

**Résumé de l'évaluation des risques effectuée conformément au
Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles
(organismes) [RRSN(O)] de la Loi canadienne sur la protection de
l'environnement (1999)**

**DSN 15050 : KB-1[®], consortium de déchloration anaérobie renfermant
des *Dehalococcoides* spp.**

Le présent document vise à expliquer la décision réglementaire prise en vertu de la partie 6 de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)* [LCPE (1999)] et de son *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)* [RRSN(O)] concernant la fabrication de KB-1[®], consortium de déchloration anaérobie renfermant des *Dehalococcoides* spp. (ci-après appelé KB-1[®]) par SiREM, une division de Geosyntec Consultants (Geosyntec), en vue de son introduction sur le territoire canadien.

Les renseignements pertinents concernant KB-1[®] ont été fournis conformément au paragraphe 3(1) du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)* de la LCPE (1999). Bien qu'il contienne une population mixte de micro-organismes, KB-1[®] est un consortium naturellement présent dans l'environnement; il satisfait donc aux critères d'évaluation à titre de substance aux termes de l'article 3 de la LCPE (1999).

Environnement Canada et Santé Canada ont effectué une évaluation des risques en se fondant sur les renseignements présentés par SiREM, ainsi que sur d'autres données scientifiques, pour déterminer si KB-1[®] satisfait aux critères énoncés à l'article 64 de la LCPE (1999)¹.

Décision réglementaire

En tenant compte des questions de danger et d'exposition et d'après l'évaluation des risques, Environnement Canada et Santé Canada ont conclu que l'utilisation proposée de KB-1[®] ne présente aucun danger pour l'environnement ni pour la santé humaine au Canada au sens de l'article 64 de la LCPE (1999). Toutefois, un avis de nouvelle activité (NAc n° 15050) a été recommandé en raison des effets environnementaux que l'organisme déclaré pourrait provoquer à la suite d'activités non visées par la présente évaluation. Le présent avis de NAc énonce les exigences en matière de renseignements pour ces activités. L'Avis de NAc a été publié dans la [*Gazette du Canada, Partie I : vol. 142, n° 28*](#) le 12 juillet 2008. Toute activité non mentionnée dans l'avis est permise après le 18 avril 2008.

¹ Selon l'article 64 de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)* [LCPE (1999)], est toxique toute substance qui pénètre ou peut pénétrer dans l'environnement en une quantité ou concentration ou dans des conditions de nature à : a) avoir, immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou sur la diversité biologique; b) mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie; c) constituer un danger au Canada pour la vie ou la santé humaines.

La présente évaluation ne comprend pas d'évaluation des risques pour la santé humaine dans un milieu de travail.

Annexe du RRSN(O) :	1 (fabrication de micro-organismes destinés à être introduits sur le territoire canadien).
Identification de l'organisme :	KB-1, consortium de déchloration anaérobie renfermant des <i>Dehalococcoides</i> spp.
Déclarant :	SiREM (division de Geosyntec Consultants), 130 Research Lane, Suite 2, Guelph, ON N1G 5G3
Date de la décision :	18 avril 2008
Utilisation proposée :	Biorestauration des eaux souterraines contaminées par des solvants organiques chlorés.

IDENTITÉ/HISTORIQUE DE LA SOUCHE

KB-1[®] a été isolé à partir d'échantillons de sol et d'eau prélevés sur un site contaminé par le trichloréthylène (TCE) dans l'écozone des Plaines à forêts mixtes du sud de l'Ontario. KB-1[®] a été enrichi en concentrations croissantes de TCE dans des milieux définis contenant des sels minéraux, ainsi que des nutriments contenant des donneurs d'électrons (mélange d'acétate, de méthanol et de lactate), à la température ambiante dans des conditions anaérobies. Après un an d'enrichissement, le consortium KB-1[®] était capable de se développer à des concentrations élevées de TCE (400 µg/L) (Duhamel et al., 2002).

Les micro-organismes présents dans KB-1[®], qui sont principalement anaérobies, dépendent de donneurs d'électrons fermentescibles et de composés chlorés pour leur croissance et tolèrent les températures fraîches à modérées. Le déclarant a identifié ces composants par clonage et séquençage du gène de l'ARNr 16S, ce qui a permis de détecter des unités taxonomiques opérationnelles (UTO²) et de les attribuer à des genres ou à des familles spécifiques à l'aide de techniques bioinformatiques standard. Le déclarant a identifié 45 UTO différentes appartenant aux genres et familles suivants de *Bacteria* (en ordre de prévalence): *Dehalococcoides*, *Geobacter*, Spirochaetaceae, *Pelobacter*, *Aminomonas*, Bacteroidetes, *Cryptanaerobacter*, *Acetivibrio*, *Anaerolinea*, *Chlorobi*, *Desulfovibrio*, *Aminobacterium*, *Syntrophus*, Clostridiales, *Syntrophomonas*, *Dehalobacter*, *Sporomusa*, *Syntrophobacter*, *Acetobacterium*, division OP5, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Sulfurospirillum*; et d'*Archaea* : *Methanomethylovorans*, Methanomicrobiales, *Methanosarcina* et *Methanosaeta*. Il n'a pas été possible d'identifier toutes les UTO observées dans le consortium, étant donné la disponibilité limitée des isolats environnementaux des bases de données publiques qui pourraient correspondre aux composants du consortium; de plus, les composants présents en faibles concentrations peuvent ne pas être détectés et, par conséquent, rester non identifiés. Cependant, le déclarant a été en mesure d'identifier les composants responsables de la déchloration du TCE, notamment *Dehalococcoides* (50-73 %), *Methanomethylovorans* (4-20 %) et *Geobacter* (4-12 %).

² Une UTO s'entend généralement d'un ensemble de données considéré comme représentatif d'un taxon valide pour les besoins d'une analyse phylogénétique.

La stabilité du consortium a été évaluée par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) et par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) pour mettre en évidence les changements importants pouvant influencer sur la sûreté ou sur le fonctionnement du consortium. La DGGE, utilisée pour évaluer la stabilité fondamentale du consortium, a montré que la composition du consortium était restée stable au fil du temps, à la suite de plusieurs transferts entre lots et entre échantillons. Ces données ont été complétées par les résultats d'analyses qPCR ciblées visant à quantifier les populations de micro-organismes responsables du bon fonctionnement du consortium et à comparer leurs proportions relatives dans différents échantillons. Les analyses ont indiqué que, malgré la présence d'une certaine variabilité d'un échantillon à l'autre, les UTO prédominantes étaient relativement constantes. De légers changements sont à prévoir, étant donné la complexité inhérente à un consortium se développant dans un système de lots. Des méthodes de production rigoureuses et des procédures d'assurance de la qualité et de contrôle de la qualité (AQ/CQ) ont été mises en place pour prévenir l'introduction et la perte de micro-organismes, qui pourraient affecter le fonctionnement et la sûreté de KB-1[®].

Antécédents d'utilisation

Depuis plus d'une décennie, KB-1[®] a été utilisé sans incident dans des centres de recherche universitaires et industriels au Canada et à l'étranger. Des antécédents d'utilisation sans danger de KB-1[®] sur le terrain ont été établis aux États-Unis et en Europe (Royaume-Uni, Danemark, Suède). Le déclarant a cité plusieurs projets à l'appui des antécédents d'utilisation sans danger de KB-1[®]. Ces projets comprenaient notamment l'utilisation de KB-1[®] dans des puits municipaux contaminés par le perchloréthylène (PCE) et par le TCE à Abilene, au Kansas; à la base des Forces aériennes Kelly, au Texas (Major et al., 2002); au complexe de lancement 34, en Floride (Battelle, 2004); et dans un ancien complexe aérospatial, en Californie (Barros et al., 2007).

EXAMEN DES DANGERS

Caractérisation des dangers pour l'environnement

L'analyse des données dérivées des méthodes moléculaires employées pour l'identification (c.-à-d. clonage et séquençage du gène de l'ARNr 16S) des composants de KB-1[®] indique qu'aucune des UTO récupérées dans KB-1[®] n'est étroitement apparentée à un pathogène environnemental connu. De plus, les tests de détection des pathogènes menés sur des eaux souterraines et sur des effluents traités par KB-1[®] se sont avérés négatifs, ce qui porte à croire que l'introduction de KB-1[®] n'entraîne pas la prolifération de pathogènes connus (Lesage et al., 2006). Les analyses par DGGE ont servi à évaluer l'incidence de KB-1[®] sur la microflore indigène. Ces études montrent que l'introduction de KB-1[®] dans un site contaminé n'a pas d'incidence défavorable sur les communautés microbiennes indigènes; les perturbations des communautés microbiennes indigènes se sont limitées à la zone d'application (Toquai-Diaz, 2006), qui était déjà vraisemblablement affectée par les polluants chlorés présents. De façon générale, les avantages du rétablissement de la qualité des eaux souterraines par l'ajout de KB-1[®]

l'emportent sur les faibles répercussions sur la structure des communautés microbiennes indigènes.

Les essais écotoxicologiques réalisés sur des effluents traités par KB-1[®] indiquent que le consortium KB-1[®] n'a pas d'effets écologiques. Rien dans les données des tests menés sur des espèces aquatiques et terrestres ne porte à croire que l'introduction de KB-1[®] dans un aquifère contaminé par le TCE puisse avoir des effets indésirables (Lesage et al., 2006; McDaniel et al., 2007). Cependant, le déclarant n'a pas fourni de données sur les invertébrés aquatiques ni sur les vertébrés terrestres.

Bien que les données concernant la séquence de l'ARNr 16S indiquent que le consortium pourrait contenir des accumulateurs de métaux et des micro-organismes dégradant les pesticides (les UTO définis comme *Bacillus* et *Pseudomonas* étaient étroitement apparentés aux espèces accumulatrices de métaux), ces micro-organismes sont naturellement présents dans l'environnement canadien et ils ne devraient pas présenter d'autres dangers.

Caractérisation des dangers pour la santé humaine

Les principaux composants de KB-1[®] (*Delhalococcoides*, *Methanomethylovorans* et *Geobacter*) ont un faible potentiel de virulence, ils ne sont pas étroitement apparentés aux pathogènes connus pour l'humain et, à ce jour, rien ne montre qu'ils interviennent dans les infections chez l'humain.

Il a été établi que quelques-uns des composants secondaires du consortium, à savoir : spirochètes, Bacteroidetes, Clostridiales, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Cellulomonas*, appartiennent au même genre ou à la même famille que des pathogènes humains connus. Les analyses phylogénétiques de ces UTO portent à croire que ces isolats sont différents de leurs pathogènes proches et qu'ils sont davantage apparentés à des isolats non pathogènes provenant de l'environnement. De plus, des tests de détection sont effectués tous les 6 mois sur KB-1[®] pour vérifier l'absence des pathogènes suivants dans le consortium : coliformes totaux, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, streptocoques fécaux, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Cryptosporidium parvum*, *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* et *Bacillus anthracis*, ainsi que des levures et des moisissures telles que *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont révélé que KB-1[®] est sensible à plusieurs antibiotiques, dont l'érythromycine, la céfopérazone, la tétracycline et l'ofloxacine, malgré que son principal composant (*Delhalococcoides*) soit résistant à l'ampicilline (Ritalahti et Löffler, 2004). Des traitements sont disponibles dans l'éventualité peu probable où KB-1[®] entraînerait une infection chez l'humain.

Aucun cas de réaction allergique ni immunologique indésirable n'a été signalé à la suite de l'exposition à KB-1[®] ou à ses principaux composants.

EXAMEN DES ASPECTS LIÉS À L'EXPOSITION

Caractérisation de l'exposition environnementale et humaine

KB-1[®] sera fabriqué par SiREM à Guelph, en Ontario. On estime que la production sera de 5 000 L (environ 7×10^{15} micro-organismes) la première année, de 10 000 L la deuxième année et de 20 000 L la troisième année. Le déclarant a présenté une description des procédures d'entreposage, de manutention, de fabrication et d'élimination destinées à limiter l'exposition humaine et environnementale durant la fabrication et l'application du consortium ainsi que des méthodes pour surveiller le consortium dans l'environnement au besoin.

KB-1[®] est formulé pour être appliqué directement à des profondeurs de 1,5 à 60 m sous la surface aux fins de biorestauration des sols, des aquifères et des eaux souterraines contaminés par des éthènes chlorés dans des habitats très semblables à son habitat original. De nombreux composants de KB-1[®] ont une vaste répartition naturelle au Canada. Il est donc raisonnable de s'attendre à ce que KB-1[®] puisse survivre dans un environnement réceptif.

Le consortium KB-1[®] persiste après avoir été injecté dans un aquifère anaérobie, tel qu'indiqué par la reprise de la déchloration réductive suivant des périodes de famine allant de plusieurs mois à une année (Toquia-Diaz, 2006). Cela suggère que les composants de KB-1[®] peuvent subsister en faibles quantités après la biorestauration; toutefois, leur croissance active est limitée par la disponibilité des métabolites essentiels (c.-à-d. composés chlorés et ajout de donneurs d'électrons) (Lesage et al., 2006), ce qui est en accord avec les travaux antérieurs portant sur *Dehalococcoides* (Cupples et al., 2004). Certains composants, plus spécifiquement des membres des genres *Bacillus* et *Clostridium*, peuvent former des spores résistantes aux conditions environnementales. Cette formation de spores peut se produire dans des conditions sous-optimales telles que des températures extrêmes, des modifications du pH et un manque de nutriments. Les spores, qui sont résistantes, ne nécessitent pas de nutriments pour persister pendant de longues périodes.

Les souches déchlorantes peuvent coloniser des zones en dehors du site d'injection initial, mais il existe peu de preuves en faveur d'une motilité indépendante; les composants du KB-1[®] semblent se disperser par colonisation et advection de l'eau souterraine. Les analyses moléculaires des échantillons prélevés dans des puits de surveillance ont établi la vitesse de transport typique de KB-1[®] à environ 6 cm par jour (Major et al., 2002). Les eaux souterraines anaérobies saturées existent seulement à plus de 1,5 m de profondeur, et bien qu'elles puissent être transportées dans les sources d'approvisionnement en eau potable, dans le sol et dans les eaux de surface à proximité du site d'application, le potentiel d'exposition au consortium dans ces milieux est limité par la nature anaérobie et par les besoins nutritionnels des composants du consortium.

Les organismes susceptibles d'être exposés au consortium KB-1[®] sont des micro-organismes naturellement présents dans les aquifères anaérobies contaminés (Bacteria, Archaea et Fungi). Compte tenu de la méthode d'application, de la nature

anaérobie des principaux composants et des besoins nutritionnels particuliers de ceux-ci, le potentiel d'exposition humaine est relativement faible. Il est peu probable que la population générale soit exposée à KB-1[®]. Il est possible que la faune et la flore canadiennes soient exposées à KB-1[®] si des eaux souterraines traitées pénétraient dans le sol et dans les eaux de surface à proximité du site d'application, mais tel que mentionné précédemment, la survie du consortium dans ces milieux serait en grande partie limitée par ses besoins en facteurs de croissance.

À la lumière des données disponibles, l'exposition de l'humain et des espèces environnementales à KB-1[®] est limitée en raison des besoins des principaux composants en facteurs de croissance et en nutriments. Il est peu probable que les eaux de surface des lacs, des ruisseaux et des rivières, les eaux d'irrigation et l'eau potable, qui sont principalement aérobies, contiennent des nutriments et des solvants chlorés en quantités suffisantes pour entraîner le maintien ou l'augmentation des concentrations des principaux composants de KB-1[®].

CARACTÉRISATION DES RISQUES

En tenant compte des questions de danger et d'exposition et d'après l'évaluation des risques, Environnement Canada et Santé Canada ont conclu que KB-1[®] n'est pas toxique pour l'environnement ni pour la santé humaine au Canada au sens de l'article 64 de la LCPE (1999).

Les organismes les plus susceptibles d'être exposés au consortium KB-1[®] sont les micro-organismes naturellement présents dans des aquifères anaérobies contaminés (Bacteria, Archaea et Fungi). Comme les habitats dans les sites d'injection proposés sont très semblables à l'habitat duquel le consortium a été initialement isolé, il est raisonnable de supposer qu'un grand nombre des composants de KB-1[®] et des organismes apparentés sont déjà indigènes au site d'application et que la perturbation de l'environnement réceptif sera minime. Les principaux composants du consortium KB-1[®] ne sont pas considérés comme pathogènes, et ils ne sont pas apparentés à des pathogènes humains ou environnementaux connus. De plus, les tests menés sur des espèces aquatiques et terrestres n'ont fait ressortir aucun effet néfaste lié au consortium KB-1[®]. Par ailleurs, on s'attend à ce que les principaux composants de KB-1[®] se limitent aux milieux anaérobies où se trouvent des composés chlorés et des donneurs d'électrons spécifiques. Ces caractéristiques limitent les risques de KB-1[®] pour l'humain ainsi que pour la faune et la flore canadienne.

Cependant, étant donné que les composants de KB-1[®] n'ont probablement pas tous été identifiés et qu'aucun essai d'écotoxicologie n'a été présenté concernant les invertébrés aquatiques et les vertébrés terrestres, il reste des incertitudes entourant les dangers que pose KB-1[®] pour les espèces environnementales. Un avis de nouvelle activité (NAc) a donc été proposé afin qu'une déclaration soit nécessaire avant toute utilisation de KB-1[®] autre que son injection dans des eaux souterraines contaminées.

RÉFÉRENCES

- Barros, N., C. Repta, D. W. Major, and M. McMaster. 2007. Successful Application of Emulsified Vegetable Oil and Bioaugmentation Culture to Treat Trichloroethene. Proceedings of the Ninth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. Baltimore, Maryland, May 7-10, 2007.
- Battelle. 2004. Demonstration of Biodegradation of Dense, Nonaqueous-Phase Liquids (DNAPL) through Biostimulation and Bioaugmentation at Launch Complex 34 in Cape Canaveral Air Force Station, Florida. Final Innovative Technology Evaluation Report. Prepared for U.S. Environmental Protection Agency, National Risk Management Research Laboratory, Superfund Innovative Technology Evaluation Program.
- Cupples, A. M., A. M. Spormann, and P. L. McCarty. 2004. Vinyl chloride and cis-dichloroethene dechlorination kinetics and microorganism growth under substrate limiting conditions. *Environ. Sci. Technol.* 38:1102-1107.
- Duhamel, M., S. D. Wehr, L. Yu, H. Rizvi, D. Seepersad, S. Dworatzek, E. E. Cox, and E. A. Edwards. 2002. Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride. *Water Res.* 36:4193-4202.
- Friis, A. K., A. C. Heimann, R. Jakobsen, H. J. Albrechtsen, E. Cox, and P. L. Bjerg. 2007. Temperature dependence of anaerobic TCE-dechlorination in a highly enriched Dehalococcoides-containing culture. *Water Res.* 41:355-364
- Lesage, S., N. Ross, and C. Ptacek. 2006. EC4.2 Biosafety of Bioremediation in an Aquifer Contaminated with Chlorinated Solvents. CRSB / EMBRR Research Project / Annual Report. Burlington, ON: Environment Canada.
- Major, D. W., M. L. McMaster, E. E. Cox, E. A. Edwards, S. M. Dworatzek, E. Henderickson, M. G. Starr, J. A. Payne, and L. W. Buonamici. 2002. Field Demonstration of Successful Bioaugmentation to achieve Dechlorination of Tetrachloroethene to Ethene. *Environmental Science and Technology.* 36:5106-5116.
- McDaniel, T. V., N. Ross, P. A. Martin, H. Steer, A. M. I. Abbey, and S. Lesage. 2007. Bioremediation of Tetrachloroethylene-Contaminated Groundwater in a Model Aquifer: Effects on Green Frogs (*Rana clamitans*) and *Xenopus laevis* as Potential Wetland Receptors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52:410-417.
- Ritalati, K. M., and F. E. Löffler. 2004. Populations Implicated in Anaerobic Reductive Dechlorination of 1,2-dichloropropane in Highly Enriched Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology.* 70(7):4088-4095.

Toquica-Diaz, S. P. 2006. Distribution of Bacteria in a PCE-Contaminated Pilot Aquifer During Bioremediation Dissertation/Thesis. University of Toronto.