaires ont été effectuées à l'aide de bases de données de publications scientifiques (SCOPUS, Google Scholar, CAB Abstracts), de recherches sur le Web et de termes de recherche clés afin de cerner les dangers pour la santé humaine et l'environnement associés à chacune des souches de la *Liste intérieure* évaluées dans le présent rapport. Les renseignements recueillis jusqu'en mai 2014 ont été pris en considération pour l'inclus dans le présent rapport.

Décisions d'autorités compétentes sur le plan national et international

Échelle nationale

Les membres du groupe *B. licheniformis/subtilis* de la *Liste intérieure* sont reconnus comme des micro-organismes du groupe de risque 1 par l'Agence de la santé publique du Canada (ASPC) et par l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA).

L'utilisation des souches de *B. subtilis* a été approuvée au Canada pour la production d'enzymes utilisées dans les aliments. Les extraits de fermentation provenant des souches de *B. subtilis* sont acceptés en tant qu'ingrédient dans les aliments en vertu du *Règlement sur les aliments du bétail*, tant qu'ils sont exempts d'activité antimicrobienne et qu'ils ne constituent pas des sources de cellules microbiennes. Pour le moment, les souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* ne sont pas approuvées sur le marché canadien en vertu de la *Loi*. Le Bureau de l'innocuité des engrais de l'ACIA a mené une évaluation exhaustive de l'innocuité de *B. subtilis* et a exempté toutes les souches des exigences complètes en matière de données sur la sécurité (ACIA, 2014). Les souches isolées du milieu naturel doivent être identifiées et différenciées jusqu'au niveau de la souche.

L'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada a approuvé plusieurs autres souches du complexe *B. subtilis* aux fins d'utilisation comme agents de lutte biologique, notamment la souche FZB24 de *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* (2011) [Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2012], la souche MBI 600 de *B. subtilis* (2005) [Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007a; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007c], la souche QST 713 de *B. subtilis* (2006) [Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007b] et la souche GB03 de *B. subtilis* (2011) [Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2013]. L'évaluation de chaque agent microbien et préparation commerciale de lutte antiparasitaire a permis de déterminer qu'aucun ne présentait de risque inacceptable pour la santé humaine ou l'environnement.

Échelle internationale

L'Environmental Protection Agency des États-Unis (USEPA) a évalué plusieurs souches de *B. subtilis* et de *B. licheniformis* utilisées dans la production d'enzymes. Cette agence a conclu qu'aucun risque déraisonnable pour la santé humaine ou l'environnement n'était associé à l'utilisation de ces souches pour la production d'enzymes, d'antibiotiques ou d'autres produits chimiques spéciaux. Selon la Food and Drug Administration des États-Unis (USFDA), les enzymes produites par la souche *B. subtilis* sont généralement reconnues comme inoffensives aux fins d'utilisation dans les aliments. L'Environmental Protection Agency des États-Unis a approuvé beaucoup des mêmes agents de lutte biologique homologués par l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada. Outre les souches approuvées aux fins

d'utilisation en tant que biofongicides au Canada, l'Environmental Protection Agency des États-Unis a approuvé la souche D747 de *B. amyloliquefaciens* (USEPA, 2011) et la souche SB3086 de *B. licheniformis* (USEPA, 2001).

En Australie, des souches modifiées de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* et *B. subtilis* ont été approuvées aux fins d'utilisation dans la production d'enzymes (ANZ, 2012a; ANZ, 2012b; ANZ, 2013). La souche PB6 de *B. subtilis* a été employée chez la volaille pour réduire les isolats de clostridies (*C. difficile* et *C. perfringens*) [ANZ, 2011]. D'autres souches font actuellement l'objet d'un examen pour la lutte biologique.

1. Évaluation du danger

1.1 Caractérisation des souches inscrites à la *Liste intérieure* faisant l'objet d'une évaluation

1.1.1 Taxonomie, identification et historique de la souche

Désignation taxonomique

Règne : Bactéries

Embranchement : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : *Bacillaceae*

Genre : *Bacillus*

Espèce : *Bacillus amyloliquefaciens* 13563-0

Bacillus atrophaeus 18250-7

Bacillus licheniformis ATCC 12713

Bacillus subtilis ATCC 6051A

Bacillus subtilis ATCC 55405

Bacillus subtilis sous-espèce *subtilis* ATCC 6051 (= souche type)

Bacillus subtilis sous-espèce *inaquosorum* ATCC 55406

Espèce *Bacillus* 16970-5

Espèce *Bacillus* 2 18118-1

Espèce *Bacillus* 4 18121-4

Espèce *Bacillus* 7 18129-3

Onze souches du complexe « *Bacillus subtilis* » inscrites à la *Liste intérieure* font l'objet de la présente évaluation. Elles seront évaluées collectivement en tant que « souches du groupe *Bacillus licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* » dans le présent rapport. Le terme « complexe *Bacillus subtilis* » et le regroupement de ces espèces sont appuyés par les ouvrages scientifiques et incluent les souches inscrites à la *Liste intérieure* (Sorokulova *et al.*, 2008; De Jonghe *et al.*, 2010). Ces termes seront utilisés lorsque les données de substitution seront abordées. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les noms de plusieurs souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* ont été maquillés au niveau du genre à la demande des proposants, conformément au *Règlement sur les dénominations maquillées* de la LCPE (1999) et ne peuvent pas être divulgués.

Les synonymes des espèces du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* ont été obtenus à partir de la « List of Prokaryotic Names with Standing in the Nomenclature » (Euzéby, 2013), du « NCBI taxonomy browser » (Benson *et al.*, 2009; Sayers *et al.*, 2009) et du « Catalogue of Life » (Shimura *et al.*, 2013) sauf indication contraire (tableau 1-1).

Tableau 1-1 : Synonymes des micro-organismes dans le complexe *B. subtilis*

Nomenclature actuelle	Synonymes
<i>B. amyloliquefaciens</i> • sous-espèce <i>amyloliquefaciens</i>^a • sous-espèce <i>plantarum</i>^a	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> ^b <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>amyloliquefaciens</i> ^c <i>Bacillus velezensis</i> ^d
<i>B. atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> <i>Bacillus globigii</i> <i>Bacillus niger</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>Denitrobacillus licheniformis</i> <i>Clostridium licheniforme</i>
<i>B. subtilis</i> • sous-espèce <i>inaquosorum</i>^e • sous-espèce <i>spizizenii</i> • sous-espèce <i>subtilis</i> • sous-espèce <i>virginiana</i>^f	<i>Vibrio subtilis</i> <i>Bacillus globigii</i> <i>Bacillus uniflagellatus</i> <i>Bacillus natto</i>

^a (Borris *et al.*, 2011)

^b (Priest *et al.*, 1987)

^c (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2012)

^d Synonyme hétérotypique ultérieur de *B. amyloliquefaciens* (Wang *et al.*, 2008)

^e Certaines souches ont été reclassées à partir de *B. licheniformis* (Rooney *et al.*, 2009)

^f (Zhao *et al.*, 2011)

1.1.1.1 Identification phénotypique et profil biochimique

L'espèce *Bacillus* est une bactérie Gram positif dont la coloration est variable, avec certaines espèces qui se colorent clairement comme des Gram positif dans les jeunes cultures uniquement. Les cellules sont en forme de bâtonnet avec des extrémités rondes ou carrées dont la taille varie de 0,5 × 1,2 à 2,5 × 10 µm, elles peuvent se présenter individuellement ou en chaîne, et la stabilité des chaînes détermine la forme de la colonie, qui peut varier d'une souche à l'autre (Logan et De Vos, 2009; Rooney *et al.*, 2009) (Logan et De Vos, 2009)(Logan et De Vos, 2009). Alors que la plupart des espèces du genre sont aérobies, certaines sont anaérobies facultatives ou strictes (Logan et De Vos, 2009; Murray *et al.*, 1995). Les espèces du genre *Bacillus* peuvent former des spores qui peuvent être cylindriques, ovales, rondes ou réniformes, placées en position centrale, terminale ou subterminale, mais aucune ne gonfle le sporange (Murray *et al.*, 1995).

Les membres du complexe *B. subtilis* peuvent être différenciés des anthropopathogènes et zoopathogènes connus du groupe *B. cereus* (*B. anthracis*, *B. cereus* et le parasite d'insecte *B. thuringiensis*) par des moyens morphologiques et biochimiques. Le diamètre des cellules des membres du complexe *B. subtilis* est inférieur à 1 μm alors que le diamètre des cellules des membres du groupe *B. cereus* est supérieur à 1 μm (Logan et De Vos, 2009). Les profils biochimiques peuvent être utilisés pour différencier les membres du complexe *B. subtilis* et ceux du groupe *B. cereus*; les caractéristiques distinctives figurent au tableau 1-2 (Santini *et al.*, 1995).

Tableau 1-2 : Caractéristiques biochimiques des espèces du groupe *B. cereus* par rapport aux espèces du complexe *B. subtilis*

Espèces <i>Bacillus</i> ^a	D-xylose	Mannose	Inositol	Mannitol	ONPG ^b
<i>B. anthracis</i>	- ^c	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	- ^d	- ^e	N.D. ^f	- ^d	N.D.
<i>B. amyloliquefaciens</i>	N.D. ^g	+ ^h	N.D.	+ ^g	N.D.
<i>B. atrophaeus</i>	+ ^h	+ ^h	N.D.	+ ^h	N.D.
<i>B. licheniformis</i>	+ ⁱ	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	+ ^j	+	+	+	+

^a (Santini *et al.*, 1995)

^b o-nitrophényl-β-D-galactopyranoside

^c -, ≤ 19 % des réactions positives

^d (Fakruddin *et al.*, 2012)

^e (Swiecicka *et al.*, 2002)

^f N.D., non disponible

^g (Boriss *et al.*, 2011)

^h (Nakamura, 1989)

ⁱ +, ≥ 81 % des réactions positives

^j 20 à 80 % des réactions positives

1.1.1.2 Identification moléculaire

Le genre *Bacillus* est vaste, avec 11 sous-groupes phylogéniques et plus de 140 espèces (Logan et De Vos, 2009). Grâce à l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S, le complexe *B. subtilis* peut être différencié du groupe *B. cereus* en raison de la présence d'un site de restriction *Hinfl* entre les régions V4 et V5 chez le complexe *B. subtilis* (Jeyaram *et al.*, 2011). La figure 1-1 illustre les liens phylogénétiques entre les espèces du genre *Bacillus* et des genres étroitement apparentés d'après l'alignement des séquences du gène de l'ARN ribosomique 16S produites par les scientifiques de Santé Canada et d'après les séquences publiées dans la littérature scientifique. Cette figure montre clairement que les espèces du complexe *B. subtilis* se regroupent à l'écart des pathogènes connus du genre *Bacillus*, en particulier ceux du groupe *B. cereus*.

L'identité des souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* de la Liste intérieure a été vérifiée de façon indépendante par les scientifiques de Santé Canada. La morphologie des colonies (annexe 1) était conforme aux descriptions figurant dans les ouvrages scientifiques. Par exemple, l'espèce *B. atrophaeus*, contrairement à d'autres membres du groupe, produit un pigment noir lorsque sa croissance se fait sur un milieu contenant de la tyrosine ou d'autres sources d'azote organique (Logan et De Vos, 2009; Rooney

et al., 2009). La capacité de la souche 18250-7 de *B. atrophaeus* à produire des pigments noirs a été confirmée.

Dans les laboratoires de Santé Canada, l'identification de la plupart des souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* de la *Liste intérieure*, y compris les souches dont le genre a été maquillé, a été confirmée par l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S; l'analyse des esters méthyliques d'acide gras (EMAG) et la teneur cellulaire totale de certains acides gras (annexes 2 à 4). Il est difficile de distinguer la souche *B. subtilis* des espèces étroitement apparentées du genre *Bacillus*, en particulier l'espèce *B. amyloliquefaciens* (Ash et al., 1991; Logan et De Vos, 2009); toutefois, l'espèce *B. amyloliquefaciens* présente une différence caractéristique dans la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S : l'absence de deux sites de restriction *RsaI* dans la région V3 qui la différencie de l'espèce *B. subtilis* (Jeyaram et al., 2011). L'absence de ces sites *RsaI* est caractéristique de l'espèce *B. amyloliquefaciens* et a été observée dans la séquence du gène de l'ARN ribosomique de la souche ATCC 55405 de *B. subtilis*. D'autres méthodes utilisées ont également montré que la souche ATCC 55405 de *B. subtilis* ressemble davantage à la souche *B. amyloliquefaciens* qu'à la souche *B. subtilis*, ce qui laisse supposer qu'elle puisse être identifiée incorrectement. Le site de restriction *CfoI*, entre les régions V4 et V5, peut être utilisé pour différencier l'espèce *B. subtilis* de l'espèce *B. licheniformis* (Jeyaram et al., 2011).

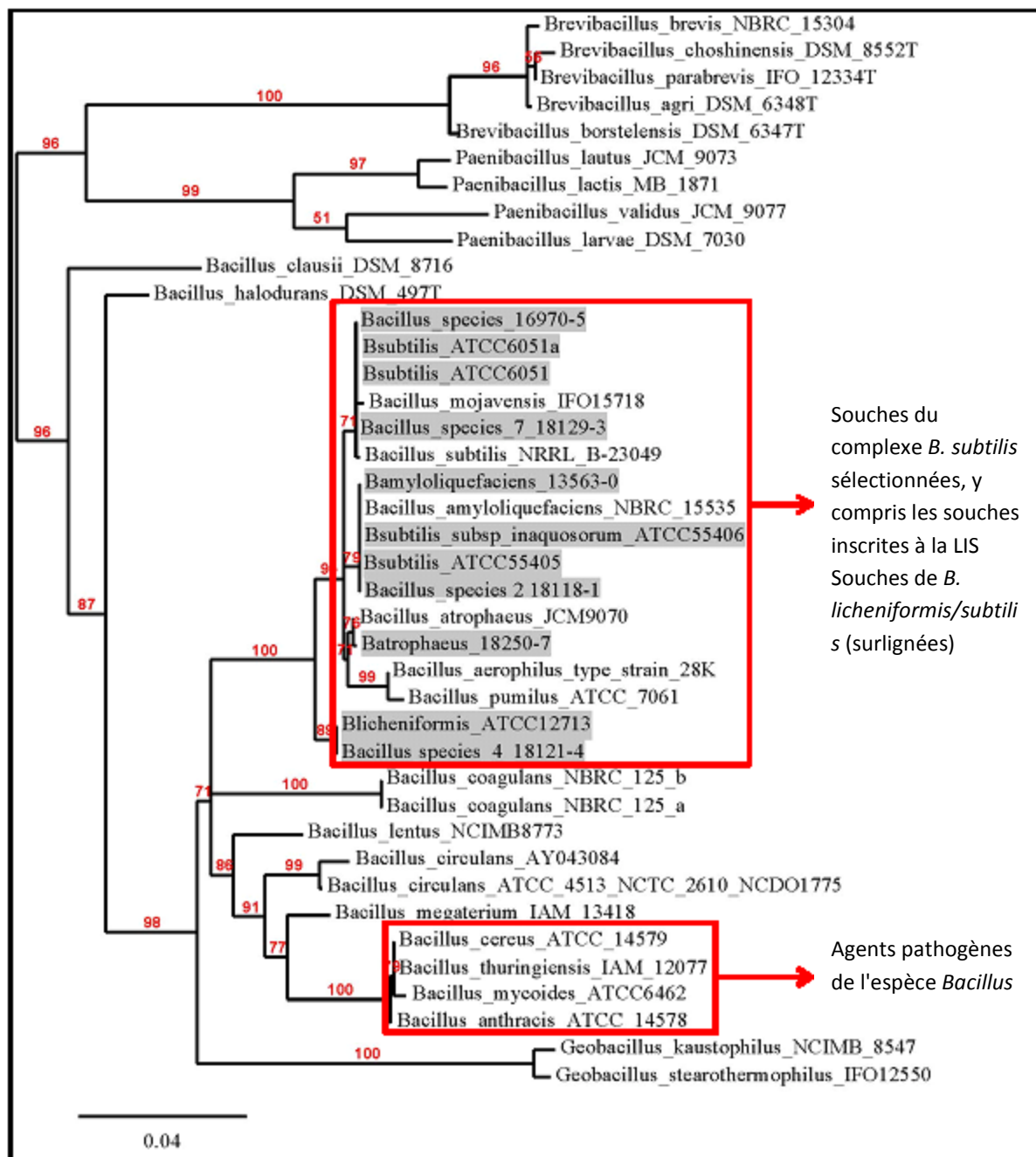


Figure 1-1 : Liens phylogénétiques entre les espèces de la famille des *Bacillaceae* d'après l'alignement de la séquence codante du gène de l'ARN ribosomique 16S

B. subtilis sous-espèce *inaquosorum* et *B. licheniformis* ont tous les deux des propriétés qui les distinguent d'autres membres du complexe *B. subtilis*, notamment une halotolérance plus faible, une croissance anaérobie et une production de composés toxiques dans certaines souches (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999). La souche *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* se distingue de l'espèce *B. licheniformis*, d'autres sous-espèces de *B. subtilis* et d'autres membres du complexe *B. subtilis*, par la production d'un nouveau lipopéptide de type surfactine, mis en évidence par un ion majeur

supplémentaire (masse m/z 1 120,8) dans le profil de spectrométrie de masse à temps de vol par désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF), ainsi que par des différences dans la teneur cellulaire totale des acides gras (Rooney *et al.*, 2009) [annexe 4]. Le séquençage génomique récent de la souche de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* corrobore son statut taxonomique en tant que sous-espèce indépendante de *B. subtilis* (Yi *et al.*, 2014). Pour les besoins du présent rapport, l'information liée à la souche ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* sera regroupée avec l'information portant sur les souches de *B. subtilis* inscrites à la *Liste intérieure*.

1.1.1.3 Historique de la souche

Les sites d'isolement de la plupart des membres du groupe *B. licheniformis/subtilis* de la *Liste intérieure* sont inconnus. Certains membres ont été isolés du sol (souche ATCC 55405 de *B. subtilis*, souche ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* et espèce *Bacillus* 16970-5) et des milieux industriels (espèce *Bacillus* 2 181181-1). Diverses souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* de la *Liste intérieure* qui figurent dans l'American Type Culture Collection (ATCC) sont également connues sous d'autres désignations de souches dans les souchothèques du monde entier (Tableau 1-3). La souche type (souche ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis*) a été déposée dans de nombreuses souchothèques et elle est connue sous le nom de souche Marburg (Tableau 1-4).

Tableau 1-3 : Souchothèques comportant des souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* de la Liste intérieure et autres désignations connues de ces souches

Souche	Souchothèque	Autre désignation de la souche
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	Agricultural Research Service Database Culture Collection/NRRL Collection	NRRL B-1001
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	Laboratoire régional des Prairies	PRL B479
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051A	Sans objet	P31K6
<i>B. subtilis</i> ATCC 55405	Sans objet	300
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406	National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria	NCMIB 14014

Tableau 1-4 : Souchothèques principales comportant la souche Marburg (souche type ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis*) et autres désignations connues

Souchothèque	Autre désignation de la souche
Agricultural Research Service Database Culture Collection/NRRL Collection	NRRL B-4219, NRS 1315, NRS 744
American Type Culture Collection	ATCC 6051-U
Collection française des Bactéries Phytopathogenes et Collection de l'Institut Pasteur (France)	CFBP 4228, CIP 52.65
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Allemagne)	DSM 10, IMET 10758
Institute for Fermentation, Osaka (collection transférée au NBRC) (Japon)	IFO 12210, IFO 13719, IFO 16412
Japan Collection of Micro-organisms (Japon)	JCM 1465, IAM 12118
National Collection (Royaume-Uni)	NCFB 1769, NCIB 3610, NCTC 3610
Netherlands Culture Collection of Bacteria	NCCB 32009, NCCB 53016, NCCB 70064

1.1.2 Propriétés biologiques et écologiques

1.1.2.1 Présence naturelle

Les membres du complexe *B. subtilis* peuvent s'adapter à de nombreux environnements et y prospérer. En général, les espèces de *Bacillus* ont été isolées de divers habitats, notamment des milieux terrestres (sol et végétation) [Logan et De Vos, 2009; Murray *et al.*, 1995; Thatoi *et al.*, 2013] et des milieux aquatiques (Rajarajan *et al.*, 2013; Shakir *et al.*, 2012; Shields *et al.*, 2013; Smitha et Bhat, 2012). Des espèces de *Bacillus* ont également été isolées d'animaux, en tant que partie transitoire

de la flore intestinale humaine (Kramer et Gilbert, 1989; Turnbull et Kramer, 1985), en tant que contaminants d'aliments crus et transformés (Fangio *et al.*, 2010; Hosoi *et al.*, 2000; Inatsu *et al.*, 2006; Kramer et Gilbert, 1989; Ray *et al.*, 2000; Turnbull *et al.*, 2001) de même que de carburant d'aviation (Rauch *et al.*, 2006). La grande variété d'environnements exploités par le genre *Bacillus* reflète la grande variation physiologique observée parmi les espèces de ce genre (Murray *et al.*, 1995).

La densité cellulaire naturelle des souches viables de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* dans l'air intérieur ainsi que dans la poussière des écoles, des garderies (Tableau 1-5) et des bâtiments agricoles (étable à vaches et porcherie) (Tableau 1-6) a été mesurée (Andersson *et al.*, 1999).

Tableau 1-5 : Densité cellulaire naturelle des souches viables de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* et *B. subtilis* dans les écoles et les garderies

Organisme	Air intérieur (UFC/m ³)	Dépôt de poussière (UFC/g)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Aucune donnée	10-10 ²
<i>B. licheniformis</i>	10 ²	10 ³
<i>B. subtilis</i>	Aucune donnée	Aucune donnée

Tableau 1-6 : Densité cellulaire naturelle des souches viables de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* et *B. subtilis* dans les établissements agricoles (étables [vaches] et porcheries)

Organisme	Air intérieur (UFC/m ³)	Dépôt de poussière (UFC/g)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Aucune donnée	Aucune donnée
<i>B. licheniformis</i>	10 ⁴ -10 ⁷	10 ⁴ -10 ⁶
<i>B. subtilis</i>	10 ⁴ -10 ⁷	10 ⁴ -10 ⁶

1.1.2.2 Survie et persistance dans l'environnement

Les espèces du genre *Bacillus* forment des spores qui leur permettent de survivre dans des conditions hostiles et leur donnent un avantage concurrentiel par rapport aux espèces qui ne forment pas de spores (Grossman et Losick, 1988; Kramer et Gilbert, 1989). Les spores résistent mieux à la chaleur, aux produits chimiques, aux radiations et au dessèchement que les cellules végétatives (Brown, 2000; Logan, 2012). La physiologie des spores de *Bacillus thuringiensis* est semblable à celles des spores du complexe *B. subtilis*; elles constituent donc un substitut adéquat. Les spores de *B. thuringiensis* persistent en grandes quantités dans le sol pendant au moins 13 ans (Hendriksen et Hansen, 2002; Hendriksen et Carstensen, 2013). Néanmoins, de manière générale, les populations microbiennes introduites dans le sol diminuent progressivement, indépendamment de leur source originale, en raison de l'hostilité des conditions biotiques et abiotiques dans le sol (Van Veen *et al.*, 1997). Les facteurs biotiques incluent la prédation et l'antagonisme; les facteurs abiotiques, le pH, la température et l'humidité inhospitaliers, ainsi que la rareté des éléments nutritifs (Van

Veen *et al.*, 1997). Il est peu probable que de grandes quantités de cellules végétatives persistent dans l'eau ou le sol, et ce, en raison de la concurrence exercée par les autres microorganismes (Leung *et al.*, 1995). La colonisation de plantes et la formation de biofilms peuvent également accroître la résistance de la bactérie aux conditions défavorables (Sella *et al.*, 2012).

Dans la littérature scientifique, trois études ont été trouvées sur la persistance du complexe *B. subtilis* dans les sols. L'une d'elles portait sur la persistance à long terme des souches ATCC 6051 de *B. subtilis* et ATCC 13933 de *B. subtilis* dans le sol agricole (Xiang *et al.*, 2010). L'ARN extrait des souches ATCC 6051 de *B. subtilis* et ATCC 13933 de *B. subtilis* pouvait être amplifié de microcosmes de laboratoire pendant 8 et 127 jours respectivement, après une inoculation avec des suspensions de cultures de cellules contenant entre 10^8 et 10^{10} UFC/mL (Xiang *et al.*, 2010). L'utilisation combinée du polymorphisme de longueur de fragments amplifiés pour mettre au point des marqueurs d'ADN spécifiques des souches étudiées et l'emploi de la PCR quantitative en temps réel ont permis de suivre quantitativement le devenir des souches ATCC 6051 de *B. subtilis* et ATCC 13933 de *B. subtilis* du sol et d'en estimer la concentration (figure 1-2).

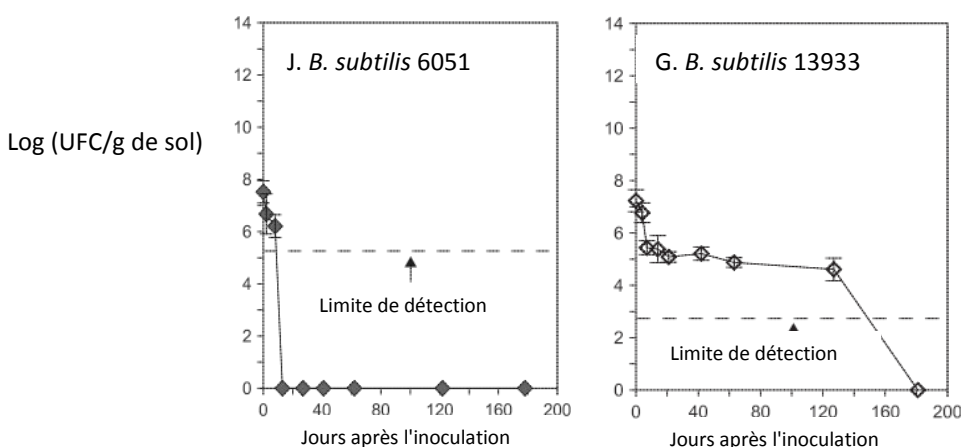


Figure 1-2 : Persistance des souches ATCC 6051 de *Bacillus subtilis* et ATCC 13933 de *Bacillus subtilis* dans le sol, selon les analyses de PCR quantitative de l'ADN pouvant être extrait du sol

Les limites de détection très différentes de ces deux souches compliquent la comparaison de leur persistance. La sporulation des cellules végétatives et la récupération moins efficace de l'ADN des spores peuvent avoir joué un rôle dans la diminution observée. La récupération de l'ADN des spores dépend du type de spore, de la concentration des spores et de l'environnement.

Dans une autre étude, une souche de *B. subtilis* a été inoculée dans les sols et un déclin rapide de la population a été observé avant qu'elle se stabilise (van Elsas *et al.*, 1986). La population est restée faible et principalement sous forme de spores pendant une période de 120 jours.

La troisième étude portait sur la persistance dans le sol des souches 13563-0 de *B. amyloliquefaciens*, ATCC 12713 de *B. licheniformis*, ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis* et ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* (Providenti *et al.* 2009). Selon les auteurs, avec un inoculum de cellules végétatives de 1×10^6 UFC/g de sol, la concentration détectable des bactéries diminuerait probablement à 1×10^2 UFC/g de sol ou moins en un à six mois.

Selon ces trois études, la concentration des espèces de *Bacillus* faisant l'objet de la présente évaluation devrait diminuer de façon importante avec le temps, mais persisterait probablement à une faible concentration sous forme de spores.

1.1.2.3 Paramètres de croissance

Les plages de températures de croissance et de pH varient entre les membres du complexe *B. subtilis* et peuvent varier entre les souches (Tableau 1-7) [Logan et De Vos, 2009; Rooney *et al.*, 2009].

Tableau 1-7 : Plages de température de croissance et de pH des membres du complexe *B. subtilis*

Espèce	Plage de température de croissance (°C)	Température de croissance optimale (°C)	Plage de pH ^a
<i>B. amyloliquefaciens</i>	15-50	30-40	5,5-8,5 ^b
<i>B. atrophaeus</i>	5-55	28-30	5,3-5,7 ^c
<i>B. licheniformis</i>	15-55	30-40	5,7-6,8 ^b
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>subtilis</i>	5-55	28-30	5,5-8,5 ^b
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquorsorum</i>	15-55 ^d	28-30 ^d	5,5-5,7 ^d

^a pH dans un bouillon Voges-Proskauer

^b (Logan et De Vos, 2009)

^c (Nakamura, 1989)

^d (Rooney *et al.*, 2009)

Les espèces *B. licheniformis* et *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* sont anaérobies facultatives et certaines souches de *B. subtilis* ont une croissance restreinte dans des conditions anaérobies (Logan et De Vos, 2009). La capacité de croissance dans des conditions aérobies et anaérobies contribue au succès de ces espèces *Bacillus* dans la colonisation d'une variété de niches. Chez les souris BALB/c inoculées par voie orale avec de fortes concentrations de spores de *B. subtilis*, la quantité de *B. subtilis* (spores et cellules végétatives) extraite des matières fécales était supérieure à la concentration d'inoculation initiale (Hoa *et al.*, 2001). Cette augmentation semble indiquer que les spores peuvent résister et germer dans le tube digestif des souris malgré l'anaérobiose (Hoa *et al.*, 2001).

1.1.2.4 Lutte biologique et promotion de la croissance⁴

Lutte biologique

Les souches du complexe *B. subtilis* ont des caractéristiques faisant d'elles des agents de lutte biologique efficaces. En tant que bactérie endophyte, l'espèce *B. licheniformis* colonise les mêmes sites que certains pathogènes des plantes et peut mieux convenir que les bactéries présentes dans la rhizosphère pour supplanter ou antagoniser les pathogènes des plantes (Mekete *et al.*, 2009). Chez la souche ATCC 14580 de *B. licheniformis*, l'activité de la chitinase et de la chitobiase peut être utile contre les pathogènes fongiques (ATCC, 2012e). Les membres du complexe *B. subtilis* sont capables de produire des antibiotiques et des enzymes chitinolytiques extracellulaires pouvant inhiber les pathogènes fongiques des plantes (Cordero-Ramírez *et al.*, 2013; Hameeda *et al.*, 2006; Jamalizadeh *et al.*, 2008; Pérez-García *et al.* 2011; Toledo *et al.* 2011). Les bactériocines sont des peptides antagonistes pouvant tuer ou inhiber la croissance d'autres bactéries (He *et al.*, 2006; Tagg *et al.*, 1976). Les bactériocines produites par les souches de *B. licheniformis* présentent une vaste gamme d'activités antagonistes contre diverses bactéries Gram positif et divers agents pathogènes fongiques, mais elles ne sont pas efficaces contre les Gram négatif (He *et al.*, 2006). Des composés antimicrobiens, tels que des bactériocines, produits par les membres du complexe *B. subtilis* pourraient avoir une incidence sur les populations microbiennes dans les habitats tels que le sol, et sur les microbiomes des plantes, des animaux et des humains. Récemment, il a été démontré que l'espèce *B. atrophaeus* CAB-1 présentait une activité antifongique, ce qui fait d'elle un agent de lutte biologique potentiel (Zhang *et al.*, 2013).

L'utilisation de souches de *B. amyloliquefaciens* et de *B. subtilis* a été approuvée aux fins d'utilisation en tant qu'agents de lutte biologique contre les maladies fongiques chez les plantes terrestres au Canada depuis 2011 et 2005, respectivement (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007a; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007b; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007c; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2012; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2013; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2014). L'utilisation de souches de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* et *B. subtilis* a été approuvée aux fins d'utilisation en tant qu'agents de lutte biologique contre les maladies fongiques chez les plantes terrestres aux États-Unis depuis 2000, 2007 et 1992, respectivement (Mendelsohn et Vaituzis, 1999; USEPA, 2001; USEPA, 2006; USEPA, 2010; USEPA, 2011; USEPA, 2012; USEPA, 2013b).

⁴ Les activités de lutte biologique et de promotion de la croissance ne s'inscrivent pas dans la portée de la présente évaluation.

Promotion de la croissance

Les membres du complexe *B. subtilis* peuvent favoriser la croissance des plantes en fixant l'azote, en produisant des engrais biologiques et des phytohormones, en renforçant la nodulation des racines, en contrôlant les agents pathogènes des plantes et par leurs interactions avec d'autres bactéries et champignons symbiotiques. Ces fonctions peuvent être liées à la colonisation de plantes et à la formation de biofilms (Beauregard *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2010; Weng *et al.*, 2012). Les espèces *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* ont été isolées des tissus intérieurs de plantes saines et pourraient jouer un rôle dans la promotion de la croissance et la protection des végétaux (Logan, 2012). Les espèces *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus* et *B. licheniformis* ont été décrites dans la rhizosphère de mangroves où elles solubilisent le phosphate, augmentant ainsi la disponibilité des éléments nutritifs pour les plantes (Thatoi *et al.*, 2013).

Les espèces *B. licheniformis* et *B. subtilis* produisent un certain nombre d'enzymes (p. ex. protéases, lipases et amylases) pouvant être incorporées aux aliments pour animaux en vue d'aider à la digestion des protéines (Ahmadnia Motlagh *et al.*, 2012; Link et Kovác, 2006). L'espèce *B. licheniformis* offre une protection contre les pathogènes en aquaculture et peut servir de solution de rechange au traitement antibiotique prophylactique, (Vinoj *et al.*, 2013); elle a aussi été utilisée comme probiotique pour la prise de poids ou la résistance aux pathogènes chez les truites arc-en-ciel (Merrifield *et al.*, 2010a; Merrifield *et al.*, 2010b), les porcs (Link et Kovác, 2006) et les poulets (Rahimi et Kahsksefidi, 2006). Des études ont montré que l'utilisation de certaines souches du complexe *B. subtilis* comme probiotiques chez les animaux et l'ajout de leurs enzymes aux aliments peuvent augmenter la prise de poids et améliorer la santé chez les animaux. D'autres études ont porté sur le potentiel de stimulation immunitaire des souches probiotiques pour renforcer la résistance des animaux aux pathogènes (Huang *et al.*, 2013; Vinoj *et al.*, 2013).

1.1.2.5 Transfert génique

L'espèce *B. subtilis* est naturellement compétente pour la transformation, un phénomène propre au stade de croissance et qui dépend des éléments nutritifs disponibles (Dubnau et Losick, 2006; Veening *et al.*, 2008). L'échange génétique par ce mécanisme semble être biaisé en faveur des espèces étroitement apparentées, puisque la fréquence de transformation diminue de façon exponentielle avec la divergence de la séquence de l'ADN (Majewski et Cohan, 1998; Roberts et Cohan, 1993; Zawadzki *et al.*, 1995). Cette caractéristique devrait limiter la probabilité que l'espèce *B. subtilis* acquière des caractères de pathogénicité des espèces éloignées.

L'espèce *B. subtilis* a également été impliquée dans le transfert conjugatif des plasmides; toutefois, une bonne partie des bactéries semblable à l'espèce *B. subtilis* ne contiennent pas d'ADN plasmidique endogène (Kreft et Hughes, 1982; Meijer, 1995; Meijer *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1977). Des éléments transposables et des prophages ont été déclarés dans le génome de la souche ATCC 14580 de *B. licheniformis* (souche

type) [Lapidus *et al.*, 2002], y compris neuf copies identiques des 1 285 séquences d'insertion de paires de base *IS3Bli1* et des séquences des prophages NZP1 et NZP3 (Rey *et al.*, 2004). Les séquences des prophages n'ont pas été caractérisées. L'espèce *B. subtilis* peut également transférer des transposons et des intégrons (Auchtung *et al.*, 2005; Celli et Trieu-Cuot, 1998; Kimura *et al.*, 2011; Koehler et Thorne, 1987; Marra et Scott, 1999; Meijer *et al.*, 1998), en particulier ceux qui s'inscrivent dans la catégorie des éléments intégratifs et conjugatifs, tels que l'élément ICEBs1 (Auchtung *et al.*, 2005), qui peut être transféré de l'espèce *B. subtilis* à d'autres espèces *Bacillus* ou *Listeria* lorsque l'hôte subit une détresse cellulaire ou en présence d'une forte concentration de cellules n'ayant pas suffisamment d'éléments ICEBs1. Les éléments intégratifs et conjugatifs codent les protéines requises pour le transfert conjugal, la résistance aux antibiotiques et le métabolisme d'autres sources de carbone (Auchtung *et al.*, 2005).

Les éléments génétiques mobiles de certaines souches du complexe *B. subtilis* sont repris dans l'annexe 5. Les gènes associés à la virulence dans les souches du complexe *B. subtilis* sont repris dans l'annexe 6. On ne sait pas si les souches inscrites à la *Liste intérieure* portent des gènes conférant des facteurs de virulence ou une résistance aux antimicrobiens sur les éléments mobiles. Compte tenu de leur capacité de transmission horizontale de gènes, elles pourraient, en théorie, acquérir ces gènes, mais ce potentiel n'est pas plus important pour les souches inscrites à la *Liste intérieure* que pour les souches naturellement présentes dans l'environnement, d'après ce qui a été déclaré dans les ouvrages scientifiques actuels.

1.1.2.6 Caractéristiques pathogéniques et toxigènes

Spores

La capacité à former des spores fait partie intégrante de l'étiologie de l'intoxication alimentaire découlant de l'espèce *Bacillus*, qui a été associée à certaines souches de *B. licheniformis* et de *B. subtilis*. Les spores de *Bacillus* survivent à la désinfection, à la radioexposition et à la cuisson (Baril *et al.*, 2012; Logan, 2012). Toutes les souches inscrites à la *Liste intérieure* faisant l'objet d'une évaluation sont en mesure de former des spores. Les spores du complexe *B. subtilis* résistent fortement à la chaleur, avec des températures comprises entre 94,9 °C et 97,7 °C dans le cas de l'espèce *B. licheniformis* et entre 103,2 °C et 108,0 °C pour *B. subtilis*, des températures requises pour inactiver 90 % des spores dans un délai de dix minutes (André *et al.*, 2013). Dans des conditions favorables, lorsque les aliments sont maintenus à des températures comprises entre 10 °C et 50 °C par exemple, les spores peuvent germer et proliférer (Baril *et al.*, 2012; Brown, 2000), ce qui permet l'accumulation de concentrations cellulaires suffisantes pour provoquer une maladie d'origine alimentaire.

Déterminants de l'infectiosité

Pour qu'une bactérie soit un agent pathogène efficace, elle doit être capable d'adhérer aux surfaces cellulaires de l'hôte, d'envahir ses tissus et d'éliminer ses défenses. Dans

une étude, certains isolats des espèces *B. licheniformis* et *B. subtilis* étaient parfois capables d'adhérer aux cellules ou de les envahir (lignées cellulaires Hep-2 et Caco-2), tandis que d'autres n'en étaient pas capables (Rowan *et al.*, 2001).

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 isolats de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* et *B. subtilis* présentent des degrés variables d'hémolyse. Une étude a révélé une activité bêta-hémolytique chez l'espèce *B. amyloliquefaciens*, aucune activité hémolytique chez *B. licheniformis* et chez l'espèce *B. subtilis*, l'activité hémolytique variait selon l'isolat : alpha-hémolytique, bêta-hémolytique ou aucune activité hémolytique (Cordero-Ramírez *et al.*, 2013). Toutefois, une analyse effectuée par les scientifiques de Santé Canada relativement aux souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* de la *Liste intérieure* n'a indiqué aucune activité hémolytique forte chez ces souches (annexe 7).

L'activité de la catalase permet aux micro-organismes de se protéger contre l'oxygène réactif produit par les cellules immunitaires, ce qui les rend plus efficaces comme pathogènes. L'activité de la catalase a été évaluée pour les souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* de la *Liste intérieure* par les scientifiques de Santé Canada; toutes les souches étaient positives au test de la catalase (annexe 8).

Métabolites secondaires

Les membres du complexe *B. subtilis* produisent également une variété de métabolites secondaires. La surfactine (*B. subtilis*) et la lichénysine (*B. licheniformis*) sont des lipopeptides amphiphiliques (Li *et al.*, 2010). Il s'agit de deux surfactants puissants qui possèdent des propriétés antimicrobiennes et hémolytiques. Bien que seulement deux acides aminés les distinguent, l'activité hémolytique de la lichénysine est bien plus élevée que celle de la surfactine (15 µmol/L et 200 µmol/L, respectivement, pour une hémolyse complète) [Li *et al.*, 2010].

L'amylosine a été détectée pour la première fois chez l'espèce *B. amyloliquefaciens* (Logan, 2012; Mikkola *et al.*, 2007). Il s'agit d'un ionophore qui forme les canaux K⁺ et Na⁺ dans les membranes cellulaires de l'hôte, entraînant alors des réactions toxiques, notamment la mort de la cellule, avec une lyse importante dans les lignées cellulaires exposées et une inhibition de la mobilité dans les essais sur les spermatozoïdes de porcs (Mikkola *et al.*, 2007).

Toxines

Les études montrent que les souches de *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. amyloliquefaciens* produisent des toxines instables et stables à la chaleur (annexe 9) [Beattie et Williams, 1999; De Jonghe *et al.*, 2010; Mikkola *et al.*, 2007; Nieminen *et al.*, 2007]. Parmi les toxines produites, certaines sont semblables à la toxine émétique (céréulide) de *B. cereus* (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2005); elles

comportent également une entérotoxine hémolytique BL (Hbl) (Lindsay *et al.*, 2000; Rowan *et al.*, 2001) et une entérotoxine non hémolytique (Nhe). Un composant cytotoxique non émétique stable à la chaleur a également été signalé chez certaines souches de *B. subtilis* et de *B. amyloliquefaciens* (De Jonghe *et al.*, 2010). Certains isolats de *B. licheniformis* produisent aussi une toxine non protéique thermostable, qui endommage l'intégrité de la membrane cellulaire, appauvrit la cellule en adénosine triphosphate (ATP) et possède une activité bêta-hémolytique (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999).

Les gènes du complexe de toxines Hbl et des toxines diarrhéiques BceT ont été décelés dans des isolats cliniques et alimentaires de *B. licheniformis* et *B. subtilis* (Rowan *et al.*, 2001). Il semble que le milieu de croissance influe sur la production de toxines; en effet, davantage de souches produisent la toxine Hbl lorsqu'elles sont cultivées dans du lait maternisé pour nourrisson plutôt que dans du bouillon d'infusion cœur-cerveille. La production de toxines n'est pas liée à la source de l'isolat (clinique ou environnementale) [Beattie et Williams, 1999; Madslien *et al.*, 2012].

Dans les essais effectués dans les laboratoires de Santé Canada, des souches ont été cultivées dans un bouillon d'infusion cœur-cerveille. Trois trousse d'essai commerciales ont été utilisées : la trousse RPLA (Oxoid) a servi à vérifier la présence de la sous-unité HblC de l'entérotoxine Hbl; la trousse TECRA a permis de faire une ELISA avec six souches⁵ et de vérifier si elles possédaient la sous-unité NheA de l'entérotoxine Nhe; la trousse Duopath Cereus (Millipore) a servi à vérifier la production des entérotoxines Nhe et Hbl par les souches inscrites à la *Liste intérieure*. Aucune des souches inscrites à la *Liste intérieure* ne produisait ces toxines.

Les surnageants de culture acellulaires de certains isolats cliniques et alimentaires des espèces *B. licheniformis* et *B. subtilis* associés à une intoxication alimentaire présentaient une activité cytotoxique influant sur les lignées cellulaires épithéliales humaines Caco-2 et HEp-2 (Rowan *et al.*, 2001). Le milieu de croissance a eu une incidence sur le potentiel cytotoxique, et le traitement thermique ou la trypsinisation du surnageant de culture a permis de réduire voire d'éliminer l'activité cytotoxique, indiquant que cette activité était due à la fraction protéinique (Rowan *et al.*, 2001). Dans une autre étude, des isolats de *B. licheniformis* et *B. subtilis* associés à une intoxication alimentaire causée par des aliments achetés de marchands ambulants se sont révélés cytotoxiques pour les cellules McCoy (Mosupye *et al.*, 2002). En outre, alors que la cytotoxicité des isolats de *B. cereus* disparaissait après un traitement thermique, certains isolats de *B. licheniformis* et *B. subtilis* conservaient leur cytotoxicité (Mosupye *et al.*, 2002). Une souche de *B. licheniformis* isolée du lait cru et qui était associée à une intoxication alimentaire était également cytotoxique pour les cellules McCoy (Lindsay *et al.*, 2000).

⁵ Les souches ATCC 12713 de *B. licheniformis*, ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis*, ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum*, les espèces *Bacillus* 2 18118-1 et *Bacillus* 7 18129-3.

Dans les essais réalisés par les scientifiques de Santé Canada, la cytotoxicité des souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* a été évaluée dans deux lignées cellulaires, J774A.1 (cellules de macrophages) et HT29 (cellules épithéliales du colôn humain), cultivées avec et sans gentamicine. Les souches n'ont pas révélé d'activité cytotoxique forte envers l'une ou l'autre des lignées cellulaires (annexe 10).

1.1.2.7 Profil de sensibilité aux antibiotiques

L'information figurant dans les ouvrages scientifiques sur la sensibilité aux antibiotiques des espèces *B. amyloliquefaciens* et *B. atrophaeus* est insuffisante, vraisemblablement parce que ces dernières n'ont pas été impliquées dans des infections.

Des profils de sensibilité aux antibiotiques variables ont été signalés dans des rapports de cas d'infection ayant un lien avec les espèces *B. licheniformis* et *B. subtilis* (Tableau 1-8). La sensibilité de *B. licheniformis* aux bêta-lactamines ampicilline, piperacilline et ticarcilline dépend de l'isolat (Banerjee *et al.*, 1988; Castagnola *et al.*, 1997). Certains isolats possèdent une bêta-lactamase inductible qui pourrait être responsable de cette sensibilité variable (Filée *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 1992). De même, la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis* résiste à l'érythromycine, tandis que la souche type ATCC 14580 y est sensible; des variations dans la séquence du gène de la bacitracine synthase pourraient déterminer la résistance à l'érythromycine (Ishihara *et al.*, 2002). Un cas d'endocardite provoquée par *B. subtilis* a été traité efficacement avec de la céfazoline (Tuazon *et al.*, 1979), mais une étude ultérieure a révélé que les isolats étaient résistants à cet antibiotique (Banerjee *et al.*, 1988).

Tableau 1-8 : Sensibilité de *B. licheniformis* et *B. subtilis* aux antibiotiques selon les ouvrages scientifiques

Antibiotique	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	Référence
Amikacine	S ^a	S	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Aminoglycoside	S	N.D. ^b	(Ozkocaman <i>et al.</i> , 2006)
Amoxicilline	I ^c	I	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Acide clavulanique avec amoxicilline	S	N.D.	(Lépine <i>et al.</i> , 2009)
Ampicilline	V ^d	S	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Azlocilline	S	S	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988)
Bactrim	S	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Carbapénème	S	N.D.	(Ozkocaman <i>et al.</i> , 2006)
Carbenicilline	S	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Ceftazimide	R ^e	R	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988)
Céfamandole	I	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Céfatoxime	S	N.D.	(Lépine <i>et al.</i> , 2009)
Céfazoline	S	V	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Céfépime	S	N.D.	(Ozkocaman <i>et al.</i> , 2006)
Céfotaxime	R	I	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Céfoxitine	R	I	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Ceftriaxone	R	I	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Céfalotine	S	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Chloramphénicol	R	V	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)

Antibiotique	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	Référence
Ciprofloxacin	S	S	(Castagnola <i>et al.</i> , 1997; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Clindamycine	R	S	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Cotrimoxazole	S	N.D.	(Castagnola <i>et al.</i> , 1997)
Doxycycline	S	N.D.	(Lépine <i>et al.</i> , 2009)
Enrofloxacin	S	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Érythromycine	V	S	(Ishihara <i>et al.</i> , 2002; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Gentamicine	S	S	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Imipénème	S	S	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Kanamycine	S	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Linézolide	S	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Méropénème	S	N.D.	(Mochiduki <i>et al.</i> , 2007)
Méticilline	R	I	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Mezlocilline	I	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Nafcilline	S	N.D.	(Blue <i>et al.</i> , 1995)
Néomycine	S	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Nétilmicine	S	N.D.	(Castagnola <i>et al.</i> , 1997)
Nitrofurantoïne	S	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)

Antibiotique	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	Référence
Norfloxacin	S	S	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Ofloxacine	S	N.D.	(Lépine <i>et al.</i> , 2009)
Oxacilline	R	R	(Castagnola <i>et al.</i> , 1997; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Pénicilline	R	R	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988)
Piperacilline	V	S	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988)
Quinupristine + dalfoprismine	N.D.	N.D.	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Rifampicine	S	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Streptomycine	S	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Telcoplanine	S	N.D.	(Castagnola <i>et al.</i> , 1997)
Tétracycline	S	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Ticarclilline	V	S	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988)
Tobramycine	S	S	(Castagnola <i>et al.</i> , 1997; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Triméthoprim	S	S	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)
Vancomycine	S	S	(Banerjee <i>et al.</i> , 1988; Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)

^a S : Sensible, comprend également les traitements efficaces avec lesquels aucun autre antibiotique n'a été utilisé.

^b N.D. : Non disponible

^c I : Intermédiaire

^d V : Variable (différentes sources ont donné lieu à des résultats différents en matière de résistance)

^e R : Résistant

Les scientifiques de Santé Canada ont vérifié la résistance des cellules végétatives des souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* à un certain nombre de familles d'antibiotiques⁶ (Tableau 1-9 à Tableau 1-13). Les catégories interprétatives (sensible, intermédiaire, résistant ou non sensible) correspondent à des classifications établies d'après la réaction in vitro d'un organisme à un agent antimicrobien présent en une concentration correspondant aux concentrations atteintes dans le sang ou les tissus avec les doses habituellement prescrites de cet antimicrobien (CLSI, 2010). Dans la mesure du possible, la concentration minimale inhibitrice a été déterminée, mais pour certains des antibiotiques testés, aucun critère interprétatif n'a pu être déterminé.

Tableau 1-9 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens*

Antibiotique	Sensible ^a	Intermédiaire ^a	Résistant ^a	CMI en µg/mL (interprétation)
Acide nalixidique	N.D.	N.D.	N.D.	10,2 ± 8,4
Amoxicilline	N.D. ^b	N.D.	N.D.	0,37 ± 0
Céfotaxime	≤ 8	16-32	≥ 64	21,3 ± 8 (I ^c)
Ciprofloxacine	≤ 1	2	≥ 4	0,37 ± 0 (S ^d)
Doxycycline	N.D.	N.D.	N.D.	0,37 ± 0
Érythromycine	≤ 0,5	1-4	≥ 8 (≥ 4 ^e)	0,37 ± 0 (S)
Gentamicine	≤ 4	8	≥ 16 (≥ 4 ^e)	0,52 ± 0,21 (S)
Méropénème	N.D.	N.D.	N.D.	0,37 ± 0
Triméthoprim	≤ 2	N.D.	≥ 4	> 24 (R ^f)
Vancomycine	≤ 4	N.D.	N.D. (≥ 4 ^e)	0,45 ± 0,17 (S)

^a Critères d'interprétation (CMI en µg/mL; CLSI, 2010)

^b N.D. : Non disponible

^c I : Sensibilité intermédiaire

^d S : Sensible

^e Critères d'interprétation (CMI µg/mL; EFSA, 2008)

^f R : Résistant

Tableau 1-10 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour la souche 18250-7 de *B. atrophaeus*

Antibiotique	Sensible ^a	Intermédiaire ^a	Résistant ^a	CMI en µg/mL (interprétation)
Acide nalixidique	N.D.	N.D.	N.D.	3 ± 0
Amoxicilline	N.D. ^b	N.D.	N.D.	0,75 ± 0

⁶ Données générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada. Travaux menés selon la méthode d'essai liquide TBS-MTT pour déterminer les valeurs de la concentration minimale inhibitrice pour les bactéries d'après des expériences répétées (Seligy *et al.*, 1997). Les valeurs correspondent à la concentration minimale inhibitrice (en µg/mL) pour l'espèce *Bacillus* cultivée en présence de l'antibiotique pendant 24 h à 37 °C.

Antibiotique	Sensible ^a	Intermédiaire ^a	Résistant ^a	CMI en µg/mL (interprétation)
Céfotaxime	≤ 8	16-32	≥ 64	1,5 ± 0 (S ^c)
Ciprofloxacine	≤ 1	2	≥ 4	0,37 ± 0 (S)
Doxycycline	N.D.	N.D.	N.D.	0,37 ± 0
Érythromycine	≤ 0,5	1-4	≥ 8 (≥ 4 ^d)	0,37 ± 0 (S)
Gentamicine	≤ 4	8	≥ 16 (≥ 4 ^d)	0,37 ± 0 (S)
Méropénème	N.D.	N.D.	N.D.	0,37 ± 0
Triméthoprime	≤ 2	N.D.	≥ 4	> 24 ± 0 (R ^e)
Vancomycine	≤ 4	N.D.	N.D. (≥ 4 ^d)	0,75 ± 0 (S)

^a Critères d'interprétation (CMI en µg/mL; CLSI, 2010)

^b N.D. : Non disponible

^c S : Sensible

^d Critères d'interprétation (CMI µg/mL; EFSA, 2008)

^e R : Résistant

La souche ATCC 12713 de *B. licheniformis* semblait résister à de nombreux antibiotiques (pour la plupart desquels des critères d'interprétation étaient disponibles; tableau 1-11). Ce résultat était inattendu, étant donné que les ouvrages sur l'espèce indiquent une sensibilité à diverses catégories d'antibiotiques (tableau 1-8). La résistance à la vancomycine était particulièrement inattendue (CLSI, 2010). Pour cette raison, les résultats des tests ont été réexaminés. La concentration minimale inhibitrice a été strictement interprétée comme la concentration la plus basse ayant complètement inhibé la croissance du micro-organisme (CLSI, 2010); toutefois, pour certains antibiotiques, la grande majorité des bactéries a été éliminée à des concentrations bien plus faibles, avec une petite quantité de bactéries résiduelles qui persistaient même sur plusieurs incréments de concentrations plus élevées. L'examen par microscopie a révélé que ces bactéries résiduelles se présentaient sous la forme d'agrégats, comportement unique de cette souche en milieu liquide. Cette formation d'agrégats peut protéger les cellules internes du contact avec les antibiotiques. Lorsque les résultats des essais étaient réinterprétés avec un seuil de l'activité de bioréduction de 95 %, les concentrations minimales inhibitrices étaient davantage conformes aux valeurs attendues pour cette espèce. Cela a été confirmé pour la vancomycine à l'aide de bandelettes diagnostiques, qui ont montré que les concentrations minimales inhibitrices étaient faibles ($1,1 \pm 1,0$; $n = 6$). Il a été conclu que la résistance apparente élevée était un artéfact de l'essai sur la CMI en milieu liquide.

Tableau 1- 11 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis*

Antibiotique	S ^a	I ^b	R ^c	CMI en µg/mL (interprétation)	Activité de bioréduction de 95 % (interprétation)
Acide nalixidique	N.D.	N.D.	N.D.	> 24	> 24
Amikacine	≤ 16	32	≥ 64	> 24 (non sensible ^d)	> 24 (non sensible)
Amoxicilline	N.D. ^e	N.D.	N.D.	> 24	> 24

Antibiotique	S ^a	I ^b	R ^c	CMI en µg/mL (interprétation)	Activité de bioréduction de 95 % (interprétation)
Ampicilline	≤ 0,25	N.D.	≥ 0,5	0,37 ± 0 (I ^f)	0,37 ± 0
Céfotaxime	≤ 8	16-32	≥ 64	12 (I)	6,0 ± 0 (S)
Ceftazidime	≤ 8	16	≥ 32	> 24 (R ^g)	> 24 (R)
Chloramphénicol	≤ 8	16	≥ 32 (≥ 8 ^h)	12 (I)	12 ± 0 (I)
Ciprofloxacine	≤ 1	2	≥ 4	18 ± 9 (R)	0,37 ± 0 (S)
Doxycycline	N.D.	N.D.	N.D.	24	0,56 ± 0,19
Érythromycine	≤ 0,5	1-4	≥ 8 (≥ 4 ^f)	> 24 (R)	> 24 (R)
Gentamicine	≤ 4	8	≥ 16 (≥ 4 ^f)	18 ± 9 (R)	2,53 ± 1,54 (S)
Méropénème	N.D.	N.D.	N.D.	24	0,37 ± 0
Pénicilline	≤ 0,12	N.D.	≥ 0,25	0,75 ± 0 (R)	0,75 ± 0 (R)
Rifampine	≤ 1	2	≥ 4	0,5 ± 0,2 (S)	0,37 ± 0 (R)
Tétracycline	≤ 4	8	≥ 16 (≥ 8 ^f)	3 ± 0 (S)	3,0 ± 0 (S)
Triméthoprim	≤ 2	N.D.	≥ 4	> 24 (R)	0,37 ± 0 (S)
Vancomycine	≤ 4	N.D.	N.D. (≥ 4 ^f)	18 ± 9 (non sensible)	0,61 ± 0,37 (S)

^a Critères d'interprétation (CMI en µg/mL; CLSI, 2010) S : Sensible

^b Critères d'interprétation (CMI en µg/mL; CLSI, 2010) I : Intermédiaire

^c Critères d'interprétation (CMI en µg/mL; CLSI, 2010) R : Résistant

^d S : Sensible

^e N.D. : Non disponible

^f I : Sensibilité intermédiaire

^g R : Résistant

^h Critères d'interprétation (CMI µg/mL; EFSA, 2008)

ⁱ Confirmée à l'aide de bandelettes diagnostiques (1,1 ± 1,0 µg/mL, n = 6)

Tableau 1-12 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI, µg/mL) pour les souches de *B. subtilis* inscrites à la Liste intérieure

Antibiotique	S ^a	I ^b	R ^c	<i>B. subtilis</i> sous- espèce <i>subtilis</i> AT CC 6051 ^T	<i>B. subtilis</i> ATCC 6051A	<i>B. subtilis</i> ATCC 55405	<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406
Acide nalixidique	N.D.	N.D.	N.D.	> 24	8 ± 3,5	8 ± 3	9,6 ± 3,3
Amoxicilline	N.D. ^d	N.D.	N.D.	0,4	12,2 ± 13,6	4,3 ± 9,6	0,6 ± 0,5
Ampicilline	≤ 0,25	N.D.	≥ 0,5	> 24 (R ^e)	> 24 (R)	> 24 (R)	Aucune donnée
Aztréonam	N.D.	N.D.	N.D.	> 24	> 24	> 24	Aucune donnée
Céfotaxime	≤ 8	16-32	≥ 64	6,1 ± 4,7 (S ^f)	5 ± 1,7 (S)	1,3 ± 1,3 (S)	> 24
Ciprofloxacine	≤ 1	2	≥ 4	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée	> 24 (R)
Doxycycline	N.D.	N.D.	N.D.	0,4	0,4	0,4	8,4 ± 3,3
Érythromycine	≤ 0,5	1-4	≥ 8 (≥ 4 ^g)	0,4 (S)	0,4 (S)	0,4 (S)	0,4 (S)

Antibiotique	S ^a	I ^b	R ^c	<i>B. subtilis</i> sous- espèce <i>subtilis</i> AT CC 6051 ^T	<i>B. subtilis</i> ATCC 6051A	<i>B. subtilis</i> ATCC 55405	<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406
Gentamicine	≤ 4	8	≥ 16 (≥ 4 ^g)	0,6 ± 0,2 (S)	0,6 ± 0,2 (S)	0,4 (S)	0,4 (S)
Méropénème	N.D.	N.D.	N.D.	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée	1,2 ± 1,1
Triméthoprim	≤ 2	N.D.	≥ 4	> 24 (R)	> 24 (R)	> 24 (R)	> 24 (R)
Vancomycine	≤ 4	N.D.	N.D. (≥ 4 ^g)	0,9 ± 0,7 (S)	0,4 (S)	0,4 (S)	0,37 (S)

^a Critères d'interprétation (CMI en µg/mL; CLSI, 2010) S : Sensible

^b Critères d'interprétation (CMI en µg/mL; CLSI, 2010) I : Intermédiaire

^c Critères d'interprétation (CMI en µg/mL; CLSI, 2010) R : Résistant

^d N.D. : Non disponible

^e R : Résistant

^f S : Sensible

^g Critères d'interprétation (CMI µg/mL; EFSA, 2008)

Tableau 1-13 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI, µg/mL) pour l'espèce maquillée de *Bacillus* inscrite à la Liste intérieure

Antibiotique	S ^a	I ^b	R ^c	Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	Espèce <i>Bacillus</i> 16970-5	Espèce <i>Bacillus</i> 7 18129-3
Acide nalixidique	N.D.	N.D.	N.D.	8 ± 3	12	9,0 ± 3,3	> 24
Amoxicilline	N.D. ^d	N.D.	N.D.	Variable	0,37	0,9 ± 0,6	0,4
Ampicilline	≤ 0,25	N.D.	≥ 0,5	Aucune donnée	Aucune donnée	> 24 (R ^e)	> 24 (R)
Aztréonam	N.D.	N.D.	N.D.	> 24	Aucune donnée	> 24	> 24
Céfotaxime	≤ 8	16-32	≥ 64	1,6 ± 0,7 (S ^f)	3 (S)	11 ± 2,4 (I ^g)	6,1 ± 4,7 (S)
Ciprofloxacine	≤ 1	2	≥ 4	Aucune donnée	0,37 (S)	Aucune donnée	Aucune donnée
Doxycycline	N.D.	N.D.	N.D.	0,8 ± 0,4	0,37	0,4	0,4
Érythromycine	≤ 0,5	1-4	≥ 8 (≥ 4 ^h)	0,37 (S)	0,37 (S)	0,4 (S)	0,4 (S)
Gentamicine	≤ 4	8	≥ 16 (≥ 4 ^h)	1,2 ± 0,5 (S)	1,5 (S)	0,5 ± 0,2 (S)	0,6 ± 0,2 (S)
Méropénème	N.D.	N.D.	N.D.	Aucune donnée	0,37	Aucune donnée	Aucune donnée
Triméthoprim	≤ 2	N.D.	≥ 4	> 24 (R)	0,37 (S)	24 ± 23 (R)	> 24 (R)
Vancomycine	≤ 4	N.D.	N.D. (≥ 4 ^h)	0,37 (S)	0,75 (S)	0,4 (S)	0,9 ± 0,7 (S)

^a Critères d'interprétation (CMI en µg/mL; CLSI, 2010) S : Sensible

^b Critères d'interprétation (CMI en µg/mL; CLSI, 2010) I : Intermédiaire

^c Critères d'interprétation (CMI en µg/mL; CLSI, 2010) R : Résistant

^d N.D. : Non disponible

^e R : Résistant

^f S : Sensible

^g I : Sensibilité intermédiaire

^h Critères d'interprétation (CMI µg/mL; EFSA, 2008)

1.1.3 Effets

1.1.3.1 Environnement

B. amyloliquefaciens

L'espèce *B. amyloliquefaciens* est largement répandue dans la nature dans une variété d'habitats. Certaines souches ont été utilisées dans des écosystèmes agricoles en tant que pesticides biologiques destinés à lutter contre les champignons phytopathogènes (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2012; USEPA, 2011; USEPA, 2012); d'autres ont été utilisées dans des habitats aquatiques pour traiter et adoucir l'eau (Advanced Water Technologies, 2012). Malgré sa présence naturelle dans une variété d'environnements et ses antécédents d'utilisation dans les écosystèmes, une recherche exhaustive dans les ouvrages scientifiques de nombreuses sources n'a pas permis de trouver de rapports sur des infections ou des preuves d'effets nocifs sur les vertébrés, les invertébrés et les plantes aquatiques ou terrestres.

Des études sur les effets des souches FZB24 et D747 de *B. amyloliquefaciens* sur une variété d'espèces environnementales ont été présentées à l'appui de leur homologation en tant que biofongicides destinés à être utilisés sur les plantes terrestres (annexe 11, Tableau A-51 et Tableau A-52). En résumé, aucune pathogénicité ou toxicité importante n'a été observée chez les vertébrés terrestres (rats CD et Sprague Dawley, Colin de Virginie [caille]), les vertébrés aquatiques (truite arc-en-ciel), les invertébrés terrestres (abeilles domestiques adultes et larves, lombric) ni les invertébrés aquatiques (*Daphnia magna*) aux concentrations testées. Même si les études sur les plantes aquatiques ou terrestres n'ont pas été déclarées dans le cadre de l'homologation des pesticides, les pesticides contenant ces souches sont délibérément appliqués aux plantes terrestres pour lutter contre les phytopathogènes fongiques et bactériens, et aucun effet nocif sur les plantes traitées n'a été signalé dans la littérature scientifique.

Des essais sur l'exposition des souris ont été dirigés par les scientifiques de Santé Canada. Les femelles BALB/c n'ont pas présenté de symptômes après une exposition à 10^6 UFC de spores ou de cellules végétatives de la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens*, administrées dans un volume de 25 µL par nébulisation endotrachéale. Hormis une réaction inflammatoire transitoire, aucun changement important n'a été observé (annexe 12, Tableau A-59 à Tableau A-63).

B. atrophaeus

L'espèce *B. atrophaeus* est largement répandue dans la nature. Elle est utilisée en tant que substitut non pathogène à l'espèce *B. anthracis* dans les expériences sur la modélisation de la dispersion des spores dans l'air (Carrera *et al.*, 2007; Page *et al.*, 2007; USEPA, 2013a). Malgré sa présence naturelle et son utilisation dans l'environnement, une recherche exhaustive dans les ouvrages scientifiques de nombreuses sources n'a pas permis de trouver de rapports sur les infections ou des

preuves d'effets nocifs sur les les vertébrés, les invertébrés et les plantes aquatiques ou terrestres.

Des essais sur l'exposition de souris ont été menés par les scientifiques de Santé Canada. Les femelles BALB/c n'ont pas présenté de symptômes après une exposition à 10^6 UFC de spores ou de cellules végétatives de la souche 18250-7 de *B. atrophaeus*, administrées dans un volume de 25 µL par nébulisation endotrachéale. Hormis une réaction inflammatoire transitoire, aucun changement important n'a été observé (annexe 12, Tableau A-59 à Tableau A-63).

B. licheniformis

Les isolats environnementaux de l'espèce *B. licheniformis* peuvent former des biofilms (Dat *et al.*, 2012) qui jouent un rôle dans la pathogenèse des mammites bovines (Contreras et Rodríguez, 2011; Nieminen *et al.*, 2007) et la toxémie bovine (Murray *et al.*, 1995). L'espèce *B. licheniformis* peut entraîner un avortement ou des mortinaissances chez les bovins, ainsi que chez les buffles, les moutons, les porcs et les camélidés (Agerholm *et al.*, 1995; Agerholm *et al.*, 1997; Cabell, 2007; Duncanson, 2012; Galiero et De Carlo, 1998; Gill, 1999; Kirkbride *et al.*, 1986; Kirkbride, 1993; Madslien *et al.*, 2012; Mitchell et Barton, 1986). D'autres effets nocifs sur les vertébrés terrestres associés à *B. licheniformis* incluent la placentite, la kéraconjonctivite, la dégradation des plumes et l'infection du sac vitellin chez les autruches (Johnson *et al.*, 1994; Gill 1999; Sheldon *et al.*, 2002; Murray 2006; Hare *et al.*, 2008; Rajchard 2010; Goncagul *et al.*, 2012). L'espèce *B. licheniformis* a été associée à des effets nocifs chez des insectes, notamment les punaises de lits, les nématodes cécidogènes, les charançons de l'*Eucalyptus* et les papillons nocturnes (Reinhardt *et al.*, 2005; Mekete *et al.*, 2008; Molina et Santolmazza-Carbone, 2010; Bilbech *et al.*, 2012). Un isolat de *B. licheniformis* a été identifié comme agent causal du dépérissement terminal chez la pistache (Baradaran et Ghasemi, 2010).

Dans une étude de six mois, des chercheurs ont tenté de déterminer la cause de 218 fœtus bovins avortés (Agerholm *et al.*, 1997). La cause probable de 73 avortements a été diagnostiquée : parmi les causes les plus communes se trouvaient la diarrhée virale bovine (13 %), *Neospora caninum* (10 %), la mycose (5 %) et *B. licheniformis* (4 %) [Agerholm *et al.*, 1997]. Dans une autre étude, *B. licheniformis* était à l'origine de 3 % des avortements bovins (n = 5 662) (Murray, 2006). Dans la mise à jour du rapport canadien sur les avortements bovins pour la période 1998 à 2004 *B. licheniformis* aurait été impliqué dans 1,1 à 3,1 % des avortements signalés au Animal Health Laboratory (McEwen et Carman, 2005). En comparaison, les espèces du genre *Neospora* représentaient entre 8,3 et 19 % des cas et d'autres espèces de bactéries représentaient entre 6,1 et 14 % pour la même période. Dans jusqu'à 60,6 % des cas, aucun agent étiologique n'a été identifié entre 2001 et 2002. Malgré sa présence naturelle à des concentrations élevées dans les milieux agricoles [10^4 - 10^7 UFC/m³ dans l'air intérieur et 10^4 - 10^6 UFC/g dans la poussière (Andersson *et al.*, 1999)], les avortements résultant d'une exposition aux populations de *B. licheniformis* naturellement présentes dans l'environnement ne sont pas courants. La

pathogénèse des avortements n'est pas claire, mais l'ingestion d'aliments de mauvaise qualité ou moisis pendant la gestation et la propagation hématogène des pathogènes qui s'ensuit dans l'appareil reproducteur ainsi que leur introduction au cours des activités générales d'élevage ont été avancées (Cabell, 2007; Scott, 2011; Goncagul, 2012). La gentamicine et la ciprofloxacine se sont avérées les antibiotiques les plus efficaces contre l'espèce *B. licheniformis* isolée du mucus cervicovaginal des vaches soumises à des saillies répétées (Yadav et Kashyap, 2003).

L'infection expérimentale avec la souche DVL 9315323 de *B. licheniformis* chez les vaches laitières gravides a révélé un tropisme vers le placentome après l'administration de doses contenant entre 10^9 et 10^{12} UFC par animal (Agerholm *et al.*, 1999). Les bactéries *B. licheniformis* ont été étroitement associées aux lésions dans le placentome et les fœtus. Par ailleurs, il semble que la bactérie pourrait provoquer des avortements ou des naissances prématurées (Agerholm *et al.*, 1999). Dans une autre étude sur les mammifères, des souris BALB/c dont l'immunité avait été affaiblie ont été exposées, par voie intraveineuse, à des isolats environnementaux et alimentaires de *B. licheniformis*, y compris la souche type ATCC 14580 de *B. licheniformis*, à des doses variant de moins de 1×10^6 à 6×10^{10} UFC par animal (Agerholm *et al.*, 1997; annexe 11, Tableau A-54). Les souris pouvaient éliminer de grandes quantités de bactéries dans un délai d'une semaine, mais certains des isolats testés ont causé des lésions pulmonaires et cérébrales. Des rats mâles albinos Wistar exposés à une souche de *B. licheniformis* avaient une DSENO orale de plus de $1,1 \times 10^{11}$ UFC/kg poids corporel (Nithya *et al.*, 2012; annexe 11, tableau A-54).

Les études sur les effets de la souche SB3086 de *B. licheniformis* sur différentes espèces environnementales ont été présentées à l'appui de son homologation en tant que fongicide pour les plantes terrestres (annexe 11, Tableau A-53). Aucune pathogénicité ou toxicité n'a été observée chez les vertébrés terrestres (rats, Canards colverts), aquatiques (truite arc-en-ciel) ou les invertébrés terrestres (larves d'abeilles domestiques) aux concentrations testées (USEPA, 2001). Des invertébrés aquatiques (*Daphnia magna*) ont été exposés à la matière active de qualité technique (MAGT). La survie des daphnies exposées à 1×10^7 UFC/mL de matière active de qualité technique (1 000 fois la concentration environnementale escomptée pour l'utilisation dans les pesticides) était de 90 % (deux sont mortes) (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, communication personnelle). Pour ce qui est de la survie, de la reproduction, de la longueur et du poids par rapport aux témoins, la matière active de qualité technique n'était pas considérée comme toxique. Bien que les études de pathogénicité et de toxicité sur les plantes aquatiques ou terrestres n'aient pas été déclarées dans le cadre de l'homologation du pesticide, le pesticide contenant cette souche est délibérément appliqué aux plantes terrestres pour lutter contre les pathogènes fongiques. Aucun effet nocif sur les plantes traitées n'a été signalé dans la littérature scientifique ni dans les essais réalisés pour évaluer l'efficacité.

Aucun effet néfaste n'a été déclaré chez les crevettes des salines, les truites arc-en-ciel, les porcs et les poulets exposés à des probiotiques contenant des souches de *B. licheniformis* (Link et Kovác, 2006; Merrifield *et al.*, 2010a; Merrifield *et al.*, 2010b;

Rahimi et Kahsksefidi, 2006; Vinoj *et al.*, 2013). Une amélioration de la prise de poids ou de la résistance aux pathogènes a par ailleurs été notée.

Les scientifiques de Santé Canada ont procédé à des essais chez les souris. Les femelles BALB/c n'ont pas présenté de symptômes après une exposition à 10^6 UFC de spores ou de cellules végétatives de la souche 12713 de *B. licheniformis*, administrées dans un volume de 25 µL par nébulisation endotrachéale. Hormis une réaction inflammatoire transitoire, aucun changement important n'a été observé (annexe 12, Tableau A-59 à Tableau A-63).

B. subtilis

L'espèce *B. subtilis* est naturellement présente dans l'air ambiant et la poussière des établissements agricoles à des densités cellulaires élevées (Andersson *et al.*, 1999). Certaines souches ont été utilisées dans des écosystèmes agricoles en tant que fongicides pour les plantes terrestres (Mendelsohn et Vaituzis, 1999; USEPA; 2006; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007a; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007b; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007c; USEPA, 2010; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2013); d'autres ont été employées dans des habitats aquatiques pour traiter et adoucir l'eau (Advanced Water Technologies, 2012). Malgré sa présence naturelle dans une variété d'environnements et ses antécédents d'utilisation dans l'environnement, une recherche exhaustive dans les ouvrages scientifiques de nombreuses sources n'a pas permis de trouver de rapports sur des infections ou des preuves d'effets nocifs sur les plantes ou les vertébrés aquatiques.

Des études sur les effets des souches de *B. subtilis* sur différentes espèces environnementales ont été présentées à l'appui de l'homologation de certaines espèces comme biofongicides pour les plantes terrestres (annexe 11, Tableau A-56 et Tableau A-57). Aucun effet nocif important n'a été signalé chez les oiseaux, les mammifères, les insectes terrestres, les lombrics ou les micro-organismes du sol à la suite de l'exposition de la souche MBI 600 de *B. subtilis* (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007a). Aucun effet nocif important n'a été signalé chez les oiseaux, les poissons d'eau douce et d'eau salée, les mammifères ou les algues à la suite de l'exposition de la souche QST 713 de *B. subtilis* (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007b). Certaines données indiquent des effets sur les invertébrés aquatiques et terrestres, mais les résultats sont contradictoires. Dans les études examinées par l'Environmental Protection Agency des États-Unis, de la mortalité a été observée chez l'espèce *Daphnia magna* et l'espèce parasite *Hymenoptera* après l'exposition à la souche QST 713 de *B. subtilis* à des concentrations variables (Mendelsohn et Vaituzis, 1999). La cause de la mortalité et l'implication de la souche QST 713 de *B. subtilis* dans la toxicité ou la pathogénicité n'ont pas pu être déterminées dans ces études.

Les scientifiques de Santé Canada ont mené des essais chez les souris. Les femelles BALB/c n'ont pas présenté de symptômes après avoir été exposées à 10^6 UFC de

spores ou de cellules végétatives des souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum*, administrées dans un volume de 25 µL par nébulisation endotrachéale. Hormis une réaction inflammatoire transitoire, aucun changement important n'a été observé (annexe 12, Tableau A-59 à Tableau A-63).

Des études sur la pathogénicité et la toxicité ont été réalisées par les scientifiques d'Environnement Canada⁷ chez les espèces *Festuca rubra* (fétuque rouge), *Folsomia candida* (collembole ou nivicole) et *Eisenia andrei* (lombric) exposées aux souches ATCC 6051A de *B. subtilis* ou ATCC 55405 de *B. subtilis* dans du loam sablo-argileux recueilli dans la nature ou dans un sol limoneux-sableux artificiel (annexe 11, Tableau A-58). Concernant la fétuque rouge, les échantillons de sol naturel et artificiel ont été inoculés avec 10⁵ UFC/g de sol (poids sec) avec les souches ATCC 6051A de *B. subtilis* ou ATCC 55405 de *B. subtilis*. À la fin de l'étude (jour 21), une réduction importante (environ 18 %) dans la longueur moyenne des pousses a été détectée chez les plantes exposées à la souche 55405 de *B. subtilis* dans l'échantillon de sol naturel, par rapport aux témoins négatifs dans le sol naturel.

Dans les essais menés avec des collemboles nivicoles, les arthropodes ont été exposés pendant 28 jours à des sols naturels ou artificiels inoculés avec 10⁴ UFC de la souche ATCC 6051A de *B. subtilis* ou 10³ UFC de la souche 55405 de *B. subtilis* par gramme de sol sec. Par rapport aux témoins négatifs dans les deux sols, une réduction importante (environ 50 %) de la production de juvéniles a été observée après une exposition à la souche ATCC 55405 de *B. subtilis*, tandis qu'aucun juvénile n'a été produit après une exposition à la souche ATCC 6051A de *B. subtilis*. La survie des adultes n'a pas été touchée par l'une ou l'autre de ces souches.

Dans les essais menés avec des lombrics, les invertébrés ont été exposés pendant 35 jours aux naturels et artificiels inoculés avec 10⁴ UFC de la souche ATCC 6051A de *B. subtilis* ou 10⁵ UFC de la souche 55405 de *B. subtilis* par gramme de sol sec. On n'a constaté aucun effet nocif sur la reproduction après une exposition à l'une ou l'autre des souches, indépendamment du type de sol. Une augmentation importante de la production de juvéniles a été observée dans le sol naturel par rapport aux témoins négatifs dans le sol naturel, après une exposition à la souche ATCC 55405 de *B. subtilis*.

Souches maquillées de *Bacillus* inscrites à la Liste intérieure

Les scientifiques de Santé Canada ont procédé à des essais chez les souris. Les femelles BALB/c n'ont pas présenté de symptômes après avoir été exposées à 10⁶ UFC de spores ou cellules végétatives des espèces *Bacillus* 16970-5, *Bacillus* 2 18118-1, *Bacillus* 4 18121-4 et *Bacillus* 7 18129-3, administrées dans un volume de 25 µL par

⁷ Essais réalisés conformément au « Guide des essais de pathogénicité et de toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les organismes aquatiques et terrestres (SPE 1/RM/44, mars 2004) ».

nébulisation endotrachéale. Hormis une réaction inflammatoire transitoire, aucun changement important n'a été observé (annexe 12, Tableau A-59 à Tableau A-63).

1.1.3.2 Santé humaine

À l'exception de *B. cereus*, les infections causées par *Bacillus* chez les humains sont rares. Elles sont variées et tendent à se produire chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli (Pennington *et al.*, 1976); elles peuvent également être associées aux implants médicaux (Banerjee *et al.*, 1988) ou à un traumatisme récent (Logan, 2012). Des cas d'intoxication alimentaire causés par des espèces de *Bacillus* autres que *B. cereus* ont été signalés (Kramer et Gilbert, 1989; Murray *et al.*, 1995). Au cours des dernières années toutefois, aucune intoxication alimentaire due à une espèce de *Bacillus* autre que *B. cereus* n'a été signalée (Sorokulova, communication personnelle). En tant que contaminants potentiels des produits du tabac, des espèces du genre *Bacillus* ont été associées à des infections, des inflammations pulmonaires, des sensibilités allergiques, ainsi qu'à une exsudation plasmatique et à un dysfonctionnement des tissus de la bouche (Rooney, 2005; Rubinstein et Pedersen, 2002).

B. amyloliquefaciens

L'espèce *B. amyloliquefaciens* est présente partout dans le monde dans une variété de niches écologiques et a déjà été utilisée dans la fermentation industrielle et la lutte contre les ravageurs. Une recherche complète dans la littérature scientifique de toutes les sources majeures n'a pas permis de trouver de rapports sur des infections humaines associées à cette espèce ou sur d'autres effets nocifs chez l'humain provoqués par l'exposition au micro-organisme, à ses métabolites ou à ses composants structurels.

Les études présentées à l'appui de l'homologation des pesticides contenant les souches FZB24 et D747 de *B. amyloliquefaciens* comportaient une variété d'expositions dans les modèles mammaliens utilisés pour prévoir les effets nocifs chez l'humain (annexe 11, Tableau A-51 et Tableau A-52). Les études portant sur l'exposition par les voies orale, pulmonaire et intraveineuse aux souches FZB24 ou D747 de *B. amyloliquefaciens* ont révélé une faible toxicité, mais aucune pathogénicité chez les rats CD et Sprague-Dawley, et ce, aux doses maximales.

Dans des études faites à Santé Canada, des souris femelles BALB/c ont été exposées à 10^6 UFC de cellules végétatives ou spores de la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens*, administrées dans un volume de 25 µL par nébulisation endotrachéale, en tant que modèle de l'exposition humaine par voie pulmonaire. Les souris semblaient normales et n'ont pas présenté de symptômes après l'exposition aux cellules végétatives ou aux spores. Toutes les souris traitées ont été autopsiées 24 heures après l'exposition aux cellules végétatives et une semaine après l'exposition aux spores, dans le but d'évaluer la clairance bactérienne, l'expression des cytokines pulmonaires et la réponse en phase aiguë (annexe 12, Tableau A-59 à Tableau A-63). Une réponse pro-inflammatoire statistiquement significative a été observée, et la

concentration de certaines cytokines pulmonaires était élevée 24 heures après l'exposition aux cellules végétatives. Aucun changement important n'a été observé une semaine après l'exposition aux spores. Les souris ayant reçu des spores n'ont pas fait l'objet d'une évaluation de l'inflammation ou de l'expression des cytokines après 24 heures; la présence d'inflammation transitoire n'aurait donc pas été détectée. Dans la réponse en phase aiguë, la concentration de l'amyloïde A sérique était légèrement élevée, et ce, tant 24 heures après l'exposition aux cellules végétatives qu'une semaine après l'exposition aux spores.

Aucun cas d'hypersensibilité aux glucanases ou aux amylases produites par *B. amyloliquefaciens* n'a été signalé (Caballero *et al.*, 2007). Aucun incident d'hypersensibilité n'a été déclaré dans les conditions de laboratoire contrôlées au cours de la recherche et du développement comprenant les essais, la production ou la manipulation des souches FZB24 et D747 de *B. amyloliquefaciens* destinées à la lutte biologique contre des espèces nuisibles (USEPA, 2011; USEPA, 2012).

B. atrophaeus

L'espèce *B. atrophaeus* est largement répandue dans la nature et a déjà été utilisée dans l'environnement comme organisme substitut dans la modélisation de la dispersion dans l'air des espèces pathogènes de *Bacillus* (Carrera *et al.*, 2007; Page *et al.*, 2007; USEPA, 2013a). Une recherche complète dans les ouvrages scientifiques provenant de toutes les sources majeures n'a pas permis de trouver de rapports sur des infections humaines associées à *B. atrophaeus* ou sur d'autres effets nocifs chez l'humain provoqués par l'exposition au micro-organisme, à ses métabolites ou à ses composants structurels.

Dans les études faites à Santé Canada, des souris femelles BALB/c ont été exposées à 10^6 UFC de cellules végétatives ou spores de la souche 18250-7 de *B. atrophaeus*, administrées dans un volume de 25 µL par nébulisation endotrachéale, en tant que modèle pour l'exposition humaine par voie pulmonaire. Les souris semblaient normales et n'ont pas présenté de symptômes après l'exposition aux spores et aux cellules végétatives. Toutes les souris traitées ont été autopsiées 24 heures après l'exposition aux cellules végétatives et une semaine après l'exposition aux spores, dans le but d'évaluer la clairance bactérienne, l'expression des cytokines pulmonaires et la réponse en phase aiguë (annexe 12, Tableau A-59 à Tableau A-63). Une réponse pro-inflammatoire statistiquement significative a été observée, et la concentration de certaines cytokines pulmonaires était élevée 24 heures après l'exposition aux cellules végétatives. Aucun changement important n'a été observé une semaine après l'exposition aux spores. Les souris ayant reçu les spores n'ont pas fait l'objet d'une évaluation de l'inflammation ou de l'expression des cytokines après 24 heures; la présence d'inflammation transitoire n'aurait donc pas été détectée. Dans la réponse en phase aiguë, les concentrations d'amyloïde A sérique étaient légèrement élevées, et ce, tant pour les cellules végétatives que pour les spores.

Aucun cas d'hypersensibilité ou d'allergie à *B. atrophaeus*, à ses métabolites ou à ses composants structuraux n'a été signalé.

B. licheniformis

Bien que l'espèce *B. licheniformis* soit naturellement présente en concentrations élevées dans une variété de milieux auxquels les humains sont exposés, seuls 35 rapports de cas d'infection ont été publiés dans la littérature scientifique anglaise depuis 1966. Plusieurs d'entre eux étaient des cas de bactériémie ou de septicémie, mais diverses autres infections ont également été signalées (Blue *et al.*, 1995; Castagnola *et al.*, 1997; Cotton *et al.*, 1987; Maucour *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 1995; Tabbara et Tarabay, 1979; Thurn et Goodman, 1988). Presque tous les cas impliquaient des facteurs prédisposants : immunodéficience, maladie invalidante ou barrières naturelles contre les infections sérieusement compromises.

Des bactériémies liées à *B. licheniformis* ont été signalées chez des patients ayant un cancer (Banerjee *et al.*, 1988; Ozkocaman *et al.*, 2006), une péritonite (Sugar et McCloskey, 1977) ou un cathéter veineux central (Blue *et al.*, 1995; Castagnola *et al.*, 1997) et d'une procédure bronchoscopique (Hong *et al.*, 2004). D'autres ont été observées en association avec des lésions aux pieds (Gayet *et al.*, 2005) et chez une femme enceinte (Peloux *et al.*, 1976). Une co-bactériémie liée aux espèces *B. licheniformis* et *B. subtilis* a été observée chez un patient âgé ayant des facteurs prédisposants (La Jeon *et al.*, 2012). Dans trois cas de septicémie liée à *B. licheniformis*, l'un était dû à une ligne intraveineuse contaminée (Matsumoto *et al.*, 2000), l'autre s'est déclaré après une artériographie (Hardy *et al.*, 1986) et le troisième a été observé chez un nourrisson prématuré (Lépine *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 1990). Dans deux cas, des personnes se sont délibérément injecté des produits contenant des spores de *B. licheniformis* (seules ou en association avec des spores d'autres espèces de *Bacillus*), provoquant alors une bactériémie (Galanos *et al.*, 2009; Hannah et Ende, 1999). La bactériémie était récurrente dans un cas, en raison peut-être des spores qui ont résisté au traitement antibiotique, qui sont restées dans les tissus et qui ont germé de façon périodique (Hannah et Ender, 1999). Ce genre de septicémie récurrente causée par *B. licheniformis* a également été observé plus récemment chez une personne immunocompétente ne présentant pas de conditions sous-jacentes apparentes (Haydushka *et al.*, 2012).

Une ophtalmie ou une endophtalmie liée à *B. licheniformis* (Maucour *et al.*, 1999; Tabbara et Tarabay, 1979; Thurn et Goodman, 1988) et un abcès cérébral (Jones *et al.*, 1992), chacun d'entre eux résultant d'un traumatisme oculaire pénétrant, ont été signalés. Un abcès cérébral provoqué par l'espèce *B. licheniformis* a aussi été décrit chez un patient souffrant de leucémie myéloblastique aiguë (Mochiduki *et al.*, 2007), ainsi que chez un patient en bonne santé, où l'abcès s'est ensuite transformé en tumeur cérébrale maligne (Flores *et al.*, 2001). Dans le dernier cas, en plus d'avoir donné lieu à la formation d'un abcès cérébral, il semble que *B. licheniformis* aurait été l'agent oncogène. Malgré le manque de preuve concluante concernant une telle relation de cause à effet, on a émis l'hypothèse que *B. licheniformis* était une bactérie oncogène au

même titre que d'autres, comme *Helicobacter pylori* (Wainwright et Al Talih, 2003). Parmi les autres infections associées à *B. licheniformis*, mentionnons les suivantes : abcès de la glande parotide (Longo *et al.*, 2003), infection cutanée découlant d'une blessure (Ameur *et al.*, 2005), endocardite sur valve prothétique (Santini *et al.*, 1995), infection provoquée par le fil d'un stimulateur cardiaque avec bactériémie (Quan *et al.*, 2000), inflammation post-opératoire des ventricules où *B. licheniformis* a été isolé du liquide céphalorachidien (Young *et al.*, 1982) et spondylite en association avec une bactériémie chez un patient atteint d'un cancer du poumon (Kim *et al.*, 2012).

L'innocuité de la souche Mel de *B. licheniformis* (isolée du lait) a été évaluée aux fins d'utilisation dans l'industrie alimentaire (annexe 11, Tableau A-54). La dose orale sans effet nocif observé était supérieure à $1,1 \times 10^{11}$ UCF/kg poids corporel chez les rats mâles albinos Wistar (Nithya *et al.*, 2012). Les études présentées à l'appui de l'homologation des pesticides contenant la souche SB3086 de *B. licheniformis* comportaient une variété d'expositions dans des modèles mammaliens utilisés pour prévoir les effets nocifs chez les humains (annexe 11, Tableau A-53). Les études portant sur l'exposition par les voies orale, pulmonaire et intraveineuse avec la souche SB3086 de *B. licheniformis* ont révélé une faible toxicité, mais aucune pathogénicité chez les rats, et ce, aux doses maximales testées.

Des souris dont le système immunitaire avait été artificiellement affaibli (souris BALB/c traitées par voie intrapéritonéale avec de la cyclophosphamide à 0,2 mg/g poids corporel), ont reçu, par voie intraveineuse, moins de 1×10^6 jusqu'à 6×10^{10} UFC par animal, d'isolats cliniques, environnementaux et alimentaires de *B. licheniformis*, dont la souche type ATCC 14580 (Agerholm *et al.*, 1997; annexe 11, Tableau A-54). Malgré l'affaiblissement de leur système immunitaire, les souris ont pu éliminer de grandes quantités de bactéries dans un délai d'une semaine; l'espèce *B. licheniformis* a toutefois été récupérée dans le foie et la rate de la plupart des souris, ainsi que dans les reins de certaines souris une semaine après l'exposition. Certains des isolats testés ont entraîné des lésions pulmonaires et cérébrales. Les signes n'ont été observés que chez deux souris, et aucune mortalité attribuée au traitement n'a été signalée. Étant donné les doses élevées, l'absence de mortalité liée au traitement et la clairance de la plupart des bactéries des tissus, la pathogénicité de toutes les souches testées de *B. licheniformis* a été considérée comme faible chez les souris au système immunitaire affaibli.

Dans les études faites à Santé Canada, des souris femelles BALB/c ont été exposées à 10^6 UFC/25 µL de cellules végétatives ou spores de la souche 12713 de *B. licheniformis*, administrées dans un volume de 25 µL par nébulisation endotrachéale, dans un modèle pour l'exposition humaine par voie pulmonaire. Les souris semblaient normales et n'ont pas présenté de symptômes après l'exposition aux cellules végétatives ou aux spores. Toutes les souris traitées ont été autopsiées 24 heures après l'exposition aux cellules végétatives ou une semaine après l'exposition aux spores, dans le but d'évaluer la clairance bactérienne, l'expression des cytokines pulmonaires et la réponse en phase aiguë (annexe 12, Tableau A-59 à Tableau A-63). Une réponse pro-inflammatoire statistiquement significative a été observée, et la concentration de certaines cytokines pulmonaires était élevée 24 heures après

l'exposition aux cellules végétatives. Chez les cellules végétatives de la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis*, une augmentation de la concentration d'amyloïde A sérique a été observée dans la réponse en phase aiguë par rapport aux témoins. Aucune donnée sur les cytokines pulmonaires ou l'amyloïde A sérique n'était disponible relativement à l'exposition aux spores de la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis*.

Selon la littérature scientifique, l'espèce *B. licheniformis* a été impliquée dans des éclosions d'intoxication alimentaire (annexe 13). Les bactéries qui forment des endospores, comme *B. licheniformis*, et les substances toxiques résistant à la chaleur qu'elles produisent, peuvent résister à la pasteurisation et à d'autres procédés de transformation des produits laitiers, ainsi qu'aux températures de cuisson (Biesta-Peters *et al.*, 2010; Nieminen *et al.*, 2007). Pour qu'une dose toxique d'entérotoxines soit produite dans le lait ou d'autres aliments contaminés, on estime qu'il faut de 10^5 à 10^9 UFC/g (Cosentino *et al.*, 1997; Griffiths, 1990; Logan, 2012; Lund, 1990; Rosenkvist et Hansen, 1995; Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999). Les symptômes d'intoxication alimentaire découlant de l'ingestion d'aliments contaminés par *B. licheniformis* apparaissent de 5 à 12 heures après la consommation (huit heures en moyenne). Les symptômes diarrhéiques de l'intoxication alimentaire à *B. licheniformis* ressemblent à ceux provoqués par les espèces *Clostridium perfringens* et *B. cereus* (Drobniewski, 1993; Kramer et Gilbert, 1989). La mort par suite d'une intoxication alimentaire liée à *B. licheniformis* a été signalée chez un nourrisson qui avait consommé du lait maternisé contaminé (Mikkola *et al.*, 2000; Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999). Deux isolats de *B. licheniformis* provenant de ce lait se sont révélés toxigènes (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999). Selon les rapports, la souche 14580 de *B. licheniformis* (souche type) est non toxigène (Pedersen *et al.*, 2002). La production de toxines Hbl et Nhe par la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis* inscrite à la Liste intérieure a été vérifiée à Santé Canada et, selon les observations, la souche ne produisait pas ces toxines diarrhéiques. La germination des spores et la croissance des *Bacillus* spp. dans le lait cru et dans d'autres aliments traités à la chaleur entraînent des « saveurs atypiques » et une mauvaise apparence, ce qui peut en dissuader la consommation et donc prévenir l'exposition (Abo-Elnaga *et al.*, 2002; Davies et Wilkinson, 1973).

Le potentiel d'allergénicité et de toxicité de la glyphosate acétyltransférase produite par *B. licheniformis* et utilisée dans les herbicides a été évalué (Delaney *et al.*, 2008). Les auteurs ont conclu que dans le contexte de la biotechnologie agricole, au moins, il ne devrait y avoir aucun effet nocif sur les humains et que le risque d'exposition humaine à la protéine est faible si elle est exprimée dans les plantes transgéniques. (Delaney *et al.*, 2008). La sensibilité retardée au contact de la souche SB3086 de *B. licheniformis* a été évaluée chez les cobayes et on a conclu que la souche n'était pas un sensibilisant cutané. Il n'y a eu aucun signalement d'hypersensibilité ni d'allergénicité impliquant la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis* inscrite à la Liste intérieure.

B. subtilis

Des bactériémies, des septicémies et d'autres infections liées à *B. subtilis* ont été signalées (De Boer *et al.*, 1991; Drobniewski, 1993; Ihde et Armstrong, 1973; Logan, 1988; Murray *et al.*, 1995; Olszewski *et al.*, 1999; Pennington *et al.*, 1976; Tuazon *et al.*, 1979; Turnbull *et al.*, 1979); toutefois, les infections causées par *B. subtilis* sont rares et impliquent des conditions prédisposantes, notamment l'immunodéficience, les maladies invalidantes et des barrières naturelles aux infections sérieusement compromises. Peu de cas d'infection et aucune mortalité attribuables à *B. subtilis* n'ont été déclarés depuis 1980.

Une bactériémie liée à *B. subtilis* a été signalée chez des patients atteints d'un cancer (Banerjee *et al.*, 1988). Une bactériémie nosocomiale provoquée par *B. subtilis* a été signalée chez quatre patients sur huit qui avaient des conditions sous-jacentes (cancer, traumatisme crânien ou chirurgie récente) et qui ont reçu un probiotique contenant des spores de *B. subtilis* (10^9 spores par comprimé) [Richard *et al.*, 1988]. Une septicémie liée à *B. subtilis* a été signalée chez un jeune enfant (Cox *et al.*, 1959) et chez des patients hospitalisés qui avaient des lignes intraveineuses (Matsumoto *et al.*, 2000).

B. subtilis a été impliqué dans un cas de cellulite qui s'est transformé en fasciite nécrosante chez un patient atteint d'un cancer (Tuazon *et al.*, 1979). Des infections, dans lesquelles *B. subtilis* était l'agent étiologique ou un contaminant d'instruments médicaux à demeure ont été signalées (Ihde et Armstrong, 1973; Schoenbaum *et al.*, 1975). Chez certains, les infections à *B. subtilis* ont été mortelles (Ihde et Armstrong, 1973; Pennington *et al.*, 1976; Tuazon *et al.*, 1979). Dans ces cas-là, les patients présentaient de graves comorbidités et dans certains cas, on pensait que *B. subtilis* était un contaminant et que son rôle en tant qu'agent causal n'a pas été pris en compte.

Les études présentées à l'appui de l'homologation des pesticides contenant les souches QST 713 et MBI 600 de *B. subtilis* comportaient une variété d'expositions dans des modèles mammaliens standards utilisés pour prévoir les effets nocifs chez les humains (annexe 11, Tableau A-56 et Tableau A-57). Les études portant sur l'exposition par les voies orale, pulmonaire et intraveineuse aux souches QST 713 et MBI 600 de *B. licheniformis* ont révélé une faible toxicité et aucune pathogénicité chez les rats CD, et ce, même aux doses maximales.

Dans les études menées à Santé Canada, des souris femelles BALB/c ont été exposées à 10^6 UFC de cellules végétatives ou de spores des souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum*, administrées dans un volume de 25 µL par nébulisation endotrachéale, dans un modèle pour l'exposition humaine par voie pulmonaire. Les souris semblaient normales et n'ont pas présenté de symptômes après l'exposition aux cellules végétatives ou aux spores. Toutes les souris traitées ont été autopsiées 24 heures après l'exposition aux cellules végétatives ou une semaine après l'exposition aux spores, dans le but d'évaluer la clairance bactérienne, l'expression des cytokines pulmonaires et la réponse en phase aiguë (annexe 12,

Tableau A-59 à Tableau A-63). Les cellules végétatives et les spores ont été dénombrées dans les poumons, la trachée et l'œsophage. Des changements dans les concentrations de cytokines et d'amyloïde A sérique au cours de la réponse en phase aiguë n'ont été observés qu'avec les cellules végétatives de la souche ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum*.

Les bactéries formant des endospores, comme les espèces du genre *Bacillus*, et les substances toxiques résistant à la chaleur qu'elles produisent, peuvent résister à la pasteurisation et à d'autres procédés de transformation des produits laitiers (Nieminen *et al.*, 2007). La prolifération de ces micro-organismes dans les aliments représente un risque potentiel d'intoxication alimentaire (Beattie et Williams, 1999). Après avoir consommé des aliments contenant de fortes charges bactériennes ($10^5 - 10^9$ UFC/g), les symptômes d'intoxication alimentaire provoquée par *B. subtilis* peuvent apparaître dans un délai de 10 minutes à 14 heures (2,5 heures en moyenne) avec des vomissements importants (Rosenkvist et Hansen, 1995; Logan, 2012). Les aliments en cause sont souvent des plats à base de viande, de fruits de mer, de pâtisserie et de riz. Des intoxications alimentaires liées à *B. subtilis* ont également été associées à la consommation de pain moisi (filant) dans lequel la concentration de *B. Subtilis* était d'environ 10^8 UFC/g. Les maladies d'origine alimentaire liées au pain filant sont peu probables étant donné l'apparence non attrayante du pain (décoloré, collant et miettes molles) résultat du grand nombre de cellules présentes qui dégradent l'amidon et les protéines (Rosenkvist et Hansen, 1995; Logan, 2012; Lund, 1990). La production de toxines Hbl et Nhe des souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* inscrites à la *Liste intérieure* a été vérifiée par Santé Canada et, selon les observations, elles ne produisaient pas ces toxines diarrhéiques.

Dans un article récent, des dommages au foie ont été signalés chez des patients qui avaient consommé des suppléments nutritifs contenant *B. subtilis* (Logan, 2012). Plus tard, il a été démontré dans un essai sur culture de cellules Hep2G que la souche était hépatotoxique. Plusieurs souches de *B. subtilis* ont été testées chez les rats et d'autres vertébrés, et aucun effet nocif n'a été observé.

Aucun incident d'hypersensibilité n'a été déclaré pendant les essais, la production ou la manipulation des souches QST 713 ou MBI 600 de *B. subtilis* (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007b; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007c). La souche MBI 600 de *B. subtilis* s'est révélée un sensibilisant cutané modéré 24 à 72 heures après l'administration (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007c; USEPA, 2012). *B. subtilis* produit des exo-enzymes qui facilitent la décomposition de la matière organique (Tjalsma *et al.*, 2004). Les subtilisines sont des enzymes protéolytiques produites par *B. subtilis* qui sont connues pour provoquer des réactions allergiques, comme des dermatites et des allergies respiratoires chez les humains après des expositions répétées (Juniper *et al.*, 1977; Norris *et al.*, 1981; Schweigert *et al.*, 2000; Thorne *et al.*, 1986; Tripathi et Grammer, 2001; Weissman et Lewis, 2002). Il a été montré que *B. subtilis* produit des enzymes causant des

symptômes associés à l'allergénicité, notamment l'asthme et l'irritation (Flindt et Hendrick, 2002).

Souches maquillées de *Bacillus* inscrites à la Liste intérieure

Dans les études faites à Santé Canada, des souris femelles BALB/c ont été exposées à 10^6 UFC de cellules végétatives ou de spores des espèces *Bacillus* 16970-5, *Bacillus* 2 18118-1, *Bacillus* 4 18121-4 et *Bacillus* 7 18129-3, administrées dans un volume de 25 µL par nébulisation endotrachéale, dans un modèle pour l'exposition humaine par voie pulmonaire. Les souris semblaient normales et n'ont pas présenté de symptômes après exposition aux cellules végétatives ou aux spores. Toutes les souris traitées ont été autopsiées 24 heures après l'exposition aux cellules végétatives ou une semaine après l'exposition aux spores, dans le but d'évaluer la clairance bactérienne, l'expression des cytokines pulmonaires et la réponse en phase aiguë (annexe 12, Tableau A-59 à Tableau A-63). Les cellules végétatives et les spores ont été dénombrées dans les poumons, la trachée et l'œsophage. Des changements dans la concentration des cytokines après l'exposition aux cellules végétatives et aux spores des espèces *Bacillus* 16970-5, *Bacillus* 2 18118-1 et *Bacillus* 4 18121-4 ont été observés. L'espèce *Bacillus* 7 18129-3 n'a pas été testée. Des changements dans la concentration des cytokines et de l'amyloïde A sérique au cours de la réponse en phase aiguë n'ont été déclarés que pour les cellules végétatives des espèces *Bacillus* 16970-5, *Bacillus* 2 18118-1 et *Bacillus* 4 18121-4 et pour les spores des espèces *Bacillus* 16970-5 et *Bacillus* 2 18118-1.

1.2 Gravité du danger

Une exposition régulière aux membres du complexe *B. subtilis* se produit en raison de leur présence généralisée dans l'environnement (Murray *et al.*, 1995). On retrouve les souches dans des particules de poussière qui peuvent être inhalées (Andersson *et al.*, 1999). Un contact cutané peut se produire, compte tenu du fait que les souches sont couramment présentes dans les sols et sur la plupart des surfaces (Logan et De Vos, 2009; Murray *et al.*, 1995; Thatoi *et al.*, 2013). Malgré la forte exposition naturelle à ces micro-organismes, le taux d'infections signalées est faible (Rooney, communication personnelle). En outre, les membres du complexe *B. subtilis* ont déjà été utilisés dans la lutte biologique, la promotion de la croissance et en tant que probiotiques, des utilisations qui entraînent toutes une exposition directe des humains et des espèces environnementales, sans que des effets nocifs n'aient été déclarés. Enfin, les souches inscrites à la Liste intérieure sont largement utilisées dans une variété de secteurs au Canada (consulter la section 2.1 Sources d'exposition) et aucun effet nocif n'a été signalé en association avec ces utilisations.

1.2.1 Danger pour l'environnement

1.2.1.1 *B. amyloliquefaciens*

Le danger que présente la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens* pour l'environnement est considéré comme faible, étant donné que la littérature scientifique ne révèle aucun signalement d'infection ou d'effet nocif chez les vertébrés, les invertébrés et les plantes terrestres et aquatiques. Les tests faits sur des vertébrés et des invertébrés terrestres et aquatiques avec les souches de *B. amyloliquefaciens* utilisées dans des pesticides indiquent un faible pouvoir pathogène ou toxique. Les résultats des essais réalisés par les scientifiques de Santé Canada dans des modèles murins et des lignées cellulaires montrent que le pouvoir pathogène de *B. amyloliquefaciens* 13563-0 est faible. Par le passé, l'utilisation de la souche *B. amyloliquefaciens* 13563-0 et des souches *B. amyloliquefaciens* employées dans les pesticides s'est avérée sécuritaire.

1.2.1.2 *B. atrophaeus*

Le danger que présente la souche 18250-7 de *B. atrophaeus* pour l'environnement est considéré comme faible, étant donné que les renseignements provenant de la littérature scientifique indiquent que *B. atrophaeus* présente un faible potentiel toxique et pathogène pour les vertébrés, les invertébrés et les plantes terrestres et aquatiques et qu'aucun effet nocif n'a été signalé. Les essais faits par les scientifiques de Santé Canada dans des modèles murins et des lignées cellulaires montrent que le pouvoir pathogène de *B. atrophaeus* 18250-7 est faible.

1.2.1.3 *B. licheniformis*

Le danger que présente la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis* pour l'environnement est considéré comme faible, étant donné que les renseignements provenant de la littérature scientifique indiquent que le pouvoir pathogène de *B. licheniformis* est faible pour les plantes ou les invertébrés terrestres et aquatiques. Même si *B. licheniformis* peut entraîner des avortements dans les milieux agricoles, ceux-ci sont rares, et dans les conditions expérimentales, les doses requises pour que l'infection s'établisse dans le placenta bovin étaient élevées et donnaient lieu à des concentrations de bactéries dans le sang qui étaient plus élevées que celles auxquelles on s'attendrait au cours d'une infection dans des conditions naturelles. Dans le cas improbable d'une infection, il existe des antibiotiques d'usage vétérinaire efficaces contre *B. licheniformis* ATCC 12713. Cette souche a d'ailleurs été utilisée comme probiotique chez les artémies, la truite arc-en-ciel, les porcs et les poulets, sans effet nocif déclaré. Les essais faits par les scientifiques de Santé Canada dans des modèles murins et des lignées cellulaires montrent que le pouvoir pathogène de *B. licheniformis* ATCC 12713 est faible (comme celui des espèces de *Bacillus* évaluées dans ce rapport).

1.2.1.4 *B. subtilis*

Le danger pour l'environnement que présentent les souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* est considéré comme faible, étant donné que les renseignements provenant de la littérature scientifique concernant l'espèce *B. subtilis* indiquent un faible pouvoir toxique et pathogène pour les vertébrés, les invertébrés et les plantes terrestres et aquatiques. Toutefois, certains effets nocifs ont été signalés après une exposition à des concentrations élevées d'autres souches de *B. subtilis*. Les essais faits avec les souches de *B. subtilis* utilisées dans les pesticides sur les vertébrés et les invertébrés terrestres et aquatiques indiquent généralement un faible pouvoir pathogène ou toxique, bien que certains effets aient été observés chez des invertébrés terrestres et aquatiques. Dans les essais réalisés par les scientifiques d'Environnement Canada, des réductions importantes de la longueur moyenne des pousses des plantes terrestres et de la production de juvéniles chez les arthropodes terrestres ont été constatées à la suite d'une exposition aux souches ATCC 6051A de *B. subtilis* et ATCC 55405 de *B. subtilis*. Les essais faits par les scientifiques de Santé Canada dans des modèles murins et des lignées cellulaires montrent que le pouvoir pathogène des souches suivantes est faible : souche ATCC 6051A de *B. subtilis*, souche ATCC 55405 de *B. subtilis*, souche ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et la souche ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum*. Par le passé, l'utilisation de toutes les souches de *B. subtilis* de la *Liste intérieure* s'est avérée sécuritaire.

1.2.1.5 Souches maquillées de *Bacillus* inscrites à la *Liste intérieure*

Le danger que présentent les espèces *Bacillus* 16970-5, *Bacillus* 2 18118-1, *Bacillus* 4 18121-4 et *Bacillus* 7 18129-3 pour l'environnement est considéré comme faible, étant donné le faible pouvoir pathogène mis en évidence par les essais effectués par les scientifiques de Santé Canada sur des modèles murins et des lignées cellulaires. Par le passé, l'utilisation de toutes les souches maquillées de *B. subtilis* de la *Liste intérieure* s'est avérée sécuritaire.

1.2.2 Danger pour la santé humaine

1.2.2.1 *B. amyloliquefaciens*

Le danger que présente la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens* pour la santé humaine est considéré comme faible, étant donné que les renseignements provenant des ouvrages scientifiques indiquent un faible pouvoir pathogène et qu'aucun cas d'infection n'a été signalé. Les essais faits avec les souches de *B. amyloliquefaciens* utilisées dans les pesticides sur des modèles d'infection chez l'humain révèlent un faible pouvoir pathogène ou toxique. Les essais faits par les scientifiques de Santé Canada dans des modèles murins et des lignées cellulaires montrent que le pouvoir pathogène de la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens* est faible. Les tests de sensibilité aux antibiotiques faits par les scientifiques de Santé Canada montrent que

les antibiotiques pertinents sur le plan clinique sont efficaces contre cette souche. Par le passé, l'utilisation de la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens* s'est avérée sécuritaire.

1.2.2.2 *B. atrophaeus*

Le danger que présente la souche 18250-7 de *B. atrophaeus* pour la santé humaine est considéré comme faible parce que les données publiées dans la littérature scientifique révèlent un faible pouvoir pathogène et qu'aucun cas d'infection n'a été signalé. Les essais faits par les scientifiques de Santé Canada dans des modèles murins et des lignées cellulaires montrent que le pouvoir pathogène de la souche 18250-7 de *B. atrophaeus* est faible. Les tests de sensibilité aux antibiotiques faits par les scientifiques de Santé Canada montrent que les antibiotiques pertinents sur le plan clinique sont efficaces contre cette souche. Par le passé, l'utilisation de la souche 18250-7 de *B. atrophaeus* s'est avérée sécuritaire.

1.2.2.3. *B. licheniformis*

Le danger que présente la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis* pour la santé humaine est considéré comme faible parce que les renseignements provenant de la littérature scientifique indiquent un certain pouvoir pathogène; toutefois, les rapports de cas sont rares et sont principalement observés chez des personnes ayant un système immunitaire affaibli, une maladie invalidante ou des personnes chez lesquelles les barrières normales aux infections sont brisées par des appareils médicaux implantés ou des blessures. Dans un cas, une septicémie récurrente a été signalée chez une personne qui ne présentait aucune prédisposition connue et qui s'est complètement rétablie. Les essais faits par les scientifiques de Santé Canada dans des modèles murins et des lignées cellulaires montrent que le pouvoir pathogène de la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis* est faible (ce qui concorde avec les résultats obtenus pour les autres souches évaluées) et aucune toxicité ou pathogénicité n'a été observée. Une intoxication alimentaire associée à *B. licheniformis* a été signalée, mais dans les essais réalisés par les scientifiques de Santé Canada, la souche inscrite à la *Liste intérieure* n'a pas produit de toxines analogues à celles produites par *B. cereus*. Par ailleurs, des facteurs d'atténuation tels que des saveurs atypiques et l'apparence décourageraient probablement la consommation d'aliments contaminés. Par le passé, l'utilisation de la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis* s'est avérée sécuritaire.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques faits par les scientifiques de Santé Canada ont d'abord montré que la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis* était résistante à beaucoup des antibiotiques contre lesquels elle avait été testée (existence de critères d'interprétation pour la plupart de ces antibiotiques, à l'exception de la tétracycline et de la rifampicine); toutefois, après une étude plus poussée, il a été conclu que la résistance apparente élevée observée était un artéfact de l'essai sur la concentration minimale inhibitrice mesurée en milieu liquide. La réinterprétation des données avec un seuil d'activité de bioréduction de 95 % a permis de conclure que le profil de sensibilité concorde aux valeurs figurant dans les ouvrages scientifiques portant sur l'espèce.

Dans le cas de la vancomycine, cela a été confirmé avec une méthode commerciale utilisant des bandelettes diagnostiques.

1.2.2.4 *B. subtilis*

Le danger pour la santé humaine que présentent les souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* est considéré comme faible, étant donné que les renseignements provenant de la littérature scientifique indiquent un certain pouvoir pathogène chez les personnes ayant une immunité compromise ou dont les barrières normales aux infections sont brisées. Toutefois, le nombre de signalements est limité et la plupart des cas signalés l'ont été avant les années 1980. Aucun décès n'a été déclaré depuis ce temps. Les essais faits par les scientifiques de Santé Canada dans des modèles murins et des lignées cellulaires montrent que le pouvoir pathogène des souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* est faible. Bien qu'une intoxication alimentaire associée à l'espèce *B. subtilis* ait été déclarée, dans les essais réalisés par les scientifiques de Santé Canada, les souches inscrites à la *Liste intérieure* n'ont pas produit de toxines analogues à celles de *B. cereus*. Par ailleurs, des facteurs d'atténuation tels que les saveurs atypiques et l'apparence décourageraient probablement la consommation d'aliments contaminés. Dans les modèles d'infection humaine, les essais faits avec les souches de *B. subtilis* utilisées dans les pesticides indiquent un faible pouvoir pathogène ou toxique. Par le passé, l'utilisation des souches figurant dans la *Liste intérieure* s'est avérée sécuritaire.

1.2.2.5 Souches maquillées de *Bacillus* inscrites à la *Liste intérieure*

Le danger que présentent les espèces *Bacillus* 16970-5, *Bacillus* 2 18118-1, *Bacillus* 4 18121-4 et *Bacillus* 7 18129-3 pour la santé humaine est considéré comme faible, étant donné que les essais faits par les scientifiques de Santé Canada dans des modèles murins et des lignées cellulaires montrent que le pouvoir pathogène de ces souches est faible. Par le passé, l'utilisation des souches maquillées de *Bacillus* inscrites à la *Liste intérieure* s'est avérée sécuritaire.

2. Évaluation de l'exposition

2.1 Sources d'exposition

Cette évaluation porte sur l'exposition aux souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* par suite de leur ajout à des produits commerciaux ou de consommation et de leur utilisation dans les procédés industriels au Canada.

Les souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* ont été inscrites sur la *Liste intérieure* en raison de leur utilisation dans des produits commerciaux et de consommation, dont des produits pour nettoyer et désodoriser, des produits de nettoyage et de dégraissage

de canalisations, de traitement des fosses septiques et des réservoirs de véhicules récréatifs, de même que dans des produits employés pour la biorestauration et la biodégradation, le traitement des déchets solides et des eaux usées ainsi que l'adoucissement de l'eau.

Les réponses à un questionnaire volontaire envoyé en 2007 à un sous-ensemble d'entreprises de biotechnologie clés, combinées aux renseignements obtenus d'autres programmes fédéraux de réglementation ou autres, indiquent que les souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* étaient utilisées dans le commerce en 2006. Aucune information sur les utilisations de *B. atrophaeus* n'a été recueillie à ce moment-là, puisque cette espèce a été inscrite à la *Liste intérieure* après la tenue de l'enquête.

Le gouvernement a mené une enquête de collecte obligatoire de renseignements (Avis) en vertu de l'article 71 de la LCPE (1999), qui a été publiée 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 des souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites sur la *Liste intérieure*, seules, dans un mélange ou dans un produit. Une activité commerciale ou de consommation a été déclarée pour ces micro-organismes dans une variété de secteurs différents (pour connaître les quantités et les concentrations, consultez le Tableau 2-1). Parmi les utilisations déclarées concernant les membres du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrits à la *Liste intérieure*, on trouve les suivantes : biodégradation; traitement biologique des déchets; biorestauration; produits de nettoyage à usage professionnel ou autres produits connexes; nettoyage et dégraissage des canalisations; production de fragrance, parfum ou désodorisant; d'enzymes ou de produits chimiques; recherche et développement; additifs pour les fosses septiques et pour les réservoirs de véhicules récréatifs et traitement des déchets solides et des eaux usées. Aucune information sur les utilisations de *B. atrophaeus* n'a été recueillie par l'intermédiaire de l'Avis en vertu de l'article 71, puisque cette espèce a été inscrite à la Liste des substances intérieure après la tenue de l'enquête.

Tableau 2-1 : Quantités déclarées des souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* importées ou fabriquées au Canada en 2009^a

Espèce ^b	Plage de quantités totales ^c (kg)	Plage de concentrations ^d (UFC/mL)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	De 10 000 à 100 000	de $2,0 \times 10^8$ à $1,0 \times 10^{11}$
<i>Bacillus licheniformis</i>	de 100 000 à 1 000 000	de $4,0 \times 10^6$ à $1,0 \times 10^{11}$
<i>Bacillus subtilis</i> ^e	de 100 000 à 1 000 000	de $1,0 \times 10^5$ à $1,0 \times 10^{11}$

^a Aucune information sur les utilisations de la souche *B. atrophaeus* n'a été recueillie par l'entremise de l'avis, car elle a été inscrite à la *Liste intérieure* une fois que le sondage a eu lieu.

^b Comprend toutes les souches de l'espèce inscrites à la *Liste intérieure*

^c Quantité combinée de tous les produits contenant les micro-organismes fabriqués ou importés au Canada

^d Plage de concentrations des micro-organismes dont l'importation ou la fabrication a été déclarée au Canada

^e Comprend la souche ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum*.

Une recherche du domaine public (Internet, base de données sur les brevets, fiches signalétiques, etc.) révèle une multitude d'utilisations potentielles du complexe *B. subtilis*, y compris les souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure*.

B. amyloliquefaciens

- En tant que micro-organisme produisant des enzymes (p. ex. amylases, isoprènes, protéases, protéine non structurale 3, ribonucléases et phytases), biosurfactants, antibiotiques et détergents destinés à des applications industrielles et commerciales (Madslien *et al.*, 2012) y compris des applications de nettoyage, de dégraissage et des utilisations antibactériennes (ATCC, 2012c; James *et al.*, 1995; Madslien *et al.*, 2012; Moons *et al.*, 2009; Pérez-García *et al.*, 2011; Rendueles et Ghigo, 2012; Rivardo *et al.*, 2009).
- Applications aux surfaces pour favoriser la formation d'un biofilm à base de *B. amyloliquefaciens* afin de déplacer des micro-organismes indésirables ou inconnus (James *et al.*, 1995; Moons *et al.*, 2009; Rendueles et Ghigo 2012; Rivardo *et al.*, 2009).
- Application dans un mélange avec d'autres espèces bactériennes dans le cadre du traitement de l'eau et des eaux usées pour traiter les efflorescences algales, les odeurs et l'accumulation de boue (Advanced Water Technologies, 2012; RoeTech, 2014).

B. atrophaeus

- Utilisation de spores en tant que substitut de *B. anthracis* (utilisé comme arme) dans la mise au point de l'équipement de surveillance de défense et en tant qu'agent de provocation (Blecka *et al.*, 2012; Carrera *et al.*, 2007; Grinshpun *et al.*, 2012; Page *et al.* 2007; USEPA 2013a).
- Utilisation de spores pour tester l'efficacité de la stérilisation à la chaleur sèche et à l'oxyde d'éthylène, ainsi que la stérilisation à la vapeur, dans le cadre de l'assurance et du contrôle de la qualité dans la production de produits pharmaceutiques et produits d'hygiène et de beauté (ATCC, 2012d).
- Modélisation de la transmission d'agents pathogènes (Gerhardts *et al.*, 2012).

B. licheniformis

- En tant qu'organisme produisant des enzymes et des biosurfactants, notamment l'alpha-amylase, la lichénysine, les pentosanases, la désoxyribonucléase (NucB), la nitroréductase et la lévansucrase (ATCC, 2013; Komolprasert et Ofoli, 1991; Moons *et al.*, 2009; Nerurkar, 2010; Rendueles et Ghigo, 2012; Rey *et al.*, 2004; Rivardo *et al.*, 2009; Thatoi *et al.*, 2013; Yakimov et Golyshin, 1997).
- Biosynthèse de nanocristaux d'argent (Kalimuthu *et al.*, 2008) et de nanocubes d'or (Kalishwaralal *et al.*, 2009).
- Dégradation des déchets de plumes produits par les fermes avicoles et les établissements de transformation (Ichida *et al.*, 2001).

- Biorestauration des métaux lourds (p. ex. zinc, cadmium et aluminium) [Kamika et Momba, 2013].
- Traitement de l'eau et des eaux usées pour réduire les efflorescences algales, les odeurs et l'accumulation de boues (Advanced Water Technologies, 2012).
- Bioindicateur de la toxicité des éluviats de sédiments (Campbell *et al.*, 1993).
- Formation de biofilms utiles (James *et al.*, 1995; Moons *et al.*, 2009; Rendueles et Ghigo, 2012; Rivardo *et al.*, 2009).
- Dans les produits probiotiques pour les humains et les animaux (Cutting, 2011; Nithya *et al.*, 2012).

B. subtilis

- En tant qu'organisme produisant des lipopeptides (biosurfactants), des enzymes (p. ex. amylase, protéase) ainsi que des composés antibiotiques (p. ex. atterimin) et isoprène (ATCC, 2012b; ATCC, 2012f; Moons *et al.*, 2009; Rendueles et Ghigo, 2012; Rivardo *et al.*, 2009; Thatoi *et al.*, 2013).
- Traitement de l'eau et des eaux usées pour réduire les efflorescences algales, les odeurs, l'accumulation de boue, les fosses septiques et les fosses de déchets agricoles (Advanced Water Technologies, 2012; RoeTech, 2014).
- Fermentation d'aliments traditionnels (Inatsu *et al.*, 2006; Leejeerajumnean, 2003).
- Formation de biofilms utiles (James *et al.*, 1995; Moons *et al.*, 2009; Rendueles et Ghigo, 2012; Rivardo *et al.*, 2009).
- Utilisation de spores pour tester l'assurance en matière de stérilité ainsi que dans la résistance bactérienne de la peinture au latex (ATCC, 2012f).
- Applications dans la recherche en tant qu'hôte bactériophage (ATCC, 2012f).
- Applications dans les diagnostics dans le cadre du dépistage sanguin pour la phénylcétonurie (ATCC, 2012f).
- Application dans la production d'aliments complémentaires (ATCC, 2012a).
- Dans les produits probiotiques pour les humains et les animaux (Cutting, 2011).

2.2 Caractérisation de l'exposition

2.2.1 Environnement

2.2.1.1 *B. atrophaeus*

L'exposition environnementale à la souche 18250-7 de *B. atrophaeus* est possible pour les espèces terrestres et, dans une moindre mesure, pour les espèces aquatiques, lors de son utilisation dans l'environnement comme substitut de *B. anthracis* dans la modélisation de la dispersion et la mise au point d'équipement de surveillance militaire. L'ampleur de l'exposition dépendra de la méthode de libération des bactéries, du volume libéré, des conditions météorologiques et de la vitesse du vent. En général, on s'attend à ce que l'exposition soit faible concernant ces applications, car il s'agit d'une activité spécialisée au Canada qui se fait à un seul endroit éloigné. L'inhalation constituerait la principale voie d'exposition. L'exposition résultant d'un contact cutané avec des surfaces contaminées et de l'ingestion fortuite provoquée par la contamination

secondaire de ressources alimentaires devrait être faible. L'exposition générale de l'environnement à la souche 18250-7 de *B. atrophaeus* est considérée comme faible.

2.2.1.2 Souches de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* et souches maquillées de *Bacillus* inscrites à la Liste intérieure

L'exposition de l'environnement aux autres souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la Liste intérieure sera considérée dans son ensemble, étant donné que les utilisations connues et potentielles sont semblables.

Les membres du complexe *B. subtilis* ont la capacité de s'adapter à plusieurs habitats terrestres et aquatiques et d'y prospérer. De nombreuses variations physiologiques existent dans la nature, ce qui permet à ce complexe de se développer fortement dans presque tous les environnements. Malgré la répartition généralisée du complexe d'espèces, des données révèlent un déclin des populations inoculées (de façon artificielle) dans des microcosmes du sol et des milieux marins (Medina *et al.*, 2003; Nybroe *et al.*, 1992). Il est peu probable que de grandes quantités de cellules végétatives restent dans l'eau ou dans le sol en raison de la concurrence pour les éléments nutritifs (Leung *et al.*, 1995) et de la microbiostase, qui est un effet inhibiteur du sol, ce qui entraîne une diminution rapide des populations de bactéries introduites (Van Veen *et al.*, 1997).

Afin d'estimer les concentrations environnementales escomptées à partir des applications prévues, des études sur la biorestauration et le traitement des eaux usées ont été explorées. Un mélange d'espèces de *Bacillus*, telles que *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* (jusqu'à 10^{11} UFC/g), a été ajouté pour traiter des eaux usées municipales à raison de 7,5 ppm (RoeTech, 2014), entraînant alors une concentration allant jusqu'à $7,5 \times 10^5$ UFC/mL dans les eaux usées traitées. Dans une étude de validation du principe à l'échelle du laboratoire, $1,5 \times 10^9$ cellules d'une souche de *B. subtilis* ont été ajoutées à 60 g de sol contaminé par des hydrocarbures pétroliers de manière à ce que la concentration finale soit de $2,5 \times 10^7$ cellules par gramme (Wu *et al.*, 2013). Il est peu probable que ces concentrations restent dans l'effluent d'eaux usées ou dans les sols, car les cellules végétatives des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la Liste intérieure n'ont pas d'avantage concurrentiel sur les populations de micro-organismes semblables naturellement présentes et elles seraient confrontées à une concurrence pour les éléments nutritifs avec la flore indigène. Les populations de cellules végétatives des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la Liste intérieure introduites dans le sol et dans l'eau diminueront probablement jusqu'à atteindre des concentrations de fond avec le temps. Dans des conditions sous-optimales, les spores des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la Liste intérieure devraient persister et s'accumuler dans l'environnement.

L'exposition aux souches de la Liste intérieure devrait être plus importante pour les organismes situés à proximité du lieu d'application des souches, que ce soit dans les écosystèmes aquatiques aux fins de traitement de l'eau (p. ex. aquariums et étangs) ou dans les sols aux fins de biorestauration des contaminants.

L'exposition indirecte des espèces environnementales découlant de l'utilisation et de l'élimination des produits de nettoyage devrait être faible par rapport aux applications directes dans des écosystèmes aquatiques ou des sols. L'accroissement du nombre de produits microbiens « plus écologiques » sur le marché peut toutefois augmenter ces expositions (Spök et Klade, 2009).

On n'a trouvé aucun rapport pertinent sur la persistance des toxines produites par les souches du complexe *B. subtilis* dans l'environnement après avoir effectué une recherche exhaustive dans les ouvrages scientifiques de nombreuses sources.

D'après la grande variété d'utilisations déclarées en réponse à l'Avis, l'exposition environnementale aux autres souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* devrait être moyenne.

2.2.2 Humains

2.2.2.1 *B. atrophaeus*

Une exposition humaine fortuite à la souche 18250-7 de *B. atrophaeus* est possible lors de son utilisation dans l'environnement comme substitut de *B. anthracis* dans la modélisation de la dispersion et dans la mise au point d'équipement de surveillance militaire. L'ampleur de l'exposition dépendra de la méthode de libération des bactéries, du volume libéré, des conditions météorologiques, de la vitesse du vent et de la proximité des tierces personnes au site d'application. En général, on s'attend à ce que l'exposition soit faible pour ces applications, car il s'agit d'une activité spécialisée au Canada qui se fait à un seul endroit éloigné. L'inhalation constituerait la principale voie d'exposition. L'exposition découlant d'un contact cutané avec des surfaces contaminées et d'une ingestion fortuite créée par la contamination secondaire de produits alimentaires devrait être faible. L'exposition humaine générale concernant la souche 18250-7 de *B. atrophaeus* est considérée comme faible.

2.2.2.2 Souches de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* et de *Bacillus* maquillées inscrites à la *Liste intérieure*

L'exposition humaine aux autres souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* sera considérée dans son ensemble, étant donné que les utilisations connues et potentielles sont semblables.

L'exposition humaine devrait être plus importante à la suite de l'utilisation directe de produits de consommation contenant des spores ou des cellules viables utilisés pour le nettoyage ou le traitement de l'eau. On s'attend à ce que la manipulation et l'application de ces produits entraînent l'exposition directe de la peau et l'inhalation de gouttelettes pulvérisées ou de spores soulevées dans l'air. L'ingestion fortuite se produisant après une utilisation sur des surfaces de préparation alimentaire, ou près de ces dernières, et après un contact avec les yeux, constitue une voie d'exposition secondaire possible.

Les humains peuvent également être exposés en tant que tierces personnes pendant l'application commerciale de produits de nettoyage, de traitement de l'eau, de produits agricoles ou de biodégradation. 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. En général, l'exposition devrait être faible pour ces applications.

L'exposition humaine indirecte aux souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure*, rejetées dans l'environnement après leur utilisation dans le traitement de l'eau, les applications agricoles ou la biodégradation, devrait également se produire à proximité des sites traités, mais devrait être moins importante que l'exposition directe découlant de l'utilisation de ces organismes dans les produits de consommation. L'exposition humaine à des plans d'eau et à des sols traités avec les souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* (p. ex. par l'entremise d'activités récréatives) pourrait également conduire à l'exposition de la peau et des yeux, ainsi qu'à ingestion fortuite; toutefois, la dilution de ces produits devrait réduire de façon importante l'exposition pour ce qui est des scénarios d'applications ménagères. L'activité humaine sur les sols récemment traités avec les souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* pourrait soulever les spores dans l'air, qui pourraient alors être inhalées et exposer la peau et les yeux. Cette exposition devrait également être faible par rapport à l'utilisation directe de produits de consommation.

Le rejet des souches du groupe *B. subtilis/licheniformis* inscrites à la *Liste intérieure* à partir des installations fabriquant des enzymes ou des produits chimiques biologiques est possible; ce rejet devrait toutefois être limité par l'application de bonnes pratiques de fabrication, dans le cadre desquelles des mesures devraient être prises pour minimiser la probabilité de rejet de micro-organismes de production.

Dans le cas des utilisations de prébiotiques et de probiotiques contenant des spores des souches *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* et *B. subtilis*, l'exposition directe se ferait principalement par ingestion orale. Une exposition indirecte pourrait se produire à la suite de l'élimination des probiotiques ou par les pertes dans les matières fécales dans le réseau d'assainissement. Dans le cas des matières fécales ou de l'élimination dans le réseau d'assainissement, le traitement des eaux usées municipales devrait réduire le fardeau microbien avant le rejet des effluents dans l'environnement. L'exposition humaine aux souches par l'intermédiaire de l'environnement devrait être faible. L'élimination des probiotiques non utilisés dans les sites d'enfouissement ne devrait pas entraîner une exposition humaine importante.

Lorsque les spores des souches du groupe *B. subtilis/licheniformis* inscrites à la *Liste intérieure* entrent dans les sources d'eau des stations de traitement de l'eau potable après un rejet provoqué par les utilisations prévues et potentielles, les procédés de traitement de l'eau potable (p. ex. coagulation, floculation, ozonisation, filtration et chloration) devraient éliminer efficacement ces micro-organismes et donc limiter leur ingestion.

L'exposition aux autres souches de *B. subtilis/licheniformis* inscrites à la *Liste intérieure* découlant de l'utilisation de produits de consommation devrait être moyenne; elle devrait aussi être faible dans le cas des expositions indirectes se produisant à la suite d'un rejet dans l'environnement dans le cadre de la biodégradation, la biorestauration et le traitement de l'eau ou des eaux usées ou le rejet des effluents à partir des installations fabriquant des enzymes et des produits chimiques biologiques.

L'accroissement du nombre de produits microbiens « plus écologiques » sur le marché peut augmenter l'exposition humaine directe à des souches du groupe *B. subtilis/licheniformis* inscrites à la *Liste intérieure* et ayant des applications potentielles dans ces produits (Spök et Klade, 2009).

3. Caractérisation des risques

Dans cette évaluation, le risque est caractérisé selon un paradigme intégré à l'article 64 de la LCPE (1999) 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.

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).

B. amyloliquefaciens

Le danger que présente la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens* pour l'environnement et la santé humaine est considéré comme faible. Selon la grande variété d'utilisations déclarées en réponse à l'Avis relatif à l'article 71, l'exposition de l'environnement à la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens* devrait être moyenne. Toujours d'après la grande variété d'utilisations déclarées en réponse à l'Avis relatif à l'article 71, l'exposition humaine devrait être moyenne pour ce qui est de l'utilisation directe des produits de consommation, et faible dans le cas des expositions indirectes survenant après un rejet dans l'environnement. Le risque associé aux utilisations courantes est considéré comme faible tant pour l'environnement que pour la santé humaine.

L'accroissement du nombre de produits microbiens « plus écologiques » sur le marché pourrait augmenter l'exposition humaine aux souches du groupe *B. subtilis/licheniformis* inscrites à la *Liste intérieure* et ayant des applications potentielles dans ces produits (Spök et Klade, 2009); toutefois le risque découlant des futures utilisations prévisibles devrait également être faible, compte tenu du faible risque associé à la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens*.

B. atrophaeus

Le danger que présente la souche 18250-7 de *B. atrophaeus* pour l'environnement et la santé humaine est considéré comme faible. D'après les utilisations connues de la

souche 18250-7 de *B. atrophaeus*, l'exposition environnementale devrait être moyenne, et l'exposition humaine, faible. Le risque associé aux utilisations courantes est considéré comme faible tant pour l'environnement que pour la santé humaine.

Le risque découlant des futures utilisations prévisibles devrait également être faible, compte tenu du faible danger associé à la souche 18250-7 de *B. atrophaeus*.

B. licheniformis

Le danger que présente la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis* est considéré comme faible tant pour l'environnement que pour la santé humaine, étant donné que les ouvrages scientifiques et les résultats obtenus en laboratoire propres à la souche inscrite à la *Liste intérieure* indiquent un faible pouvoir pathogène (ce qui concorde avec les résultats obtenus pour les autres souches évaluées) et, que par le passé, l'utilisation de la souche inscrite à la *Liste intérieure* s'est avérée sécuritaire. *B. licheniformis* a été associé à des avortements chez le bétail. Les voies d'exposition menant à l'avortement dû à *B. licheniformis* chez les animaux d'élevage semblent comprendre l'ingestion d'aliments de mauvaise qualité ou moisissus pendant la gestation et la propagation hématogène subséquente à l'appareil reproducteur ainsi que l'introduction au cours des activités générales d'élevage (p. ex. reproduction naturelle, insémination artificielle, parturition et pendant les examens) (Cabell, 2007; Scott, 2011; Goncagul, 2012). Les applications actuelles de la souche inscrite à la *Liste intérieure* ne devraient pas fortement accroître l'exposition du bétail par ces voies. Selon la grande variété d'utilisations déclarées en réponse à l'Avis relatif à l'article 71, l'exposition de l'environnement à la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis* devrait être moyenne. L'exposition humaine devrait être moyenne pour ce qui est de l'utilisation directe des produits de consommation, et faible dans le cas des expositions indirectes survenant après des rejets dans l'environnement, d'après la grande variété d'utilisations déclarées en réponse à l'Avis relatif à l'article 71. Le risque associé aux utilisations courantes est considéré comme faible tant pour l'environnement que pour la santé humaine.

L'accroissement du nombre de produits microbiens « plus écologiques » sur le marché pourrait augmenter l'exposition humaine aux souches du groupe *B. subtilis/licheniformis* inscrites à la *Liste intérieure* et ayant des applications potentielles dans ces produits (Spök et Klade, 2009); toutefois le risque découlant des futures utilisations prévisibles devrait rester faible pour les humains et l'environnement, compte tenu du faible risque associé à la souche 12713 de *B. licheniformis*.

B. subtilis

Le danger que présentent les souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* pour l'environnement et la santé humaine est considéré comme faible. Selon la grande variété d'utilisations déclarées en réponse à l'Avis relatif à l'article 71, l'exposition de l'environnement aux souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* devrait être moyenne. Toujours d'après la grande variété d'utilisations déclarées en réponse à l'Avis relatif à l'article 71,

l'exposition humaine devrait aussi être moyenne pour ce qui est de l'utilisation directe des produits de consommation, et faible dans le cas des expositions indirectes par suite de rejets dans l'environnement. Le risque associé aux utilisations courantes est considéré comme faible tant pour l'environnement que pour la santé humaine.

L'accroissement du nombre de produits microbiens « plus écologiques » sur le marché pourrait augmenter l'exposition humaine aux souches du groupe *B. subtilis/licheniformis* inscrites à la *Liste intérieure* et ayant des applications potentielles dans ces produits (Spök et Klade, 2009); toutefois le risque découlant des futures utilisations prévisibles devrait également être faible, compte tenu du faible risque associé aux souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* pour la santé humaine et la salubrité de l'environnement.

Souches maquillées de *Bacillus* inscrites à la *Liste intérieure*

Le danger que présentent les espèces *Bacillus* 16970-5, *Bacillus* 2 18118-1, *Bacillus* 4 18121-4 et *Bacillus* 7 18129-3 pour l'environnement et la santé humaine est considéré comme faible, étant donné les résultats obtenus en laboratoire avec les souches maquillées inscrites à la *Liste intérieure* ainsi que leurs antécédents d'utilisation sécuritaire. D'après la grande variété d'utilisations déclarées en réponse à l'Avis relatif à l'article 71, l'exposition de l'environnement aux espèces *Bacillus* 16970-5, *Bacillus* 2 18118-1, *Bacillus* 4 18121-4 et *Bacillus* 7 18129-3 devrait être moyenne. Toujours d'après la grande variété d'utilisations déclarées en réponse à l'Avis relatif à l'article 71, l'exposition humaine devrait aussi être moyenne pour ce qui est de l'utilisation directe des produits de consommation, et faible dans le cas des expositions indirectes par suite de rejets dans l'environnement. Le risque associé aux utilisations courantes est considéré comme faible tant pour l'environnement que pour la santé humaine.

L'accroissement du nombre de produits microbiens « plus écologiques » sur le marché pourrait augmenter l'exposition humaine aux souches du groupe *B. subtilis/licheniformis* inscrites à la *Liste intérieure* et ayant des applications potentielles dans ces produits (Spök et Klade, 2009); toutefois le risque découlant des futures utilisations prévisibles devrait également être faible, compte tenu du faible risque associé à ces souches.

4. Conclusions

D'après l'information présentée dans cette évaluation préalable, on peut conclure que les souches 13563-0 de *Bacillus amyloliquefaciens*, 18250-7 de *Bacillus atrophaeus*, ATCC 12713 de *Bacillus licheniformis*, ATCC 6051A de *Bacillus subtilis*, ATCC 55405 de *Bacillus subtilis*, ATCC 6051 de *Bacillus subtilis* sous-espèce *subtilis*, ATCC 55406 de *Bacillus subtilis* sous-espèce *inaquosorum*, et les espèces *Bacillus* 16970-5, *Bacillus* 2 18118-1, *Bacillus* 4 18121-4 et *Bacillus* 7 18129-3 ne pénètrent pas dans l'environnement en une quantité, à une 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.

Il est donc proposé de conclure que les souches du groupe *Bacillus licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* ne satisfont pas aux critères établis à l'article 64 de la LCPE (1999).

5. Références

- Abo-Elnaga, H.I., Hegazi, F.Z., Abo-Elnaga, I.G. 2002. Spore-forming rods surviving boiling the raw milk and implicated in later spoilage of the product. *Arch. Lebensmittelhyg.* 53, 86-89.
- Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Omar, N.B., Galvez, A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 201-232.
- Advanced Water Technologies. 2012. Advanced Water Technologies: Freshwater and Saltwater Liquid and Powder Based Bacterial Products. MSDS 1-2.
- Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada. 2014. Pesticides et lutte antiparasitaire – Protéger votre santé et l'environnement – Registre public – Produit Demande – Matières actives. Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada 2014, 1.
- Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada. 2013. Projet de décision d'homologation PRD2013-14, Souche GB03 de *Bacillus subtilis*. Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada.
- Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada. 2012. Projet de décision d'homologation PRD2012-32, Souche FZB24 de *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*. p. 1-47.
- Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada. 2007a. La souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*. Projet de décision réglementaire. p. 1-57.
- Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada. 2007b. Rapport d'évaluation pour la souche QST 713 de *Bacillus subtilis*. Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada, ERC2007-06.
- Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada. 2007c. Projet de décision réglementaire pour *Bacillus subtilis*, souche MBI 600. Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada, PDR2007-05.
- Agerholm, J.S., Jensen, H.E., Jensen, N.E. 1995. Experimental infection in mice with *Bacillus licheniformis*. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B* 42, 247-256.
- Agerholm, J.S., Jensen, N.E., Dantzer, V., Jensen, H.E., Aarestrup, F.M. 1999. Experimental Infection of Pregnant Cows with *Bacillus licheniformis* Bacteria. *Vet. Pathol.* 36, 191-201.
- Agerholm, J.S., Jensen, N.E., Giese, S.B., Jensen, H.E. 1997. A preliminary study on the pathogenicity of *Bacillus licheniformis* bacteria in immunodepressed mice. *APMIS* 105, 48-54.
- Agerholm, J.S., Krogh, H.V., Jensen, H.E. 1995. A Retrospective Study of Bovine Abortions Associated with *Bacillus licheniformis*. *J. Vet. Med. B.* 42, 225-234.
- Agerholm, J.S., Willadsen, C.M., Nielsen, T.K., Giese, S.B., Holm, E., Jensen, L., Agger, J.F. 1997. Diagnostic Studies of Abortion in Danish Dairy Herds. *J. Vet. Med. A* 44, 551-558.

- Ahmadnia Motlagh, H.R., Farhangi, M., Rafiee, G., Noori, F. 2012. Modulating gut microbiota and digestive enzyme activities of *Artemia urmiana* by administration of different levels of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Aquacult. Int.* 20, 693-705.
- Ameur, M.A., Dubrous, P., Koeck, J.L. 2005. *Bacillus licheniformis*: An unusual cause of erysipelas. *Med. Mal. Infect.* 35, 417-418.
- Andersson, A.M., Weiss, N., Rainey, F., Salkinoja-Salonen, M.S. 1999. Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. *J. Appl. Microbiol.* 86, 622-634.
- André, S., Zuber, F., Remize, F. 2013. Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their resistance. Results of a French ten-year survey. *Int. J. Food Microbiol.* 165, 134-143.
- Anisimova M., Gascuel O. 2006. Approximate likelihood ratio test for branches: A fast, accurate and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539-552.
- ANZ. 2011. Application summary for Application No 50240: Registration of a 2 x 10¹¹ CFU/kg *Bacillus subtilis* powder product for application in poultry. Aust. Pest. Vet. Med. Authority 1-3.
- ANZ. 2012a. Application A1050 - Acyltransferase from *Bacillus licheniformis* for use as an emulsifier. ANZ Food Standards.
- ANZ. 2012b. Application A1061 - Amylomaltase from *Bacillus amyloliquefaciens* as a Processing Aid (Enzyme). ANZ Food Standards.
- ANZ. 2013. Application A1044 - Pullanase from *Bacillus subtilis* as a Processing Aid (Enzyme). ANZ Food Standards.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 202-206.
- ATCC. 2012a. *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (ATCC® 13933). ATCC 2013.
- ATCC. 2012b. *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (ATCC® 6051a). ATCC 2013.
- ATCC. 2012c. Product description of *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842. ATCC 2013.
- ATCC. 2012d. Product description of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372. ATCC 2013.
- ATCC. 2012e. Product Description of *Bacillus licheniformis* ATCC14580. ATCC 2013.
- ATCC. 2012f. Product description of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (Ehrenberg) Cohn (ATCC® 6051). ATCC 2013.
- ATCC. 2013. Product description of *Bacillus licheniformis* ATCC 12713. ATCC.
- Auchtung, J.M., Lee, C.A., Monson, R.E., Lehman, A.P., and Grossman, A.D. 2005. Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12554-12559.

- Banerjee, C., Bustamante, C.I., Wharton, R., Talley, E., Wade, J.C. 1988. *Bacillus* infections in patients with cancer. *Arch. Intern. Med.* 148, 1769-1774.
- Baradaran, G.R., Ghasemi, A. 2010. Introducing *Bacillus licheniformis* as the causal agent of pistachio dieback in Iran. Vol. 43, 597-601.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., and Mafart, P. 2012. Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and aw. *Food Microbiol.* 32, 79-86.
- Beattie, S.H., Williams, A.G. 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 221-225.
- Beauregard, P.B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. 2013. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E1621-E1630.
- Begley, M., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2009. Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5451-5460.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W. 2009. GenBank. *Nuc. Acids Res.* 37, D26-31.
- Biesta-Peters, E.G., Reij, M.W., Blaauw, R.H., In't Veld, P.H., Rajkovic, A., Ehling-Schulz, M., Abee, T. 2010. Quantification of the emetic toxin cereulide in food products by liquid chromatography-mass spectrometry using synthetic cereulide as a standard. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7466-7472.
- Blecka, M.I., Rataj, M., and Szymanski, G. 2012. Passive Detection of Biological Aerosols in the Atmosphere with a Fourier Transform Instrument (FTIR)-the Results of the Measurements in the Laboratory and in the Field. Vol. 42, 101-111.
- Blibech, I., Ksantini, M., Chaieb, I., Jlassi, B., Rhouma, A., Jaoua, S., Aifa, S. 2012. Isolation of entomopathogenic *Bacillus* from a biodynamic olive farm and their pathogenicity to lepidopteran and coleopteran insect pests. Vol. 31, 72-77.
- Blue, S.R., Singh, V.R., and Saubolle, M.A. 1995. *Bacillus licheniformis* bacteremia: Five cases associated with indwelling central venous catheters. *Clin. Infect. Dis.* 20, 629-633.
- Borriss, R., Chen, X.H., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R., Schumann, P., Spröer, C., Junge, H., Vater, J., Pühler, A., Klenk, H.P. 2011. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 1786-1801.
- Brown, K.L. 2000. Control of bacterial spores. *Br. Med. Bull.* 56, 158-171.

- Caballero, M.I., Gomez, M., Gonzalez-Muñoz, M., Reinoso, I., Rodriguez-Perez, R., Alday, E., Moneo, I. 2007. Occupational sensitization to fungal enzymes used in animal feed industry. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 144, 231-472.
- Cabell, E. 2007. Bovine abortion: aetiology and investigations. *In Pract.* 29, 455-463.
- Campbell, M., Bitton, G., and Koopman, B. 1993. Toxicity testing of sediment elutriates based on inhibition of alpha- glucosidase biosynthesis in *Bacillus licheniformis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 469-472.
- Carrera, M., Zandomeni, R.O., Fitzgibbon, J., Sagripanti, J. 2007. Difference between the spore sizes of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol.* 102, 303-312.
- Castagnola, E., Conte, M., Venzano, P., Garaventa, A., Viscoli, C., Barretta, M.A., Pescetto, L., Tasso, L., Nantron, M., Milanaccio, C., Giacchino, R. 1997. Broviac catheter-related bacteraemias due to unusual pathogens in children with cancer: Case reports with literature review. *J. Infect.* 34, 215-218.
- CDC. 1995. Foodborne Disease Outbreak Line Listing. CDC 1-11.
- Celli, J., Trieu-Cuot, P. 1998. Circularization of Tn916 is required for expression of the transposon-encoded transfer functions: Characterization of long tetracycline-inducible transcripts reading through the attachment site. *Mol. Microbiol.* 28, 103-117.
- Chung, S., Lim, J., Kim, S. 2010. Powder formulation using heat resistant endospores of two multi-functional plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus* strains having phytophthora blight suppression and growth promoting functions. *J. Appl. Biol. Chem.* 53, 485-492.
- CLSI. 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline - Second Edition. CLSI document M45-A2. Wayne (PA) : Clinical and Laboratory Standard Institute.
- Contreras, G.A., Rodríguez, J.M. 2011. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16, 339-356.
- Cordero-Ramírez, J.D., López-Rivera, R., Figueroa-Lopez, A.M., Mancera-López, M.E., Martínez-Álvarez, J.C., Apodaca-Sánchez, M.A., Maldonado-Mendoza, I.E. 2013. Native soil bacteria isolates in Mexico exhibit a promising antagonistic effect against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *J. Basic Microbiol.*
- Cosentino, S., Mulargia, A.F., Pisano, B., Tuveri, P., Palmas, F. 1997. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 235-238.
- Cotton, D.J., Gill, V.J., Marshall, D.J., Gress, J., Thaler, M., Pizzo, P.A. 1987. Clinical features and therapeutic interventions in 17 cases of *Bacillus* bacteremia in an immunosuppressed patient population. *J. Clin. Microbiol.* 25, 672-674.
- Cox, R., Sockwell, G., and Landers, B. 1959. *Bacillus subtilis* septicemia: report of a case and review of the literature. *N. Engl. J. Med.* 261, 894-896.

- Cutting, S.M. 2011. Review: *Bacillus* Probiotics. *Food. Microbiol.* 28, 214-220.
- Dat, N.M., Hamanaka, D., Tanaka, F., Uchino, T. 2012. Control of milk pH reduces biofilm formation of *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus paracasei* on stainless steel. Vol. 23, 215-220.
- Davies, F.L., Wilkinson, G. 1973. *Bacillus cereus* in milk and dairy products. In : The Microbiological Safety of Food, Hobbs, B.C., Christian, J.H.B. (éd.), London : Academic Press, p. 3-126.
- De Boer, W., Gunnewiek, P.J.A.K., Veenhuis, M., Bock, E., and Laanbroek, H.J. 1991. Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3600-3604.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., De Vos, P., and Heyndrickx, M. 2010. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 318-325.
- Delaney, B., Zhang, J., Carlson, G., Schmidt, J., Stagg, B., Comstock, B., Babb, A., Finlay, C., Cressman, R.F., Ladics, G., et al. 2008. A gene-shuffled glyphosate acetyltransferase protein from *Bacillus licheniformis* (GAT4601) shows no evidence of allergenicity or toxicity. *Toxicol. Sci.* 102, 425-432.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., Gascuel, O. 2008. Dedicated to reconstructing and analysing phylogenetic relationships between molecular sequences. *Nuc. Acid. Res.* 36, W465-9.
- Dischinger, J., Josten, M., Szekat, C., Sahl, H., and Bierbaum, G. 2009. Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. *PLoS ONE* 4.
- Drobniewski, F.A. 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 324-338.
- Dubnau, D., Losick, R. 2006. Bistability in bacteria. *Mol. Microbiol.* 16, 269-275.
- Duncanson, G.R. Nutrition and metabolic diseases in. Veterinary treatment of llamas and alpacas. Wallingford : CABI, 13-21.
- Echeverri-Molina, D., Santolamazza-Carbone, S. 2010. Toxicity of synthetic and biological insecticides against adults of the Eucalyptus snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). *J. Pest Sci.* 83, 297-305.
- EFSA. 2008. Technical guidance: Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 732, 1-15.
- Euzéby, J.P. 2013. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - Genus *Bacillus*. LPSN 2013.

- Fakruddin, M., Sarker, N., Ahmed, M.M., Noor, R. 2012. Protein Profiling of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Agro-forest Soil in Bangladesh. *ASpac J. Mol. Biol. Biotechnol.* 20, 139-145.
- Fangio, M.F., Roura, S.I., Fritz, R. 2010. Isolation and identification of *Bacillus* spp. and related genera from different starchy foods. *J. Food Sci.* 75, M218-M221.
- Filée, P., Benlafya, K., Delmarcelle, M., Moutzourelis, G., Frère, J., Brans, A., Joris, B. 2002. The fate of the BlaI repressor during the induction of the *Bacillus licheniformis* BlaP β -lactamase. *Mol. Microbiol.* 44, 685-694.
- Flindt, M.L., Hendrick, D.J. 2002. Papers that have changed the practice of occupational medicine: Pulmonary disease due to inhalation of derivatives of *Bacillus subtilis* containing proteolytic enzyme by M.L.H. Flindt. 1969. *Occup Med (Lond)* 52, 57-63.
- Flores, C.M., Ravishankar, J., Ajiboye, P., Kramer, M. 2001. *Bacillus licheniformis* causing brain abscess in a normal host. *Clin. Infect. Dis.* 33, 146.
- From, C., Pukall, R., Schumann, P., Hormazábal, V., Granum, P.E. 2005. Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1178-1183.
- Galanos, J., Perera, S., Smith, H., O'Neal, D., Sheorey, H., Waters, M.J. 2009. Bacteremia Due to Three *Bacillus* Species in a Case of Muchaussen's Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2247-2248.
- Galiero, G., De Carlo, E. 1998. Abortion in water buffalo (*Bubalus bubalis*) associated with *Bacillus licheniformis*. *Vet. Rec.* 143, 640.
- Galvez, A., Valdivia, E., Gonzalez-Segura, A., Lebbadi, M., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M. 1993. Purification, characterization, and lytic activity against *Naegleria fowleri* of two amoebicins produced by *Bacillus licheniformis* A12. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1480-1486.
- Gayet, S., Garcin, O., Mazodier, K., Kaplanski, G., Bernit, E., Schleinitz, N., Veit, V., Harlé, J.R. 2005. Bactériémie à *Bacillus licheniformis* chez un sujet immunocompétent [2]. *La revue de médecine interne* 26, 250-251.
- Gerhardts, A., Hammer, T.R., Balluff, C., Mucha, H., Hoefer, D. 2012. A model of the transmission of micro-organisms in a public setting and its correlation to pathogen infection risks. *J. Appl. Microbiol.* 112, 614-621.
- Gill, J.M. 1999. *Bacillus* species - an occasional cause of sheep abortion. p. 39-40.
- Goncagul, G., SeyrekIntas, K., Kumru, I.H., Ozakin, C., Ozdemir, S.E.S., Weiss, R., Prenger-Berninghoff, E. 2012. Bacterial infertility and ascending uterine infections with respect to pneumovagina and urovagina in cows. 2, 583-586.
- Griffiths, M.W. 1990. Toxin production by psychotropic *Bacillus* spp. present in milk. *J. Food Prot.* 53, 790-792.

- Grinshpun, S.A., Adhikari, A., Yermakov, M., Reponen, T., Dreizin, E., Schoenitz, M., Hoffmann, V., Zhang, S. 2012. Inactivation of aerosolized *Bacillus atrophaeus* (BG) endospores and MS2 viruses by combustion of reactive materials. Vol. 46, 7334-7341.
- Grossman, A.D., Losick, R. 1988. Extracellular Control of Spore Formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4369-4373.
- Hameeda, B., Rupela, O.P., Reddy, G. 2006. Antagonistic activity of bacteria inhabiting composts against soil-borne plant pathogenic fungi. *Indian J. Microbiol.* 46, 389-396.
- Hannah, W.N., Ender, P.T. 1999. Persistent *Bacillus licheniformis* bacteremia associated with an intentional injection of organic drain cleaner. *Clin. Infect. Dis.* 29, 659-661.
- Hardy, A., Christmann, D., Feger, J.M., Pasquali, J.L., Storck, D. 1986. État septique après artériographie. Du rôle d'un germe réputé non pathogène : *Bacillus licheniformis*. Vol. 16, 37-38.
- Hare, W.R., Hoyt, P.G., Hohn, C., Higgins, J.A. 2008. Ribosomal RNA-based analysis of the bacterial flora from the conjunctivae of cattle with bovine keratoconjunctivitis (BKC). *Vet. Microbiol.* 131, 358-368.
- Haydushka, I.A., Markova, N., Kirina, V., Atanassova, M. 2012. Recurrent sepsis due to *Bacillus licheniformis*. *J. Global Infect. Dis.* 4, 82-83.
- He, L., Chen, W.L., Liu, Y. 2006. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiol. Res.* 161, 321-326.
- Hendriksen, N.B., Carstensen, J. 2013. Long-term survival of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a field trial. *Can. J. Microbiol.* 59, 34-38.
- Hendriksen, N.B., Hansen, B.M. 2002. Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. *Can J Microbiol.* 48, 256-261.
- Hoa, T.T., Duc, L.H., Isticato, R., Baccigalupi, L., Ricca, E., Van, P.H., Cutting, S.M. 2001. Fate and Dissemination of *Bacillus subtilis* Spores in a Murine Model. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3819-3823.
- Hong, T.W., Kim, H.Y., Jee, M.G., Choi, J.W., Youg, S.J., Shin, K.C., Lee, W.Y. 2004. A case of *Bacillus licheniformis* bacteremia associated with bronchoscopy. *Tuberc. Respir. Dis.* 57, 553-556.
- Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K., Kaminogawa. 2000. Improved growth and viability of *Lactobacilli* in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase, or subtilisin." *Canadian Journal of Microbiology* 46, 892-897.
- Huang, J.-M., La Ragione, R. M., Nunez, A., Cutting, S.M. 2008. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53, 195-203.
- Huang, Q., Xu, X., Mao, Y., Huang, Y., Rajput, I.R., Li, W. 2013. Effects of *Bacillus subtilis* B10 spores on viability and biological functions of murine macrophages. *Animal Sci. J.* 84, 247-252.

- Ichida, J.M., Krizova, L., LeFevre, C.A., Keener, H.M., Elwell, D.L., Burt E.H., J. 2001. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. Microbiol. Methods* 47, 199-208.
- Ihde, D.C., Armstrong, D. 1973. Clinical spectrum of infection due to *Bacillus* species. *Am. J. Med.* 55, 839-845.
- Inatsu, Y., Nakamura, N., Yuriko, Y., Fushimi, T., Watanasiritum, L., Kawamoto, S. 2006. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thya nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 237-242.
- Ishihara, H., Takoh, M., Nishibayashi, R., Sato, A. 2002. Distribution and variation of bacitracin synthetase gene sequences in laboratory stock strains of *Bacillus licheniformis*. *Curr. Microbiol.* 45, 18-23.
- Jamalizadeh, M., Etebarian, H.R., Alizadeh, A., Aminian, H. 2008. Biological control of gray mold on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN74-1). *Phytoparasitica* 36, 23-29.
- James, G.A., Beaudette, L., Costerton, J.W. 1995. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *J. Ind. Microbiol.* 15, 257-262.
- Jephcott, A.E., Barton, B.W., Gilbert, R.J., Shearer, C.W. 1977. An unusual outbreak of food-poisoning associated with meals-on-wheels. *Lancet* 129-130.
- Jeyaram, K., Romi, W., Singh, T.A., Adewumi, G.A., Basanti, K., Oguntinyinbo, F.A. 2011. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance. *J. Microbiol. Methods* 87, 161-164.
- Johnson, C.T., Lupson, G.R., Lawrence, K.E. 1994. The bovine placentome in bacterial and mycotic abortions. *Vet. Rec.* 134, 263-266.
- Jones, B.L., Hanson, M.F., Logan, N.A. 1992. Isolation of *Bacillus licheniformis* from a brain abscess following a penetrating orbital injury. *J. Infect.* 24, 103-104.
- Juniper, C.P., How, M.J., Goodwin, B.F.J., Kinshott, A.K. 1977. *Bacillus subtilis* enzymes: a 7 year clinical, epidemiological and immunological study of an industrial allergen. *J. Soc. Occup. Med.* 27, 3-12.
- Kalimuthu, K., Suresh Babu, R., Venkataraman, D., Bilal, M., Gurunathan, S. 2008. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 65, 150-153.
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ram Kumar Pandian, S., Gurunathan, S. 2009. Biological synthesis of gold nanocubes from *Bacillus licheniformis*. *Bioresour. Technol.* 100, 5356-5358.
- Kamika, I., Momba, M.N.B. 2013. Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. *BMC Microbiol.* 13.
- Katz, E., Demain, A.L. 1977. The Peptide Antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, Biogenesis, and Possible Functions. *Bacteriol. Rev.* 41, 449-474.

- Kim, H., Lee, E., Bae, E., Kim, M., Hur, J., Cho, O., Kang, D.H., Kim, S., Jun, J., Bae, I. 2012. A case of *Bacillus licheniformis* spondylitis and bacteremia in a patient with lung cancer. *Infect. Chemother.* 44, 512-515.
- Kimura, K., Tran, L.P., Funane, K. 2011. Loss of poly- γ -glutamic acid synthesis of *Bacillus subtilis* (natto) due to IS4Bsu1 translocation to swrA gene. *Food Sci. Technol. Res.* 17, 447-451.
- Kirkbride, C.A. 1993. Bacterial agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. Vol. 5, 64-68.
- Kirkbride, C.A., Collins, J.E., Gates, C.E. 1986. Porcine abortion caused by *Bacillus* sp. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188, 1060-1061.
- Koehler, T.M., Thorne, C.B. 1987. *Bacillus subtilis* (natto) plasmid pLS20 mediates interspecies plasmid transfer. *J. Bacteriol.* 169, 5271-5278.
- Komolprasert, V., Ofoli, R.Y. 1991. A dispersion model for predicting the extent of starch liquefaction by *Bacillus licheniformis* α -amylase during reactive extrusion. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 681-690.
- Kramer, J.M., Gilbert, R.J. 1989. In : *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species; Foodborne Bacterial Pathogens, Doyle, M. P. (éd.), New York : Marcel Dekker Inc., p. 21-70.
- Kreft, J., Hughes, C. 1982. Cloning vectors derived from plasmids and phage of *Bacillus*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 96, 1-17.
- La Jeon, Y., Yang, J.J., Kim, M.J., Lim, G., Cho, S.Y., Park, T.S., Suh, J., Park, Y.H., Lee, M.S., Kim, S.C., Lee, H.J. 2012. Combined *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* infection in a patient with oesophageal perforation. *J. Med. Microbiol.* 61, 1766-1769.
- Lapidus, A., Galleron, N., Andersen, J.T., Jorgensen, P.L., Ehrlich, S.D., Sorokin, A. 2002. Co-linear scaffold of the *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* genomes and its use to compare their competence genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 23-30.
- Lebbadi, M., Galvez, A., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M. 1994. Biological activity of amoebicin m4-A from *Bacillus licheniformis* M-4. *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol. 38, 1820-1823.
- Leejeerajumnean, A. 2003. Thus nao: Alkali Fermented Soybean from *Bacillus subtilis*. *Silpakorn University Int. J.* Vol. 3, 277-292.
- Lépine, A., Michel, F., Nicaise, C., Imbert, G., Vialet, R., Thomachot, L., Di Marco, J., Lagier, P., Martin, C. 2009. *Bacillus licheniformis* septicemia in a very-low-birth-weight neonate: A case report. *Infection* 37, 156-158.
- Leung, K., Trevors, J.T., Lee, H. 1995. Survival of and lacZ expression recombinant *Pseudomonas* strains introduced into river water microcosms. *Can. J. Microbiol.* 41, 461-469.

- Li, Y., Yang, S., Mu, B. 2010. The surfactin and lichenysin isoforms produced by *Bacillus licheniformis* HSN 221. *Anal. Lett.* 43, 929-940.
- Lindsay, D., Mosupye, F.M., Brözel, V.S., Von Holy, A. 2000. Cytotoxicity of alkaline-tolerant dairy-associated *Bacillus* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 364-369.
- Link, R., Kovác, G. 2006. The effect of probiotic BioPlus 2B on feed efficiency and metabolic parameters in swine. *Biologia* 61, 783-787.
- Logan, N.A. 1988. *Bacillus* species of medical and veterinary importance. *J. Med. Microbiol.* 25, 157-165.
- Logan, N.A. 2012. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J. Appl. Microbiol.* 112, 417-429.
- Logan, N.A., De Vos, P. 2009. In : Genus I. *Bacillus*; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes, De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H. and Whitman, W.B. Eds (éd.), New York : Springer, p. 21-127.
- Longo, F., Pavone, E., Califano, L. 2003. About a case of parotid gland abscess by *Bacillus Licheniformis* [2]. *Br. J. Plast. Surg.* 56, 424-425.
- Lund, B.M. 1990. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. *Lancet* 336, 982-986.
- Madslien, E.H., Olsen, J.S., Granum, P.E., Blatny, J.M. 2012. Genotyping of *B. licheniformis* based on a novel multi-locus sequence typing (MLST) scheme. *BMC Microbiol.* 12, 230-237.
- Majewski, J., Cohan, F.M. 1998. The effect of mismatch repair and heteroduplex formation on sexual isolation in *Bacillus*. *Genetics* 148, 13.
- Mandal, M.D., Mandal, S., Pal, N.K. 2005. Plasmid-mediated dimethoate degradation by *Bacillus licheniformis* isolated from a fresh water fish *Labeo rohita*. *J. Biomed. Biotechnol.* 2005, 280-286.
- Marra, D., Scott, J.R. 1999. Regulation of excision of the conjugative transposon Tn916. *Mol. Microbiol.* 31, 609-621.
- Matros, L., Wheeler, T., Microbiology Team, IVS Sacramento. 2001. Microbiology Guide to Interpreting MIC (Minimum Inhibitory Concentration). Accès : <http://the-vet.net/DVMWiz/Vetlibrary/Lab-%20Microbiology%20Guide%20to%20Interpreting%20MIC.htm>
- Matsumoto, S., Suenaga, H., Naito, K., Sawazaki, M., Hiramatsu, T., Agata, N. 2000. Management of suspected nosocomial infection: An audit of 19 hospitalized patients with septicemia caused by *Bacillus* species. *Jpn. J. Infect. Dis.* 53, 196-202.
- Maucour, M.F., Brugniart, C., Ducasse, A., Brasme, L., Bajolet, O. 1999. *Bacillary endophthalmitis*. Four case reports. *J. Fr. Ophtalmol.* 22, 371-376.
- McEwen, B., Carman, S. 2005. Animal Health Laboratory Reports - Cattle: Bovine abortion update, 1998-2004. *Can. Vet. J.* 46, 46.

Medina, A., Probanza, A., Gutierrez Mañero, F.J., Azcón, R. 2003. Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effects on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). *Appl. Soil Ecol.* 22, 15-28.

Meijer, W.J.J. 1995. Replication and maintenance of plasmids in *Bacillus subtilis*. Pays-Bas : State University of Groningen.

Meijer, W.J.J., Wisman, G.B.A., Terpstra, P., Thorsted, P.B., Thomas, C.M., Holsappel, S., Venema, G., Bron, S. 1998. Rolling-circle plasmids from *Bacillus subtilis*: Complete nucleotide sequences and analyses of genes of pTA1015, pTA1040, pTA1050 and pTA1060, and comparisons with related plasmids from Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 337-368.

Mekete, T., Hallmann, J., Kiewnick, S., Sikora, R. 2009. Endophytic bacteria from Ethiopian coffee plants and their potential to antagonise *meloidogyne incognita*. *Nematology* 11, 117-127.

Mendelsohn, M., Vaituzis, Z. 1999. Non-target Organisms Registration Data Requirements Risk Assessment for AgraQuest, Inc.'s Product Containing the Microbial Active Ingredient *Bacillus subtilis* strain QST-731. USEPA 1-44.

Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J. 2010a. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquacult. Nutr.* 16, 496-503.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J. 2010b. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquacult. Nutr.* 16, 504-510.

Mikkola, R., Andersson, M.A., Teplova, V., Grigoriev, P., Kuehn, T., Loss, S., Tsitko, I., Apetroaie, C., Saris, N.L., Veijalainen, P., Salkinoja-Salonen, M.S. 2007. Amylosin from *Bacillus amyloliquefaciens*, a K⁺ and Na⁺ channel-forming toxic peptide containing a polyene structure. *Toxicon* 49, 1158-1171.

Mikkola, R., Kolari, M., Andersson, M.A., Helin, J., Salkinoja-Salonen, M.S. 2000. Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*. *Eur. J. Biochem.* 267, 4068-4074.

Mitchell, G., Barton, M.G. 1986. Bovine abortion associated with *Bacillus licheniformis*. *Aust. Vet. J.* 63, 160-161.

Mochiduki, Y., Amemiya, T., Yabe, M. 2007. Brain abscess induced by *Bacillus licheniformis* complications in acute myeloid leukemia (AML). *Kansenshogaku Zasshi* 81, 592-596.

Moons, P., Michiels, C.W., Aertsen, A. 2009. Bacterial interactions in biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 157-168.

- Mosupye, F.M., Lindsay, D., Damelin, L.H., Von Holy, A. 2002. Cytotoxicity assessment of *Bacillus* strains isolated from street-vended foods in Johannesburg, South Africa. *J. Food Saf.* 22, 95-105.
- Mullany, P., Wilks, M., Tabaqchali, S. 1995. Transfer of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS) resistance in *Clostridium difficile* is linked to a gene homologous with toxin A and is mediated by a conjugative transposon, Tn5398. *J. Antimicrob. Chemother.* 35, 305-315.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. 1995. *Bacillus*. In : Manual of Clinical Microbiology. ASM 8-349-356.
- Murray, R.D. 2006. Practical approach to infectious bovine abortion diagnosis. 24th World Buiatrics Congress, Nice, France. World Association of Buiatrics: Paris. p. 260-268.
- Nakamura, L.K. 1989. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 295-300.
- Nerurkar, A.S. 2010. Structural and molecular characteristics of lichenysin and its relationship with surface activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672, 304-315.
- Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A., Ali-Vehmas, T., Seppälä, A., Priha, O., Salkinoja-Salonen, M. 2007. Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Vet. Microbiol.* 124, 329-339.
- Nithya, V., Muthukumar, S.P., Halami, P.M. 2012. Safety assessment of *Bacillus licheniformis* Me1 isolated from milk for probiotic application. *Int. J. Toxicol.* 31, 228-237.
- Norris, J.R., Berkeley, R.C.W., Logan, N.A., O'Donnell, A.G. 1981. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In : The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Berlin : Springer-Verlag.
- Nybroe, O., Christoffersen, K., Riemann, B. 1992. Survival of *Bacillus licheniformis* in seawater model ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 252-259.
- Oguntoyinbo, F.A., Sanni, A.I. 2007. Determination of toxigenic potentials of *Bacillus* strains isolated from Okpehe, a Nigerian fermented condiment. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 65-70.
- Olszewski, W., Jamal, S., Manokaran, G., Pani, S., Kumaraswami, V., Kubicka, U. 1999. Bacteriological studies of blood, tissue fluid, lymph and lymph nodes in patients with acute dermatolymphangioadenitis (DLA) in course of filarial lymphedema. *Acta Tropica* 73, 217-224.
- Ozkocaman, V., Ozcelik, T., Ali, R., Ozkalemkas, F., Ozkan, A., Ozakin, C., Akalin, H., Ursavas, A., Coskun, F., Ener, B., Tunali, A. 2006. *Bacillus* spp. among hospitalized patients with haematological malignancies: clinical features, epidemics and outcomes. *J. Hosp. Infect.* 64, 169-176.

Page, W.F., Young, H.A., Crawford, H.M. 2007. Long-term health effects of participation in project SHAD. 500, rue Fifth Nord-Ouest, Washington (DC) : The National Academies Press.

Pavić, S., Brett, M., Petrić, I., Laštre, D., Smoljanović, M., Atkinson, M., Kovačić, A., Cetinić, E., Ropac, D. 2005. An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Arch. Lebensmittelhyg.* 56, 20-22.

Pedersen, P.B., Bjørnvad, M.E., Rasmussen, M.D., Petersen, J.N. 2002. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36, 155-161.

Peloux, Y., Charrel Taranger, C., Gouin, F. 1976. New opportunist infection due to a *bacillus*. A case of bacteremia with *Bacillus licheniformis*. *PATH. BIOL.* 24, 97-98.

Pennington, J.E., Gibbons, N.D., Strobeck, J.E., Simpson, G.L., Myerowitz, R.L. 1976. *Bacillus* species infection in patients with hematologic neoplasia. *J. Am. Med. Assoc.* 235, 1473-1474.

Pérez-García, A., Romero, D., de Vicente, A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 187-193.

Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Wallach, J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 553-563.

Phelps, R.J., McKillip, J.L. 2002. Enterotoxin Production in Natural Isolates of *Bacillaceae* outside of the *Bacillus cereus* Group. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3147-3151.

Pragai, Z., Tran, S.L.P., Nagy, T., Fulop, L., Holczinger, A., Sik, T. 1994. Transposon Tn917PF1 mutagenesis in *Bacillus licheniformis*. *Microbiology* 140, 3091-3097.

Priest, F.G., Goodfellow, M., Shute, L.A., Berkeley, R.C.W. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 69-71.

Providenti, M.A., Begin, M., Hynes, S., Lamarche, C., Chitty, D., Hahn, J., Beaudette, L.A., Scroggins, R., Smith, M.L. 2009. Identification and application of AFLP-derived genetic markers for quantitative PCR-based tracking of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. released in soil. *Can. J. Microbiol.* 55, 1166-1175.

Quan, J., Darer, J.D., Sewell, D.L., Strausbaugh, L.J. 2000. Pacemaker wire infection caused by *Bacillus licheniformis*. *Clin. Microbiol. Newsl.* 22, 110-111.

Rahimi, S., Kahsksefidi, A. 2006. A comparison between the effects of a probiotic (Bioplus 2B) and an antibiotic (virginiamycin) on the performance of broiler chickens under heat stress conditions. *Iran. J. Vet. Res.* 7, 23-28.

Rajarajan, N., Ward, A.C., Burgess, J.G., Glassey, J. 2013. Use of physiological information and process optimisation enhances production of extracellular nuclease by a marine strain of *Bacillus licheniformis*. *Bioresour. Technol.* 130, 552-558.

- Rajchard, J. 2010. Biologically active substances of bird skin: a review. *Vet. Med.* 55, 413-421.
- Rauch, M.E., Graef, H.W., Rozenzhak, S.M., Jones, S.E., Bleckmann, C.A., Kruger, R.L., Naik, R.R., Stone, M.O. 2006. Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 29-36.
- Ray, P., Sanchez, C., O'Sullivan, D.J., McKay, L.L. 2000. Classification of a bacterial isolate, from pozol, exhibiting antimicrobial activity against several gram-positive and gram-negative bacteria, yeasts, and molds. *J. Food Prot.* 63, 1123-1132.
- Reinhardt, K., Naylor, R.A., SivaJothy, M.T. 2005. Potential sexual transmission of environmental microbes in a traumatically inseminating insect. *Ecol. Entomol.* 30, 607-611.
- Rendueles, O., Ghigo, J. 2012. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 972-989.
- Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., Lopez de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., et al. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5.
- Richard, V., Van Der Auwera, P., Snoeck, R., Daneau, D., Meunier, F. 1988. Nosocomial bacteremia caused by *Bacillus* species. Vol. 7, 783-785.
- Rivardo, F., Turner, R.J., Allegrone, G., Ceri, H., Martinotti, M.G. 2009. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 541-553.
- Roberts, A.P., Braun, V., Von Eichel-Streiber, C., Mullany, P. 2001. Demonstration that the group II intron from the clostridial conjugative transposon Tn5397 undergoes splicing *in vivo*. *J. Bacteriol.* 183, 1296-1299.
- Roberts, M., Cohan, F. 1993. The effect of DNA sequence divergence on sexual isolation in *Bacillus*. *Genetics* 134, 401.
- RoeTech. 2014. CASE STUDY: Treatment of Municipal Wastewater Treatment Plant for Hydrogen Sulfide Control with RoeTech 106 Bacteria Culture. RoeTech, 2014, 1.
- Rooney, A.P., Price, N.P.J., Ehrhardt, C., Sewzey, J.L., and Bannan, J.D. 2009. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2429-2436.
- Rooney, A.P., Sewzey, J.L., Wicklow, D.T., McAtee, M.J. 2005. Bacterial Species Diversity in Cigarettes Linked to an Investigation of Severe Pneumonitis in U.S. Military Personnel Deployed in Operation Iraqi Freedom. *Curr. Microbiol.* 51, 46-52.
- Rosenkvist, H., Hansen, Å. 1995. Contamination profiles and characterisation of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 353-363.

- 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.
- Rubinstein, I., Pedersen, G.W. 2002. *Bacillus* Species Are Present in Chewing Tobacco Sold in the United States and Evoke Plasma Exudation from the Oral Mucosa. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 9, 1057-1060.
- Rückert, C., Blom, J., Chen, X., Reva, O., Borriss, R. 2011. Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *J. Biotechnol.* 155, 78-85.
- Salkinoja-Salonen, M.S., Vuorio, R., Andersson, M.A., Kämpfer, P., Andersson, M.C., Honkanen-Buzalski, T., Scoging, A.C. 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4637-4645.
- Santini, F., Borghetti, V., Amalfitano, G., Mazzucco, A. 1995. *Bacillus licheniformis* prosthetic aortic valve endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3070-3073.
- Sayers, E.W., Barrett, T., Benson, D.A., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., et al. 2009. Database resources of the National Centre for Biotechnology Information. *Nuc. Acids Res.* 37, D5-15.
- Schoenbaum, S.C., Gardner, P., Shillito, J. 1975. Infections of cerebrospinal fluid shunts: epidemiology, clinical manifestations, and therapy. *J. Infect. Dis.* 131, 543-552.
- Schweigert, M.K., Mackenzie, D.P., Sarlo, K. 2000. Occupational asthma and allergy associated with the use of enzymes in the detergent industry - A review of the epidemiology, toxicology and methods of prevention. Vol. 30, 1511-1518.
- Scott, P. 2011. Cattle self-assessment. *Livestock.* Vol. 16, 27-28.
- Seligy, V.L., Beggs, R.W., Rancourt, J.M., Tayabali, A.F. 1997. Quantitative bio-reduction assays for calibrating spore content and viability of commercial *Bacillus thuringiensis* insecticides. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18, 370-378.
- Sella, S.R.B.R., Guizelini, B.P., Gouvea, P.M., Figueiredo, L.F.M., Ribeiro, C.A.O., Vandenberghe, L.P.S., Minozzo, J.C., Soccol, C.R. 2012. Relations between phenotypic changes of spores and biofilm production by *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 growing in solid-state fermentation. *Arch. Microbiol.* 194, 815-825.
- Shakir, A., Elbadawey, M.R., Shields, R.C., Jakubovics, N.S., Burgess, J.G. 2012. Removal of biofilms from tracheoesophageal speech valves using a novel marine microbial deoxyribonuclease. Vol. 147, 509-514.
- Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A.N., Pfeiffer, D.U., Dobson, H. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. Vol. 123, 837-845.
- Shields, R.C., Mokhtar, N., Ford, M., Hall, M.J., Burgess, J.G., ElBadawey, M.R., Jakubovics, N.S. 2013. Efficacy of a Marine Bacterial Nuclease against Biofilm Forming Microorganisms Isolated from Chronic Rhinosinusitis. *PLoS ONE* 8.

- Shimura, J., Hiraki, K., Garrity, G.M. 2013. BIOS: Bacteriology Insight Orienting System. In : Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2013 Annual Checklist. Roskov, Y., Kunze, T., Paglinawan, L., Orrell, T., Nicolson, D., Culham, A., Bailly, N., Kirk, P., Bourgoin, T., Baillargeon, G., *et al.* (éd.). Reading (Royaume-Uni) : Species, 2000.
- Smitha, S., Bhat, S.G. 2012. Thermostable Bacteriocin BL8 from *Bacillus licheniformis* isolated from marine sediment. *J. Appl. Microbiol.* 114, 688-694.
- 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.
- Spök, A., Klade, M. 2009. Environmental, Health and Legal Aspects of Cleaners Containing Living Microbes as Active Ingredients. IFZ, p. 1-17.
- Sprengel, R., Reiss, B., Schaller, H. 1985. Translationally coupled initiation of protein synthesis in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 13, 893-909.
- Stein, T. 2005. MicroReview: *Bacillus subtilis* antibiotic: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56, 845-857.
- Sugar, A.M., McCloskey, R.V. 1977. *Bacillus licheniformis* sepsis. *JAMA* 238, 1180-1181.
- Swiecicka, I., Fiedoruk, K., Bednarz, G. 2002. The occurrence and properties of *Bacillus thuringiensis* isolated from free-living animals. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 194-198.
- Tabbara, K.F., Tarabay, N. 1979. *Bacillus licheniformis* corneal ulcer. *Am. J. Ophthalmol.* 87, 717-719.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722-756.
- Tanaka, T., Kuroda, M., Sakaguchi, K. 1977. Isolation and characterization of four plasmids from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 129, 1487-1494.
- Tareq, F.S., Kim, J.H., Lee, M.A., Lee, H., Lee, Y., Lee, J.S., Shin, H.J. 2012. leodoglucomides A and B from a marine-derived bacterium *Bacillus licheniformis*. *Org. Lett.* 14, 1464-1467.
- Taylor, J.M., Sutherland, A.D., Aidoo, K.E., Logan, N.A. 2005. Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 313-317.
- Thatoi, H., Behera, B.C., Mishra, R.R., Dutta, S.K. 2013. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: A review. Vol. 63, 1-19.
- Thomson, A.P.J., Damjanovic, V., Hart, C.A., Cooke, R.W.I. 1990. *Bacillus licheniformis* infection in a preterm neonate. *PEDIATR. REV. COMMUN.* 4, 147-149.
- Thorne, P.S., Hillebrand, J., Magreni, C., Riley, E.J., Karol, M.H. 1986. Experimental sensitization to subtilisin. I. Production of immediate- and late-onset pulmonary reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 86, 112-123.

- Thurn, J.R., Goodman, J.L. 1988. Post-traumatic ophthalmitis due to *Bacillus licheniformis*. *Am. J. Med.* 85, 708-710.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J.D.H., Braun, P.G., Darmon, E., Dorenbos, R., *et al.* 2004. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 207-233.
- Toledo, A.V., Alippi, A.M., De Remes Lenicov, A.M.M. 2011. Growth inhibition of *Beauveria bassiana* by bacteria isolated from the cuticular surface of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* and the planthopper, *Delphacodes kuscheli*, two important vectors of maize pathogens. *J. Insect. Sci.* 11.
- Tong, J.L., Engle, H.M., Cullyford, J.S., Shimp, D.J., Love, C.E. 1962. Investigation of an Outbreak of Food Poisoning Traced to Turkey Meat. *Am. J. Publ. Health* 52, 976-990.
- Tripathi, A., Grammer, L.C. 2001. Extrinsic allergic alveolitis from a proteolytic enzyme. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 86, 425-427.
- Tuazon, C.U., Murray, H.W., Levy, C., Solny, M.N., Curtin, J.A., Sheagren, J.N. 1979. Serious Infections From *Bacillus* sp. *JAMA* 241, 1137-1140.
- Turnbull, G.A., Ousley, M., Walker, A., Shaw, E., Morgan, J.A.W. 2001. Degradation of Substituted Phenylurea Herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and Characterization of a Plasmid-Associated Hydrolase Gene, *puhA*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2270-2275.
- Turnbull, P.C., Jorgensen, K., Kramer, J.M., Gilbert, R.J., Parry, J.M. 1979. Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of exotoxins. *J. Clin. Pathol.* 32, 289-293.
- Turnbull, P.C.B., Kramer, J.M. 1985. Intestinal Carriage of *Bacillus cereus*: Faecal Isolation Studies in Three Population Groups. *J. Hyg.* 95, 629-638.
- USEPA. 1993. Ecological Effects Review of a 154A-16 Tier I Avian oral study of GUS Concentrate Biological Fungicide with *Bacillus subtilis* as Active Ingredient. MRID No. 425783-01 1-7.
- USEPA. 2001. Biopesticide Registration Action Document: *Bacillus licheniformis* strain SB3086. BRAD PC Code 006492, 1-49.
- USEPA. 2006. Biopesticide Registration Action Document *Bacillus subtilis* Strain QST 713, PC Code 006479. BRAD PC Code 006479, 1-41.
- USEPA. 2010. *Bacillus subtilis* Final Registration Review Decision Case 6012. Docket Number EPA-HQ-OPP-2007-1026. USEPA, 1-83.
- USEPA. 2011. *Bacillus amyloliquefaciens* strain D747. Biopesticides Registration Action Document Docket Number EPA-HQ-OPP-2011-0853-0011. USEPA.
- USEPA. 2012. *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* strain FZB24 (006480) Biopesticide Registration Action Document. USEPA.

- USEPA. 2013a. Bio-response Operational Testing and Evaluation (BOTE) Project. EPA/600/R-13/168 i-799.
- USEPA. 2013b. Registration Review: Microbial Cases Schedule: 2012-2015. USEPA 1-7.
- van Elsas, J.D., Dijkstra, A.F., Govaert, J.M., van Veen, J.A. 1986. Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots. *FEMS Microbiol. Lett.* 38, 151-160.
- Van Veen, J.A., Van Overbeek, L.S., Van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 121-135.
- Veening, J.W., Smits, W.K., Kuipers, O.P. 2008. Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 193-210.
- Vinoj, G., Vaseeharan, B., DavidJayaseelan, B., Rajakumaran, P., Ravi, C. 2013. Inhibitory effects of *Bacillus licheniformis* (DAB1) and *Pseudomonas aeruginosa* (DAP1) against *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Fenneropenaeus indicus*. *Aquacult. Int.* 21, 1121-1135.
- Wainwright, M., Al Talih, A. 2003. Is this the historical 'cancer germ'? *Med. Hypotheses* 60, 290-292.
- Wang, H., Mullany, P. 2000. The large resolvase TndX is required and sufficient for integration and excision of derivatives of the novel conjugative transposon Tn5397. *J. Bacteriol.* 182, 6577-6583.
- Wang, L.T., Lee, F.L., Tai, C.J., Kasai, H. 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1846-1850.
- Wang, L.T., Lee, F.L., Tai, C.J., Kuo, H.P. 2008. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 671-675.
- Weissman, D.N., Lewis, D.M. 2002. Allergic and latex-specific sensitization: Route, frequency, and amount of exposure that are required to initiate IgE production. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, S57-S63.
- Weng, J., Wang, Y., Li, J., Shen, Q., Zhang, R. 2012. Enhanced root colonization and biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by *abrB* gene disruption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1-8.
- Wu, G., Coulon, F., Yang, Y., Li, H., Sui, H. 2013. Combining Solvent Extraction and Bioremediation for Removing Weathered Petroleum from Contaminated Soil. Vol. 23, 455-463.
- Wulff, E.G., Mguni, C.M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lübeck, M., Hockenhull, J. 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.* 51, 574-584.

- 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.
- Yadav, G., Kashyap, S.K. 2003. Efficacy of Different Antibiotics Against Bacterial Isolated from Cervicovaginal Mucus of Repeat Breeding Holstein Friesian Crossbred Cows. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.* 24, 107-108.
- Yakimov, M.M., Fredrickson, H.L., Timmis, K.N. 1996. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* BASSO. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 23, 13-18.
- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N. 1997. Com-A-dependent transcriptional activation of lichenysin A synthetase promoter in *Bacillus subtilis* cells. *Biotechnol. Prog.* 13, 757-761.
- Yi, H., Chun, J., Cha, C.-J. 2014. Genomic insights into the taxonomic status of the three subspecies of *Bacillus subtilis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 95-99
- Young, R.F., Yoshimori, R.N., Murray, D.L., Chou, P.J. 1982. Postoperative neurosurgical infections due to *Bacillus* species. *Surg. Neurol.* 18, 271-273.
- Zawadzki, P., Riley, M.A., Cohan, F.M. 1996. Homology among nearly all plasmids infecting three *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* 178, 191-198.
- Zawadzki, P., Roberts, M.S., Cohan, F.M. 1995. The log-linear relationship between sexual isolation and sequence divergence in *Bacillus* transformation is robust. *Genetics* 140, 917.
- Zhang, X., Li, B., Wang, Y., Guo, Q., Lu, X., Li, S., Ma, P. 2013. Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atrophaeus* CAB-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9525-9534.
- Zhao, K., Liu, J., Li, Z., Chang, Z., Shi, P., Ping, W., Zhou, D. 2011. *Bacillus subtilis* subspecies *virginiana*, a new subspecies of antitermitic compound-producing endophytic bacteria isolated from *Juniperus virginiana*. *J. Econ. Entomol.* 104, 1502-1508.
- Zhu, Y., Englebert, S., Joris, B., Ghuysen, J., Kobayashi, T., Lampen, J.O. 1992. Structure, function, and fate of the BlaR signal transducer involved in induction of β -lactamase in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 174, 6171-6178.

Annexes

Annexe 1. Morphologie des colonies des membres du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrits à la *Liste intérieure*

Tableau A-1 : Morphologie des colonies de la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens*

Caractéristique	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^a	Gélose de pomme de terre ou bouillon (Spizizen) (ATCC medium 423) à 37 °C vérifié après 24 heures (pour les milieux solides, ajouter 1,5 % de gélose) ^a
Forme	Irrégulière	Irrégulière
Taille du diamètre (en mm)	5	5
Marge	Ondulée	Étalée, bords irréguliers
Élévation	Plate	Aucune donnée
Couleur/pigment	Blanc cassé	Blanc
Texture	Mate	Lisse, mate
Opacité	Opaque	Aucune donnée

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

Tableau A-2. Morphologie des colonies de la souche 18250-7 de *B. atrophaeus*

Caractéristique	Gélose TSB après 24 heures de croissance à température de la pièce ^a	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^a	Gélose nutritive à 30 °C pendant 24 heures ^a	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 30 °C après 24 heures dans des conditions aérobies ^b	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 30 °C après 24 heures dans des conditions aérobies ^b	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 30 °C après 24 heures dans des conditions aérobies ^b
Forme	Circulaire	Irrégulière	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Irrégulière
Taille du diamètre (en mm)	2	5-10	0,5	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée
Marge	Entière	Ondulée	Entière	Entière	Entière	Ondulée
Élévation	Plate	Plate	Aucune donnée	Légèrement convexe	Légèrement convexe	Plate
Couleur/pigmentation ^a	Blanc	Blanc cassé/beige	Blanc	Orange	Aucune donnée	Blanc
Texture	Lisse, humide	Lisse, humide	Aucune donnée	Brillante	Brillante	Aucune donnée
Opacité	Opaque	Opaque	Aucune donnée	Aucune donnée	Opaque	Aucune donnée

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

^b Description ATCC, plusieurs morphologies de colonies

Tableau A-3. Morphologie des colonies de la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis*

Caractéristique	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^{a, b}	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^{a, b}	Gélose nutritive à 30 °C pendant 24 heures ^a	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 30 °C pendant 24 heures dans des conditions aérobies ^c	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 30 °C pendant 24 heures dans des conditions aérobies ^c
Forme	Circulaire	Irrégulière	Irrégulière	Aucune donnée	Irrégulière
Taille du diamètre (en mm)	5-7	5-7	2	Aucune donnée	Aucune donnée
Marge	Ondulée	Ondulée, lobée	Ondulée, filiforme	Aucune donnée	Aucune donnée
Élévation	Plate	Ombonée	Soulevée	Soulevée	Convexe
Couleur/pigment	Beige/blanc cassé	Beige/blanc cassé	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée
Texture	Humide, lisse	Ridée, sèche	Sèche	Sèche, ridée	Mucoïde
Opacité	Semi-translucide	Opaque	Opaque	Aucune donnée	Aucune donnée

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

^b Les colonies s'accrochent à la gélose; plusieurs morphologies de colonies

^c Description ATCC, plusieurs morphologies de colonies

Tableau A-4. Morphologie des colonies de la souche ATCC 6051A de *B. subtilis*

Caractéristique	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^a	Gélose nutritive à 30 °C pendant 24 heures ^a	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 30 °C vérifié après 24 heures et jusqu'à une semaine dans des conditions aérobies ^b	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 30 °C vérifié après 24 heures et jusqu'à une semaine dans des conditions aérobies ^b
Forme	Circulaire à irrégulière	Irrégulière	Irrégulière et étalée avec l'âge	Irrégulière et étalée avec l'âge
Taille du diamètre (en mm)	6 à 25	2	Plus grande	Plus petite
Marge	Ondulée	Entière	Érodée	Entière
Élévation	Plate	Plate	Plate	Plate
Couleur/pigment	Blanc cassé	Blanc cassé	Beige/ crème	Beige/ crème
Texture	Humide	Sèche	Mate, plus dure	Mate, plus lisse
Opacité	Translucide	Semi-translucide	Opaque	Opaque

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

^b Description ATCC, plusieurs morphologies de colonies

Tableau A-5. Morphologie des colonies de la souche ATCC 55405 de *B. subtilis*

Caractéristique	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^{a,b}	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^{a,b}	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^{a,b}	Gélose nutritive à 30 °C pendant 24 heures ^a	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3 à 30 °C vérifié après 24 heures et jusqu'à une semaine dans des conditions aérobies ^c
Forme	Irrégulière à circulaire	Circulaire	Irrégulière à circulaire	2	Circulaire
Taille du diamètre (en mm)	4	4	4	Aucune donnée	Aucune donnée
Marge	Entière	Ondulée	Lobée	Entière	Entière
Élévation	Convexe	Plate	Soulevée	Convexe	Convexe
Couleur/pigment	Incolore à blanc cassé	Blanc cassé	Blanc	Incolore	Aucune donnée
Texture	Brillante, mucoïde	Mate, sèche	Plate, fragile, sèche	Mucoïde	Mucoïde, brillante
Opacité	Opaque	Translucide à opaque	Opaque	Aucune donnée	Opaque

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

^b Plusieurs morphologies de colonies

^c Description ATCC

Tableau A-6. Morphologie des colonies de la souche ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis*

Caractéristique	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^a	Gélose nutritive à 30 °C pendant 24 heures ^a	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 30 °C vérifié après 24 heures et jusqu'à une semaine dans des conditions aérobies ^b	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 30 °C vérifié après 24 heures et jusqu'à une semaine dans des conditions aérobies ^b
Forme	Irrégulière	Irrégulière	Circulaire	Irrégulière
Taille du diamètre (en mm)	20	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée
Marge	Ondulée	Ondulée	Entière	Aucune donnée
Élévation	Soulevée	Aucune donnée	Légèrement convexe	Plate
Couleur/pigment	Blanc cassé	Blanc cassé	Aucune donnée	Aucune donnée
Texture	Sèche	Aucune donnée	Brillante	Dure
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque

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

^b Description ATCC, plusieurs morphologies de colonies

Tableau A-7. Morphologie des colonies de la souche ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum*

Caractéristique	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^{a,b}	Gélose nutritive à 30 °C pendant 24 heures ^a	Gélose nutritive (ATCC medium n° 3) à 30 °C vérifiée à 24 heures ^{c,d}	Gélose nutritive (ATCC medium n° 3) à 30 °C vérifiée à 24 heures ^{c,d}
Forme	Circulaire	Irrégulière	Circulaire	Circulaire
Taille du diamètre (en mm)	5	1	Aucune donnée	Aucune donnée
Marge	Ondulée	Aucune donnée	Érodée	Aucune donnée
Élévation	Plate	Aucune donnée	Plate	Aucune donnée
Couleur/pigment	Blanc	Incolore	Crème	Blanc
Texture	Mate	Aucune donnée	Aucune donnée	Lisse
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque

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

^b Croissance des colonies dans la gélose

^c Description ATCC, plusieurs morphologies de colonies

^d Les colonies creusent dans la gélose; cet organisme se développe mieux sur des milieux solides que dans un bouillon

Tableau A-8. Morphologie des colonies de l'espèce *Bacillus* 16970-5

Caractéristique	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^a	Gélose nutritive à 30 °C pendant 24 heures ^a	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 30 °C vérifié après 24 heures et jusqu'à une semaine dans des conditions aérobies ^b
Forme	Irrégulière	Irrégulière	Circulaire
Taille du diamètre (en mm)	12 à 20	2	Aucune donnée
Marge	Ondulée	Aucune donnée	Certaines avec des marges lobées
Élévation	Plate	Plate	Aucune donnée
Couleur	Blanc cassé	Blanc cassé	Aucune donnée
Texture	Mate	Sèche	Brillante, lisse
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque

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

^b Description ATCC

Tableau A-9. Morphologie des colonies de l'espèce *Bacillus* 2 18118-1

Caractéristique	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^a	Gélose de pomme de terre ou bouillon (Spizizen) (ATCC medium 423) à 37 °C vérifié après 24 heures (pour les milieux solides, ajouter 1,5 % de gélose) ^a	Gélose de pomme de terre ou bouillon (Spizizen) (ATCC medium 423) à 37 °C vérifié après 24 heures (pour les milieux solides, ajouter 1,5 % de gélose) ^b	Gélose de pomme de terre ou bouillon (Spizizen) (ATCC medium 423) à 37 °C vérifié après 24 heures (pour les milieux solides, ajouter 1,5 % de gélose) ^b
Forme	Irrégulière	Circulaire	Circulaire	Aucune donnée
Taille du diamètre (en mm)	5-12	5	Aucune donnée	Aucune donnée
Marge	Ondulée	Bords légèrement irréguliers	Légèrement irrégulière	Étalement lisse, bords irréguliers
Élévation	Ombonée, soulevée	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée
Couleur/pigment	Blanchâtre	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée
Texture	Humide, brillante et mate	Aucune donnée	Lisse, brillante	Brillante, centre lisse
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque	Aucune donnée

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

^b Description ATCC, plusieurs morphologies de colonies

Tableau A-10. Morphologie des colonies de l'espèce *Bacillus* 4 18121-4

Caractéristique	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^a	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^a	Gélose nutritive à 30 °C pendant 24 heures ^a	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 37 °C pendant 24 heures dans des conditions aérobies ^b	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 37 °C pendant 24 heures dans des conditions aérobies ^b
Forme	Circulaire	Elliptique	Irrégulière	Irrégulière	Rhizoïde
Taille du diamètre (en mm)	5-7	5-7	2	Aucune donnée	Aucune donnée
Marge	Ondulée	Ondulée	Ondulée, filiforme	Ondulée	Filamenteuse
Élévation	Imparfaite, ombonée	Plate	Soulevée	Convexe	Soulevée
Couleur	Beige/blanc cassé	Beige/blanc cassé	Aucune donnée	Translucide	Aucune donnée
Texture	Humide	Mate	Sèche	Lisse, brillante	Dure
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque	Aucune donnée	Opaque

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

^b Description ATCC, plusieurs morphologies de colonies

Tableau A-11. Morphologie des colonies de l'espèce *Bacillus* 7 18129-3

Caractéristique	Gélose TSB après sept jours de croissance à température de la pièce ^a	Gélose nutritive à 30 °C pendant 24 heures ^a	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 30 °C vérifié après 24 heures et jusqu'à une semaine dans des conditions aérobies ^b	Gélose ou bouillon nutritif (ATCC medium n° 3) à 30 °C vérifié après 24 heures et jusqu'à une semaine dans des conditions aérobies ^b
Forme	Irrégulière	Irrégulière	Circulaire	Irrégulière
Taille du diamètre (en mm)	20	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée
Marge	Ondulée	Ondulée	Entière	Aucune donnée
Élévation	Soulevée	Aucune donnée	Légèrement convexe	Plate
Couleur	Blanc cassé	Blanc cassé	Aucune donnée	Aucune donnée
Texture	Sèche	Aucune donnée	Brillante	Dure
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque

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

^b Description ATCC, plusieurs morphologies de colonies

Annexe 2. Caractéristique des membres du groupe *B. licheniformis/subtilis* – Analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S

Données sur la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada. Des polymorphismes de la longueur des fragments de restriction au sein de la région V3 et entre les régions V4 et V5 ont été définis selon Jeyaram *et al.*, 2011. Les séquences génétiques de l'ARN ribosomique 16S ont été comparées à la version 11 du projet Ribosomal Database (<https://rdp.cme.msu.edu/>) et dix correspondances principales se distinguent. Le principal format de correspondance était le suivant : code d'identification, cote de similitude (si la source de référence est précisée), coefficient obtenu grâce à la méthode SAB, oligomères communs uniques et nom complet de la séquence.

Tableau A 12. Résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens*^a

Identification abrégée	Indice de similarité	Indice S_ab	Oligomères uniques communs	Nom complet de la séquence
S001153538	1,000	1,000	1364	<i>Bacillus</i> sp. XI; EU779996
S001550906	1,000	1,000	1371	<i>Bacillus subtilis</i> ; Y2; GQ148813
S001588402	1,000	1,000	1374	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; IMAU80205; GU125623
S001745899	1,000	1,000	1393	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; PBT; FJ169495
S002038639	1,000	1,000	1354	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; HK1; AB279736
S002222255	1,000	1,000	1447	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7; DSM7; FN597644
S002222257	1,000	1,000	1447	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7; DSM7; FN597644
S002222259	1,000	1,000	1447	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7; DSM7; FN597644
S002222261	1,000	1,000	1447	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7; DSM7; FN597644
S002222263	1,000	1,000	1447	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7; DSM7; FN597644

^a Le site *HinfI* est présent et les sites *RsaI* sont absents, ce qui signifie qu'il s'agit de l'espèce *B. amyloliquefaciens* et non de l'espèce *B. subtilis*, à laquelle elle est étroitement apparentée (Jeyaram *et al.*, 2011).

Tableau A 13. Résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche 18250-7 de *B. atrophaeus*^a

Identification abrégée	Indice de similarité	Indice S_ab	Oligomères uniques communs	Nom complet de la séquence
S000382399	Non calculé	1,000	1432	<i>Bacillus</i> sp.; SSA3; AB017587
S000644416	Non	1,000	1436	<i>Bacillus atrophaeus</i> ; SCH0408; AY881241

	calculé			
S000980555	Non calculé	1,000	1337	<i>Bacillus atrophaeus</i> ; K01-03; EU326483
S001872424	Non calculé	1,000	1411	<i>Bacillus subtilis</i> ; JAM A-6-10; AB542912
S002035172	Non calculé	1,000	1375	<i>Bacillus atrophaeus</i> ; NMTD54; GU568183
S002035195	Non calculé	1,000	1379	<i>Bacillus atrophaeus</i> ; GBSC56; GU568206
S002166857	Non calculé	1,000	1376	<i>Bacillus atrophaeus</i> ; RJGP16; GU969134
S002167105	Non calculé	1,000	1372	<i>Bacillus atrophaeus</i> ; LSSC3; GU994860
S002221550	Non calculé	1,000	1464	<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942; CP002207
S002221552	Non calculé	1,000	1464	<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942; CP002207

^a La séquence du gène de l'ARN ribosomique de la souche 18250-7 de *B. atrophaeus* correspond à celle des souches *B. atrophaeus* et *Bacillus* sp. De plus, le site *HinfI* est présent pour le groupe *B. subtilis/licheniformis* (Jeyaram *et al.*, 2011).

Tableau A 14. Résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis*^a

Identification abrégée	Indice de similarité	Indice S_ab	Oligomères uniques communs	Nom complet de la séquence
S000392549	Non calculé	1,000	1427	<i>Bacillus licheniformis</i> ; Mo1; AF372616
S000615411	Non calculé	1,000	1409	<i>Bacillus licheniformis</i> ; ACO1; DQ228696
S000647676	Non calculé	1,000	1421	<i>Bacillus licheniformis</i> ; K19; DQ351932
S000736754	Non calculé	1,000	1448	<i>Bacillus licheniformis</i> ; BCRC 15413; DQ993676
S000752038	Non calculé	1,000	1409	<i>Bacillus licheniformis</i> ; EF059752
S000824918	Non calculé	1,000	1422	<i>Bacillus licheniformis</i> ; BCRC 12826; EF423608
S000843501	Non calculé	1,000	1442	<i>Bacillus</i> sp. J24; EF471917
S000901702	Non calculé	1,000	1389	<i>Bacillus licheniformis</i> ; NBRC 12107; AB354236
S000941823	Non calculé	1,000	1389	<i>Bacillus licheniformis</i> ; NBRC 12202; AB363734
S001153503	Non calculé	1,000	1319	<i>Bacillus licheniformis</i> ; SVD1; EU770587

^a La séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche ATCC 12713 de *Bacillus licheniformis* correspond principalement à celle de *B. licheniformis*. Le profil RFLP (sites *RsaI* dans la région V3; site *HinfI* et *CfoI* entre les régions V4 et V5) est conforme à celui de *B. licheniformis* sp. (Jeyaram *et al.*, 2011).

Tableau A 15. Résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche ATCC 6051A de *B. subtilis*^a

Identification abrégée	Indice de similarité	Indice S_ab	Oligomères uniques communs	Nom complet de la séquence
S000003473	Non calculé	1,000	1423	<i>Bacillus subtilis</i> (T); DSM10; AJ276351
S000365537	Non calculé	1,000	1446	<i>Bacillus</i> sp. TUT1206; AB188212
S000383767	Non calculé	1,000	1412	<i>Bacillus</i> sp. CH4-4; AB055846
S000383768	Non calculé	1,000	1412	<i>Bacillus</i> sp. CH4-5; AB055848
S000383769	Non calculé	1,000	1412	<i>Bacillus</i> sp. CH15-2; AB055849
S000383770	Non calculé	1,000	1412	<i>Bacillus</i> sp. CH19-3; AB055850
S000383771	Non calculé	1,000	1412	<i>Bacillus</i> sp. CH20-1; AB055851
S000383772	Non calculé	1,000	1412	<i>Bacillus</i> sp. CH7-1; AB055852
S000383773	Non calculé	1,000	1412	<i>Bacillus</i> sp. CH10-1; AB055853
S000434646	Non calculé	1,000	1401	<i>Bacillus subtilis</i> ; KL-073; AY030330

^a La séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche ATCC 6051A de *B. subtilis* correspond à celle des espèces *Bacillus subtilis* et *Bacillus* sp. Le profil RFLP (sites RsaI dans la région V3; site HinfI entre les régions V4 et V5) est conforme à celui de *B. subtilis* sp. (Jeyaram *et al.*, 2011). Toutefois, le premier site RsaI putatif doit être vérifié, car il contient une base ambiguë (le pic dominant semble correspondre à une A).

Tableau A 16. Résultats de l'analyse de la séquence génétique de l'ARN ribosomique 16S de la souche ATCC 55405 de *B. subtilis*^a

Identification abrégée	Indice de similarité	Indice S_ab	Oligomères uniques communs	Nom complet de la séquence
S000870716	Non calculé	1,000	1391	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; NBRC 14141; AB325582
S001745899	Non calculé	1,000	1393	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; IMAU80205; GU125623
S002038639	Non calculé	1,000	1354	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; HK1; AB279736
S002222255	Non calculé	1,000	1447	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7; DSM7; FN597644
S002222257	Non calculé	1,000	1447	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7; DSM7; FN597644
S002222259	Non calculé	1,000	1447	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7; DSM7; FN597644
S002228859	Non calculé	1,000	1224	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; BAC3048; HM355639
S003280603	Non calculé	1,000	1329	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; BSS5; JQ407053
S003285855	Non calculé	1,000	1305	<i>Bacillus</i> sp. SE18; JQ714100

S003313087	Non calculé	1,000	1342	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; KU-8; JQ696827
------------	-------------	-------	------	--

^a La séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche ATCC 55405 de *B. subtilis* correspond principalement à celle de *B. amyloliquefaciens* et le profil RFLP de l'enzyme *HinfI* concorde avec celui de *B. amyloliquefaciens* (Jeyaram *et al.*, 2011).

Tableau A 17. Résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *Subtilis*^a

Identification abrégée	Indice de similarité	Indice S_ab	Oligomères uniques communs	Nom complet de la séquence
S000398967	1,000	1,000	1383	<i>Bacillus subtilis</i> ; BHP6-1; AY162131
S001020073	1,000	1,000	1422	<i>Bacillus subtilis</i> ; B1-33; EU435361
S001096330	1,000	1,000	1435	<i>Bacillus</i> sp. zh161; EU526087
S002038710	1,000	1,000	1388	<i>Bacillus</i> sp. PT401; AB374305
S002199724	1,000	1,000	1420	<i>Bacillus</i> sp. non cultivé; CapF3B.16; HM152583
S002199742	1,000	1,000	1386	<i>Bacillus</i> sp. non cultivé; Filt.13; HM152601
S002199744	1,000	1,000	1386	<i>Bacillus</i> sp. non cultivé; Filt.15; HM152603
S002199761	1,000	1,000	1386	<i>Bacillus</i> sp. non cultivé; Filt.32; HM152620
S002199769	1,000	1,000	1385	<i>Bacillus</i> sp. non cultivé; Filt.40; HM152628
S002199775	1,000	1,000	1386	<i>Bacillus</i> sp. non cultivé; Filt.46; HM152634

^a La séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de l'espèce *Bacillus* 6051 correspond à celle de *Bacillus subtilis* et de *Bacillus* sp. Le profil RFLP (deux sites *RsaI* dans la région V3; site *HinfI* entre les régions V4 et V5) est conforme à celui de *B. subtilis* sp. (Jeyaram *et al.*, 2011).

Tableau A 18. Résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche ATCC 55406 de *B. subtilis*^a

Identification abrégée	Indice de similarité	Indice S_ab	Oligomères uniques communs	Nom complet de la séquence
S001020073	Non calculé	0,946	1422	<i>Bacillus subtilis</i> ; B1-33; EU435361
S001096330	Non calculé	0,946	1435	<i>Bacillus</i> sp. zh161; EU526087
S002038710	Non calculé	0,946	1388	<i>Bacillus</i> sp. PT401; AB374305
S002199724	Non calculé	0,946	1420	<i>Bacillus</i> sp. non cultivé; CapF3B.16; HM152583
S002199860	Non calculé	0,946	1421	<i>Bacillus</i> sp. non cultivé; Filt.132; HM152719
S002199880	Non calculé	0,946	1421	<i>Bacillus</i> sp. non cultivé; Filt.152; HM152739
S002410934	Non calculé	0,946	1413	<i>Bacillus subtilis</i> ; MB5 NIOT; HQ858061
S003257857	Non calculé	0,946	1446	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> ; souche type : DSM 22148; HE582781
S003261902	Non calculé	0,946	1388	<i>Bacillus subtilis</i> ; NBRC 3108; AB680011
S003264071	Non calculé	0,946	1388	<i>Bacillus subtilis</i> ; NBRC 104440; AB682180

^a Les correspondances de l'ARN 16S pour la souche ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* incluaient *Bacillus* sp. et *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum*. Le profil de restriction de la souche ATCC 55406 de *B. subtilis*

sous-espèce *inaquosorum* est différent de celui de *B. licheniformis*, corroborant l'argument selon lequel l'espèce a été mal nommée.

Tableau A 19. Résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de l'espèce *Bacillus* 16970-5

Les résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S confirment l'identité de cette souche telle qu'établie lors de son inscription à la *Liste intérieure*. Cependant, en raison des demandes de confidentialité, l'identité de l'espèce *Bacillus* 16970-5 et les correspondances présentant les plus fortes similitudes établies à l'aide de la Ribosomal Database ne peuvent être divulguées.

Tableau A 20. Résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de l'espèce *Bacillus* 2 18118-1

Les résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S confirment l'identité de cette souche telle qu'établie lors de son inscription à la *Liste intérieure*. Cependant, en raison des demandes de confidentialité, l'identité de l'espèce *Bacillus* 2 18118-1 et les correspondances présentant les plus fortes similitudes établies à l'aide de la Ribosomal Database ne peuvent être divulguées.

Tableau A 21. Résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de l'espèce *Bacillus* 4 18121-4

Les résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S confirment l'identité de cette souche telle qu'établie lors de son inscription à la *Liste intérieure*. Cependant, en raison des demandes de confidentialité, l'identité de l'espèce *Bacillus* 4 18121-4 et les correspondances présentant les plus fortes similitudes établies à l'aide de la Ribosomal Database ne peuvent être divulguées.

Tableau A 22. Résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S de l'espèce *Bacillus* 7 18129-3

Les résultats de l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S confirment l'identité de cette souche telle qu'établie lors de son inscription à la *Liste intérieure*. Cependant, en raison des demandes de confidentialité, l'identité de l'espèce *Bacillus* 7 18129-3 et les correspondances présentant les plus fortes similitudes établies à l'aide de la Ribosomal Database ne peuvent être divulguées.

Annexe 3. Caractéristiques des membres du groupe *B. licheniformis/subtilis* – Analyse des esters méthyliques d'acides gras (EMAG)

Les données générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada indiquent la meilleure correspondance entre l'échantillon et les bases de données MIDI environnementales et cliniques, ainsi que l'indice de similarité du profil d'acide gras (moyenne de l'ensemble des correspondances) et le nombre de correspondances (nombre de correspondances/ nombre total de tests, parenthèses). Pour obtenir des méthodes et des renseignements supplémentaires, consultez le site www.midilabs.com/fatty-acid-analysis. En règle générale, les échantillons qui se regroupent au sein d'une distance euclidienne de 2,5, 6 et 10 sont ceux qui proviennent de la même souche, de la même sous-espèce et de la même espèce, respectivement.

Tableau A-12. Analyse des EMAG de la souche 13563-0 de *B. amyloliquefaciens*

Environnementale		Clinique	
<i>B. amyloliquefaciens</i> (groupe <i>B. subtilis</i>)	0,598 (10/15)	<i>B. subtilis</i>	0,735 (12/17)
		CG sous-groupe A	
<i>B. subtilis</i>	0,441 (3/15)	<i>B. subtilis</i>	0,729 (5/17)
		CG sous-groupe B	
<i>B. atrophaeus</i> CG sous-groupe A	0,801 (1/15)	Sans objet	
<i>Staphylococcus lutrae</i> (coag+)	0,490 (1/15)	Sans objet	

Tableau A-13. Analyse des EMAG de la souche *B. atrophaeus* 18250-7

Environnementale		Clinique	
<i>B. atrophaeus</i>	0,877 (6/10)	<i>B. atrophaeus</i>	0,814 (5/6)
		CG sous-groupe B	
L'analyse ne convient pas suffisamment (4/10) pour la recherche en bibliothèque		<i>B. atrophaeus</i>	0,853 (1/6)
		CG sous-groupe A	

Tableau A-14. Analyse des EMAG de la souche ATCC 12713 de *B. licheniformis*

Environnementale	Clinique
<i>B. licheniformis</i> 0808 (13/14) (groupe <i>B. subtilis</i>)	<i>B. licheniformis</i> 0,674 (6/17) (groupe <i>B. subtilis</i>)
<i>B. megaterium</i> 0,719 (1/14)	
CG sous-groupe A	<i>Staphylococcus schleiferi</i> 0,418 (6/17)
Sans objet	<i>B. pumilis</i> – CG sous-groupe A 0,669 (2/17)
Sans objet	<i>B. pumilis</i> – CG sous-groupe B 0,468 (2/17)
Sans objet	<i>B. subtilis</i> 0,233 (1/17)

Tableau A-15. Analyse des EMAG de la souche ATCC 6051A de *B. subtilis*

Environnementale	Clinique
<i>B. subtilis</i> 0,876 (16/17)	<i>B. subtilis</i> 0,872 (13/13)
<i>B. amyloliquefaciens</i> 0,798 (1/17)	Sans objet

Tableau A-16. Analyse des EMAG de la souche ATCC 55405 de *B. subtilis*

Environnementale	Clinique
<i>B. subtilis</i> 0,753 (10/15)	<i>B. subtilis</i> 0,662 (12/12)
<i>B. amyloliquefaciens</i> 0,736 (5/15) (groupe <i>B. subtilis</i>)	Sans objet

Tableau A-17. Analyse des EMAG de la souche ATCC 6051 de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis*

Environnementale	Clinique
<i>B. subtilis</i> 0,911 (14/14)	<i>B. subtilis</i> 0,760 (9/12)
Sans objet	L'analyse ne convient pas 2/12 pour la recherche en bibliothèque
Sans objet	<i>Micrococcus lylae</i> 0,292 (1/12) CG sous-groupe B

Tableau A-18. Analyse des EMAG de la souche ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum*

Environnementale	Clinique
<i>B. subtilis</i> 0,803 (10/25)	<i>B. subtilis</i> 0,727 (12/12)
<i>B. amyloliquefaciens</i> 0,793 (9/25) (groupe <i>B. subtilis</i>)	Sans objet
<i>B. megaterium</i> 0,602 (4/25) CG sous-groupe A	Sans objet
Pas de correspondance 2/25	Sans objet

Tableau A-19. Analyse des EMAG de l'espèce *Bacillus* 16970-5

Environnementale	Clinique
Les résultats produits à partir de la base de données environnementale associée à l'analyse des EMAG confirment l'identité de cette souche qui avait été établie lorsqu'elle a été inscrite à la <i>Liste intérieure</i> . Cependant, en raison des demandes de confidentialité, l'identité de l'espèce <i>Bacillus</i> 16970-5 ne peut être divulguée.	Les résultats produits à partir de la base de données environnementale associée à l'analyse des EMAG confirment l'identité de cette souche qui avait été établie lorsqu'elle a été inscrite à la <i>Liste intérieure</i> . Cependant, en raison des demandes de confidentialité, l'identité de l'espèce <i>Bacillus</i> 16970-5 ne peut être divulguée.

Tableau A-20. Analyse des EMAG de l'espèce *Bacillus* 2 18118-1

Environnementale	Clinique
Les résultats produits à partir de la base de données environnementale associée à l'analyse des EMAG confirment l'identité de cette souche qui avait été établie lorsqu'elle a été inscrite à la <i>Liste intérieure</i> . Cependant, en raison des demandes de confidentialité, l'identité de l'espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1 ne peut être divulguée.	Les résultats produits à partir de la base de données environnementale associée à l'analyse des EMAG confirment l'identité de cette souche qui avait été établie lorsqu'elle a été inscrite à la <i>Liste intérieure</i> . Cependant, en raison des demandes de confidentialité, l'identité de l'espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1 ne peut être divulguée.

Tableau A-21. Analyse des EMAG de l'espèce *Bacillus* 4 18121-4

Environnementale	Clinique
Les résultats produits à partir de la base de données environnementale associée à l'analyse des EMAG confirment l'identité de cette souche qui avait été établie lorsqu'elle a été inscrite à la <i>Liste intérieure</i> . Cependant, en raison des demandes de confidentialité, l'identité de l'espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4 ne peut être divulguée.	Les résultats produits à partir de la base de données clinique associée à l'analyse des EMAG confirment l'identité de cette souche qui avait été établie lorsqu'elle a été inscrite à la <i>Liste intérieure</i> . Cependant, en raison des demandes de confidentialité, l'identité de l'espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4 ne peut être divulguée.

Tableau A-22. Analyse des EMAG de l'espèce *Bacillus* 7 18129-3

Environnementale	Clinique
Les résultats produits à partir de la base de données environnementale associée à l'analyse des EMAG confirment l'identité de cette souche qui avait été établie lorsqu'elle a été inscrite à la <i>Liste intérieure</i> . Cependant, en raison des demandes de confidentialité, l'identité de l'espèce <i>Bacillus</i> 7 18129-3 ne peut être divulguée.	Les résultats produits à partir de la base de données environnementale associée à l'analyse des EMAG confirment l'identité de cette souche qui avait été établie lorsqu'elle a été inscrite à la <i>Liste intérieure</i> . Cependant, en raison des demandes de confidentialité, l'identité de l'espèce <i>Bacillus</i> 7 18129-3 ne peut être divulguée.

Annexe 4. Contenu cellulaire de certains acides gras

Tableau A-23 : Contenu cellulaire de certains acides gras chez les membres du groupe *B. licheniformis/subtilis*^a

Souche inscrite à la LIS	C _{16:0} (%)	Iso-C _{17:1ω} 10c (%)
<i>B. amyloliquefaciens</i> 13563-0	3,17	2,4
<i>B. atrophaeus</i> 18250-7	3,07	1,5
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	2,89	1,56
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>subtilis</i> ATCC 6051 ^T	4,34	1,95
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051A	2,55	2,65
<i>B. subtilis</i> ATCC 55405	3,05	2,34
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406	3,3	1,16
Espèce <i>Bacillus</i> 16970-5	3,52	1,81
Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	6,09	1,77
Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	3,41	1,11
Espèce <i>Bacillus</i> 7 18129-3	4,34	1,95

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

Annexe 5. Liste de certains éléments mobiles et des caractéristiques connexes identifiées dans certains isolats du complexe *B. subtilis*

Tableau A-24. Liste de certains éléments mobiles et des caractéristiques connexes identifiées chez certaines souches de *B. licheniformis*

Nom de l'élément	Caractéristiques connexes	Références
Plasmide (nom inconnu)	Résistance au diméthoate et gènes supplémentaires pour une résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds Na, Er, Ch, Cz, Cf, Ba ²⁺ et Zn ²⁺)	(Mandal <i>et al.</i> , 2005)
Plasmide (pBL1, pBL10, pBL2)	Non précise	(Zawadzki <i>et al.</i> , 1996)
Élément d'insertion (<i>IS3Bli1</i>)	Code deux séquences codantes de protéines de recouvrement prévues, désignées par <i>orfA</i> et <i>orfB</i> dans les cadres de lecture traductionnel de 0 et 1. Huit de ces éléments se trouvent dans les régions intergéniques et l'un d'entre eux interrompt le gène <i>comP</i>	(Rey <i>et al.</i> , 2004)
Séquences de la prophase (NZP1 et NZP3)	Codes pour la grande sous-unité de l'enzyme terminase, une signature protéique fortement conservée parmi les prophages	(Rey <i>et al.</i> , 2004)

Tableau A-25. Liste de certains éléments mobiles et des caractéristiques connexes identifiées chez certaines souches de *B. subtilis*

Nom de l'élément	Caractéristiques connexes	Références
Transposon (Tn917)	Utilisé dans la mutagenèse de transposition (clonage et construction rapides des fusions transcriptionnelles des gènes et caractérisation des gènes surexprimés)	(Pragai <i>et al.</i> , 1994)
Plasmide (pLS20)	Favorise le transfert du plasmide pBC16 de résistance à la tétracycline de l'espèce <i>B. subtilis</i> (natto) aux espèces <i>Bacillus B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> et <i>B. thuringiensis</i> .	(Koehler et Thorne, 1987)
Transposon (Tn5)	Gène de la phosphotransférase entraînant la résistance à la néomycine	(Sprengel <i>et al.</i> , 1985)
Réplication en cercle roulant concernant la famille de plasmides pTA (pTA1015, pTA1040, pTA1050 et pTA1060)	Contient des gènes codant des peptidases de signal type I et des gènes codant des protéines appartenant à la famille aspartate phosphatases régulant la réponse, qui devraient jouer un rôle dans la régulation des procédés en phase post-exponentielle.	(Meijer <i>et al.</i> , 1998)
Plasmide (pBS4, pBS12, pBS7, pBS8, pBS6)	Non précise	(Zawadzki <i>et al.</i> , 1996)
Transposon (catégorie d'éléments intégratifs et conjugatifs : ICEBs1)	- Intégration au gène <i>trnS-leu2</i> régulée par la réponse SOS et la signalisation des peptides intracellulaire du gène <i>Rapl-Phrl</i>. - Lorsque des dommages à l'ADN se	(Auchtung <i>et al.</i> , 2005)

	produisent ou que des concentrations élevées de partenaires d'accouplement potentiels ne possèdent pas l'élément ICEBs1, celui-ci est excisé du chromosome et transféré aux receveurs.	
Tn916 (transposon)	• Joue un rôle dans le transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques chez de nombreuses espèces de bactéries Gram positif • Le transfert de cet élément peut accroître la présence de la tétracycline	(Celli et Trieu-Cuot, 1998; Marra et Scott, 1999)
Tn5397 (transposon)	• Provient de l'espèce <i>Clostridium difficile</i>; transfert de l'élément à l'espèce <i>B. subtilis</i> et à partir de cette dernière • Code un système de conjugaison semblable à celui de Tn916 • Contient un intron du groupe II	(Roberts <i>et al.</i> , 2001; Wang et Mullany, 2000)
Tn5398 (transposon)	• Provient de l'espèce <i>C. difficile</i> • Facilite le transfert du gène de résistance aux macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines (MLS) (<i>ermBZ</i>)	(Mullany <i>et al.</i> , 1995)
IS4Bsu1 (élément mobile)	Se déplace spontanément dans le gène <i>swrA</i> chez l'espèce <i>B. subtilis natto</i> ; cause un défaut dans la synthèse de l'acide poly-gamma-glutamique (gamma-PGA)	(Kimura <i>et al.</i> , 2011)

Annexe 6. Gènes de virulence

Tableau A-26. Liste de certains gènes de virulence identifiés dans certains isolats du complexe *B. subtilis*

Espèce	Gène(s) de virulence	Caractéristiques connexes	Références
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>HblC, HblD, HblA, NheB, NheA</i>	Production d'entérotoxine et bêta-hémolyse discontinue	(Phelps et McKillip, 2002)
<i>B. licheniformis</i>	<i>cesA</i>	Céréulide synthase	(Nieminen <i>et al.</i> , 2007)
<i>B. licheniformis</i>	<i>lchAA, lchAB, lchAC</i>	Lichénysine synthase	(Nieminen <i>et al.</i> , 2007)
<i>B. licheniformis</i>	<i>bceT, hblC, hblA, hblD</i>	Entérotoxine Hbl, entérotoxine hémolytique <i>Bacillus</i>	(Oguntoyinbo et Sanni, 2007; Rowan <i>et al.</i> , 2001)
<i>B. licheniformis</i>	<i>lchAA, lchAB</i> et <i>lchAC</i> (gènes de la lichénysine synthase)	• Surfactant lichénysine • Toxines constituées de lipopeptides cycliques thermostables; immobilise le sperme de porc • Structuellement semblable à la céréulide, mais l'activité toxique semble différente; peut former des canaux ioniques dans la membrane cellulaire de l'hôte et possède un effet surfactant	(Logan, 2012; Mikkola <i>et al.</i> , 2000; Nieminen <i>et al.</i> , 2007; Peypoux <i>et al.</i> , 1999)
<i>B. licheniformis</i>	<i>bacA, bacB, bacC</i> (gènes de la bacitracine synthétase)	• Polipeptides cycliques; interfèrent avec la synthèse de la paroi cellulaire et du peptidoglycane des bactéries Gram positif et Gram négatif; pourraient être liés directement ou indirectement à la résistance à l'érythromycine	(Ishihara <i>et al.</i> , 2002)
<i>B. licheniformis</i> et <i>B. subtilis</i>	<i>bceT, hblC, hblA, hblD</i>	Production d'entérotoxines diarrhéogènes	(Rowan <i>et al.</i> , 2001)

Annexe 7. Essais de virulence et de pathogénicité des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* : Activité hémolytique

Données générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada. Les souches ont été cultivées sur gélose à 5 % de sang de mouton et incubées à 37 °C pendant 24 heures. L'hémolyse a été évaluée d'après les zones éclaircies autour des colonies, ce qui indique la lyse des globules rouges.

Tableau A-27. Activité hémolytique des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure*

Souche inscrite à la LIS	Activité hémolytique
<i>B. amyloliquefaciens</i> 13563-0	+ ^{a,b}
<i>B. atrophaeus</i> 18250-7	- ^c
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	+ ^d
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051A	F ^e
<i>B. subtilis</i> ATCC 55405	F
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>subtilis</i> ATCC 6051	F
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406	+
Espèce <i>Bacillus</i> 16970-5	F
Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	F
Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	–
Espèce <i>Bacillus</i> 7 18129-3	F

^a +, activité hémolytique

^b Hémolyse observée dans 5 à 10 % des colonies

^c -, aucune activité hémolytique

^d Hémolyse observée dans 70 à 80 % des colonies

^e F, faible activité hémolytique – le dégagement des zones ne s'étend pas au-delà de la marge de la colonie

Annexe 8. Essais de virulence et de pathogénicité des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* : Production de catalase

Données générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada. Les bactéries ont été cultivées sur la gélose TSB à 28 °C pendant 48 heures. Une goutte de peroxyde d'hydrogène a été déposée sur les colonies pour vérifier s'il était converti en eau et en hydrogène. La réaction positive de la catalase révélait la capacité de la bactérie de se protéger contre l'oxygène réactif produit par les cellules immunitaires.

Tableau A-28. Production de catalase des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure*

Souche inscrite à la LIS	Production de catalase
<i>B. amyloliquefaciens</i> 13563-0	+
<i>B. atrophaeus</i> 18250-7	+
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	+
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051A	+
<i>B. subtilis</i> ATCC 55405	+
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>subtilis</i> ATCC 6051	+
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406	+
Espèce <i>Bacillus</i> 16970-5	+
Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	+
Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	+
Espèce <i>Bacillus</i> 7 18129-3	+

Annexe 9. Composés antimicrobiens, autres métabolites et toxines produits par certains isolats du complexe *B. subtilis*

Tableau A-29. Composés antimicrobiens produits par certaines souches de *B. amyloliquefaciens*

Nom de la substance	Activité	Références
Peptides de type bactériocine	Large spectre antibactérien avec une activité contre les bactéries Gram positif	(Abriouel <i>et al.</i> , 2011; Smitha et Bhat, 2012)
BLIS ^a 5940, BLIS RC-2, BLIS 5006	Activité antibactérienne et antifongique	(Abriouel <i>et al.</i> , 2011)
Surfactine, iturine, bacillomycine, azalomycine F, acivicine, arthrobactine, acide rhodotorulique, valinomycine, sténothricine, entérochéline, nocardamine	Activité antibactérienne et antifongique, inhibition de la croissance	(Wulff <i>et al.</i> , 2002)
Subtilisine A	• Bactériocine avec activité bactéricide contre les bactéries Gram négatif • Activité spermicide contre les spermatozoïdes de porcs, de bovins, de chevaux, de rats et d'humains	(Abriouel <i>et al.</i> , 2011)

^a BLIS : substances inhibitrices de type bactériocine

Tableau A-30. Composés antimicrobiens produits par certaines souches de *B. atrophaeus*

Nom de la substance	Activité	Références
Subtilisine A	• Bactériocine avec activité bactéricide contre les bactéries Gram négatif • Activité spermicide contre les spermatozoïdes de porcs, de bovins, de chevaux, de rats et d'humains	(Abriouel <i>et al.</i> , 2011)

Tableau A-31. Composés antimicrobiens produits par certaines souches de *B. licheniformis*

Nom de la substance	Activité	Références
Amoebicine (m4-A)	Activité bactéricide et bactériolytique contre <i>Bacillus megaterium</i> GR10	(Lebbadi <i>et al.</i> , 1994)
Amoebicines (A12-A et A12-B)	• Activité de lyse contre l'amibe <i>Naegria fowleri</i> • Activité antibiotique contre les levures (<i>Saccharomyces heterogenicus</i> et <i>Cryptococcus neoformans</i>) et plusieurs espèces fongiques	(Galvez <i>et al.</i> , 1993)
Antibiotiques (bacitracine, licheniformine, proticine)	Antibiotiques sécrétés et pouvant inhiber les organismes compétiteurs incluant des bactéries Gram positif et Gram négatif, des levures et des moisissures	(Katz et Demain, 1977)
Bacillocine, BLIS P40, BLIS ZJU12, BLIS MKU3, peptide A-12 C	Activité antibactérienne et antifongique	(Abriouel <i>et al.</i> , 2011)
Bactériocine BL8	• Thermostable, large plage de pH • Activité antibactérienne contre les bactéries Gram positif	(Smitha et Bhat, 2012)
leodoglucomides A et B	• Activité cytotoxique contre les lignées cellulaires du cancer des poumons et de l'estomac • Activité antimicrobienne modérée	(Tareq <i>et al.</i> , 2012)
Lichénicidine (α , β)	Activité antibactérienne associée à la surface de la cellule	(Abriouel <i>et al.</i> , 2011; Begley <i>et al.</i> , 2009; Dischinger <i>et al.</i> , 2009)
Lichénine	Bactériocine produite dans des conditions anaérobies	(Abriouel <i>et al.</i> , 2011)
Lichénysine	Lipopeptide qui agit comme un biosurfactant anionique et comme un antimicrobien	(Li <i>et al.</i> , 2010; Nerurkar, 2010; Nieminen <i>et al.</i> , 2007)
Peptide de type bactériocine	Large spectre d'activités antagonistes contre les agents pathogènes fongiques et les bactéries Gram positif, mais pas la plupart des bactéries Gram négatif	(He <i>et al.</i> , 2006)
Surfactine, iturine, acivicine, arthrobactine, acide rhodotorulique, valinomycine	Activité antibactérienne et antifongique, inhibition de la croissance	(Wulff <i>et al.</i> , 2002)

Tableau A-32. Composés antimicrobiens produits par certaines souches de *B. subtilis*

Nom de la substance	Activité	Référence
Anti-bactériens (éricine S et A, sublancine 168, subtiline B, subtilisine A et A1, mersacidine, bétacine, MJP1, Bac 14B, LFB112)	Activité bactérienne contre des pathogènes bactériens	(Abriouel <i>et al.</i> , 2011)
Antibiotiques (mycobacilline, subtiline, bacilysine, bacillomycine, fongistatine, bulbiformine, bacilline, subsporine, bacillocine, mycosubtiline, fongocine, iturine, néocidine, eumycine)	Antibiotiques pouvant inhiber des organismes compétiteurs incluant des bactéries Gram positif et Gram négatif, des levures et des moisissures	(Katz et Demain, 1977)
Antibiotiques (subtiline, éricine, mersacidine, sublancine 168, subtilosine, surfactine, iturine, bacillomycine, mycosubtiline, fengycine, plipastatine, corneybactine, bacilysine, bacilysocine, amicoumacine, mycobacilline, TL-119, rhizocticine, difficidine, 3,3'-neotrehalos-adiamine 168)	Activité antimicrobienne, biofilm et essaimage, phéromones dans la détection du quorum et « facteur de destruction » (<i>killing factor</i>).	(Stein, 2005)
Subtiline	• Peptide antimicrobien • Influe sur la formation de pores dans la membrane cytoplasmique • Produites en plus grandes quantités lorsque la nourriture manque pour éliminer les espèces compétitrices et accroître les éléments nutritifs assimilables	(Abriouel <i>et al.</i> , 2011)
Surfactine	• Lipopeptide qui agit comme un biosurfactant et un puissant antimicrobien	(Li <i>et al.</i> , 2010)
Thermostable, substance antimicrobienne résistante à la protéase	Inhibe la croissance de nombreuses bactéries	(Sorokulova <i>et al.</i> , 2008)

Tableau A-33. Métabolites toxiques produits par certaines souches de *B. amyloliquefaciens*

Nom de la substance	Activité	Références
Amylosine	Inhibe la mobilité du sperme de porc; cytotoxique pour les cellules pulmonaires félines	(Mikkola <i>et al.</i> , 2007)

Tableau A-34. Métabolites toxiques produits par certaines souches de *B. licheniformis*

Nom de la substance	Activité	Références
Composante cytotoxique non émétique thermostable	Activité cytotoxique	(De Jonghe <i>et al.</i> , 2010)
Substance cytotoxique instable à la chaleur	Activité cytotoxique	(De Jonghe <i>et al.</i> , 2010)
Toxine protéinique de type <i>B. cereus</i>	- Réduction de l'activité métabolique cellulaire - Activité cytotoxique	(Beattie et Williams, 1999)
Toxine émétique	- Provoque des vomissements en cas d'ingestion - Absorption ionophorique de K⁺ entraînant la dissipation du potentiel transmembranaire, stimulant ainsi l'enflure et la respiration dans la mitochondrie, ce qui conduit à leur inactivation	(Biesta-Peters <i>et al.</i> , 2010; From <i>et al.</i> , 2005)
Entérotoxine hémolysine BL (Hbl)	Provoque la diarrhée	(Rowan <i>et al.</i> , 2001)
Toxine de type diarrhéique de <i>B. cereus</i> instable à la chaleur	Cytotoxique pour les cellules McCoy, ce qui entraîne une fuite dans les membranes, rompt les surfaces cellulaires et diminue l'activité métabolique	(Lindsay <i>et al.</i> , 2000)
Lichénysine	- Inhibe la mobilité des spermatozoïdes - Synthétisée dans des conditions aérobies et anaérobies pendant la croissance - Variations propres aux espèces (A, B, C, D, G et le surfactant BL86)	(Li <i>et al.</i> , 2010; Nerurkar, 2010; Nieminen <i>et al.</i> , 2007)
Lichénysine A	- Entraîne une perte de mobilité, des dommages à la membrane plasmique et à l'acrosome, une perte de NADH et ATP cellulaires dans les spermatozoïdes de porcs - Toxique pour les cellules mammaliennes naturelles (bénignes) - Peut être produite par voie aérobie et anaérobie - Plus puissante que la surfactine et la	(Mikkola <i>et al.</i> , 2000; Yakimov <i>et al.</i> , 1996)

Nom de la substance	Activité	Références
	lychensine B	
Agent toxique pour le sperme non protéique thermostable	• Inhibe la mobilité du sperme et gonfle l'acrosome • Endommage l'intégrité des membranes cellulaires • Appauvrit la cellule en ATP cellulaire • Activité bêta-hémolytique	(Salkinoja-Salonen <i>et al.</i> , 1999)
NucB	• Dégrade l'ADN extracellulaire qui est essentiel aux biofilms formés par une espèce unique ou par des espèces mixtes • Désoxyribonucléase non toxique • Enzyme de sporulation	(Rajarajan <i>et al.</i> , 2013; Shakir <i>et al.</i> , 2012)
Surfactine	Inhibe les champignons phytopathogènes	(Nerurkar, 2010)

Tableau A-35. Métabolites toxiques produits par certaines souches de *B. subtilis*

Nom de la substance	Activité	Références
Composante cytotoxique non émétique thermostable et substance cytotoxique instable à la chaleur	Activité cytotoxique	(De Jonghe <i>et al.</i> , 2010)
Entérotoxine hémolysine BL (Hbl)	Provoque la diarrhée	(Rowan <i>et al.</i> , 2001)
Substances protéolytiques et lipolytiques	Lyse des protéines et des lipides	(De Jonghe <i>et al.</i> , 2010)
Toxine émétique putative	Provoque des nausées et des vomissements	(From <i>et al.</i> , 2005)

Annexe 10. Essais de virulence et de pathogénicité des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* : Cytotoxicité

Données générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada. Le test MTT a été utilisé pour déterminer le potentiel cytotoxique des souches pour HT29 (cellules épithéliales du côlon) et J774A.1 (cellules macrophages). Le MTT est un sel de bromure soluble jaune, qui est réduit à du cristal de formazan insoluble violet par les enzymes déshydrogénases des cellules vivantes (ce qui indique une activité mitochondriale). À l'état de cristal, après la réduction, il est piégé dans la cellule. Le DMSO, ou un autre solvant tel que de l'isopropanol ou de l'huile minérale, peut être utilisé pour solubiliser le formazan, qui peut ensuite sortir de la cellule, transformant ainsi la couleur du solvant en violet qui est détectable avec un spectrophotomètre. Ce test convient aux cellules animales adhérentes. Des cellules bactériennes actives sur le plan métabolique peuvent également réduire le MTT. Puisque la plupart des cellules animales ne sont pas des bactéries adhérentes, leur contribution au formazan peut être rincée avec du PBS avant la solubilisation.

HT29 et J774A.1 ont été incubées à 37 °C en présence de 5 % de dioxyde de carbone. Des cellules mammaliennes ont reçu une dose de 10⁶ UFC de cellules végétatives pendant 2, 4 et 24 heures. Les cellules traitées ont été lavées deux fois avec du PBS avant l'ajout de MTT.

La perte constatée dans l'activité de bioréduction des lignées cellulaires envers le MTT a été mesurée en vue de déterminer le potentiel cytotoxique des souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure*. La cytotoxicité est liée à une augmentation des pertes dans l'activité de bioréduction des lignées cellulaires.

Tableau A-36. Potentiel cytotoxique des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* envers les cellules HT29 cultivées en présence de gentamicine après 2, 4 et 24 heures

Souche inscrite à la LIS ^a	2 heures	4 heures	24 heures
<i>B. amyloliquefaciens</i> 13563-0	F ^b	F	F
<i>B. atrophaeus</i> 18250-7	F ^c	F	F
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	F	F	F
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406	F	-	-
Espèce <i>Bacillus</i> 16970-5	F	-	F
Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	-	-	-
Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	F	F	F

^a Aucune donnée disponible pour les souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051¹ de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et l'espèce *Bacillus* 7 18129-3

^b f, faible toxicité cytotoxique (5 – 50 % de perte dans la bioréduction)

^c Liée aux composantes structurelles

Tableau A-37. Potentiel cytotoxique des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* envers les cellules HT29 cultivées sans gentamicine après 2, 4 et 24 heures

Souche inscrite à la LIS	2 heures	4 heures	24 heures
<i>B. amyloliquefaciens</i> 13563-0	F ^a	F	F
<i>B. atrophaeus</i> 18250-7	F ^b	F	F
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	F	F	+ ^{c,d}
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051A	AD ^e	F	F
<i>B. subtilis</i> ATCC 55405	AD	- ^f	-
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>subtilis</i> ATCC 6051 ^f	AD	F	F
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406	F	F	+
Espèce <i>Bacillus</i> 16970-5	F	F	+
Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	F	F	+ ^c
Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	F	F	F
Espèce <i>Bacillus</i> 7 18129-3	AD	F	F

^a F, faible toxicité cytotoxique (5 – 50 % de perte dans la bioréduction)

^b Liée aux composantes structurales

^c +, activité cytotoxique (> 50 % de perte dans la bioréduction)

^d Liée à la croissance

^e AD, aucune donnée

^f -, aucune activité cytotoxique (< 5 % de perte dans la bioréduction)

Tableau A-38. Potentiel cytotoxique des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* envers les cellules J774A.1 cultivées en présence de gentamicine après 2, 4 et 24 heures

Souche inscrite à la LIS ^a	2 heures	4 heures	24 heures
<i>B. amyloliquefaciens</i> 13563-0	- ^b	-	-
<i>B. atrophaeus</i> 18250-7	F ^{c,d}	F	F
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	–	–	F
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406	F	F	F
Espèce <i>Bacillus</i> 16970-5	F	F	F
Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	-	-	-
Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	-	F	F

^a Aucune donnée disponible pour les souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051^f de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et l'espèce *Bacillus* 7 18129-3

^b -, aucune activité cytotoxique (< 5 % de perte dans la bioréduction)

^c F, faible toxicité cytotoxique (5 – 50 % de perte dans la bioréduction)

^d Liée aux composantes structurales

Tableau A-39. Potentiel cytotoxique des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* envers les cellules J774A.1 cultivées sans gentamicine après 2, 4 et 24 heures

Souche inscrite à la LIS	2 heures	4 heures	24 heures
<i>B. amyloliquefaciens</i> 13563-0	- ^a	-	-
<i>B. atrophaeus</i> 18250-7	F ^{b,c}	F	F
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	F	-	F
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051A	AD ^d	F	F
<i>B. subtilis</i> ATCC 55405	AD	-	F
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>subtilis</i> ATCC 6051 ^f	AD	-	F
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406	-	-	+ ^e
Espèce <i>Bacillus</i> 16970-5	-	-	F
Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	-	-	+ ^f
Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	-	-	F
Espèce <i>Bacillus</i> 7 18129-3	AD	-	F

^a -, aucune activité cytotoxique (< 5 % de perte dans la bioréduction)

^b F, faible toxicité cytotoxique (5 – 50 % de perte dans la bioréduction)

^c Activité cytotoxique liée aux composantes structurelles

^d AD, aucune donnée

^e +, activité cytotoxique (> 50 % de perte dans la bioréduction)

^f Activité cytotoxique liée à la croissance

Annexe 11. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation des souches du complexe *B. subtilis* menés sur les vertébrés, les invertébrés et les plantes terrestres et aquatiques

Tableau A-40. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation de la souche FZB24 de *B. amyloliquefaciens*^a

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
Toxicité aiguë par voie orale et infectivité	Rats CD	$1,3 \times 10^8$ UFC/animal	Faible toxicité, non pathogène $DL_{50} > 1,3 \times 10^8$ UFC/animal
Toxicité aiguë par voie pulmonaire et infectivité	Rats CD	0,1 mL d'au moins $1,4 \times 10^8$ UFC viables par animal	Faible toxicité, non pathogène $DL_{50} > 1,4 \times 10^8$ UFC/animal
Toxicité aiguë par voie pulmonaire et infectivité	Rats	$1,3 \times 10^8$ UFC	Non toxique/ Non pathogène
Infectivité aiguë par voie intraveineuse	Rats CD	0,5 mL d'au moins $1,0 \times 10^7$ UFC/animal	Non pathogène $DL_{50} > 1,0 \times 10^7$ UFC/animal
Infectivité aiguë par voie intraveineuse	Rats	$1,7 \times 10^8$ UFC	Non toxique/ Non pathogène
Toxicité dermale aiguë	Lapins	2 000 mg/kg p.c. ^b ($1,5$ à 2×10^{12} UCF/animal)	Faible toxicité, mais très irritante $DL_{50} > 2\ 000$ mg/kg
Irritant cutané primaire	Lapins	0,5 g de substance d'essai granulaire ($7,0 \times 10^{10}$ UCF/g) et 0,5 mL de 1,5 % en poids par volume d'une suspension	Aucune irritation observée
Irritant oculaire primaire	Lapin	$3,6 \times 10^{10}$ UCF	Irritation oculaire
Irritation cutanée aiguë	Lapin blanc néo-zélandais	2 000 mg/kg p.c. ($1,5$ à 2×10^{12})	Faible toxicité et extrêmement irritante

		UCF/animal)	DL ₅₀ > 2 000 mg/kg/p.c.
Toxicité aviaire par voie orale	Colin de Virginie (<i>Colinus virginianus</i>)	10 mL/kg p.c. ou 1,0 × 10 ⁹ UFC/g p.c.	DSEO ^c : 1,0 × 10 ⁹ UFC/animal
Toxicité pour les arthropodes terrestres	Abeilles adultes (<i>Apis mellifera</i>)	10 ⁵ UFC/mL	Aucun signe de toxicité ou de pathogénicité CL ₅₀ > 1,0 × 10 ⁶ UFC/mL
Toxicité pour les arthropodes terrestres	Larve (<i>Apis mellifera</i>)	6,0 × 10 ³ UFC/larve	CL ₅₀ > 6,0 × 10 ³ UFC/larve
Invertébrés autres que les arthropodes terrestres	Ver (<i>Eisenia fetida</i>)	6,0 × 10 ¹¹ UFC/kg sol	CSEO ^d : 6,0 × 10 ¹¹ UFC/kg sol
Toxicité/pathogénicité pour le poisson d'eau douce	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	de 1,85 × 10 ⁹ UFC/kg à 1,85 × 10 ¹⁰ UFC/L (ingrédient actif)	CL ₅₀ > 1,85 × 10 ¹⁰ UFC/L CSEO : 1,85 × 10 ¹⁰ UFC/L
Toxicité/pathogénicité pour l'invertébré d'eau douce	<i>Daphnia magna</i>	Jusqu'à 1,85 × 10 ¹⁰ UFC/L	CL ₅₀ > 1,85 × 10 ¹⁰ UFC/L CSEO : 1,85 × 10 ¹⁰ UFC/L

^a Études effectuées avec la matière active de qualité technique et non la préparation commerciale contenant le micro-organisme (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2012; USEPA, 2012)

^b p.c., poids corporel

^c DSEO, dose sans effet observé : dose la plus élevée de la substance d'essai dans le substrat d'essai à laquelle aucun effet statistiquement significatif sur l'organisme d'essai n'a été observé par rapport au groupe témoin

^d CSEO, concentration sans effet observé : concentration la plus élevée de la substance d'essai dans le substrat d'essai à laquelle aucun effet statistiquement significatif sur l'organisme d'essai n'a été observé par rapport au groupe témoin

Tableau A-41. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation de la souche D747 de *B. amyloliquefaciens*^a

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
Toxicité aiguë par voie orale	Rats Sprague-Dawley (5 semaines, mâles et femelles)	10 ⁸ UFC/animal	Non toxique, infectant ou pathogène DL ₅₀ > 5 000 mg/kg
Toxicité pulmonaire aiguë	Rats Sprague-Dawley (5 semaines, mâles et femelles)	10 ⁷ UFC/animal	Non toxique ou pathogène CL ₅₀ > 2,18 mg/L
Injection aiguë	Rats Sprague-Dawley (5 semaines, mâles et	10 ⁷ UFC/animal	Non toxique, infectant ou

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
	femelles)		pathogène DL ₅₀ > 5 050 mg/kg
Irritation oculaire aiguë	Lapins blancs néo-zélandais	0,1 mL de la préparation commerciale	Irritation oculaire
Irritant cutané primaire	Lapins blancs néo-zélandais	500 mg de la préparation commerciale	Aucune preuve d'irritation
Toxicité aviaire par voie orale	Colin de Virginie [caille] (<i>Colinus virginianus</i>)	8,9 × 10 ⁹ spores/oiseau	Non toxique DL ₅₀ > 4,5 × 10 ¹¹ spores/kg p.c. ou > 8,0 × 10 ¹⁰ spores/oiseau
Toxicité/pathogénicité pour le poisson d'eau douce	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	1,7 × 10 ⁸ UFC/L	CL ₅₀ : 8,1 × 10 ¹⁰ UFC/L CSEO : 1,44 × 10 ¹⁰ UFC/L
Toxicité/pathogénicité pour l'invertébré d'eau douce	<i>Daphnia magna</i>	1,7 × 10 ⁸ UFC/L	CE ₅₀ : 3,7 × 10 ¹⁰ UFC/L CSEO : 2,84 × 10 ⁸ UFC/L

^a Études effectuées avec la matière active de qualité technique et non la préparation commerciale contenant le micro-organisme (USEPA, 2011)

Tableau A-42. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation de la souche SB3086 de *B. licheniformis*^a

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
Toxicité/pathogénicité aiguë par voie orale	Rats	1,0 × 10 ⁸ UFC/animal ^b	Non toxique, infectant ou pathogène DL ₅₀ > 5 000 mg/kg
Toxicité/pathogénicité pulmonaire aiguë	Rats	1,1 × 10 ⁸ UFC/animal ^b	Non toxique, infectant ou pathogène
Toxicité/pathogénicité aiguë par intraveineuse	Rats	1,0 × 10 ⁷ UFC/animal ^b	Non toxique, infectant ou pathogène

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
Toxicité dermale aiguë	Lapins blancs néo-zélandais	AD ^{c,d}	DL ₅₀ > 5 050 mg/kg
Irritant oculaire primaire	Lapins blancs néo-zélandais	0,1 mL/animal (concentration non fournie) ^d	Non irritant
Hypersensibilité au contact retardée	Cobaye	AD ^d	N'est pas un sensibilisant cutané
Toxicité/pathogénicité aviaire par voie orale	Jeunes Canards colverts (<i>Anas platyrhynchos</i>)	4,5 × 10 ¹⁰ UFC/kg de p.c.	Aucun signe de maladie ou comportement anormal observé
Toxicité/pathogénicité pour le poisson d'eau douce	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CL ₅₀ (de formule 710-132) > 1,1 × 10 ⁶ UFC/mL ^b	Aucun effet observé résultant de l'agent microbien actif
Toxicité/pathogénicité pour les invertébrés aquatiques d'eau douce (cycle de renouvellement de 21 jours)	<i>Daphnia magna</i>	1 × 10 ⁴ UFC/mL ^b	CL ₅₀ : 1,8 × 10 ⁶ UFC/mL CSENO ^d : 1,2 × 10 ⁶ UFC/mL ^{b,e} 2 daphnies sont mortes à la fin de l'essai à 1 × 10 ⁷ UFC/mL (1 000 fois la concentration environnementale escomptée)
Toxicité/pathogénicité pour les invertébrés	Larve d'abeille domestique (<i>Apis mellifera</i> L.)	1,6 × 10 ⁶ UFC/mL (de formule 710-132) ^f	Aucun effet statistiquement significatif observé sur la survie des larves, ni aucun comportement défavorable ou anomalie de développement

^a (USEPA, 2001)

^b MAQT, matière active de qualité technique

^c AD, aucune donnée

^d CSENO, concentration sans effet nocif observé

^e Les ingrédients de la préparation sont des substances toxiques aquatiques connues à des concentrations élevées

^f PC, préparation commerciale

Tableau A-43. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation de plusieurs souches de *B. licheniformis* et *B. subtilis*

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
Infection expérimentale (inoculation par voie intraveineuse) ^a	Système immunitaire affaibli des souris BALB/c	4×10^7 UFC	Nombreuses lésions plus importantes observées dans de nombreux organes et plus d'infections graves découlant des lésions produites dans plus d'organes par rapport à ce que l'on observe chez les souris normales et en bonne santé utilisées dans l'étude
Infection expérimentale (inoculation par voie intraveineuse) ^a	Souris normales	4×10^7 UFC	Lésions observées dans le foie et les reins
Infection expérimentale (inoculation par voie intraveineuse) ^b	Système immunitaire affaibli des souris BALB/c	Doses de $< 10^6$ à 10^{10} UFC par voie intraveineuse	Seules les lésions cérébrales et pulmonaires pourraient être attribuées à la souche <i>B. licheniformis</i> . Les souris étaient capables d'éliminer de grandes quantités de bactéries dans un délai d'une semaine.
Infection expérimentale (inoculation par voie intraveineuse) ^c	Vaches gravides de descendance croisée entre les vaches laitières danoises rouges et les vaches américaines « Brown Swiss » (6 à 8 mois de gestation, n = 8) et leurs veaux	Doses de $< 10^9$ à 10^{12} UFC par voie intraveineuse (une seule fois ou sur 4 jours consécutifs)	Démonstration du potentiel de l'agent abortif de la souche <i>B. licheniformis</i> et du tropisme placentaire des bovins. Lésions dans les membranes fœtales, la partie fœtale des placentomes, nécrose dans le compartiment fœtal du placenta et inflammation chez certains veaux. Deux avortements ont été observés.
Activité cytotoxique ^d	Inhibition de la motilité du sperme de sanglier	1-10 µg/mL	CE ₅₀ : 20-30 µg/mL
Étude sur l'irritation oculaire aiguë ^e	Lapins albinos mâles	0,1 g de $1,1 \times 10^{11}$ UFC/kg p.c.	Aucune irritation ou aucun symptôme négatif observé dans la cornée ou l'iris
Étude sur l'irritation	Lapins albinos	0,5 g de	Aucun signe clinique d'érythème

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
cutanée aiguë ^e	mâles	$1,1 \times 10^{13}$ UFC/kg p.c.	ou d'œdème
Toxicité aiguë par voie orale (14 jours) ^e	Rats Wistar mâles albinos adultes	$1,1 \times 10^{11}$ UFC/kg p.c.	Aucun changement lié au traitement.
Toxicité subchronique par voie orale (13 semaines) ^e	Rats Wistar mâles et femelles	$1,1 \times 10^{11}$ UFC/kg p.c. et $1,1 \times 10^{11}$ UFC/kg p.c.	DSENO ^f > $1,1 \times 10^{11}$ UFC/kg p.c.
Test du micronoyau (2 jours à 24 heures d'intervalle) ^e	Les souris albinos Swiss adultes mâles et femelles (souche CFT)	$1,1 \times 10^{10}$ UFC/kg p.c. et $1,1 \times 10^{11}$ UFC/kg p.c.	Aucun signe de toxicité pour la moelle osseuse et aucune génotoxicité observée
Étude sur la pathogénicité et la toxicité orale ^g	Colin de Virginie [caille] (<i>Colinus virginianus</i>)	3 333 kg/mg tous les jours pendant cinq jours	DL ₅₀ > 2 000 mg/kg

^a *B. licheniformis* ATCC 14580 (Agerholm *et al.*, 1995)

^b 13 souches de *B. licheniformis* (Agerholm *et al.*, 1997)

^c Souche DVL 9315323 de *B. licheniformis* (Agerholm *et al.*, 1999)

^d Souches NR 5160 et NR 6768 de *B. licheniformis* (substance non protéinique toxique thermostable) [Nieminen *et al.*, 2007]

^e Souche Me I de *B. licheniformis*. La concentration utilisée dans l'étude correspond à 77×10^{11} UFC pour un être humain pesant en moyenne 70 kg; par conséquent, on peut considérer que la concentration utilisée est de 2 566 à 77 000 fois plus sécuritaire pour la consommation humaine (plage de doses humaines : de 1×10^8 à 3×10^9 UFC) [Nithya *et al.*, 2012]

^f DSENO, dose sans effet nocif observé

^g Souche GB03 de *B. subtilis* (USEPA, 1993)

Tableau A-44. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation d'un mélange contenant deux souches de *B. licheniformis* et *B. subtilis*^a

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
Toxicité aiguë	Souris BALB/c	de 5×10^7 à 2×10^{11} UFC/souris (administration orale)	Aucun changement dans les tissus, les organes ou le poids
Toxicité aiguë	Souris BALB/c	de 5×10^7 à 5×10^9 UFC/souris (administration par	Aucun changement dans les tissus, les organes ou le poids

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
		voie IP ^b ou IV ^c)	
Toxicité chronique	Souris	1 × 10 ⁶ UFC par jour	Aucun effet sur l'état de santé
Toxicité chronique	Lapins	1 × 10 ⁹ UFC par jour	Aucun effet sur l'état de santé
Toxicité chronique	Porcelets	1 × 10 ⁹ UFC par jour	Aucun effet sur l'état de santé

^a Souche VKPM B2336 de *B. licheniformis* et souche VKPM B2335 de *B. subtilis* (Sorokulova *et al.*, 2008)

^b IP, voie intrapéritonéale

^c IV, voie intraveineuse

Tableau A-45. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation de la souche QST 713 de *B. subtilis*^a

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
Toxicité aiguë par voie orale et infectivité	Rats CD	1,13 × 10 ⁸ UFC/animal	Non toxique et non infectant DL ₅₀ > 1,13 × 10 ⁸ UFC/animal
Toxicité aiguë par voie pulmonaire et infectivité	Rats CD	1,2 × 10 ⁸ UFC/animal	Non toxique et non infectant DL ₅₀ > 1,2 × 10 ⁸ UFC/animal
Infectivité par voie intraveineuse	Rats CD	9,4 × 10 ⁸ UFC/animal	Non infectante
Toxicité dermale aiguë	Rats CD	de 2 g/kg p.c. (2,3 × 10 ¹¹ à 2,73 × 10 ¹¹ UFC/animal	Faible toxicité DL ₅₀ > 2g/kg p.c.
Irritation oculaire	Lapins	0,1 mL (4,8 × 10 ⁹ UFC/animal)	Irritation minimale
Irritation cutanée	Lapins	500 mg (2,4 × 10 ¹⁰ UFC/animal)	Légèrement irritant
Toxicité aviaire par voie orale	Colin de Virginie [caille] (<i>Colinus virginianus</i>)	1 × 10 ⁸ UFC/g p.c. par jour (5 000 mg/kg p.c. par jour)	DL ₅₀ > 5 000 mg/kg/p.c.
Poissons d'eau douce	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus</i>	Dose maximale : 1,4 × 10 ⁷ UFC/mL	CL ₅₀ : 1,4 × 10 ⁷ UFC/mL

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
	<i>mykiss</i>)		
Invertébrés aquatiques d'eau douce (48 heures)	<i>Daphnia magna</i>	5×10^5 UFC/mL, 1×10^6 UFC/mL, 2×10^6 UFC/mL et 4×10^6 UFC/mL	Mortalité de 15, 15, 45 et 85 % respectivement, et léthargie des daphnies toujours en vie dans une solution de traitement de 100 mg/L
Invertébrés aquatiques d'eau douce (21 jours)	<i>Daphnia magna</i>	5×10^5 UFC/mL, 1×10^6 UFC/mL, 2×10^6 UFC/mL et 4×10^6 UFC/mL	$CL_{50} \sim 3 \times 10^5$ UFC/mL CSEO : $7,5 \times 10^3$ UFC/mL
Invertébrés aquatiques d'eau douce (21 jours)	<i>Daphnia magna</i>	$7,9 \times 10^5$ UFC/mL, $1,8 \times 10^6$ UFC/mL, $3,4 \times 10^6$ UFC/mL, $7,3 \times 10^6$ UFC/mL et $2,0 \times 10^7$ UFC/mL	$CL_{50} \sim 1,6 \times 10^6$ UFC/mL CSEO : $7,9 \times 10^5$ UFC/mL.
Invertébrés aquatiques d'eau douce	Bouquet Mississippi (<i>Palaemonetes pugio</i>)	$4,0 \times 10^6$ UFC/g	$CL_{50} > 4,0 \times 10^6$ UFC/mL
Plante aqueuse	Algue verte unicellulaire (<i>Scenedesmus subspicatus</i>)	Dose maximale : $5,1 \times 10^5$ UFC/mL	CSEO ≥ 100 mg/L CMEQ > 100 mg/L
Étude sur les insectes non ciblés (orale/alimentaire)	Abeille domestique – <i>Apis mellifera</i> L.	Dose maximale : 100 000 ppm	$DL_{50} > 100\ 000$ ppm
Toxicité/pathogénicité alimentaire	Abeille domestique – <i>Apis mellifera</i> L.	600, 6 000 et 60 000 ppm	$CL_{50} : 5\ 663$ ppm
Étude sur les insectes non ciblés (orale/alimentaire)	Chrysope verte (<i>Chrysoperla carnea</i>)	Dose maximale : 60 000 ppm	$CL_{50} > 60\ 000$ ppm
Étude sur les insectes non ciblés (orale/alimentaire)	Coccinelle – <i>Hippodamia convergens</i>	Dose maximale : $1,2 \times 10^9$ UFC/mL (60 000 ppm)	$CL_{50} > 60\ 000$ ppm CSEO : 60 000 ppm ($1,2 \times 10^9$ UFC/g)

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
Essai de toxicité et de pathogénicité (30 jours)	Hymenoptera parasite – <i>Nasonia vitripennis</i>	600, 6 000 et 60 000 ppm	CL ₅₀ : 28 000 ppm (15 jours)
Étude sur les insectes non ciblés (orale/alimentaire)	Hymenoptera parasite – <i>Nasonia vitripennis</i>	Dose maximale : $3,2 \times 10^9$ UFC/mL (60 000 ppm)	CL ₅₀ ~ 24 739 ppm

^a Études réalisées avec la matière active de qualité technique (Mendelsohn et Vaituzis, 1999; USEPA, 2006; USEPA, 2010; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007b).

Tableau A-46. Résultats des essais de pathogénicité, de toxicité et du pouvoir d'irritation de la souche MBI 600 de *B. subtilis*^a

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
Toxicité aiguë par voie orale et infectivité	Rats CD	$2,0 \times 10^8$ spores	Faible toxicité, non infectant DL ₅₀ > 2×10^8 UFC
Toxicité aiguë par voie pulmonaire et infectivité	Rats CD	de $3,3 \times 10^8$ à $3,7 \times 10^8$ spores	Toxique, non infectant DL ₅₀ > $3,5 \times 10^8$ UFC
Infectivité par voie intraveineuse	Rats CD	10^7 spores	Aucun signe important de toxicité
Toxicité dermale aiguë	Lapins blancs néo-zélandais	2 mL/kg poids corporel	Faible toxicité (léger œdème) DL ₅₀ > 2 mL/kg poids corporel
Irritation oculaire	Lapins blancs néo-zélandais	$1,0 \times 10^9$ UFC	Irritation minimale
Irritation cutanée	Lapins blancs néo-zélandais	$2,0 \times 10^{10}$ UCF	Irritation minimale
Toxicité/pathogénicité aiguë aviaire par voie orale	Colin de Virginie [caille] (<i>Colinus virginianus</i>)	Concentré GUS 378 : 4 000 mg/kg p.c. par jour	Faible toxicité, non pathogène
Toxicité/pathogénicité aiguë aviaire par voie orale	Colin de Virginie [caille] (<i>Colinus virginianus</i>)	Métabolites hydrosolubles : 240 mg/kg p.c. par	Faible toxicité, non pathogène

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
		jour	
Toxicité/pathogénicité aiguë aviaire par voie orale	Colin de Virginie [caille] (<i>Colinus virginianus</i>)	Spoires lavées : 3 680 mg/kg p.c. par jour	Faible toxicité, non pathogène
Toxicité et pathogénicité des plantes	Graines de soja	de 10^5 à 10^7 spores/graines viables	Non pathogène
Toxicité et infectivité des poissons d'eau douce	Carpe	$2,0 \times 10^6$ UFC/mL, $2,0 \times 10^7$ UFC/mL, $2,0 \times 10^8$ UFC/mL	Aucune toxicité ou pathogénicité liée au traitement

^a Études effectuées avec la matière active de qualité technique et non la préparation commerciale contenant le micro-organisme (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada, 2007a)

Tableau A-47. Résultats des essais de pathogénicité et de toxicité des souches ATCC 6051A et ATCC 55405 de *B. subtilis*^a

Genre d'étude	Organisme cible	Concentration par dose	Résultat
Essais de pathogénicité/toxicité	Fétuque rouge (<i>Festuca rubra</i>)	10^5 UFC/g de sol (poids sec)	Longueur des pousses fortement touchée ($p = 0,03$) ^b
Essais de pathogénicité/toxicité	Collemboule (<i>Folsomia candida</i>)	10^3 UFC ^c /g de sol (poids sec); 10^4 UFC ^d /g de sol (poids sec)	• Réduction importante ($p < 0,01$) dans la production de juvéniles^c • Aucune production de juvénile (il n'a pas été possible d'effectuer d'analyse statistique)^d • La survie des adultes n'a pas été touchée par l'une ou l'autre des souches
Essais de pathogénicité/toxicité	Ver de terre (<i>Eisenia andrei</i>)	10^5 UFC ^c /g de sol (poids sec); 10^4 UFC ^d /g de sol (poids sec)	Aucun effet nocif n'a été déclaré

^a Données produites par la Division des méthodes biologiques d'Environnement Canada

^b La survie, la croissance et la reproduction des organismes d'essai ont été fortement inhibées dans l'échantillon de sol recueilli sur le terrain par rapport au sol artificiel

^c *B. subtilis* ATCC 55405

^d *B. subtilis* ATCC 6051A

Annexe 12. Essai de virulence et de pathogénicité des souches de *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la LIS

Données sur l'exposition de la souris générées par la Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs de Santé Canada. Les souris BALB/c femelles ont été exposées à 10^6 UFC/25 µL de bactéries (cellules végétatives ou spores) par nébulisation endotrachéale pour l'exposition par voie pulmonaire. Les animaux ont été autopsiés après 24 heures et après une semaine pour l'exposition aux cellules végétatives et aux spores, respectivement.

Clairance suivant l'exposition endotrachéale

Tableau A-48. Dénombrement des cellules végétatives (UFC/mg) des souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la Liste intérieure après une exposition endotrachéale

Souche ^a	Poumon	Trachée	Œsophage
<i>B. amyloliquefaciens</i> 13563-0	468,5	124,1	16,1
<i>B. atrophaeus</i> 18250-7	270,7	96,6	45,0
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	323,1	31,4	14,6
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406	228,4	1,5	4,8
Espèce <i>Bacillus</i> 16970-5	249,2	17,6	30,2
Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	235,0	51,8	17,8
Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	310,7	47,3	44,3

^a Aucune donnée disponible pour les souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051¹ de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et l'espèce *Bacillus* 7 18129-3

Figure A-1. Dénombrement des cellules végétatives (UFC/mg) des souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la Liste intérieure après une exposition endotrachéale

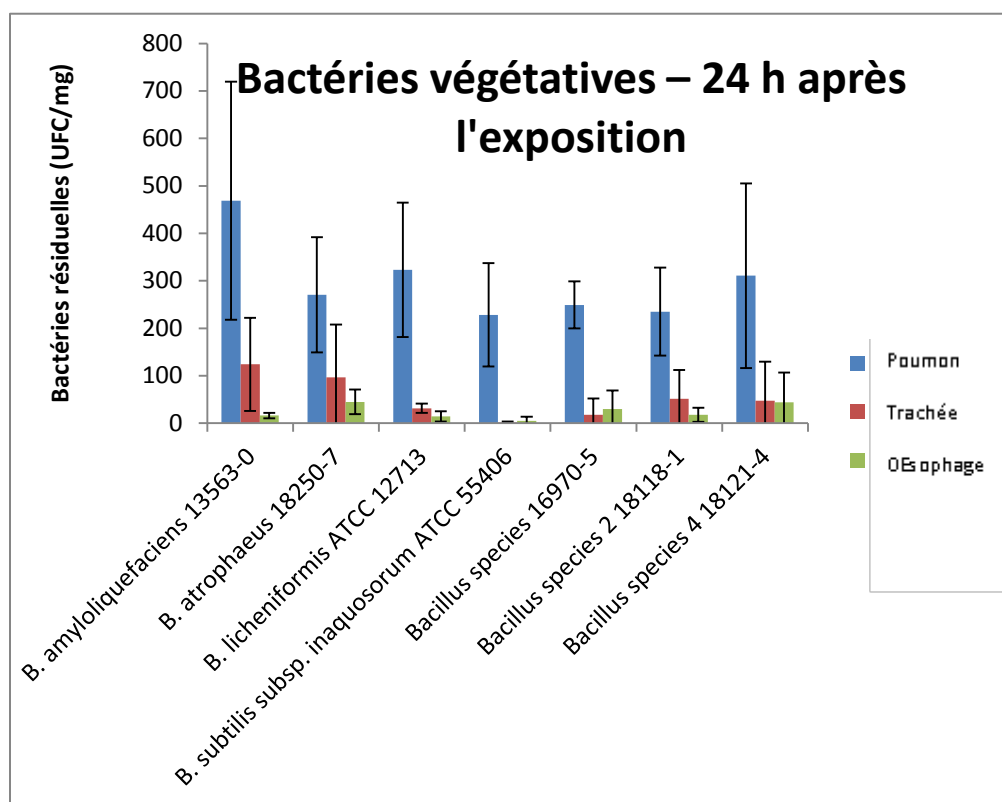
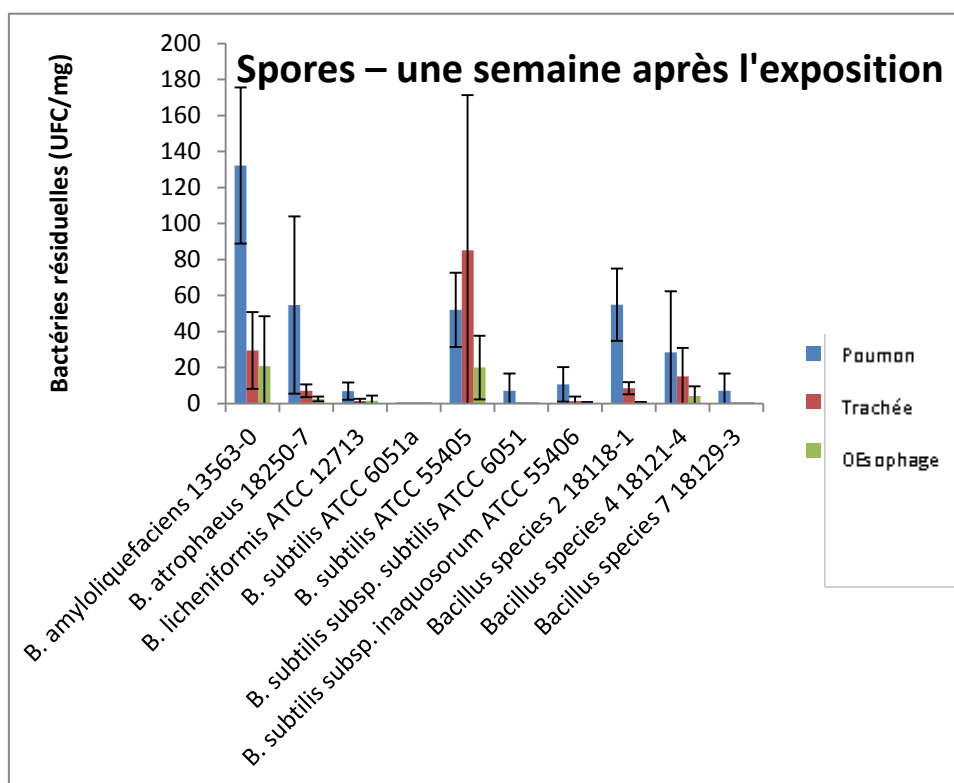


Tableau A-49. Dénombrement des spores (UFC/mg) des souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la Liste intérieure après une exposition endotrachéale

Souche ^a	Poumon	Trachée	Œsophage
<i>B. amyloliquefaciens</i> 13563-0	132,2	29,5	20,7
<i>B. atrophaeus</i> 18250-7	54,7	7,0	2,6
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	6,9	1,3	1,6
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051A	0,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i> ATCC 55405	52,1	85,1	20
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>subtilis</i> ATCC 6051 [†]	7,0	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406	10,6	1,4	0,3
Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	54,8	8,5	0,4
Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	28,4	15,0	4,1
Espèce <i>Bacillus</i> 7 18129-3	7,0	0,0	0,0

^a Aucune donnée disponible pour l'espèce *Bacillus* 16970-5

Figure A-2. Dénombrement des spores (UFC/mg) des souches du groupe *B. licheniformis/subtilis* inscrites à la *Liste intérieure* après une exposition endotrachéale



Cytokines pulmonaires

Tableau A-50. Expression des cytokines pulmonaires (pg/mL) après l'exposition à des cellules végétatives

Souche inscrite à la LIS ^a	IL-1 bêta	IL-6	MCP-1	IL-12 (p70)	KC	TNF-alpha
Témoin (solution saline)	73,58 ± 13,26	2,02 ± 0,61	1 501,94 ± 288,19	18,07 ± 2,26	7,32 ± 1,16	728,57 ± 107,77
<i>B. amyloliquefaciens</i> 13563-0	141,39 ± 60,31	1,46 ± 1,11	1 597,70 ± 177,87	13,05 ± 5,77	62,46 ± 16,28	575,77 ± 58,43
<i>Bacillus atrophaeus</i> 18250-7	1 619,34 ± 564,47	4,20 ± 0,73	4 446,72 ± 1 536,15	16,49 ± 9,96	452,83 ± 160,76	718,82 ± 135,08
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	1 818,28 ± 573,73	5,80 ± 1,94	6 032,81 ± 2 094,65	19,08 ± 7,44	387,79 ± 146,88	705,84 ± 228,92
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406	262,22 ± 44,63	1,10 ± 0,49	1 624,45 ± 242,78	12,23 ± 4,65	34,61 ± 19,19	591,58 ± 87,85
Espèce <i>Bacillus</i> 16970-5	101,13 ± 5,94	1,10 ± 0,53	1 651,50 ± 319,11	16,38 ± 5,78	26,29 ± 18,31	667,01 ± 133,49
Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	1 444,876 ± 778,68	4,53 ± 2,24	5 554,10 ± 2 162,64	13,95 ± 2,00	660,90 ± 74,56	647,20 ± 205,74
Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	7 545,602 ± 1 988,01	53,43 ± 21,70	20 278,06 ± 7 401,54	24,40 ± 7,21	2 082,50 ± 501,70	983,90 ± 172,32

^a Aucune donnée disponible pour les souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051[†] de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et l'espèce *Bacillus* 7 18129-3

Tableau A-51. Expression des cytokines pulmonaires (pg/mL) après l'exposition à des spores

Souche inscrite à la LIS ^a	IL-bêta	IL-6	MCP-1	IL-12 (p70)	KC	TNF-alpha
Témoin (solution saline)	90,86 ± 13,65	2,29 ± 1,27	837,12 ± 147,20	12,62 ± 8,05	9,13 ± 2,46	484,79 ± 160,58
<i>B. amyloliquefaciens</i> 13563-0	98,07 ± 11,21	2,87 ± 1,75	921,78 ± 187,96	9,82 ± 7,62	11,89 ± 4,39	476,05 ± 167,15
<i>Bacillus atrophaeus</i> 18250-7	120,36 ± 52,91	2,53 ± 1,60	750,55 ± 146,43	14,23 ± 8,82	9,48 ± 2,70	521,90 ± 110,22
Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	104,37 ± 9,54	2,13 ± 1,78	843,20 ± 101,71	13,86 ± 6,73	10,0 ± 3,74	526,06 ± 115,86
Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	90,31 ± 19,54	3,06 ± 1,47	884,30 ± 105,05	17,10 ± 6,72	7,17 ± 0,74	374,76 ± 91,07

^a Aucune donnée disponible sur les souches ATCC 12713 de *B. licheniformis*, ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 55406 de *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum*, l'espèce *Bacillus* 16970-5 et l'espèce *Bacillus* 7 18129-3

Réponse en phase aiguë

Tableau A-52. Concentration d'amyloïde A^a (µg/mL) dans les échantillons de sérum obtenus de souris BALC/c traitées avec des cellules végétatives ou des spores des souches inscrites à la *Liste intérieure*

Souche ^b	Cellules végétatives	Spores
Témoin (solution saline)	13,80 ± 3,52	14,08 ± 0,63
<i>B. amyloliquefaciens</i> 13563-0	17,87 ± 2,73	16,60 ± 2,09
<i>Bacillus atrophaeus</i> 18250-7	20,73 ± 1,21	21,56 ± 14,0
<i>B. licheniformis</i> ATCC 12713	39,54 ± 28,54	Aucune donnée
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i> ATCC 55406	17,76 ± 4,34	Aucune donnée
Espèce <i>Bacillus</i> 16970-5	13,72 ± 2,66	13,88 ± 3,10
Espèce <i>Bacillus</i> 2 18118-1	23,35 ± 3,29	16,04 ± 2,38
Espèce <i>Bacillus</i> 4 18121-4	17,68 ± 7,89	Aucune donnée

^a L'amyloïde A sérique, qui est un indicateur des effets systémiques, a été mesurée par analyse immuno-enzymatique

^b Aucune donnée disponible pour les souches ATCC 6051A de *B. subtilis*, ATCC 55405 de *B. subtilis*, ATCC 6051^T de *B. subtilis* sous-espèce *subtilis* et l'espèce *Bacillus* 7 18129-3

Figure A-3. Concentration d'amyloïde A (µg/mL) dans les échantillons de sérum obtenus de souris BALC/c traitées avec des cellules végétatives ou des spores des souches inscrites à la *Liste intérieure*

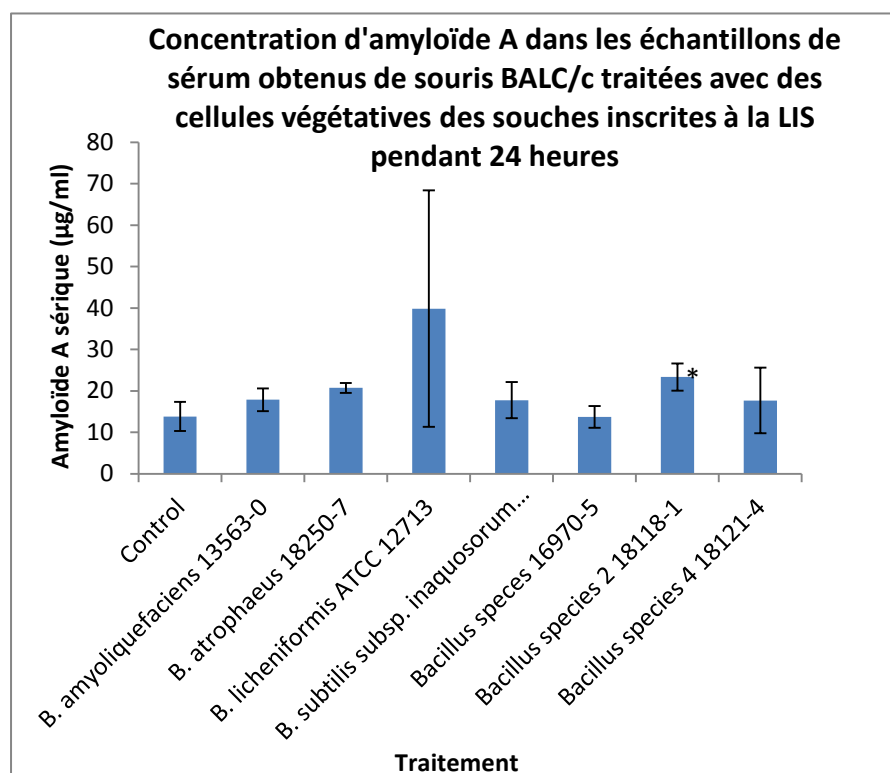
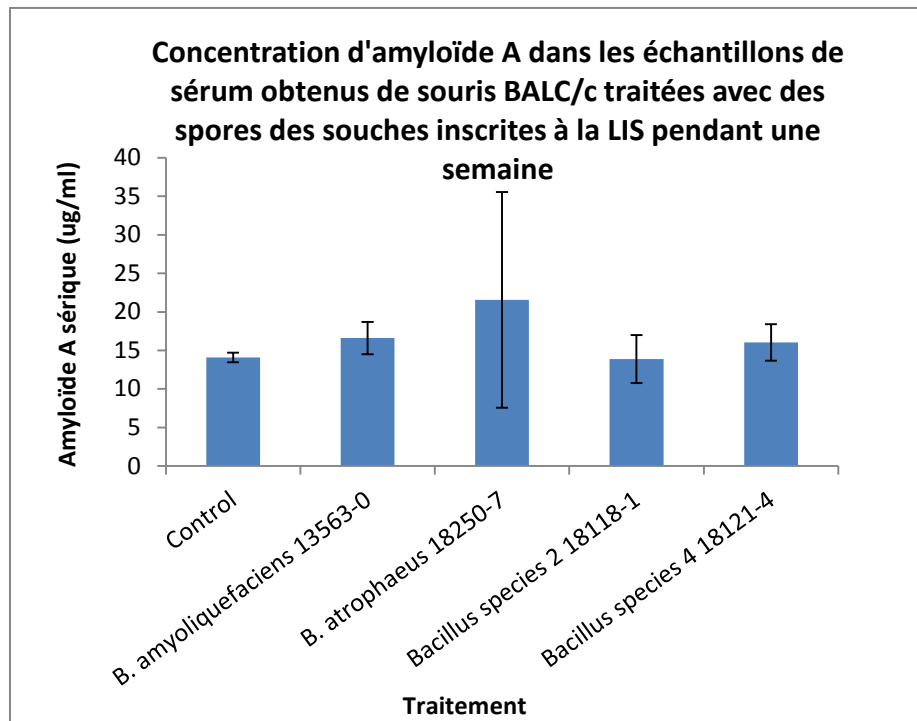


Figure A-4. Concentration d'amyloïde A ($\mu\text{g/mL}$) dans les échantillons de sérum obtenus de souris BALC/c traitées avec des spores des souches inscrites à la LIS



Annexe 13. Éclosions d'intoxications alimentaires

Tableau A-53. Éclosions d'intoxications impliquant *B. licheniformis*

Lieu	Année	Nombre de cas ^a	Symptômes	Cause	Mort
Veterans Administration Hospital, Denver, CO ^b	1959	161	Gastroentérite (crampes abdominales, diarrhée et vomissement)	Viande de dinde cuite qui a été maintenue à la température de la pièce pendant la nuit	1
Australie ^c	1976	49	Douleur abdominale, diarrhée et vomissement	Repas livrés à domicile co-contaminés avec les espèces <i>Clostridium perfringens</i> et <i>B. cereus</i>	1
Prison dans l'Ohio, États-Unis ^d	1995	165	Aucune donnée	De la dinde et de la sauce étaient mises en cause	Aucune donnée
Maternelle à Split, Croatie ^e	2000	12	Nausées, maux de tête et vomissements	Poudre de lait contaminé qui a été préparé deux heures avant la consommation et qui n'a pas été bouilli Co-contamination avec l'espèce <i>B. subtilis</i>	0

^a Le terme « cas » renvoie à une personne souffrant d'intoxication alimentaire

^b (Tong *et al.*, 1962), bien que les auteurs définissent l'espèce *B. subtilis* comme étant l'agent causal, l'intoxication alimentaire a été probablement causée par l'espèce *B. licheniformis*, étant donné que l'apparition et les symptômes concordent mieux avec la description formulée par Lund (1990); par ailleurs, les résultats des essais biochimiques semblent être proches de ceux obtenus avec l'espèce *B. licheniformis* (p. ex. croissance dans le sel et croissance anaérobie).

^c (Jephcott *et al.*, 1977)

^d (CDC, 1995)

^e (Pavić *et al.*, 2005), la contamination des aliments par les toxines des espèces *B. licheniformis* et *B. subtilis* a été confirmée par un essai de vacuolisation et un essai de culture cellulaire MTT.